

## キャピラリー電気泳動法を用いる金属イオンの超高感度検出法の全体設計

### Designing Chemical Systems for Ultratrace Detection of Metal ions Using Capillary Electrophoresis

大学院理工学研究科物質科学部門 齋藤 伸吾

School of Science and Engineering, Saitama University

Shingo SAITO

#### Abstract

Various highly sensitive capillary electrophoresis (CE) techniques for detecting metal ions were developed. The chemical systems were designed taking dissociation kinetics, fluorescent and separation characteristics into consideration. To design novel detection ligands, the coordination structure and the distance between binding and emissive moiety were controlled. Some polydentate ligands with light-emitting moiety were described in this article. Mutual separation among metal complexes with high resolution was achieved using dynamic ternary complex formation on capillary, which effectively changed the mobility of the mother complexes. This separation mode is based on the idea that both the labeling and separation functions was involved in the first coordination sphere of the center metal ions. The direct fluorescent detection of heavy and paramagnetic metal ions in CE was achieved for the first time. The detection limits were in the level of  $10^{-10} - 10^{-11}$  mol dm<sup>-3</sup>, a significantly improvement on those of conventional CE systems for metal ions.

#### はじめに

種々の金属イオンを計測するために非常に多くの方法が開発されている。近年では、機器分析法による高エネルギー・高コストな手法が大きな発展を遂げている一方で、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、キャピラリー電気泳動法 (CE) やフローインジェクション分析法 (FIA) などの簡便・安価を長所とする方法も重要視されており、手法の二極化が見受けられる。後者の分離分析法で実用化している例としては、蛍光検出 HPLC を用いる輸液中の Al<sup>3+</sup> の計測法が公定法となり、キット化・市販されている。また、米国では CE を用いる河川中のアルカリ金属イオンの検出法が公定法となっている。この様に、特殊技能が不要で迅速・簡便・低コストでキット化できる方法は広く有用性が認められている。しかし、計測対象は比較的到高濃度で存在している化学種の検出が主であり、低濃度試料の測定はもっぱら機器分析法に頼らざるを得ないのが現状である。

この報文では、簡便、低エネルギー、マトリクス耐性といった利点を有する分離分析法に対し、最大の欠点ともいえる低感度を克服した金属イオンの分離分析システムを、分子デザインおよび化学反応の集積化により全体設計した著者の CE に関する研究の幾つかを紹介する。

#### 1. 配位子の設計

分離分析システムで金属イオンを比較的簡便な吸光あるいは蛍光検出するには、金属イオンを有機配位子で錯形成し(プレカラム誘導体化)、それを分離システムに導入することが一般的である。その際、金属イオンに対し、どのような誘導体化配位子を適用するかが高性能化の鍵となる。今回行った方法では、バックグラウンドシグナルと錯体のシグナルを完全分離して高感度化するために誘導体化試薬(検出配位子)を泳動液に添加しない。この方法が機能するための要件としては、① 強いシグナルを得るために高いモル吸光係数を有する、あるいは高い

量子収率を持つ配位子を用いることが必要である。また、この分離検出法においては、配位子のバンドと錯体のバンドが完全分離すると、錯体バンド中には遊離の配位子がほとんど存在しなくなるため、一種の濃度ジャンプが起きる。その時、錯体バンド中では錯平衡状態が成立しなくなり、錯体は解離方向への強い推進力を受けることになる。従って、検出されるまでのタイムスケール(通常、数分から数十分)で解離反応がほとんど進行しないような解離反応不活性な錯体を選ぶ必要がある。よって、② 金属と結合する配位部位の構造をどのようなものにするかが問題となる。さらに、③ 金属間の相互分離を達成するために、分離手法とのマッチングも重要である。電荷に基づく分離を行うCEに導入するのであれば中心金属によって母錯体の有効電荷が異なるように設計すべきである。従来の研究においては、配位部位と解離反応の関係性、また、錯体の構造と分離の特性を全体論的にデザインした研究はほとんどなく、モル吸光係数の高い指示薬等、既存の色素を CE に導入し、検出挙動を観測するに留まっていた。さらに、蛍光試薬を重金属イオンの検出に用いる例は稀である。なぜなら、常磁性金属イオンは常磁性消光によって、重金属イオンは重原子効果によって配位子の蛍光を消光してしまうので、根本的に蛍光検出が不可能であったからである。

