

## 塩中の主成分の超高感度同時機器分析法の開発

富士 惠一

神戸大学大学院海事科学研究科

**概要【緒言】** 塩中主成分イオン濃度は、濃度に応じた方法により個別に定量されているが<sup>1)</sup>、スクリーニング法、原料海水やかん水分析法として、同時定量法開発は意義があると考えられる。そこで、簡便で高感度な主成分イオン同時定量法を開発するために、キャピラリーゾーン電気泳動法を用い、基礎的分析条件について検討した。

**【実験】** 検出法:電気伝導度検出器(CCD);キャピラリー:内径 50  $\mu\text{m}$ 、全長 80 cm;泳動液:(A) 9 mM L-ヒスチジン+15 mM リンゴ酸+2 mM 18-crown-6、(B) 25 mM 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸+25 mM L-ヒスチジン+2 mM 18-crown-6。①CCDを陰極側から20 cmの位置に設置し、陽、陰イオン混合溶液を試料とし、泳動液(A)を用い、キャピラリー両端から電氣的注入法により試料を注入した。再現性を求め、検量線の作成を試みた。②陰イオン再現性改善のため、CCDの位置を変化させた。③陰イオン用試料バイアルとして、陰極及びキャピラリーと試料バイアルとの接触を防ぐために、泳動液用バイアルに変更した。④真空吸引法を用い、泳動液(A)、(B)について検討した。⑤有効長 60 cmとし、泳動液(B)を用い、真空吸引法により陽、陰イオンを個別に分析し、再現性を求め、検量線を作成した。⑥電氣的注入法により陰イオンを分析し、再現性を求め、検量線の作成を試みた。⑦有効長 60 cmとし、泳動液(B)を用い、真空吸引法により、市販塩の陽イオン分析を試みた。

**【結果と考察】** ①陽、陰イオンを同時に分離検出でき、陽イオンの再現性は良好だが、陰イオンの再現性が悪く、直線性の良い検量線は得られなかった。②CCDの位置が陰極側から40 cmの場合、陰イオンの再現性が改善されたが、陽イオンの再現性が悪くなった。③泳動液用バイアルの場合、陰イオンの再現性が改善された。両側電氣的注入法では、再現性が悪く、直線性の良い検量線が得られなかったため、真空吸引法を用い、陽、陰イオンの個別分析を試みた。④ $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Na}^{+}$ の泳動時間の差は、泳動液(B)のほうが(A)より大きく、塩の分析には適している。⑤陽、陰イオンとも再現性は良好で、比較的直線性の良い検量線が得られた。⑥再現性は良かったが、直線性の良い検量線は得られなかった。⑦吸引時間1秒では、 $\text{Na}^{+}$ ピークは十分大きく、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ ピークは小さいが、分離検出された。 $\text{Mg}^{2+}$ は検出されなかった。3秒では、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ ピークは十分大きかったが、 $\text{Ca}^{2+}$ ピークがブロードになり、 $\text{Mg}^{2+}$ は検出されなかった。今後、試料注入法、CCDの位置、泳動液組成、塩試料濃度等について詳細に検討し、簡便で高感度な塩中主成分イオンの同時定量法を確立したい。

1) 野田 寧: Salt & Seawater Science Seminar 2014, "塩試験方法の変遷と特徴".

### 1. 研究目的

塩は製法、原料により主成分イオン( $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^{-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ )濃度が異なるため、品質保証・表示の観点から、これら濃度を明らかにする必要がある<sup>1)</sup>。我が国では100年以上前に、塩鑑定分析法として塩試験方法が制定され、塩の品質向上に貢献してきた<sup>2)</sup>。主成分イオン

は、現在では、含まれるイオン濃度に応じて、容量法( $\text{Cl}^{-}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ )、イオンクロマトグラフィー( $\text{SO}_4^{2-}$ )、ICP発光分光分析法( $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ )、炎光光度法( $\text{K}^{+}$ )により個別に定量されている。また、塩化ナトリウム濃度は計算により求められている(結合計算法)。しかし、さらに分析の効率を上げるためのスクリーニング法として、あるいは、原料海水

やかん水分析法として、これら陽イオン、陰イオンの同時定量法を開発することは意義あることと考える。そこで、本研究では、キャピラリー電気泳動法(CE)の分離モードの一つであるキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)及び非接触型電気伝導度検出器(CCD)を用い、主成分イオンの簡便な高感度同時定量法を開発することを目的とした。

## 2. 研究方法

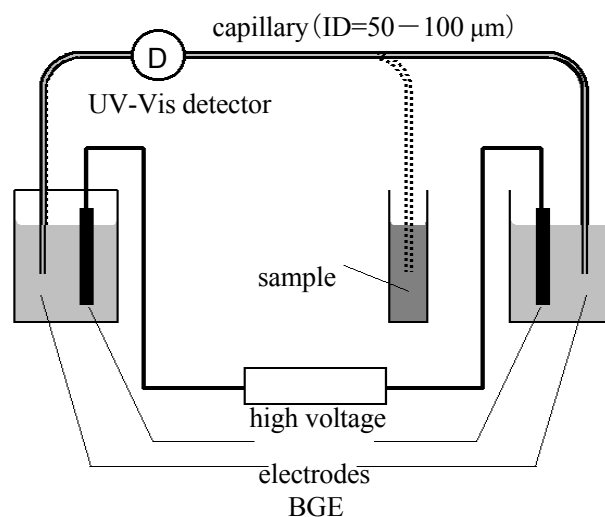
### 2.1 塩中の主成分イオン濃度

文献<sup>1)</sup>や塩容器に記載されている含有量を基に、種々の塩 0.1 g を 1 L の水に溶解した場合の主成分イオン濃度を計算により求めた。参考値として、250 倍に希釈した海水中の主成分イオン濃度とともに **Table 1** にまとめた。NaCl 濃度は、塩 (0.1 g/L) と海水 (250 倍希釈) とではほぼ同程度であるが、塩中の他の主成分イオン濃度は、K<sup>+</sup>は海水の 1/40–1/9、Mg<sup>2+</sup>は 1/520–1/9、Ca<sup>2+</sup>は 1/180–1/7、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-S は 1/550–1/8 とかなり低濃度である。また塩の種類により濃度差が大きいことがわかる。

### 2.2 キャピラリー電気泳動法の概要

**Fig. 1** にキャピラリー電気泳動装置の概略を示す。まず左右の泳動液(BGE)容器と内径 50–100 μm のフューズドシリカ製キャピラリーに BGE を満たす。一般に用いるキャピラリーには、折れにくくするために被覆が施されている。次いで、試料を注入するために、右側のキャピラリー端を試料容器に挿入する。試料注入法としては、試料容器を一定時間、一定の高さに保ち、重力差を利用する重力法、試料容器と反対側の BGE 容器側を減圧する減圧法、試

