

9811 キャピラリー電気泳動法による海水・濃厚塩溶液中の微量イオン性物質の
溶存状態解明と分離・定量に関する研究

助成研究者：本水 昌二 (岡山大学 理学部)

共同研究者：大島 光子 (岡山大学 理学部)

高柳 俊夫 (岡山大学 理学部)

海水や高塩濃度溶液中の微量化学種の分析では、多量に存在する塩成分 (Na^+ , Cl^- , 及び Mg^{2+} , Ca^{2+} など) が常に問題となり、これらの影響を十分考慮した分析法でなければならぬ。従来汎用されてきたクロマトグラフ法では高濃度に存在する塩成分の影響が大きく、定量の正確性、再現性に大きな問題があった。キャピラリー電気泳動法 (high performance capillary electrophoresis: HPCE) はイオン移動度の差異を利用して各イオン成分を分離・定量できる。本研究はその分離・検出における優れた機能に着目し、海水・濃厚塩溶液に存在する微量イオン性物質の正確な高感度定量法開発と溶存状態解明を目指して検討を行った。

1. キャピラリー電気泳動法 (HPCE) による陰イオン検出の高感度化

複雑なマトリックス中の微量成分の正確な定量を実現するためには、感度の向上とともにシグナル形状がシャープなものであることが望ましい。キャピラリー電気泳動法を海水等の塩濃度の高い試料に適用する場合、目的成分シグナルのプロード化の問題があった。本研究では、泳動液として緩衝剤とスタッキング向上剤を含む水溶液を用いることで、分析対象イオンをキャピラリー中で直接高倍率濃縮し、ピーク形状、感度を大幅に改善した。更に、比較的大容量の試料溶液の導入、Z型検出セルの併用により、各種陰イオンの sub-ppb レベルの検出限界と分析時間の短縮を同時に達成することができた。

2. 高塩濃度試料中のオキソ酸イオンの定量法開発

本研究で達成した高感度化の手法を、高塩濃度試料中の微量オキソ酸イオンの定量に応用した。実際試料への適用例として、半導体エッチング液中のタングステン酸イオンの定量を行ない、溶液を前処理することなしに 10^{-5} M レベルのタングステン酸イオンの定量を可能とし、溶存種を明らかにした。

3. 海水中の陰イオン性物質の相互分離特性の向上と高感度定量：CM-ID/SC の開発

Br^- , I^- , IO_3^- , NO_3^- , SCN^- , NO_2^- などの海水中の微量陰イオンの分離特性の向上を目的として、対抗泳動 (counter migration) イオン会合誘導体化 (ID) 反応とスタッキング (SC) を効果的に利用する方法 (CM-ID/SC 法) を開発し、微量陰イオン成分の分離性能の向上を図った。検討した各種 CM-ID 試薬の中で K^+ -18C6 錯体が最も効果的であることが分かり、海水の 5~10 倍希釈と 100mM KCl を含む泳動液使用により、ピークの広がりを抑制し、各陰イオンをベースライン分離することに成功した。

9811 キャピラリー電気泳動法による海水・濃厚塩溶液中の微量イオン性物質の 溶存状態解明と分離・定量に関する研究

助成研究者：本水 昌二（岡山大学 理学部）
共同研究者：大島 光子（岡山大学 理学部）
高柳 俊夫（岡山大学 理学部）

1. 研究目的

海水は多種類の元素を多様なイオン、化合物として含んでおり、海洋資源、海底資源、生物資源の宝庫である。また、太陽エネルギーの保管、水蒸気発生による大気エンジン、二酸化炭素の吸収・放出、生物資源の生産など、環境、気候等と密接に関連した重要な役割を担っている。従って、海水中に含まれる多種・多様な化学成分の動態についての知見は海洋科学、海水科学の観点から基本的に必要不可欠なものであり、海洋資源の有効・効果的な利用の観点から、それぞれの成分について溶存状態（スピーシエイション）と存在量の正確な測定法が望まれている。