著者は、上記の①～③の問題に対し、配位骨格、検出部位および分離原理をデザインし、高性能なCEシステムを構築した。基本骨格としては、主に多座配位子系に光アンテナ部位を導入する戦略をとった。Figure 1 に本論文で紹介する誘導体化配位子群を示す。配位部位のデザインは、種々の多座ポリアミノカルボン酸錯体の解離反応速度論の研究[1, 2]から得た知見に基づいている。多座ポリアミノカルボン酸錯体の自己触媒解離反応の活性化エンタルピー $-\Delta H_a^\ddagger$ は配位子の窒素原子の  $pK_a$  値と相関があることから、カルボン酸酸素と金属との結合エネルギーよりも、窒素原子の塩基性に由来する配位空間の奥に金属イオンを押しとどめる結合エネルギーが重要であることが分かった。さらに活性化エントロピー $-\Delta S_a^\ddagger$ は配位座数および配位空間の剛性に依存することが明らかとなった。これらの事実から、配位部位は4～6座の多座配位子とし、さらに配位子B～DではN-N架橋部位にメチレン基を介して発光部位を組み込むことにより、窒素原子の塩基性を上げるとともに N-N 架橋部位の回転を抑制し配位骨格の剛性を高めたものを選択した。また、A～D は蛍光配位子であるが、A < B < C, D の順で発光部位と配位部位の距離が大きくなるようにした。これにより、金属イオンによる消光効果(常磁性消光, 重原子効果)を制御(抑制)できる距離を探索した。

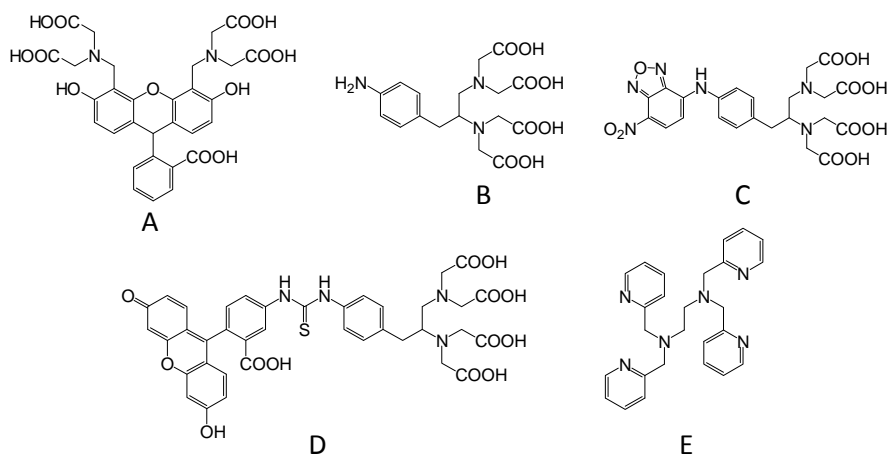


Figure 1. Derivatizing agents for separation systems.

## 2. 4座配位子を用いるキャピラリーゾーン電気泳動(GZE) [3]

まず、蛍光配位子 A を、CE-レーザー励起蛍光検出法(LIF)に導入した。A は、発光部位と中心金属が隣接することが予想できる。分子動力学法による水溶液中での距離の見積もりをしたところ、おおよそ 3 Å 程度の距離であった。この時、常磁性金属は常磁性消光を起こし、閉殻金属イオン錯体だけが発光を示すことがわかった。つまり、配位部位と発光部位が隣接した場合は、閉殻金属イオンだけの選択的検出が見込めることになる。配位