料容器を加圧する加圧法があり、これらは圧力差法(hydrodynamic injection, HDI)と呼ばれる。さらに、試料容器と反対側電極の極性を分析目的成分の極性と反対に設定し、電氣的に注入する電氣的注入法(electrokinetic injection, EKI)がある。いずれかの方法により試料を注入後、右側のキャピラリー端を再び BGE 容器に戻し、高電圧電源により、左右の BGE 容器中の電極に高電圧を印加する。試料中の各成分は、キャピラリー内で発生する電気浸透流(EOF)及び電気泳動によりキャピラリー内を移動し、電気泳動移動度の差によって分離され、一般的には吸光検出器により検出される。この場合、キャピラリー自身が一般的な吸光光度法におけるセルの役割



**Fig. 1.** Basic schematic of capillary electrophoresis (CE) instrument. BGE, background electrolyte

**Table 1.** Concentrations (mg/L) of principal components in salts<sup>1,a)</sup> and seawater<sup>3,b)</sup>

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S
Namien	38	0.16	0.08	0.06	59	0.01
Seiseien	39	0	0	0	61	0
Alpen salz	39	0.05	0.01	0.01	60	0.0067
Sesanmnosio	35	0.18	0.55	0.27	54	0.46
Hakatanosio	37	0.04	0.1	0.1	58	0.15
Aoiumi	35	0.17	0.44	0.26	–	–
Seawater	44	1.6	5.2	1.8	80	3.7

<sup>a)</sup>0.1 g salt was dissolved in 1 L water.

<sup>b)</sup>250 fold diluted

を果たすため、光が透過できるように検出部の被覆をはがす必要がある。ただし、本研究では電気伝導度検出器(2.3参照)を用いているので、その必要はない。通常、EOFは陽極から陰極に向かって流れ、その大きさは電気泳動移動度より大きい。本法は、キャピラリー断面におけるEOFの速度がほぼ均一であるため、高い分離能を有する。一方、キャピラリー内径が光路長となるため、濃度感度が十分でないが、これを補うため、各種オンライン濃縮法が提案されている。

### 2.3 非接触型電気伝導度検出器

本研究における分析目的成分( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ )は、 $\text{Cl}^-$ を除き、光吸収を持たないため、吸光検出器では直接検出(直接吸光法)できない。この場合、光吸収を有する間接吸光試薬を含むBGEを用い、分析目的成分と吸収を持つ成分とが置き換わることにより、光吸収を持たないこれら分析目的成分を間接的に検出する間接吸光法が用いられる。しかし、直接吸光法と比較し、一般的に感度が低い。そこで、本研究では、イオン性成分であれば、すべて検出可能な電気伝導度検出器を用いることとした。非接触型電気伝導度検出器(CCD, Innovative Sensor Technologies製 TraceDec)をFig. 2に示す。キャピラリーを2つの管状の金属電極が取り巻いており、作用電極(actuator electrode)に交流電圧をかけ、キャピラリー内の溶液に高周波交流シグナルを照射させる。試料中のイオン性成分が通過する際に電流変化が生じ、その変化はピックアップ電極(pick-up electrode)で電圧シグナルに変換され、電気伝導度として記録される<sup>4)</sup>。

### 2.4 電気伝導度検出器に関する文献

CCDに関する総説は毎年のように報告されており、KubánとHauser<sup>5)</sup>(2004)は、1998年～2004年初めに出版された文献をまとめ、UV検出器より高感度なCCDは、

無機及び有機イオン種の有用な検出器であることを紹介した。KubánとHauser<sup>6)</sup>(2004)は、CCDの基本的特性について調べ、電極の直径やキャピラリーと電極との密着度は検出器の性能に関係ないが、CCDのデザイン、増幅器、BGE、キャピラリーに応じた最適な周波数設定が大切であることを示した。さらにKubánとHauser<sup>7)</sup>(2004)は、より低い検出限界(LOD)を得るためには、電気伝導度の低いBGE、高い励起電圧を用い、周波数を最適化することが重要であると結論づけた。Brito-Netoら<sup>8)</sup>(2005)は、CCDの特性について調べ、感度は、BGEの共通イオン及びカウンターイオン、検出器の構造及び位置、周波数によることを示した。また、Padaruskas<sup>9)</sup>(2006)は、CEによる無機及び低分子量有機イオン定量法について、分離システム、陽イオン、陰イオンの個別及び同時分離、CCDを含む検出法等の項目を設け、解説している。Kubánら<sup>10)</sup>(2006)は、低分子量無機イオンを試料とし、4種類のCCDの性能を比較し、理論段数、再現性、ダイナミックレンジ(いずれも2桁)及び相関係数はほぼ同様であるが、検出器内に増幅器のないCCDのLOD( $1.5 \mu\text{mol/L}$ )は他のCCDのLOD( $0.1 \mu\text{mol/L}$ )と比較し、15倍高いことを示した。その後の総説として、KubánとHauser<sup>11)</sup>(2008)は、2004年～2007年の文献についてCCDの原理、CEだけでなく他の分析法へのCCDの応用も含め、無機イオン、有機イオン、アミノ酸等に関する応用例を紹介している。さらに、KubánとHauser<sup>12)</sup>(2009)は、CCDが使用されるようになってからの10年間(1998年～2008年)において蓄積された情報のうち、CCDを使用する際に有用な一般的情報について概観している。彼らは、続けて、2008年～2010年<sup>13)</sup>(2011)、2010年～2012年<sup>14)</sup>(2013)、2012年～2014年<sup>15)</sup>(2015)に出版された文献についてまとめている。Sáizら<sup>16)</sup>(2014)は、CEによる陽イオン及び陰イオンの



Fig. 2. Contactless conductivity detector (Model TraceDec)

同時定量にしぼり、特に試料注入法について詳しく解説している。最近、Mai ら<sup>17)</sup> (2013) は、溶液の充填は加圧空気、試料の注入はマイクロメンブランポンプ、検出は CCD によるポータブルタイプの CE 装置を開発した。Kobrin ら<sup>18)</sup> (2014) は、CCD を検出器とする市販のポータブルタイプ CE 装置を用い、爆発残留物中の無機陽イオン及び陰イオンを同時分離した。

## 2.5 陽イオン及び陰イオンの同時定量

### 2.5.1 吸光検出器の使用例

Bächmann ら<sup>19)</sup> (1992) は、キャピラリーと検出器(蛍光検出器)を 2 セット(陽イオン及び陰イオン分析用)用い、間接蛍光法(蛍光を有する成分を BGE に添加し、蛍光を持たない成分を検出する方法)により、無機陽イオン及び無機陰イオンの同時定量を試みた。Krokhin ら<sup>20)</sup> (1997) は、あらかじめ金属イオンと 4-(2-pyridylazo) resorcinolato (PAR) との錯体を形成することにより、間接吸光法による金属イオンと無機陰イオンの同時定量法を提案した。Kobayashi ら<sup>21)</sup> (1998) は、金属イオンを ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) と錯形成させて陰イオンとし、他の陰イオンとともに同時定量する方法を開発し、ミネラルウォーターの分析に応用した。Kubán ら<sup>22)</sup> (1999) は、間接吸光法による無機陰イオン、有機酸、金属イオン(EDTA により陰イオンとして検出)の同時定量法をミネラルウォーター及び水道水の分析に適用した。Soga と Ross<sup>23)</sup> (1999) は、間接吸光試薬及び錯形成剤としての役割を持つ 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) を BGE とし、無機陰イオン及び有機酸を間接吸光法、金属イオンを PDC 錯体として直接吸光法により定量する方法を確立した。Xiong と Li<sup>24)</sup> (1998) は、陽イオン、陰イオン用間接吸光試薬を含む BGE を用い、EOF により陰イオンを陰極側に移動させ、無機陽イオンと移動度の小さな無機陰イオンの同時定量に成功した。Chvojka ら<sup>25)</sup> (2001) は、無機陽イオンを CCD、移動度の小さな有機陰イオンを吸光検出器により検出する同時定量法について述べている。一方、Johns ら<sup>26)</sup> (2004) は、臭化ジドデシルジメチルアンモニウム(DDAB)により強い EOF を発生させ、陽イオン用間接吸光試薬を含む BGE を用い、片側試料注入法(HDI)により無機陽イオン及び移動度の大きな無機陰イオンの同時定量法を確立した。この場合、陽イオンは通常の間接吸光法(陽イオンと陽イオン性プローブとが置換される

