

キャピラリー電気泳動法による 環境試料中の無機陰イオンの定量

高柳 俊夫¹⁾・和田 栄子¹⁾・大島 光子¹⁾・本水 昌二¹⁾

Determination of Inorganic Anions in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis

Toshio TAKAYANAGI, Eiko WADA, Mitsuko OSHIMA,
and Shoji MOTOMIZU

Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University

1. はじめに

環境水中の陰イオンの存在量、構成比、分布は、人間の活動や自然の営みを的確に示す指標として重要である。例えば、雨水中の硫酸イオン、硝酸イオンなどは主に化石燃料の消費に起因しており、消費地に近接した局地的問題であると同時に、風などによる運搬、すなわち、広域的な拡散とも密接に関連した問題でもある。また、河川水中の炭酸イオンは上流域における石灰岩質の存在や人間活動による酸性化に伴う流出を反映している。さらに、リン酸イオンや有機酸イオンなどは、消費社会を反映した汚染指標物質となっている。

これら陰イオンの測定法としては、イオンクロマトグラフィー法が通常よく用いられているが、著者らは近年脚光を浴びるようになったキャピラリー電気泳動法に着目し、環境試料中の無機陰イオンの測定法について検討を行った。キャピラリー電気泳動法による陰イオンの測定法では、これまで、主にクロム酸イオンが間接吸光検出試薬とし

て用いられている¹⁻³⁾が、有害性から使用しないことが望ましい。フタル酸イオンを間接吸光試薬として用いる吸光法⁴⁾、蛍光法⁵⁾が提案されているが、本研究では、環境負荷の少ない有機試薬を間接吸光試薬として用いる、迅速で簡便な計測システムの構築を行った。

2. キャピラリー電気泳動法(CE)について

電気泳動法は古くから知られている分離法の一つである。電解質を含む泳動液に陽極、陰極を浸して電圧を印加すると、分析対象物質はそれぞれのイオン固有の移動度に従って泳動し、分離される。分析対象イオンの移動度は、泳動液組成、あるいはプロトン付加・脱離反応、錯形成反応、ミセル抽出反応等により大きく変わりうるので、通常は“見かけの移動度 (apparent mobility)”となる。分離されたイオンまたは分子種の光吸収、蛍光等の測定からそれら成分を定量することが可能である。キャピラリーを用いる電気泳動法、い

¹⁾ 岡山大学理学部化学科

いわゆるCEは、DNAのシーケンス決定等にも用いられるきわめて有用な方法である。電気泳動を行う媒体として、内径50 μ m程度の熔融シリカキャピラリーにつめた電解質泳動液を用いることで、ジュール熱の放散が容易となり、高い分離効率が得られることから、近年、キャピラリー電気泳動法は注目を集めるようになった。また、この測定法の利点として、分離能が極めて良いことに加え、有機溶媒等を用いない水溶液系で測定が行えること、測定に必要なサンプル量が微量であること、分析時間が短いこと等、魅力的な分析法である。既に成書^{6, 7)}、総説^{8, 9)}も出版されている。

キャピラリー電気泳動法の装置をFig. 1に示す。分離場となる熔融シリカキャピラリー、泳動液、高電圧電源、および、検出器からなる簡単なシステムである。キャピラリー内における分離の概念図をFig. 2に示す。通常、シリカキャピラリー内壁の表面シラノール基は一部解離している ($\text{-SiOH} \rightleftharpoons \text{-SiO}^- + \text{H}^+$) ため負に帯電し、泳動液内の対陽イオン (Na^+ 等) と電気二重層を形成している。キャピラリーの両端に高電圧を印加すると、キャピラリー内の溶液はカソード側 (一極側) に電気浸透流として流れる。電気浸透流は断面方向での速度差が小さい (栓流という) ので、物理的なポンプを用いる通常の“流れ (層流という)”を用いる分析法と異なり、溶質の分散・混合がおこりにくい。溶液内の溶質の分散は主に拡散係数のみに従うため、ピークはシャープで高い分離効率を得ることができる。また、分離のメカニズムとして、クロマトグラフィーにおける充填カラムでの二相間分配現象を必要とせず、電荷、質量、水との相互作用等に応じた固有の電気泳動移動度、あるいは錯形成、ミセル抽出分配平衡等による移動度の変化等を活用することが特徴である。

通常のキャピラリー電気泳動法では、無機陰イオンは電気浸透流の方向と逆向きに泳動し、その

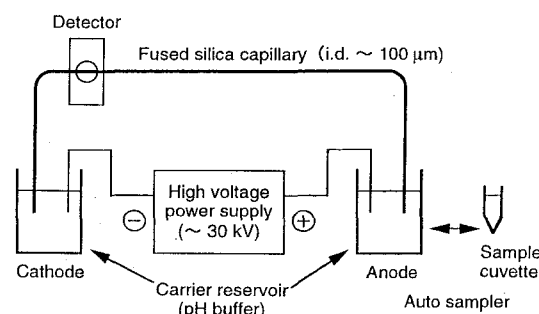


Fig. 1 System diagram of capillary electrophoresis.