子 A の錯体の泳動図を Figure 2 に示す。3 価閉殻金属イオンである  $\text{Al}^{3+}$  と  $\text{Ga}^{3+}$  だけが選択的に検出され、発光する  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  や  $\text{Zn}^{2+}$  等の閉殻金属イオンは検出されないことがわかった。これは、これら 2 価閉殻金属イオンがオンキヤピラリー解離してしまっていることを強く示唆している。この理由として、一般に 2 価閉殻金属イオンは解離反応活性な金属イオン種であるということと、配位子 A が 5 員環と 6 員環で構成される比較的狭い配位空間を有しているため、イオンサイズの小さな 3 価金属イオンに適しているということが挙げられる。この様に、検出選択性には発光特性(消光効果, 発光部位-配位部位間距離)および解離反応特性が本質的な制御因子であるといえる。このシステムでは、検出可能な金属種は  $\text{Al}^{3+}$  と  $\text{Ga}^{3+}$  だけであるものの検出限界は  $3.7 \times 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$  (10 ppt) に達し、機器分析法と同等の検出限界を有する CE システムとなった。

### 3. 6 座配位子を用いる動的三元錯体形成分離システム [4-8]

配位子 A の例は、比較的解離不活性になりやすい 3 価典型金属イオンを検出したものであるが、解離活性化学種を形成しやすい金属イオン群を解離不活性錯体として検出できれば、より多くの金属イオンを高感度一斉検出できる可能性がある。そのような例としてランタノイドイオン群 ( $\text{Ln}^{3+}$ ) を検出した研究を挙げる。  $\text{Ln}^{3+}$  イオン群は解離活性化学種を形成しやすい金属イオンとして知られている。また、その金属間分離は幾つかの系で達成されているが、その相互分離がいまだに高度分離の指標となっている金属イオン群である。  $\text{Ln}^{3+}$  に対しては、配位子 B~D を用いた。 Figure 3 に配位子 D を CE-LIF に導入した例を示す。この泳動図は分離が不十分であるものの、幾つかの重要な事実を示している。一つは重金属であり常磁性金属を多く含む  $\text{Ln}^{3+}$  イオン群が蛍光検出可能になったということである。配位子 D では中心金属と発光部位が  $10 \text{ \AA}$  以上離れていると分子動力学法で見積もられている。この程度の距離とすることで重原子効果および常磁性消光を効果的に抑制できるということがわかった。ちなみに配位子 B ではこの距離は  $6 \text{ \AA}$  程度であり、配位子中心の蛍光は常磁性消光されることもわかっている。第二の点は、  $\text{Ln}^{3+}$  イオン群がオンキヤピラリー解離せずに検出されていることである。この様に多座で配位骨格の剛性および窒素原子の塩基性を高くするように設計された配位子は、  $\text{Ln}^{3+}$  と解離不活性錯体を形成しうることがわかった。このような分子デザインにより解離反応速度を制御し、解離活性な化学種を形成しやすい金属イオンも解離不活性錯体として検出できることが明らかとなった。

以上の様に  $\text{Ln}^{3+}$  群を CE-LIF で検出できるようになったが、通常のゾーン電気泳動モード (CZE) では Ln 間相互分離がほとんどなされないため (Fig. 3), 新しい分離モードである動的三元錯体平衡分離モードを考案した (Fig. 4)。この分離様式は、母錯体の残余配位座に分離機能を持たせることを狙いとした。  $\text{Ln}^{3+}$  は通常 8~10 配位をとることが知られており、配位子 B~D は 6 座であるため母錯体には 2~4 の残余配位座が存在し、水分子が配位している。ここで、母錯体である D 錯体に対し 2~4 座を有する第二の錯形成試薬を泳動液に添加すると三元

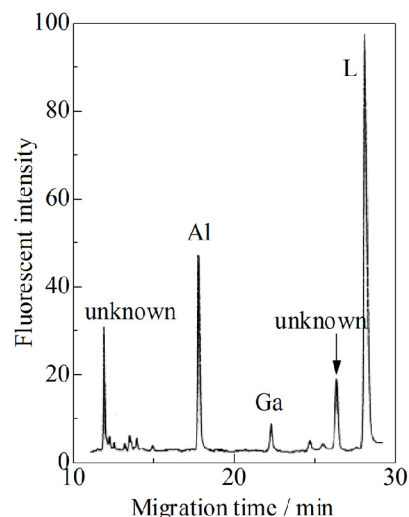


Figure 2. Typical electropherogram of  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$ -A complexes with LIF detection [3]. Sample,  $C_L = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{Al}} = C_{\text{Ga}} = 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{HEPES}} = 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Carrier buffer,  $C_{\text{HEPES}} = 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 7.5),  $C_{\text{EDTA}} = 5.0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ .

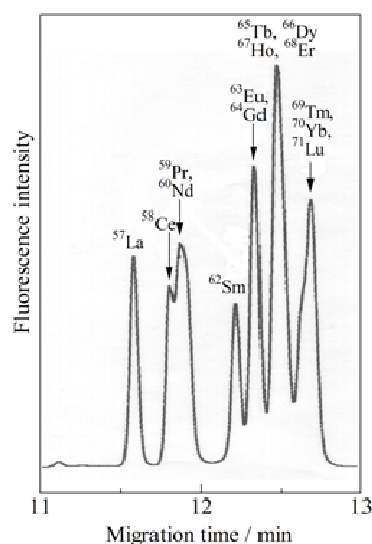


Figure 3. Typical electropherogram of Ln-D complex with CZE-LIF [7]. Sample,  $C_{\text{Ln}} = 2.0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_L = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{borate}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 10.0). Carrier buffer,  $C_{\text{borate}} = 1.2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 10.50).

錯体を形成することが予想できる。第二の配位子の選択の指針としては、三元錯体形成をした時に錯体の大きさあるいは電荷を大きく変化させることと、母錯体を配位子置換反応で分解(解離)させないことである。この化学平衡が動的(錯形成と解離が活性)であり、その平衡定数が中心金属によって異なれば、母錯体の電気移動度を制御でき、金属間精密分離が可能であると考えた。Ln 母錯体に対する三元錯体形成試薬としては、炭酸イオン(2座配位子)、イミノ酢酸(IDA)(3座配位)およびクエン酸(3座配位子)が有効であることを見出している。Figure 5にイミノ酢酸とクエン酸を混合した泳動液を用いたCE-LIFの例を示す。Ln<sup>3+</sup>群の精密分離が可能であるとともに、検出限界は  $9.1 \times 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$  (15 ppt)にも達することがわかった。

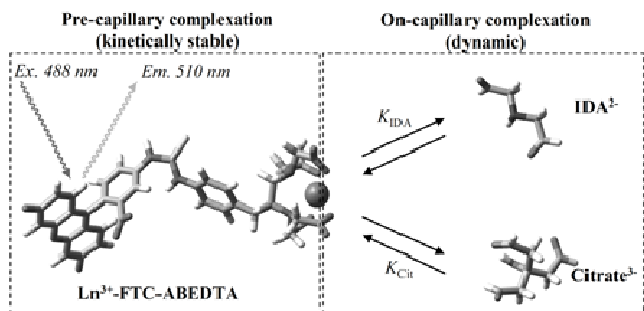


Figure 4. The chemical system in this work combined between precapillary complexation (the Ln-D mother inert complex) and oncapillary ternary complexation (Ln-D and the auxiliary reagents, IDA and citrate)[7].