ことにより、陽イオン性プローブ濃度が変化する)により検出され、陰イオンは対イオン間接吸光法(陰イオンと陽イオン性プローブの対イオンとが置換されることにより、陽イオン性プローブ濃度が変化する)により検出される。以上の方法において、試料はすべて HDI により片側からキャピラリー内に注入されている。

Kubán と Karlberg<sup>27)</sup> (1998) は、低分子イオンを同時定量するための両側試料注入法(dual-opposite end injection)を提案した。まず、片側のキャピラリー端を試料バイアルに入れ、一定時間、反対側の BGE バイアルより高く保ち、HDI により試料を注入する。試料注入後、同様に BGE を少量注入する。ついで、同様に、反対側のキャピラリー端より試料を注入する。その後、キャピラリー両端を BGE に挿入し、泳動を開始する。陽イオン用及び陰イオン用の間接吸光試薬を含む BGE を用い、水道水、雨水中の陽イオン及び陰イオンを定量した。Haumann ら<sup>28)</sup> (2000) は、同様に両側試料注入法により、飲料水中の無機陽イオン及び陰イオンを間接吸光法により同時定量し、それらの結果は、原子吸光法やイオンクロマトグラフィーによる結果とほぼ一致することを示した。ただ、正確に定量するためには、試料注入法として EKI より HDI の方が望ましいと述べている。以上の方法において、試料はすべて HDI による両側試料注入法を用い、両側からキャピラリー内に注入されている。

Jandik と Jones<sup>29)</sup> (1991) は、試料中に移動度の小さなイオン(ターミナルイオン、オクタンスルホン酸)を添加して EKI により試料を注入すると、分析目的成分は BGE 中の移動度の大きなイオン(リーディングイオン、クロム酸)とターミナルイオンとの間に挟まれ等速電気泳動(isotachopheresis, ITP)状態が起り、濃縮され、無機陰イオンを高感度に検出できることを示した。Bondoux ら<sup>30)</sup> (1992) は、ITP による濃縮を利用した間接吸光法は、検量線の直線性及び分析目的成分ピークの再現性も良く、サブ ppb レベルの検出限界を有し、原子力発電所の一次及び二次冷却水中の無機陰イオン分析に適用できることを示した。Shi ら<sup>31)</sup> (1994) は、試料注入法として EKI、検出法として間接吸光法を用い、標準添加法により、動物の目のレンズに含まれる無機陽イオンを定量し、フレーム原子吸光法やフレーム原子発光法による結果とほぼ一致する結果を得た。Padaruskas ら<sup>32)</sup> (1998) は、陽イオン用及

び陰イオン用の間接吸光試薬を含む BGE を用い、キャピラリー両端から陽イオン及び陰イオンを EKI により同時に注入し、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$  の分離を達成した。EKI において、キャピラリーに注入される分析目的成分量は、成分の移動度及び試料のイオン強度により異なる(バイアス)が、定量性についてはまったく検討されていない。その後、Padaruskas ら<sup>33)</sup>(1998) は、両側同時 EKI の定量性について検討し、試料に内標準として  $\text{Li}^+$  を添加して分析することにより、試料のイオン強度によるバイアスの問題を解決し、河川、水道水中の陽イオン及び陰イオンを定量した。それらの結果は、イオンクロマトグラフィーや従来の CZE による結果と一致した。さらに、Padaruskas ら<sup>34)</sup>(2001) は、同様の方法を用い、雨水中の  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  を直接吸光法、 $\text{NH}_4^+$  を間接吸光法により同時定量し、従来法である吸光光度法による結果と良く一致することを報告した。Durkin と Foley<sup>35)</sup>(2000) は、EOF を抑制した両側同時 EKI により、陽イオン性医薬品及び関連のある陰イオンの分離を達成した。以上の方法において、試料はすべて EKI によりキャピラリー内に注入されている。

## 2. 5. 2 電気伝導度検出器の使用例

2. 5. 1 で述べたように、吸光検出器を用いて陽イオン及び陰イオンを同時定量するためには、単一の波長において吸収及び置き換え率も最大である 2 種類の間接吸光試薬が必要である<sup>36)</sup>(2002)。また、分析目的成分の泳動順は検出器の位置による。これは、検出器の位置により、陽イオン及び陰イオンに対するキャピラリー有効長が変化するからである。さらに、吸光検出器の場合、検出器の位置を自由に変えられるようにするためには、キャピラリー被覆を広範囲にはがす必要があり、キャピラリーが折れやすくなる。これに対して、CCD は、イオン性成分ならば検出可能であり、検出位置も自由に変更可能である。Unterholzner ら<sup>36)</sup>(2002) は、HDI により、まず陽イオンを注入し、次いで陰イオンを注入する両側試料注入法と CCD 及び全長 100 cm のキャピラリーを用い、ミネラルウォーター中の無機陽イオン及び陰イオンを同時検出した。LOD 及び検量線の直線性の範囲に関する記述はあるが、再現性については触れられていない。Kubáň ら<sup>37)</sup>(2002) は、HDI による両側試料注入-CCD 検出法の LOD は、両側試料注入-UV 検出法の LOD より 10 倍低いことを述べ、