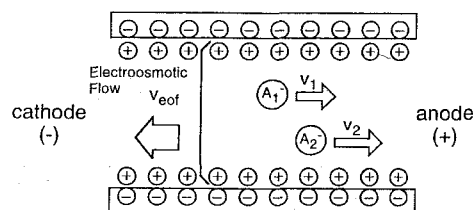


Fig. 2 Electroosmotic flow and migration behavior of anionic substances.
Velocity of substances; A_1^- , $v = v_{eof} - v_1$;
 A_2^- : $v = v_{eof} - v_2$

泳動速度が電気浸透流の速度よりも大きいイオンもある。このようなイオンは検出器に到達することはできないので、検出することもできない。しかし、試料の注入を陰極側とし検出器を陽極側にすることで検出が可能となる。また、電気浸透流の抑制、逆転によりイオンの分離性能の向上を行うために、泳動液のpH制御によるシラノール基解離の抑制 (Fig. 3 a), 内面コーティングによるシラノール基の除去 (Fig. 3 b), 陽イオン性界面活性剤添加による電気浸透流の方向逆転 (Fig. 3 c) 等が用いられる。検出方法としては吸光度法が一般に用いられているが、無機陰イオン自身の吸光係数が小さいために、良好な検出感度が得られない。そこで、液体クロマトグラフィーなどで用いられている間接吸光検出法を用いて感度の向上を図ることができる。本法では、ベースラインの安定性、定量範囲等を考慮し、内面コーティングキャピラリーと多価の芳香族陰イオンを間接吸光試薬として用いる系に関して検討を行った。

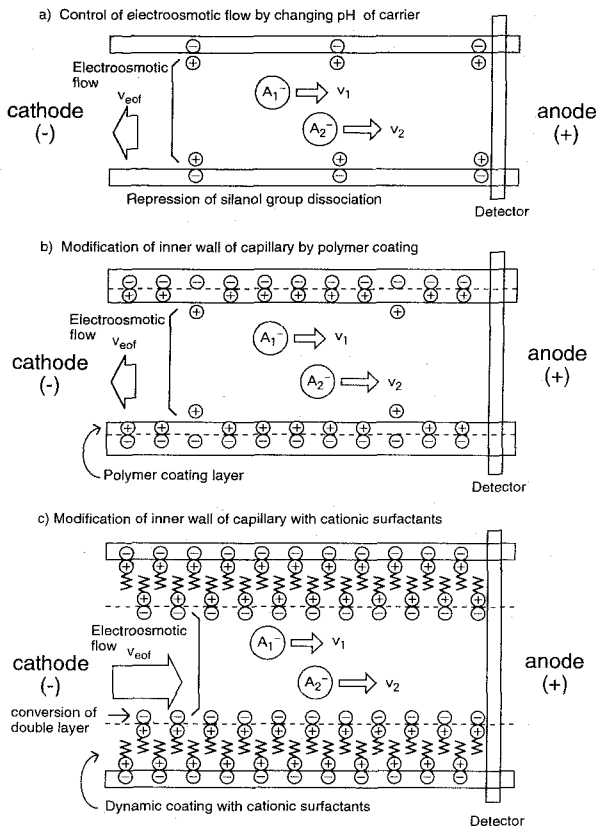


Fig. 3 Comparison of modification of capillary wall.