海水分析では、多量に存在する塩成分（ Na^+ 、 Cl^- 、及び Mg^{2+} 、 Ca^{2+} など）が常に問題となり、これらの影響を十分考慮した分析法でなければならないが、従来の分析方法では高濃度に存在する塩成分の影響が大きく、信頼性及び正確なスピーシエイションに大きな問題があった。そこで本研究では、従来の分析手法・分析方法では不可能あるいは不十分であった海水・濃厚塩溶液に存在する微量のイオン性物質の正確な溶存状態の解明と化学分析法の開発を目的とした。近年その分離・検出における優れた機能が注目されているキャピラリー電気泳動法（high performance capillary electrophoresis: HPCE）に着目し、その特徴と利点を海水・高塩濃度溶液の分析に有効に活用するための基礎的な検討を行った。

本研究の目的達成のために、インキャピラリー濃縮法を開発し検出感度の向上を図り、高塩濃度溶液中のオキソ酸の直接定量法を開発し、実際試料中のタングステン酸イオンの定量に応用した。また、新しい誘導体化試薬の合成、新しい分離・検出モードである対抗泳動イオン会合誘導体化（CM-ID）、および対抗泳動キレート誘導体化（CM-CD）／スタッキング濃縮（SC）／分離検出法による海水中微量イオンの定量法を開発を行った。以下には、特に陰イオン性物質に関して得られた結果を中心に述べる。

2. 研究方法

2.1 キャピラリー電気泳動法（HPCE）による陰イオン検出の高感度化

従来、イオン分析法としてイオンクロマトグラフ法が用いられていたが、この方法はカラム固定相への保持力の差異に基づいて各成分を分離している。一方、キャピラリー電気

泳動法はクロマトグラフ法と異なり、イオン移動度の差異を利用して各イオン成分を分離するので、海水の新しい分析法としての大きな可能性を秘めているが、塩濃度の高い試料や泳動液成分と極端に異なる移動度を有する分析対象物質の場合には、目的成分シグナルのブロード化の問題があった。また、検出器の有効光路長が短いために濃度感度の点で液体クロマトグラフィーなどに比較して劣るものと考えられていた。

複雑なマトリックス中の微量成分の正確な定量を実現するためには、感度の向上とともにシグナル形状がシャープなものであることが望ましい。このために、キャピラリー中で試料イオンをスタッキング効果により直接高倍率濃縮する手法を検討し、高感度化の研究を進めた。

2. 2 高塩濃度試料中のオキソ酸イオンの定量法開発

本研究で達成した分離性能の向上と高感度化の手法を、高塩濃度試料中の微量オキソ酸イオンの定量について検討した。実際試料への適用例として、半導体エッチング液中のタングステン酸イオンの定量を検討した。本研究では溶液を前処理することなしに分析することを目的とした。

2. 3 海水中の陰イオン性物質の相互分離特性の向上と高感度定量：CM-ID/SC法の開発

キャピラリー電気泳動法を海水試料中のイオン分析に適用する場合、試料が高塩濃度であることを考慮しなければならない。具体的には、次のようなことに注意しなければならない。①試料溶液が泳動液よりも高い電導度を有するとき、電圧印加開始時に電気泳動拡散が起こり、ピークのブロード化が起こる。②間接吸光検出法では、主成分であるナトリウムイオン、塩化物イオンの幅広いピークにより、分析対象イオンのピークがそのシグナルに隠れてしまう。③総塩濃度の変化により、泳動時間の再現性が悪くなる。④電氣的注入法ではキャピラリーに注入されるイオン量が試料の塩濃度に依存するので、正確な定量値を得られない。

以上のような問題を克服するために、海水試料に適用可能で、かつ、微量陰イオン成分の分離性能を向上する泳動液の開発を目指して検討した。特に、対抗泳動（counter migration）イオン会合誘導体化（ID）反応とスタッキング（SC）を効果的に利用する方法（CM-ID/SC法）を開発し、微量陰イオン成分の分離性能の向上を図った。

3. 研究結果

3. 1 キャピラリー電気泳動法による陰イオン検出の高感度化

キャピラリー電気泳動法はイオン移動度の差異を利用してイオンを分離するが、ピークのブロード化、液体クロマトグラフィーなどと比較した場合の濃度感度が問題とされてい

た. 本研究では, 微量イオン成分定量のために濃度感度の向上を目的として, インキャピラリーでのスタッキングを利用する濃縮法, キャピラリー内への比較的少量の試料溶液の導入による相乗的な濃縮効果, そして, Z型検出セルを用いた高感度化について検討を行った.