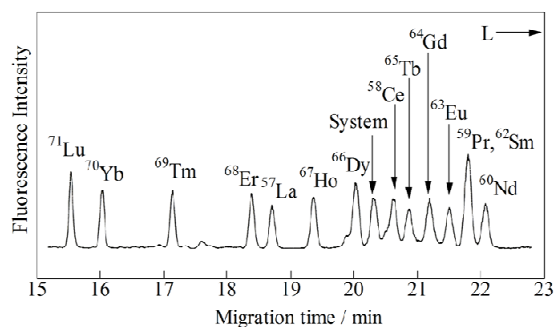


Figure 5. Typical electropherogram of Ln-D complex under optimal conditions [7]. Sample,  $C_{Ln} = 5.0 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $C_L = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $C_{borate} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 10.0). Carrier buffer,  $C_{borate} = 1.2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 9.60);  $C_{IDA} = 5.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $C_{citrate} = 9.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $C_{CyDTA} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Figure 6は、系にIDAを添加した時のLn-C錯体の電気移動度(○, 図中の○)を示したものである。電気移動度はLn系列の途中で折れ曲がっていることが分かる。通常のLn錯体のCEでは、検出順は原子番号順であることが多く(Fig. 3でもそのような傾向である)、このような検出順が観測されることは珍しい。一般に錯形成に伴い錯体の有効電荷は負の方向へと傾く。原子番号のより大きいLn<sup>3+</sup>の方がランタニド収縮によって原子の電荷密度が増大するため、静電相互作用が強くなる。従って、原子番号の増大とともに錯形成能が大きくなり、有効電荷が負の方向へ動くので検出順と原子番号順が一致する。動的三元錯体分離モードでもLn-B錯体に炭酸イオンを添加した場合、そのような原子番号と同じ序列であった。これは残余配位座(2~4座)の配位空間に対し、炭酸イオン(2座)は十分に小さく、立体化学的な因子が関与しないためである。一方、Ln-C錯体に対し3座配位子IDAを添加した場合、軽希土類では残余配位座が4座程度あるため原子番号順となる。しかし、中希土から重希土へと移るに従い母錯体の残余配位空間は3~2座と小さくなることが予想できる(Fig. 6中の▲)。従って、中~重希土母錯体ではIDAが配位するための空間が狭くなり、さらに母錯体のカルボン酸との静電反発も生じるため錯形成定数が小さくなる。これが母錯体の有効電荷(電気移動度)を増大させる(有効負電荷が小さくなる)。この立体的効果と電荷密度がともに関与して検出順の“折れ曲がり”が観測されるものと考察している。この様に残余配位座の性質を制御すれば、通常とは異なる検出選択性を得ることもできる。

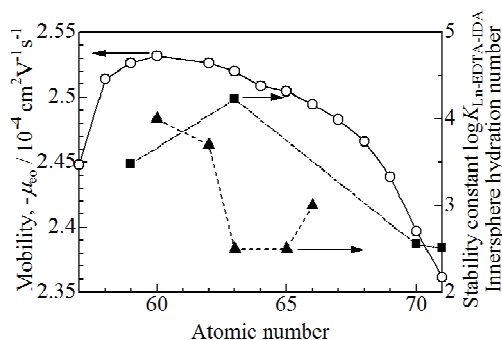


Figure 6. Mobility of Ln-C complexes using dynamic ternary complexation separation, stability constant for Ln-EDTA-IDA ternary complexes and a number of metal-bonded water molecule [6]. ○, Mobility of Ln-L complexes; ▲, stability constant of Ln-EDTA complex with IDA; ■, number of water molecules bound to center metal ion.

この動的三元錯体分離モードは、遷移金属群にも有効であることが明らかとなった。Figure 7には配位子Dの

遷移金属錯体の分離を示す。三元錯体形成試薬としては水酸化物イオンを用いた。中性 pH では分離されない金属イオンが pH 12 以上で水酸化物イオンとの三元錯体形成により相互分離できる。このとき、この配位子が遷移金属イオンと錯形成しても、消光効果を抑制していることも非常に重要な知見である。検出限界は  $\text{Co}^{2+}$  に対し  $1.3 \times 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$  (0.77 ppt) を達成しており、絶対感度は 65 ゼプトモルである。これは  $\text{Co}^{2+}$  原子およそ 4 万個に相当し、このような超高感度を CE-LIF の様な簡便な装置構成で達成できることを実証した。

最後にポリアミノカルボン酸ではない多座配位部位を導入した例を紹介する。配位子 E は蛍光配位子ではなく吸光配位子として用いた。E は無電荷配位子であり、金属イオンとは強い静電相互作用が働かないと考えられる。また、E の金属錯体はカチオン性錯体となり、これまでカチオン性錯体を解離不活性錯体として検出した例は非常に少ない。実際に、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  や  $\text{Al}^{3+}$  等の HSAB 則でいうところのかたい酸はオンキヤピラリー解離してしまい検出できない。一方で、多くの 2 価遷移金属イオン群は解離不活性錯体として検出可能であることがわかった (Fig. 8)。これら金属群の中にはやわらかいものから比較的かたい金属イオンまでを含んでいるおり、ピリジン環窒素原子が中間のやわらかさであることに加え、多座配位によるエントロピー的な効果の両方が作用することにより解離不活性錯体を形成しているものと考察している。さらに塩化物イオンを三元錯体形成試薬とすることで金属間相互分離を達成し、種々の金属イオンを一斉分離検出できた (Fig. 8)。吸光検出であるため感度は  $2.9 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  と超高感度ではないものの、この配位骨格は従来の配位子とは異なる速度論的特性に基づく検出選択性を示している点が興味深い。