3. 実験

Applied Biosystems 270A-HT キャピラリー電気泳動システムを用い、Hitachi D-2500 Chromato-Integrator によりデータ処理、解析を行った。装着したキャピラリーとしては、全長78cm、検出器までの有効長53cm、内径50 μ mのポリマーコーティング型キャピラリー (ProFocus™, Applied Biosystems) を使用した。実際試料の測定では、分析時間の短縮のために全長55cm、検出器までの有効長34cmのものを使用した。泳動液には、芳香族陰イオン系間接吸光試薬を含む緩衝液 (pH 8.4) を用いた。試料は減圧法によりカソード側から3秒間 (約9 nl) 注入し、30℃、15kVで電気泳動を行い、間接法により230nmで吸光検出した。各種陰イオンは、試薬特級のナトリウム塩を、イオン交換/蒸留および超純水精製装置 (Milli-Q Lab system, Millipore社) で精製した水に溶解して調製した。実際試料は、孔径

0.20 μ m メンブランフィルターでろ過した試料をキャピラリーに注入して分析を行った。

4. 結果と考察

4. 1 陰イオンの泳動挙動

Fig. 4に、9種類の陰イオン (各 8×10^{-5} M) を含む試料のフェログラムを示す。データ処理の都合上、シグナルを上向きにしている。9種陰イオンは良好に分離され、12分以内での測定が可能である。陰イオンの溶出する順序は、臭化物イオン、塩化物イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン、過塩素酸イオン、硫酸イオン、フッ化物イオン、リン酸イオン、炭酸イオンの順であり、クロム酸イオンを用いる間接吸光法^{1, 2)}と同じである。溶出時間から各陰イオンの電気泳動移動度を次式(1)により求めた。

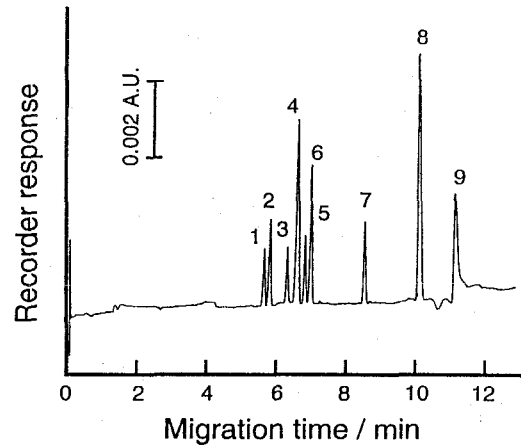


Fig. 4 Typical electropherogram of anions. Sample contains 9 kinds of 8×10^{-5} M anions. 1, Br⁻; 2, Cl⁻; 3, NO₃⁻; 4, SO₄²⁻; 5, ClO₄⁻; 6, C₂O₄²⁻; 7, F⁻; 8, HPO₄²⁻; 9, HCO₃⁻.

$$\mu_{ep}' = (L_d \times L_t / V) \cdot \left(\frac{1}{t_{std}} - \frac{1}{t_i} \right) \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (1)$$

L_d : 検出器までの長さ

L_t : キャピラリーの全長

V : 印加電圧

t_{std} : 内部標準物質 (臭化物イオン) の泳動時間

t_i : 目的イオン種 i の泳動時間

電気泳動移動度 μ_{ep} の値は陰極側へ泳動するとき、すなわち陽イオンを正の値とするので、陰イオンの移動度は負の値となる。ここで求めた移動度 μ_{ep}' は、臭化物イオンを内部標準物質として式(1)より求めた相対移動度であり正の値となる。電気泳動移動度の絶対値は、臭化物イオンが最も大きな値をとるため、相対移動度の大きなイオンほど実際の移動度の絶対値の値は小さい。その模式図を Fig. 5 に示した。得られた相対移動度とストークス半径との関係を Fig. 6 に示す。1価陰イオンについて良好な直線性がみられ、イオン半径の大きなイオンほど相対移動度が大きく、実際の泳動速度は小さい。従って、本システムでの電気泳動移動度には、イオンそのものの電荷/質量比だけでなく、陰イオンの水和の度合いも大きく関与することを示唆している。

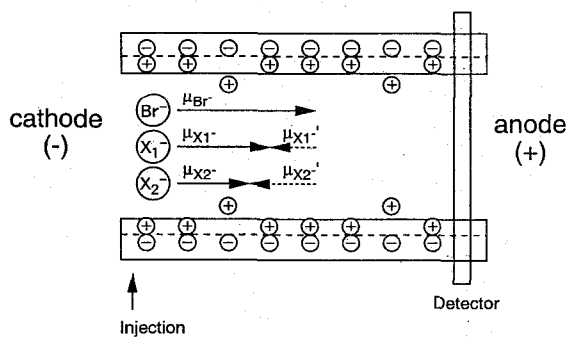


Fig. 5 Relative mobilities of anions with Br⁻ as an internal standard.