高感度化のためにはベースラインノイズの低下が重要なファクターとなるので, 泳動液には光吸収の弱いものを選択し, 分析対象物質の光吸収を利用する直接吸光検出法に着目した. 分析対象とするイオン性物質としてオキソ酸陰イオンおよびハロゲン化物イオンをとりあげた. 通常の泳動液を用いて得られたエレクトロフェログラムを Fig. 1 a) に示す. 紫外部に光吸収を有する各オキソ酸陰イオンは検出されているが, シグナルはフロンティングとブローディングしており, ピークは低い. これを改善するために, 泳動液に各種電

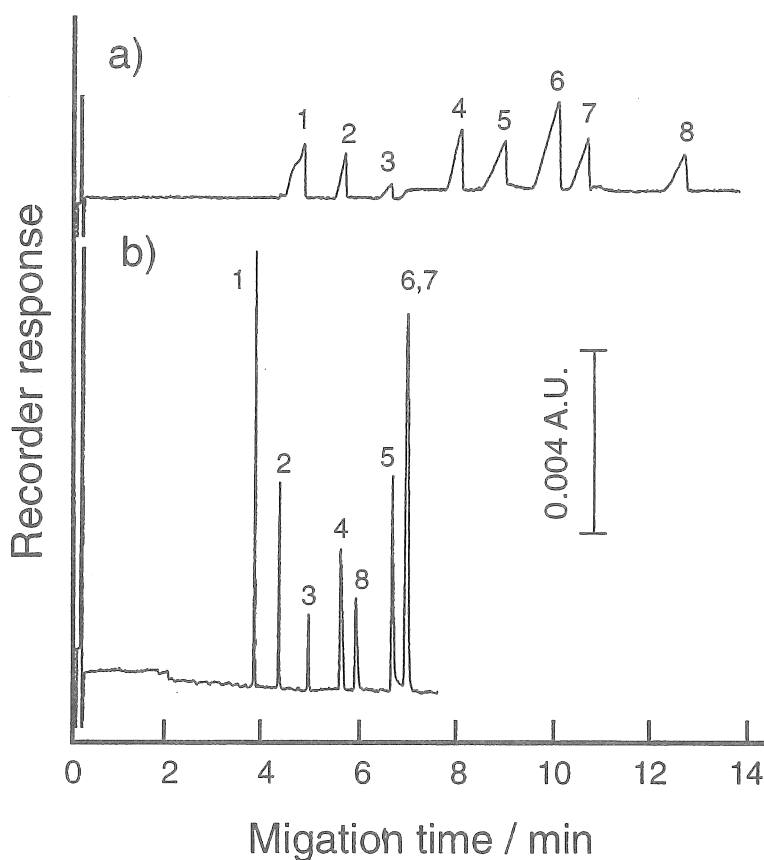


Fig. 1 Typical electropherograms for oxoacid anions in the absence and presence of Na_2SO_4 . Sample: 1×10^{-4} M anions. Migrating solutions: a) 5mM citrate buffer (pH 3.2); b) 5mM citrate buffer (pH 3.2) + 30mM Na_2SO_4 . CE conditions: applied voltage, 20kV; detection wavelength, 200nm; capillary room temperature, 30°C; injection period, 3s. Signal identifications: 1, NO_3^- ; 2, MnO_4^- ; 3, BrO_3^- ; 4, CrO_4^{2-} ; 5, WO_4^{2-} ; 6, MoO_4^{2-} ; 7, IO_3^- ; 8, NO_2^- .