河川水、雨水、排水中の無機陽イオン及び陰イオンを定量し、それらの結果は、IC や CE による個別定量結果と良く一致することを示した。さらに Kubáň ら<sup>38)</sup>(2002) は、BGE について検討し、22 種類のアルカリ金属、アルカリ土類金属、遷移金属、有機、無機イオンの同時定量法を確立し、水道水、雨水、河川水、排水等の分析に応用した。また、Kubáň ら<sup>39)</sup>(2004) は、フローインジェクションシステムを利用した自動両側試料注入法を開発し、内部標準を試料に添加することにより、無機陽イオン及び陰イオンに対するピーク面積の相対標準偏差(RSD, %)として 0.09-0.82% という再現性の高い結果を得た。Feng ら<sup>40)</sup>(2005) は、HDI による両側試料注入法により水道水、雨水中の陽イオン及び陰イオンを同時定量した。Flanigan ら<sup>41)</sup>(2010) は、gradient elution moving boundary electrophoresis (GEMBE) という方法により、ミネラルウォーター中の無機陽イオン及び陰イオンを定量した。この方法では、泳動電圧を印加した状態で、EOF に対して外部圧力を調整することにより、移動度の大きな陰イオン、次いで移動度の小さな陽イオンがキャピラリーに注入され、CCD により順次検出される。Kubáň ら<sup>42)</sup>(2012) は、HDI による両側試料注入法(初めに陽イオンを注入し、一定時間、電圧を印加後、反対側より陰イオンを注入する、あるいはその逆の方法)を用い、彼らの考案した装置により採取した凝縮呼気中の無機陽イオン及び陰イオンを同時定量した。May と Hauser<sup>43)</sup>(2012) は、シリンジポンプと multi-position valve を用いた sequential injection analysis (SIS) manifold 及び 1 つあるいは 2 つの CCD を用い、種々の試料注入法及び検出法について紹介している。Neaga ら<sup>44)</sup>(2014) は、まず入り口側キャピラリーを加圧して試料を注入後、入り口側を真空にして出口側キャピラリーより試料を注入する両側試料注入 HDI (加圧と真空)を用い、井戸水中の無機陽イオン及び陰イオンを分析した。田中ら<sup>4)</sup>は、長さ 10 cm のキャピラリー及び CCD を用い、成分分離のための電気泳動中に連続的に試料を注入し続ける連続試料注入法を提案した。河川水等の環境水試料中の  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、F<sup>-</sup> 定量に適用可能であるが、連続的試料注入法は、イオン強度の高い海水試料には適用できないことを示した。さらに田中らは、続試料注入法では、陽イオンと陰イオンを同時に定量できないため、新たな試料注入法としてキャピラリー充填法を開発し

た(私信, 田中喜秀)。この方法は、初めにキャピラリーを試料溶液で満たしておき、電気伝導度検出器の位置を調整することにより、陽イオン及び陰イオンの同時定量をねらったものである。通常用いられる試料注入法である HDI 及び EKI(片側からのみ注入する場合)では、陽イオンあるいは陰イオンのいずれかしか検出できない。しかし、キャピラリー充填法では、両イオンの検出が可能となる。Sáiz ら<sup>45)</sup>(2014)は、2本のキャピラリーと2つの CCD(それぞれ陽イオン分析用、陰イオン分析用)を備えたポータブルタイプの CE 装置、一種類の BGE を用い、花火中の 12 種類の無機陽イオン及び陰イオンを定量した。Kubáň ら<sup>46)</sup>(2014)は、HDI による両側試料注入法(片側から試料注入後、続けて BGE を注入後、反対側から試料を注入)により、汗及び皮膚を拭いたガーゼ(水を含ませたもの)を水に浸した試料中の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>を同時定量した。この方法は嚢胞性線維症の診断に有用であることを示した。以上の方法において、試料はすべて HDI により注入されている。

Tanyanyiwa ら<sup>47)</sup>(2002)は、EOF を抑制し、試料を BGE で調製すれば、EKI による両側試料注入法より、無機陽イオン及び陰イオンの同時定量あるいは連続定量が可能であることを示した。ただし、再現性や検量線等については触れていない。また、Wan ら<sup>48)</sup>(2004)は、試料注入法として EKI を用い、ヒト血清及び尿中の無機陽イオン及び陰イオンを個別に定量し、それらの結果は、従来法による結果とよく一致することを示した。以上の方法において、試料はすべて EKI によりキャピラリー内に注入されている。この内容については、本研究を遂行する上で非常に関連が深いので、「5. 今後の計画」において詳しく紹介する。

## 2.6 装置

装置は、大塚電子(Otsuka Electronics, Osaka, Japan)製キャピラリー電気泳動装置 CAPI-3300 を用いた。キャピラリーはジーエルサイエンス(GL Sciences, Tokyo, Japan)製フューズドシリカ管(内径 50  $\mu\text{m}$ , 外径 375  $\mu\text{m}$ , 全長 80 cm)である。非接触型電気伝導度検出器は、Innovative Sensor Technologies (Strasshof, Austria)製 TraceDec、データ処理には、日立(Hitachi, Tokyo, Japan)製 D-2500 クロマトインテグレーターを使用した。

## 2.7 試薬

試薬はすべて特級品を用いた。溶液調製の際に使用した純水は、ヤマト科学(Yamato Kagaku, Tokyo, Japan)製 WG220 型純水製造装置およびメルクミリポア(Merck Millipore, Tokyo, Japan)製 Simpli Lab 超純水製造装置により得られたものである。なお、BGE、標準溶液は使用する前に 0.45  $\mu\text{m}$  のアドバンテック(Advantec Toyo Kaisha, Tokyo, Japan)製メンブレンフィルターで濾過した。

## 2.8 キャピラリー洗浄法

吸光検出器の場合、新しいキャピラリーの洗浄は、1 mol/L NaOH 溶液を 40 分、純水を 10 分流して行ってきた。CCD の場合、NaOH 由来の Na<sup>+</sup>が系内から除去されにくいいため、Greguš らの方法<sup>49)</sup>(2015)に基づき、0.1 mol/L NaOH を 30 分、純水を 30 分、BGE を 10 分流して行った。しかし、分析目的成分の分離状態が悪かった。Sáiz ら<sup>45)</sup>(2014)は、1 M NaOH を 10 分、純水を 10 分、BGE を 1 時間流して新しいキャピラリーを洗浄している。そこで、我々は、1 mol/L NaOH を 30 分、純水を 30 分、BGE を 10 分流して行うことにした。また、安定な応答を得るには、毎日の分析開始 1 時間程度前に CCD を on にする必要がある。そこで、その間約 30 分(純水を 5 分流した後)、BGE を流すことにした。他の文献におけるキャピラリー洗浄法は以下の通りである。Kubáň ら<sup>38)</sup>(2002)は、HDI による両側試料注入法を用いて無機陽イオン及び陰イオンを同時定量する場合、毎分析時、1 mol/L HCl 溶液を 20 秒、水を 60 秒、40  $\mu\text{mol/L}$  臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)溶液を 40 秒(EOF を反転するため)、BGE を 180 秒流して、キャピラリーを洗浄している。Wan ら<sup>48)</sup>(2004)は、CCD 検出において内径 25  $\mu\text{m}$  のキャピラリーを使用した。新しいキャピラリーは、1 mol/L NaOH を 8 分、水を 8 分、1 mol/L HCl を 8 分、水を 8 分流して洗浄した。また、毎日分析前に、0.1 mol/L NaOH と 0.1 mol/L HCl によりキャピラリーを平衡化した。

## 2.9 操作法

恒温槽温度を 25°C に設定し、印加電圧は 20 kV とした。BGE として、(A) 9 mmol/L L-ヒスチジン(HIS) + 15 mmol/L リンゴ酸 + 2 mmol/L 18-crown-6、(B) 25 mmol/L 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES) + 25 mmol/L HIS + 2 mmol/L 18-crown-6 の二種類を用いた。また、CCD における設定値は、Frequency: HIGH、Voltage: -6 dB、Gain: 50%とした。分析の際は、BGE をキャピラリーに