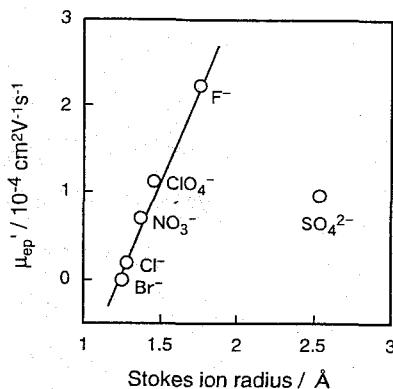


Fig. 6 Relative mobility of anions vs. Stokes ion radius

4. 2 陰イオンの分離に関する諸条件の検討

(1) 印加電圧の効果：キャピラリーの両端に印加

する電圧を10, 15, 20, 25kVで検討を行った。電圧が高いほど分析時間を短縮できるが、ベースラインの安定性が悪くなり（ノイズが大きくなり、S/N比は小さくなる）、ピーク間の分離も悪くなった。分析時間とベースラインを勘案し、15kVを選択した。なお、各陰イオンの相対移動度 (μ_{ep}') は電圧の影響を受けず、ほぼ一定の値を示した。これは、ジュール熱の放散が充分に行われ、泳動液の温度も電圧によらずほぼ一定となっていることを示している。

(2) 温度の影響：30, 40, 50℃で検討を行った。溶媒である水の粘性の低下により温度が高いほど分析時間は短くなり、相対移動度 (μ_{ep}') も小さくなる。この場合、ピークの広がり、ベースラインの安定性は変わらないが、イオンによっては移動度の低下の度合いが異なり、NO₃⁻とSO₄²⁻とのピークが重なる。従って、実際の分析を考慮して30℃を選択した。

(3) 注入時間の影響：注入時間を1～5秒で検討した。注入時間とピーク面積は直線性を示したが、4, 5秒の注入では、ピークの広がりによりイオンの各ピークの分離性が低下し、分別定量が困難となったので、3秒間の注入時間に設定した。なお、この場合の試料注入量は約9 nlとなる。

(4) 測定波長の検討：間接吸光試薬を含む泳動溶液の吸収スペクトルは206nmに極大吸収波長を有するので、この近辺の波長での測定が高感度検出に好都合である。200, 230, 260nmで検討を行ったが、200nmではベースラインの乱れ、260nmでは、感度の低下が甚だしいので、230nmに設定した。

4. 3 検量線および検出限界

9種類の陰イオンについて検量線を作成したところ、0～4×10⁻⁴mol dm⁻³で良好な直線性を示した。Cl⁻, NO₃⁻, および、SO₄²⁻の検量線の例を

Fig. 7 に示した。また、これらイオンの検出限界は、 $(S/N) = 3$ の時、 $2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (HPO_4^{2-}) $\sim 4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (NO_2^-) であった。なお、この測定システムはリン酸イオンに対して特に高感度であり、富栄養塩（窒素、リン化合物）の分離定量に好都合である。

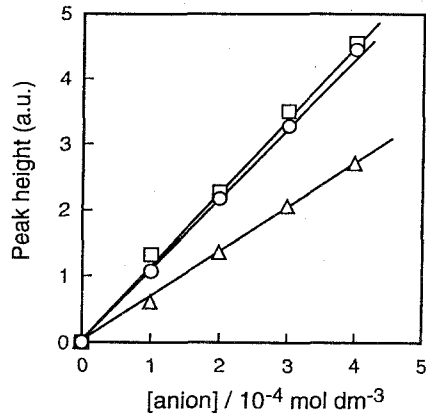


Fig. 7 Calibration graphs.
 O : Cl⁻, Δ : NO₃⁻, □ : SO₄²⁻

4. 4 実際試料の測定への応用

本計測システムを、河川水・雨水・水道水・排水に適用し、測定を行った。岡山大学北団地の排水と座主川の5日間の連続測定結果をTableに示す。また、6月27日の座主川および排水試料のフェログラムをFig. 8に示す。河川水の塩化物イオン、硝酸イオン、および、硫酸イオンはイオンクロマトグラフィーで測定した値と一致している。河川水においてはこれらのイオン濃度は、日々の変動が小さい。一方、排水中の陰イオンは総じて高い濃度を示しており、日々の変動が大きく、人間生活と関連深いリン酸イオンも河川水に比べ多量に検出されている。本測定法によれば、メンブランフィルターを用いる簡便な濾過と短時間で各種無機陰イオンを同時定量することが可能である。

Table Analytical results of anions in river water and waste water. (year of 1995, conc. / p.p.m.)