解質を添加して電圧印加時のスタッキング効果の活用を試みた。電解質としては、硫酸ナトリウムがベースラインノイズ、ベースライン安定性、スタッキング効果、電気浸透流速等の観点から最適と分かった。Fig. 1 b) に例を示すように、いずれのピークも非常にシャープなものとなり、高感度化と分析時間の短縮を同時に達成した。

電気浸透流と逆向きに泳動するオキソ酸を分析対象とする場合、電気浸透流の速度を低下させるために低い pH の緩衝液を用いることが好ましい。このような場合、緩衝液の選択が重要なファクターとなる。緩衝液の種類により検出できるオキソ酸について調べた結果を Table 1 に示す。ヘテロポリ酸を形成しやすいタングステン酸イオン、モリブデン酸イオンも含めて検出するためには、クエン酸緩衝溶液が好ましいが、この場合はバナジン酸イオンは検出されない。

試料イオンのスタッキング効果を利用する高感度検出をさらに向上させるために、比較的大量の試料溶液を導入する方法と Z 型セルを用いる方法を検討した。各方法における検出限界 (LOD) を Table 2 にまとめて示す。試料導入時間を 60 秒 (通常の約 20 倍) にした場合 (Condition B), 導入時間の増加に対応して試料イオンの検出感度は向上した。また、通常のキャピラリーは 50 μm の光路長しか有していないが、1.2 mm の光路長を有する Z 型セルを併用することにより、光路長増加に対応した大幅な検出感度向上が実現された (Condition C)。最終的な検出限界は sub-ppb レベルとなり、濃度感度としては、液体クロマトグラフィー (HPLC)、イオンクロマトグラフィー (IC) と比較しても遜色なく、それをはるかに凌ぐ結果を得た。Condition C により得られた LOD は、現在までにキャピラリー電気泳動法で達成されたものの中で最も優れている。

Table 1 Oxoacid anions detected with various migrating buffers¹⁾

Oxoacid anions	Migrating buffer ²⁾			
	phosphate	glycine	citrate	monochloroacetate
CrO_4^{2-}	○	○	○	○
MnO_4^-	○	○	○	○
WO_4^{2-}	×	△	○	×
MoO_4^{2-}	×	×	○	×
VO_3^-	○	○	×	○
NO_2^-	○	○	○	○
NO_3^-	○	○	○	○
BrO_3^-	○	○	○	○
IO_3^-	○	○	○	○

1) Concentration of anions in sample solution: 1×10^{-4} M. 2) Concentration: 10 mM, except for citrate; citrate: 5 mM. Detection: ○, good; △, detected but less reproducible; ×, not detected.

Table 2 Limit of detection (LOD) for anions by the direct photometric methods obtained in this study

Anions	Limit of detection / M ¹⁾		
	Condition (A) ²⁾	Condition (B) ²⁾	Condition (C) ²⁾
Br ⁻	7.8x10 ⁻⁶ (620)	1.6x10 ⁻⁷ (13)	7.9x10 ⁻⁹ (0.63)
NO ₃ ⁻	3.8x10 ⁻⁶ (235)	1.4x10 ⁻⁷ (8.7)	3.2x10 ⁻⁹ (0.20)
I ⁻	4.6x10 ⁻⁶ (580)	1.2x10 ⁻⁷ (15)	5.9x10 ⁻⁹ (0.75)
MnO ₄ ⁻	1.0x10 ⁻⁵ (1200)	2.0x10 ⁻⁷ (24)	-
BrO ₃ ⁻	3.1x10 ⁻⁵ (3900)	1.0x10 ⁻⁶ (130)	3.6x10 ⁻⁸ (4.6)
ReO ₄ ⁻	1.3x10 ⁻⁵ (750)	2.6x10 ⁻⁷ (65)	1.5x10 ⁻⁸ (3.8)
CrO ₄ ²⁻	1.1x10 ⁻⁵ (3300)	2.0x10 ⁻⁷ (23)	2.0x10 ⁻⁸ (2.3)
IO ₃ ⁻	1.0x10 ⁻⁵ (1700)	2.6x10 ⁻⁷ (46)	1.6x10 ⁻⁸ (2.8)
H ₂ AsO ₄ ⁻	8.5x10 ⁻⁵ (12000)	3.7x10 ⁻⁶ (520)	-

1) Values at S/N = 3. Values in parentheses are in ppb units. 2) Conditions (injection period, capillary, migrating solution): (A), 3s, 50 μ m capillary, 10mM phosphate buffer + 30mM Na₂SO₄; (B), 60s, 50 μ m capillary, 10mM phosphate buffer + 30mM Na₂SO₄; (D), 60s, 75 μ m capillary with a high sensitivity cell, 10mM phosphate buffer + 10mM Na₂SO₄.