4分充填した。試料を電氣的に注入する(EKI)場合には、電圧 6 kV、注入時間 3 秒あるいは、電圧 10 kV、注入時間 1 秒とした。真空吸引法(HDI, 50 kPa)の場合には 1 秒(約 11 nL)あるいは 3 秒(約 33 nL)とした。ただし、後に確認したところ、他の装置において真空吸引法で通常使われてきた注入量(63 nL)と比較して、1/6–1/2 とかなり少ないことがわかった。

## 2. 10 実験及び結果

### 2. 10. 1 EKIによる両側試料注入法

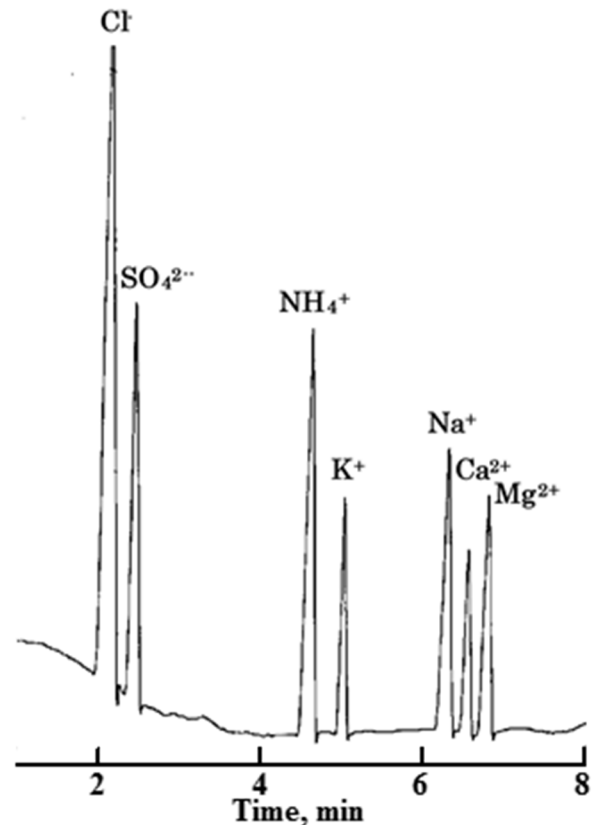
陽イオン、陰イオンを同時分析するために、CCD を陰極側から 20 cm の位置に設置し、標準溶液( $\text{Na}^+$ =2 mg/L,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ =1 mg/L,  $\text{Cl}^-$  =8.1 mg/L,  $\text{SO}_4^{2-}$ -S =1.4 mg/L)を試料とし、泳動液(A)を用い、キャピラリー両端から EKI により試料を注入した。泳動時間、ピーク面積、ピーク高さの相対標準偏差(RSD)を求め、検量線(陽イオンについては 1.0–10 mg/L、陰イオンについては 1.4–41 mg/L の標準溶液)の作成を試みた。

その結果、Fig. 3 に示すように、陽イオン、陰イオンを同時に分離検出できた。しかし、Table 2 に示すように、陽イオンの RSD は、泳動時間 0.36–0.44%、ピーク面積 0.46–3.1%、ピーク高さ 0.26–0.67%であり、再現性は良好であったが、陰イオンの RSD が泳動時間 1.0–1.1%、ピーク面積 21–22%、ピーク高さ 11–13%と悪かった。これは、キャピラリー有効長(試料バイアル中のキャピラリー端から検出器までの長さ)が、陽イオンについては 60 cm であり、分離に十分な長さを有しているが、陰イオンについては 20 cm と短かったためであると考えられる。また、直線性の良い検量線は得られなかった。この原因として、標準溶液濃度の範囲が広く、分析目的成分濃度が高くなるにつれて、試料溶液の電気伝導度も高くなり、その結果電場の強さが弱まり、分析目的成分注入量が減少したためであると考えられる。

### 2. 10. 2 CCD の位置(キャピラリー有効長)

同時分析時の陰イオン再現性改善のため、CCD の位置を陰極側から 40 cm とした。すなわち、キャピラリー有効長は、陽イオン及び陰イオンについて 40 cm となる。

その結果、泳動時間、ピーク面積、ピーク高さの RSD は、陰イオンについては、0.34–0.37%、5.4–19%、11–16% であり、再現性が改善される傾向が見られた。一方、陽イオンについては、RSD はそれぞれ、0.14–0.55%、14–65



**Fig. 3.** Electropherogram of the simultaneous separation of inorganic cations and anions

Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{\text{tot}}$ =80 cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D. $\times$ 375  $\mu\text{m}$  O.D.; BGE, (A) a mixture of 9 mmol/L L-histidine, 15 mmol/L malic acid, and 2 mmol/L 18-crown-6; voltage, 20 kV with the sample (anions) inlet side as the cathode; detection, CCD at 20 cm from the cathode. Sample, a standard solution containing 2 mg/L  $\text{Na}^+$ , 1 mg/L  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ , 8.1 mg/L  $\text{Cl}^-$ , and 1.4 mg/L  $\text{SO}_4^{2-}$ ; EKI, 6 kV for 3 s

**Table 2.** Precision of cations and anions

Analyte	RSD (%)		
	Time	Area	Height
$\text{Na}^+$	0.38	1.6	0.67
$\text{K}^+$	0.44	1.2	0.52
$\text{Mg}^{2+}$	0.36	0.46	0.26
$\text{Ca}^{2+}$	0.40	3.1	0.47
$\text{Cl}^-$	1.1	21	11
$\text{SO}_4^{2-}$	1.0	22	13

Electrophoretic conditions and a sample are identical to those in Fig. 3

%, 9.0–63%であり、再現性が悪くなった。両側試料注入法の場合には、CCD の位置が重要であることが確認された。

### 2. 10. 3 試料バイアルサイズ

2. 10. 1 及び 2. 10. 2 では陰イオン用試料バイアルとして、陽イオン用試料バイアル(長さ 31 mm, 上部内径 6 mm)より内径が小さく、長いもの(長さ 59 mm, 上部内径 6 mm)を用いた。この場合、試料注入時、陰極及びキャピラリーと試料バイアルとが接触すると、電極先端とキャピラリー先端との距離が変化し、電氣的に注入される分析目的成分量が変動する可能性がある。そこで、接触による注入量変動を防ぐために、陰イオン用試料バイアルを BGE 用バイアル(長さ 55 mm, 上部内径 16 mm)に変更した。CCD の位置は、陰極から 30 cm とした。

その結果、陰イオンについて RSD は、泳動時間 0.17–0.19%、ピーク面積 0.66–1.5%、ピーク高さ 0.46–0.76% であり、再現性が改善されたが、陽イオンの分離が悪かった。以上の結果より、陰イオン用試料バイアルとして BGE 用バイアルを用い、また、CCD の位置を陰極側 20 cm とし、陽イオン分離に十分な有効長とすることで、陽イオン及び陰イオンとも再現性の良い結果が得られることが期待された。したがって、これを行った後、検量線の作成を試みる必要があるが、片側注入法を用いた陽イオン及び陰イオンを個別分析することで CCD の特性を理解することが重要と考えた。そこで、まず、バイアスを考慮する必要がない HDI(真空吸引法)による個別分析、次いで、EKI による個別分析、最後に HDI による塩試料の分析について検討した。