analyte ion	Jun. 26th		Jun. 27th		Jun. 28th		Jun. 29th		Jun. 30th	
	Z*	W**	Z	W	Z	W	Z	W	Z	W
Cl ⁻	5.78	33.0	5.03	17.7	4.11	15.7	3.65	13.8	3.69	17.4
NO ₂ ⁻	---	6.67	-	2.91	-	-	-	-	-	-
NO ₃ ⁻	4.07	44.5	2.60	15.6	2.52	12.9	1.56	10.9	1.66	14.0
SO ₄ ²⁻	6.94	19.7	6.80	16.2	6.66	12.6	5.59	10.1	7.09	12.3
F ⁻	0.24	-	-	-	1.40	0.88	-	0.60	0.21	-
HPO ₄ ²⁻	-	4.67	-	1.55	-	2.27	-	2.11	-	3.20

* Zasu river ** Waste water of Okayama University North District --- No detection

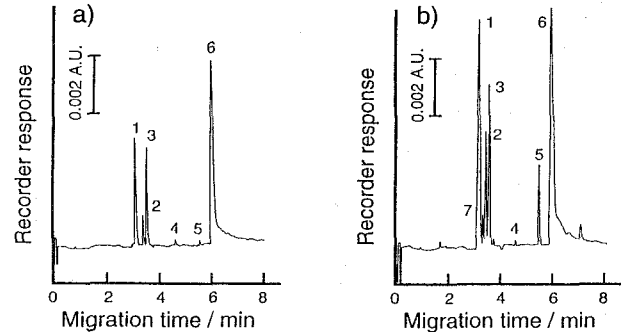


Fig. 8 Electropherograms of anions in a) river water and b) waste water. Sampling date is Jun. 27th, 1995.

1, Cl⁻; 2, NO₃⁻; 3, SO₄²⁻; 4, F⁻; 5, HPO₄²⁻; 6, HCO₃⁻; 7, NO₂⁻.

5. まとめ

近年、急速な実用化への展開を示しているキャピラリー電気泳動法を用いた陰イオンの分析法について検討した。本法は短時間での同時測定、微量サンプル量での測定に加え、自動化が可能である。本研究で提案した計測システムは他の水溶液中の各種無機・有機イオン性物質の分析にも対応でき、汎用性の高い分析法といえる。また、富栄養塩の窒素、リンの排水基準にも充分通用できる感度を有する分析法である。

参考文献

- 1) N. J. Benz, J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A*, **671**, 437 (1994).
- 2) B. J. Wildman, P. E. Jackson, W.R. Jones, and P.G.Alden, *J. Chromatogr. A*, **546**, 459 (1991).
- 3) C. Stathakis, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, **66**, 2110 (1994).
- 4) E. D. Zlotorzynska and J. F. Dlouhy, *J. Chromotogr. A*, **671**, 389 (1994).
- 5) L. Gross and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. A*, **480**, 169 (1989).
- 6) "化学の領域選書 3 ゾーン電気泳動" 木曾義之, 南江堂 (1972).
- 7) Handbook of Capillary Electrophoresis, Ed. by J. P. Landers, CRC Press (1994).
- 8) C. A. Monnig and R. T. Kennedy, *Anal. Chem.*, **66**, 280R (1994).
- 9) W. Buchberger, S. M. Cousins and P. R. Haddad, *Trends in Analytical Chemistry*, **13**(8) 313(1994).

Determination of Inorganic Anions in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis

Toshio TAKAYANAGI, Eiko WADA, Mitsuko OSHIMA,
and Shoji MOTOMIZU

Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University

Abstract

Several inorganic anions in environmental water samples, such as river, rain, tap, and waste waters, were determined by capillary electrophoresis with indirect photometric UV detection. In this study, the use of a polymer coated silica capillary and an anionic organic photometric reagent realized a stable baseline and short analytical time. Nine kinds of anions, Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, ClO_4^- , F^- , HPO_4^{2-} , and HCO_3^- , were well separated and detected within 12 minutes. Calibration graphs for the anions showed a good linearity in the range of 0 to 4×10^{-4} mol dm^{-3} . Detection limits of the anions were 2×10^{-6} mol dm^{-3} (HPO_4^{2-}) to 4×10^{-5} mol dm^{-3} (NO_2^-). Anions in river water (Zasu river) and waste water (Okayama University, North district) were measured over 5 days. The waste water contained various kinds of anions, at high concentrations with its large variation, when compared with the river water. The proposed method offers a simple, rapid, and accurate analysis of anions in water samples.