3. 2 高塩濃度試料液中のオキソ酸イオンの定量法開発

スタッキング効果等の利用による高感度検出法の高塩濃度試料分析への応用を検討した。実際例の一つとして、現在分析要望の高い半導体エッチング液中のタングステン酸イオン定量を行った。半導体エッチング液中には過酸化水素の他にアンモニウムイオン等の電解質が多量に含まれており、通常のHPLC、ICではタングステン酸イオン等の定量は極めて難しい。本研究で開発した高感度HPCE法では、試料をそのまま用いて分析できるので、タングステン酸イオンの存在状態も知ることができる。本研究では、タングステン酸イオンの検出に適するクエン酸緩衝溶液を用いて検討した。得られたエレクトロフェログラムを Fig. 2 に示す。10⁻⁵M レベルのタングステン酸イオンも十分検出でき、正確に定量することに初めて成功した (Fig. 2 b)。なお、用いたエッチング液中にはタングステン酸イオンはHWO₄⁻の形で存在していることも分った。

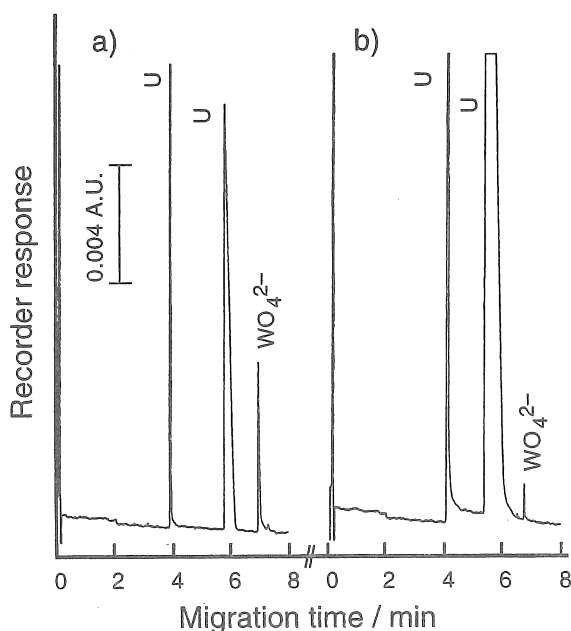


Fig. 2 Electropherograms for highly concentrated salt solutions (samples: etching solutions). CE conditions and migrating solution are the same as in Fig. 1 b). Sample (a) contains a larger amount of WO_4^{2-} than sample (b). U: Unknown peak. Determination results for WO_4^{2-} : (a), 1.4×10^{-4} M; (b), 2.1×10^{-5} M.

3. 3 海水中の陰イオン性物質の相互分離特性の向上と高感度定量：CM-ID/SC法の開発

海水中の微量陰イオンをキャピラリー電気泳動法 (HPCE) で分離定量する場合、2. 3に記した問題が生じる可能性もある。ピークのブロード化は、試料の希釈 (5~10倍) と比較的塩濃度の高い泳動液の使用で克服できるので、泳動液として 100mM KCl (pH 4) を用いた。また、直接吸光検出法によれば、塩化物イオン以外の微量陰イオンを高濃度に存在する塩化物イオンの妨害なしに検出・定量することが可能である。この点は、HPLC, ICに比べ極めて優れた特徴の1つである。海水試料に各種陰イオンをスパイクした場合のエレクトロフェログラムを Fig. 3 a) に示す。この条件では、各陰イオンの分離は不完全であることが分かる。従って、対抗泳動イオン会合誘導体化 (CM-ID) 法による分離特性の向上を検討した。CM-ID試薬が存在しない場合には、各陰イオンは固有の移動度で泳動するが、CM-ID試薬が存在すると、Fig. 4 に示すように泳動中にイオン会合体を形成し、本来とは異なる移動度で泳動するようになる。CM-ID法では、それぞれの陰イオンのイオン会合体生成の割合が異なるので分離特性の改善が期待できる。