### 2. 10. 4 BGE の種類

HDI(3 秒)を用い、(A)、(B)の BGE について検討した。

その結果、泳動液(A)の場合、陽イオンの泳動順序は  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  であり、 $K^+$  は他の陽イオンと離れて検出されたが、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  の泳動時間の差は小さかった。(B)の場合、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$  の順に検出されたが、 $Ca^{2+}$  と  $Na^+$  との泳動時間の差が(A)と比較して大きかった。食用塩の場合、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  の濃度は、それぞれ  $Na^+$  濃度の約 1/130 及び 1/80 と低い。従って、(B)の方が塩の分析には適していると考えられたので、以後の実験では、(B)の BGE を用いた。ただ、特に  $Na^+$  と  $Mg^{2+}$  との分離につい

ては、さらに検討する余地がある。

### 2. 10. 5 HDI による陽イオン、陰イオンの個別分析

有効長を 60 cm とし、HDI(3 秒)により陽イオン、陰イオンを個別に分析し、再現性を求め、検量線を作成した。

その結果、泳動時間、ピーク面積、ピーク高さの RSD は、陽イオン(0–1.0 mg/L)については、0–0.31%、0.20–5.8%、0.50–3.0% であり、陰イオン(0–4.5 mg/L  $Cl^-$ , 0–0.56 mg/L  $SO_4^{2-}$ -S)については、0.10–0.48%、1.2–4.5%、1.5–2.5% であり、再現性の良い結果が得られた。検量線を作成したところ、ピーク面積の相関係数  $r$  は、陽イオンについては、 $r=0.9146–0.9984$  (0–1.0 mg/L)、陰イオンについては、 $r=0.9970–0.9996$  (0–4.5 mg/L  $Cl^-$ , 0–0.56 mg/L  $SO_4^{2-}$ -S) であり、比較的直線性の良い結果が得られた。なお、LOD(S/N=3)は、0.021 mg/L ( $Na^+$ )、0.023 mg/L ( $K^+$ )、0.012 mg/L ( $Mg^{2+}$ )、0.018 mg/L ( $Ca^{2+}$ )、0.045 mg/L ( $Cl^-$ )、0.009 mg/L ( $SO_4^{2-}$ -S) であった。これら LOD は、 $Na^+$  及び  $Cl^-$  については十分であるが、他の微量成分については、塩によっては不十分であり、さらに高感度化する必要がある。

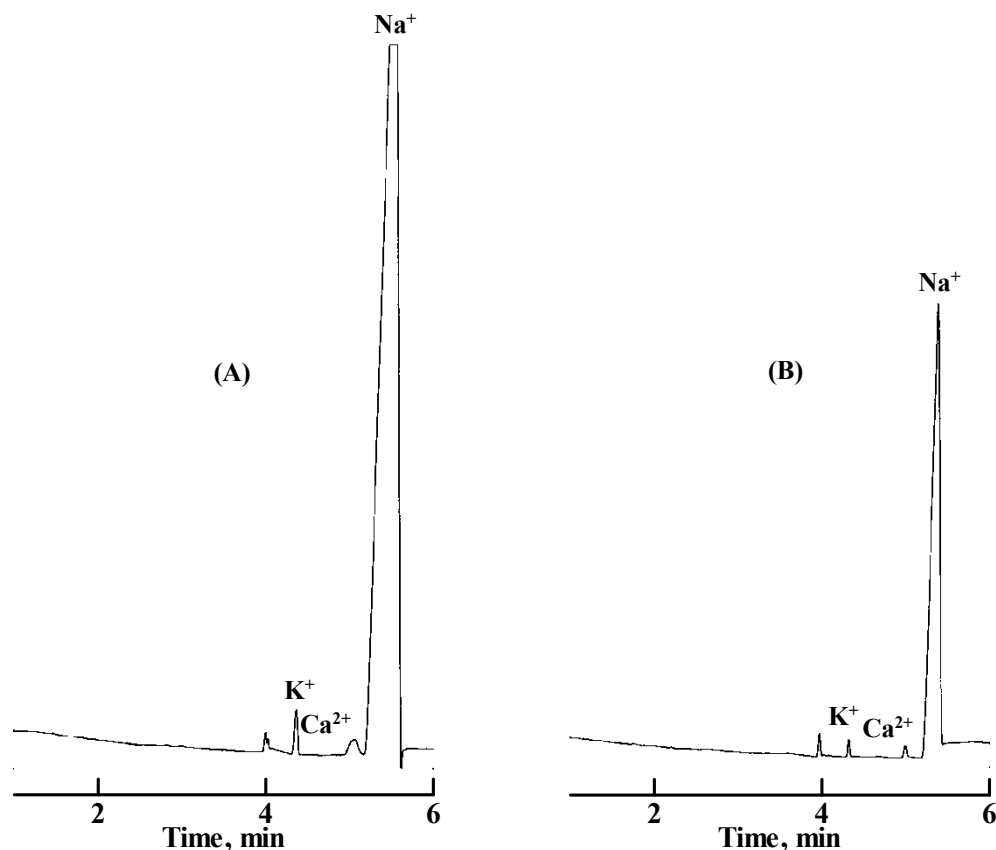
### 2. 10. 6 EKI による陰イオンの分析

電氣的注入法(1 kV, 10 秒)により陰イオンを分析し、再現性を求め、検量線の作成を試みた。陰イオン(0–4.5 mg/L  $Cl^-$ , 0–0.56 mg/L  $SO_4^{2-}$ -S)の泳動時間、ピーク面積、ピーク高さの RSD は、0.10–0.48%、1.2–4.5%、1.2–9.6% であり、再現性の良い結果が得られた。しかし、検量線を作成したところ、二次曲線となり、直線性の良いものは得られなかった。この原因として、2. 10. 1 で述べたように分析目的成分濃度が高くなるにつれて、試料溶液の電気伝導度も高くなり、その結果電場の強さが弱まり、分析目的成分注入量が減少したためであると考えられる。

### 2. 10. 7 塩の分析

有効長を 60 cm とし、HDI(1, 3 秒)により、塩(Aoiumi, 0.1 g/L)中の陽イオン分析を試みた。Fig. 4 に示すように、吸引時間 1 秒の場合、 $Na^+$  については十分なピーク高さが得られた。 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  については、ピーク高さは小さいが、分離検出されたが、 $Mg^{2+}$  は検出されなかった。3 秒の場合、 $Na^+$ 、 $K^+$  については十分なピーク高さが得られたが、 $Ca^{2+}$  のピークはブロードであり、 $Mg^{2+}$  は検出されなかった。 $Na^+$  と  $Mg^{2+}$  との分離及び  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  の感度を改善する必要がある。





**Fig. 4.** Electropherogram of the separation of inorganic cations in a salt BGE, (B) a mixture of 25 mmol/L 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, 25 mmol/L L-histidine, and 2 mmol/L 18-crown-6; CCD position, 60 cm from the anode; Sample, 0.1 g/L salt (Aoiumi); HDI (vacuum 50 kPa), (A) 3 s (33 nL) and (B) 1 s (11 nL). Other electrophoretic conditions are identical to those in Fig. 3