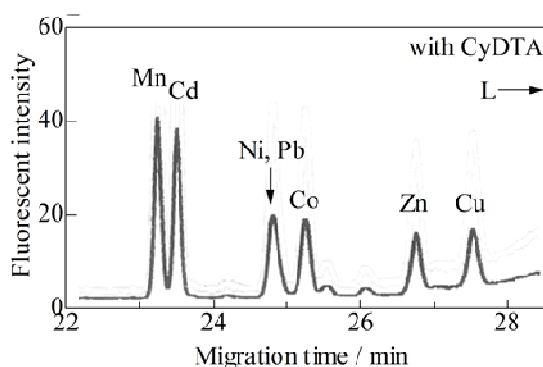


Figure 7. Typical electropherograms of  $\text{M}^{2+}$ -D complexes [8]. Sample,  $C_L = 5.0 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_M = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{M} = \text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , and  $\text{Hg}^{2+}$ ). Carrier buffer,  $C_{\text{phosphate}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 12.7),  $C_{\text{TBAcl}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{CyDTA}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

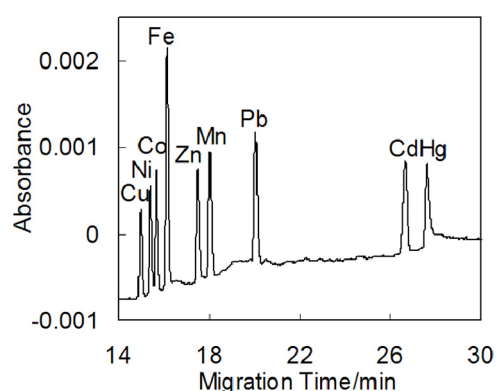


Figure 8. Typical electropherogram of  $[\text{M-E}]^{2+}$  complex with addition of KCl and methanol in carrier buffer [5]. Carrier buffer,  $C_{\text{Bis-Tris}} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 7.0),  $C_{\text{KCl}} = 0.175 \text{ mol dm}^{-3}$ , methanol, 78 vol%. Sample,  $C_{\text{TPEN}} = 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{M}^{2+}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{Bis-Tris}} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (pH 7.0).

## おわりに

本研究は、速度論(解離反応速度)、発光特性および分離特性を組み合わせ、CE システムを全体設計(配位子および分離場設計)したものであり、従来法にはない高性能化を達成している。特に配位子 A, D および E は、環境試料や生体試料などの実試料にも適用できるマトリクス耐性を有しており、さらに A および D は超高感度を有していることから、従来の CE 法の持つ簡便・高分離といった利点を残しながらも高感度検出が可能な実用法としても有用であることを示している。

また、新規分離モードである動的三元錯体分離は、金属イオンの表面にラベル化機能と分離機能の両方を与えるユニークな手法であり、分子サイズに関係なく金属錯体間の高度分離を達成できる。これは、母錯体の第一配位圏を高機能化したものであり、従来の分離様式と異なり検出試薬と分離試薬をそれぞれの役割に特化させることができる。

このように化学システムの多様性を用いた系の全体設計という戦略が、高性能分析システムを構築する上での重要な鍵となると考える。

## References

- [1] S. Saito, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 3819.
- [2] S. Saito, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Anal. Sci.*, **2000**, 16, 1095.
- [3] S. Saito, J. Shimidzu, S. Hoshi, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1140, 230.
- [4] S. Saito, H. Hoshino, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378, 1644.
- [5] S. Saito, S. Sasamura, S. Hoshi, *Analyst*, **2005**, 130, 659–663.
- [6] S. Saito, N. Danzaka, S. Hoshi, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 3093.
- [7] S. Saito, S. Takeuchi, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, *Analyst*, **2007**, 132, 237.
- [8] S. Saito, R. Suzuki, N. Danzaka, A. Hikichi, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, *Electrophoresis*, **2007**, 14, 2448.