無機陰イオンとイオン会合体を形成するCM-ID試薬として、テトラブチルアンモニ

ウムイオン (TBA^+), 1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン ([14]-ane N_4) などを検討した。また、泳動液中に K^+ が大量に存在することに着目し、クラウンエーテル化合物 (18-クラウン-6 : 18C6 など) を泳動液に添加して K^+ -クラウンエーテル錯体を CM-ID 法のイオン会合試薬として用いた。以上のような各種 CM-ID 試薬の中では、 K^+ -18C6 錯体の場合に最も良好な分離が達成された。Fig. 3 b) に示すように、各陰イオンをベースライン分離することに成功した。

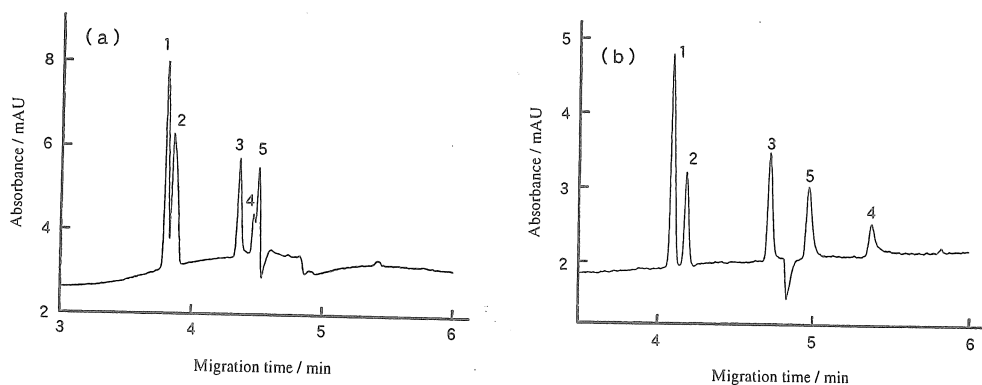


Fig. 3 Electropherograms of inorganic minor anions in the absence and in the presence of 18-crown-6 in the migrating solution by the CM-ID/SC method. CE conditions: applied voltage, -10kV ; detection wavelength, 200 nm ; sample introduction, 3 s at 50 mbar , temperature, 30°C . Migrating solution: (a) $\text{pH}4.0\text{ HCl} + 100\text{ mM KCl}$; (b) $\text{pH}4.0\text{ HCl} + 100\text{ mM KCl} + 20\text{ mM 18-crown-6}$. Sample solution: Sea water (1:10, sampled at Ushimado on August, 1998) spiked with $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ inorganic anions. Signal identifications: 1, Br^- , 2, I^- , 3, NO_3^- , 4, NO_2^- , 5, SCN^- .

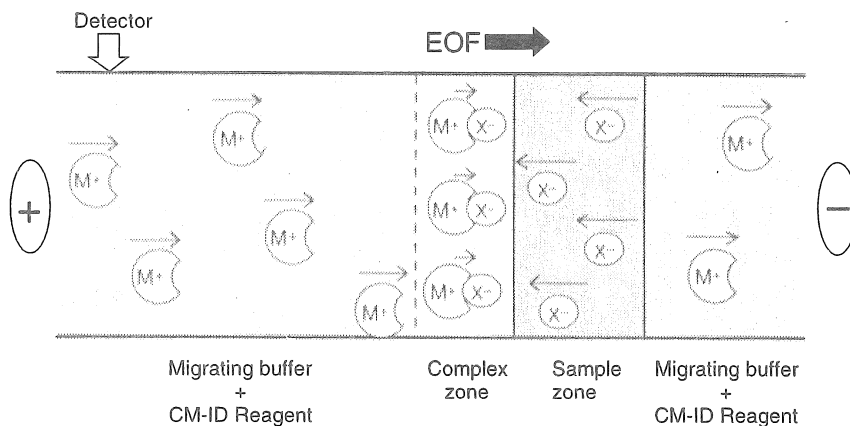


Fig. 4 Principle of counter migrating analyte derivatization method. Analyte: anion (X^-); counter migrating reagent: cation (M^+).