### 3. 結言

昨年度の助成では、「電氣的注入法(EKI)により試料をキャピラリー両端より導入し、高感度検出器である電気伝導度検出器(CCD)を用い、主成分イオンの高感度同時定量」を目標として研究を行ってきた。しかし、塩中では、NaClと比較し、その他主成分イオン濃度は非常に低濃度であり、成分間の濃度差が大きく、現在のところ、十分な成果が得られていない。今年度は4で示すように、本報告書でまとめた文献を参考に基礎的な実験を行い、CCDの特性を十分把握した後、試料注入法及びBGE等について検討し、塩中主成分イオンの超高感度同時定量法を確立したい。

本研究を行うにあたり助成頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団及び本実験に協力頂いた本学の吉田周平学生に感謝申し上げます。

### 4. 今後の計画

2.5.2で触れたように、Wanら<sup>48)</sup>(2004)は、CCDを検出器として、ヒト血清及び尿中の無機陽イオン及び陰イオンを個別に定量する方法を提案した。彼らは、血清及び尿中のこれらイオン濃度をもとに標準溶液を調製したが、これらの値は、 $\text{Na}^+=35 \text{ mg/L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}=0.24 \text{ mg/L}$ 、 $\text{Ca}^{2+}=1.2 \text{ mg/L}$ 、 $\text{Cl}^-=42 \text{ mg/L}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}=4.8 \text{ mg/L}$ であった。これらの値をTable 1の値と比較すると $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ についてはほぼ同様の濃度であった。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$ については、塩中濃度のほうが低い(Aoiumi中 $\text{Ca}^{2+}$ は約1/5、Hakatanoshio中 $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$ は約1/30)が、 $\text{Mg}^{2+}$ については含有量が多い塩についてはほぼ同様の濃度であった。一方、LODは、 $\text{Na}^+=0.017 \text{ mg/L}$ 、 $\text{K}^+=0.018 \text{ mg/L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}=0.012 \text{ mg/L}$ 、 $\text{Ca}^{2+}=0.014 \text{ mg/L}$ 、 $\text{Cl}^-=0.020 \text{ mg/L}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}=0.025 \text{ mg/L}$ であり、岩塩を除き、Wanらの分析法を用いれば、塩中の分析目的成分を陽イオン、陰イオン別に定量できるので

はないかと考える。

彼らの方法の陽イオン分析条件は以下の通りである。キャピラリー:内径 25  $\mu\text{m}$ 、全長 60 cm、有効長 54 cm; BGE:6.5 mmol/L マレイン酸+7.5 mmol/L アルギニン (pH 5.5); 試料注入:EKI(5 kV, 6 秒); 泳動電圧:20 kV. 陰イオン分析条件は以下の通りである。キャピラリー:内径 25  $\mu\text{m}$ 、全長 52 cm、有効長 46 cm; BGE:13 mmol/L マレイン酸+15 mmol/L アルギニン (pH 5.5); 試料注入:EKI (-5 kV, 6 秒); 泳動電圧:-20 kV. CCD の周波数は 100 kHz である。標準溶液は保存溶液(陽イオン, 陰イオンとも 100 mmol/L)を BGE で適宜希釈し、血清及び尿試料は BGE で 100 倍に希釈した。なお、1%精度を達成するために、標準溶液及び試料溶液には、内標準として、陽イオン分析には 0.5 mmol/L  $\text{Li}^+$ 、陰イオン分析の場合には 0.2 mmol/L  $\text{NO}_2^-$ を添加した。

陰イオン分析用 BGE の濃度が高いのは、 $\text{NO}_3^-$ と  $\text{SO}_4^{2-}$ との分離を改善するためである。塩試料では  $\text{NO}_3^-$ について考慮する必要がないため、陰イオン分析においても陽イオン分析と同じ BGE を使用できるのではないかと考える。したがって、まず上記条件により、塩試料中の陽イオン及び陰イオンを個別に定量する。次いで、CCD をキャピラリーの中央付近に設置し、陽イオン分析用 BGE 及び両側試料注入法(EKI)を用いれば、陽イオン、陰イオンの同時定量が可能ではないかと考える。

2. 5. 2で述べたように、Tanyanyiwa ら<sup>47)</sup>(2002) は、EOFを抑制し、試料をBGEで調製すれば、両側同時EKIにより、無機陽イオン及び陰イオンの同時定量あるいは連続定量が可能であることを示した。連続定量とは、初めに陽イオンを分析し、次いで、同じBGEを用い、極性を逆にして電圧を印加することにより、陰イオンを分析するものである。しかし、再現性や検量線等については触れていない。陽イオン及び陰イオンの同時定量の場合には、両側BGEの交換頻度についても検討する必要がある。個別定量の場合には、分析目的成分は、検出後、検出器側BGEバイアル内に移動し、2回目の分析においてキャピラリー内に戻ることはない。しかし、濃度が低いため問題にはならないかもしれないが、同時定量の場合には、分析目的成分は、両側のBGEバイアル内に移動し、2回目の分析においてキャピラリー内に戻されて検出される可能性がある。

なお、EKIによる両側試料注入法により期待した結果が得られなかった場合には、HDIを用い、陽イオンを分析後、極性を変えて陰イオンを分析する(上記の連続定量)試みも行ってみたい。

現在まで、CCD においてもっとも一般的に用いられているMES、HIS混合溶液をBGEとして実験を行ってきた。しかし、CCDを適切に使用するためには、その独特の特性を十分理解する必要がある<sup>11)</sup>(2009)。今後は、今回調べた文献から得た情報について詳細に検討し、CZEによる塩中の陽イオン、陰イオン高感度同時定量法を確立したい。

## 5. 文 献

- 1) 尾方 昇: 日本海水学会誌 (*Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*), **57**, 17 (2003).
- 2) 野田 寧: Salt & Seawater Science Seminar 2014, "塩試験方法の変遷と特徴".
- 3) 一色健司: "海と湖の化学", 第1版, 宗林由樹, 一色健司編, p. 14 (2005), (京都大学学術出版会).
- 4) 田中喜秀, 山本冴音, 脇田慎一, 齊藤惠逸: *Chromatography*, **34**, 89 (2013).
- 5) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electroanalysis*, **16**, 2009 (2004).
- 6) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electrophoresis*, **25**, 3387 (2004).
- 7) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electrophoresis*, **25**, 3398 (2004).
- 8) J. G. A. Brito-Neto, J. A. F. da Silva, L. Blanes, C. L. do Lago: *Electroanalysis*, **17**, 1198 (2005).
- 9) A. Padaruskas: *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 132 (2006).
- 10) P. Kubáň, C. J. Evenhuis, M. Macka, P. R. Haddad, P. C. Hauser: *Electroanalysis*, **18**, 1289 (2006).
- 11) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Anal. Chim. Acta*, **607**, 15 (2008).
- 12) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electrophoresis*, **30**, 176 (2009).
- 13) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electrophoresis*, **32**, 30 (2011).
- 14) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electrophoresis*, **34**, 55 (2013).
- 15) P. Kubáň, P. C. Hauser: *Electrophoresis*, **36**, 195 (2015).
- 16) J. Sáiz, I. J. Koenka, T. D. Mai, P. C. Hauser, C. García-Ruiz: *Trends in Analytical Chemistry*, **62**, 162