4. 今後の課題

本研究では、キャピラリー電気泳動法 (HPCE) を海水・高塩濃度試料の分析に適用するための基礎的事項を検討した。HPCEはイオン成分の分析に最も適した分析法であるが、高塩濃度の試料に適用するためには、克服しなければならない問題点として試料液と泳動液との間の塩濃度の差、即ち試料液のより高い塩濃度がある。このために、通常のHPCEでは分析が困難なこともあり、報告例もわずかである。この問題の最も簡単な解決法は、例えば海水試料では数倍(約5倍)希釈することであるが、同時に高感度検出法の開発が必要となる。このため、本研究では様々な高感度検出手法を開発した。キャピラリー電気泳動法はイオン移動度の差異に基づく高性能・精密分離という大きな特徴を有する新しい分析法であるが、海水分析においてはその特性が十分に活かされていたとは言い難い。本研究では高感度検出法と対抗泳動法 (Fig. 4) のカップリングにより海水試料、高塩濃度試料中の陰イオン性物質の分離・分析に対処できる方法を開発することができた。陰イオン分析に関しては、本研究で開発した手法は、HPLC、IC等のクロマトグラフ法を凌ぐ分離性能・検出性能を実現することができる。

HPCEの海水分析への適用に関する研究は、まだまだ日が浅いが、HPCEの原理の効果的利用、検出器も含めた測定システムの改良、開発、そして新しい分離モード (CM-ID法、CM-CD法等)、新しい泳動液修飾剤 (ID、CD試薬等) の開発により微量、極微量イオン性成分の高感度・高精度分析法、溶存状態解析法として展開できるものと期待でき、今後も更に研究を深めたいと考えている。

5. 参考文献

学術論文

1. Toshio Takayanagi, Eiko Wada and Shoji Motomizu, "Direct Photometric Determination of Tungstate Ion in the Etching Solutions by Capillary Zone Electrophoresis", *Anal. Sci.*, **14**, 1181 (1998).
2. Andrei R. Timerbaev, Toshio Takayanagi and Shoji Motomizu, "Separation of inorganic anions for analysis of sea-water by capillary zone electrophoresis", *Anal. Commun.*, **36**, 139 (1999).
3. 本水昌二, 高柳俊夫, "高性能キャピラリー電気泳動法とその海水分析への応用", *日本海水学会誌*, 印刷中.

Separation and Determination of Trace Ionic Substances in Sea Water and Concentrated Electrolyte Solutions by Capillary Electrophoresis and Its Application to Speciation of Substances

Shoji MOTOMIZU, Dept. Chem., Fac. Sci, Okayama University

Mitsuko OSHIMA, Dept. Chem., Fac. Sci, Okayama University

Toshio TAKAYANAGI, Dept. Chem., Fac. Sci, Okayama University

Summary

In the determination of trace amounts of various ions in concentrated electrolyte solutions, it must be noticed that the interference from matrices contained in samples at large amounts is usually very serious. The separation efficiency in capillary electrophoresis is excellent, compared with the conventional methods used so far; therefore no pretreatment is required before analyzing such sample solutions. In this study, various fundamentals concerning the development of the analysis and the speciation methods for trace ions in the concentrated electrolyte solutions were studied.

1. Highly sensitive detection method for oxoacid anions by capillary zone electrophoresis.

Peak shapes for oxoacid anions, as well as the detection sensitivity, were improved by stacking the analyte ions at the beginning of the electrophoresis by adding electrolytes, such as sodium sulfate etc., in the migrating solution. Analysis time was also shortened with such migrating solutions. To improve the detection sensitivity, large volume sample injection technique and the use of Z-shaped cell were also found to be very successful. The detection sensitivity reached down to sub-ppb levels by the combined use of the stacking, large volume sample injection and Z-shaped detection cell.

2. Application of the proposed sensitive method to the determination of oxoacid anion.

The proposed sensitive determination method was applied to the determination of tungstate ion in semiconductor etching solutions which were examples of a concentrated electrolyte solution. Tungstate ion existing at 10^{-5} M levels was preferably determined and its species was found to be HWO_4^- .

3. Novel separation and detection method for minor anions in sea water by CM-ID method with various ion association reagent.

Separability of minor anions in sea water, such as Br^- , I^- , NO_3^- , SCN^- and NO_2^- , was improved by adding CM-ID reagent in migrating solutions, which was attributed to the formation of ion associate between the analyte anions and the CM-ID reagent. Peak broadening was also suppressed by diluting the sea water 10 fold with KCl at 100 mM in the migrating solution.