- (2014).
- 17) T. D. Mai, T. T. T. Pham, H. V. Pham, J. Sáiz, C. G. Ruiz, P. C. Hauser: *Anal. Chem.*, **85**, 2333 (2013).
- 18) E. -G. Kobrin, H. Lees, M. Fomitšenko, P. Kubáň, M. Kaljurand: *Electrophoresis*, **35**, 1165 (2014).
- 19) K. Bächmann, I. Haumann, T. Groh: *Anal. Bioanal. Chem.*, **343**, 901 (1992).
- 20) O. V. Krokhin, H. Hoshino, O. A. Shpigun, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr. A*, **776**, 329 (1997).
- 21) J. Kobayashi, M. Shirao, H. Nakazawa: *J. Liq. Chromatogr.* **21**, 1445 (1998).
- 22) P. Kubáň, P. Kubáň, V. Kubáň: *J. Chromatogr. A*, **836**, 75 (1999).
- 23) T. Soga, G. A. Ross: *J. Chromatogr. A*, **834**, 65 (1999).
- 24) X. Xiong, S. F. Y. Li: *Electrophoresis*, **19**, 2243 (1998).
- 25) T. Chvojka, I. Jelinek, F. Opekar, K. Štulík: *Anal. Chim. Acta*, **433**, 13 (2001).
- 26) C. Johns, W. Yang, M. Macka, P. R. Haddad: *J. Chromatogr. A*, **1050**, 217 (2004).
- 27) P. Kubáň, B. Karlberg: *Anal. Chem.*, **70**, 360 (1998).
- 28) I. Haumann, J. Boden, A. Mainka, U. Jegle: *J. Chromatogr. A*, **895**, 269 (2000).
- 29) P. Jandik, W. R. Jones: *J. Chromatogr. A*, **546**, 431 (1991).
- 30) G. Bondoux, P. Jandik, W. R. Jones: *J. Chromatogr. A*, **602**, 79 (1992).
- 31) H. Shi, R. Zhang, G. Chandrasekher, Y. Ma: *J. Chromatogr. A*, **680**, 653 (1994).
- 32) A. Padaruskas, V. Olšauskaitė, G. Schwedt: *J. Chromatogr. A*, **800**, 369 (1998).
- 33) A. Padaruskas, V. Olšauskaitė, V. Paliulionytė: *J. Chromatogr. A*, **829**, 359 (1998).
- 34) A. Padaruskas, V. Paliulionytė, B. Pranaityte: *Anal. Chem.*, **73**, 267 (2001).
- 35) D. Durkin, J. P. Foley: *Electrophoresis*, **21**, 1997 (2000).
- 36) V. Unterholzner, M. Macka, P. R. Haddad, A. Zemann: *Analyst*, **127**, 715 (2002).
- 37) P. Kubáň, B. Karlberg, P. Kubáň, V. Kubáň: *J. Chromatogr. A*, **964**, 227 (2002).
- 38) P. Kubáň, P. Kubáň, V. Kubáň: *Electrophoresis*, **23**, 3725 (2002).
- 39) P. Kubáň, P. Kubáň, P. C. Hauser, V. Kubáň: *Electrophoresis*, **25**, 35 (2004).
- 40) T. Feng, Y. Bingcheng, G. Yafeng: *Chin. J. Anal. Chem.*, **33**, 313 (2005).
- 41) P. M. Flanigan, IV, D. Ross, J. G. Shackman: *Electrophoresis*, **31**, 3466 (2010).
- 42) P. Kubáň, E. -G. Kobrin, M. Kaljurand: *J. Chromatogr. A*, **1267**, 239 (2012).
- 43) T. D. Mai, P. C. Hauser: *J. Chromatogr. A*, **1267**, 266 (2012).
- 44) I. -O. Neaga, B. C. Iacob, E. Bodoki: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **37**, 2072 (2014).
- 45) J. Sáiz, M. T. Duc, I. J. Koenka, C. Martín-Alberca: *J. Chromatogr. A*, **1372**, 245 (2014).
- 46) P. Kubáň, M. Greguš, E. Pokojová, J. SkřičKová, F. Foret: *J. Chromatogr. A*, **1358**, 293 (2014).
- 47) J. Tamyanyiwa, S. Leuthardt, P. C. Hauser: *J. Chromatogr. A*, **978**, 205 (2002).
- 48) Q. J. Wan, P. Kubáň, J. Tamyanyiwa, A. Rainelli, P. C. Hauser: *Anal. Chim. Acta*, **525**, 11 (2004).
- 49) M. Greguš, F. Foret, P. Kubáň: *Electrophoresis*, **36**, 526 (2015).

## Highly Sensitive Instrumental Analytical-Method for the Simultaneous Determination of Principal Components in Salts

Keichi Fukushi

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

### Summary

We investigated a capillary zone electrophoresis (CZE) method with a contactless conductivity detector (CCD) for the determination of major constituents, such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{SO}_4^{2-}$ , in salts. The total capillary length was 80 cm and its inner diameter was 50  $\mu\text{m}$ . The position of the CCD was freely changeable. Applied voltage was set at 20 kV with the sample inlet side as the anode for cations and the cathode for anions. The following background electrolyte (BGE) was used: (A) a mixture of 9 mM L-histidine, 15 mM malic acid, and 2 mM 18-crown-6 and (B) a mixture of 25 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 25 mM L-histidine, and 2 mM 18-crown-6. The difference between the migration time for  $\text{Ca}^{2+}$  and that for  $\text{Na}^+$  using the BGE (B) was larger than that using the BGE (A). The BGE (B) is suitable for salts analysis. Linear calibration graphs for peak area were obtained when the standard solutions of cations and anions were separately analyzed using the BGE (B) and vacuum injection method (sample injection period 3 s (33 nL)); correlation coefficient,  $r=0.9146-0.9984$  for cations and  $r=0.9970-0.9996$  for anions. The limits of detection (LODs) were 0.012–0.023 mg/l for cations and 0.009–0.045 mg/l for anions at a signal-to-noise ratio of three. The values of the relative standard deviation (RSD,  $n=3$ , intra-day) of migration time, peak area, and peak height were, respectively, 0.0–0.31%, 0.20–5.8%, and 0.10–3.0% for cations (0–1.0 mg/L) and 0.10–0.48%, 1.2–4.5%, and 1.5–2.5% for anions (0–4.5 mg/L  $\text{Cl}^-$ , 0–0.56 mg/l  $\text{SO}_4^{2-}$ –S). The solution of commercially available salt (0.1 g/L) was vacuum injected into the apparatus for 1 s and 3 s. When the injection period was 1 s, the high  $\text{Na}^+$  peak and low  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  peaks were observed with base line separation but  $\text{Mg}^{2+}$  was not detected. When the injection period was 3 s, the higher  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  peaks were observed but  $\text{Ca}^{2+}$  peak became broad.  $\text{Mg}^{2+}$  was not detected. When the standard solutions were analyzed using electrokinetic injection (EKI), the RSDs were inferior to those for vacuum injection. In addition, linear calibration graphs could not be obtained both for cations and anions using EKI. We intend to examine sample injection procedure, CCD position, BGE component, salt concentration to establish the sensitive CZE for the simultaneous determination of the principal components in salts.