

総合論文*

超微量金属錯体の速度論的識別モードキャピラリー電気泳動
システムの設計

壹岐 伸彦**

System design of kinetic differentiation mode capillary electrophoresis for
separation and determination of ultratrace metal chelates

Nobuhiko Iki**

**Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579

(Received 26 March 2002, Accepted 11 May 2002)

A kinetic differentiation (KD) mode determination system for ultra-trace metal ions consists of the derivatization of metal ions by a spectrophotometric reagent followed by separation and detection of the resulting complexes and the free reagent, which has two attractive features. The first is high selectivity based on the differentiation of the kinetic stability of metal complexes during separation process. The second is high sensitive detection of the complexes owing to the absence of background absorption. The recent advent of capillary electrophoresis (CE) prompted us to transfer the principle of KD to CE in order to construct new separation/detection systems for metal ions at the fmol level. For instance, 4-(2-pyridylazo)resorcinol was best separated by the simple CE mode, owing to the 1-OH group of the complex having different pK_a values among the center metal ions. By using 2,2'-dihydroxyazobenzene-5,5'-disulfonate (DHABS) and quaternary ammonium ions, ion-association CE was constructed, in which the difference in the ability of ion-association arising from the center metal ion via the $-SO_3^-$ group determines the separation selectivity. As a result, the requirements for chemical systems in KD-CE were obtained: i) The ligand should possess functional group which is able to convert the character of the center metal ion by means of the reactivity or degree of interaction at the second coordination sphere. ii) An electrophoretic buffer should contain an interacting reagent which can interact with the function group. This guideline successfully produces a new separation system based on the hydrogen-bonding ability of DHABS complexes and poly(ethylene glycol) through solvated water molecules. Similarly to KD-HPLC, KD-CE exhibited detection selectivity based on kinetic stability of metal complexes. Taking advantage of the simplicity of the separation processes of KD-CE, a CE reactor was constructed to measure the solvolytic dissociation rate of metal complexes which determines the kinetic selectivity in KD mode systems.

Keywords : kinetic differentiation ; metal chelates ; HPLC ; CE ; dissociation reaction.

1 緒 言

金属イオンに限らず、物質の計測を化学的に行おうとする場合、分析対象物と相互作用する「試薬・プローブの設

計」と「その機能が発現される場の設計」が肝要である。前者は古くから金属イオンの吸光試薬開発として行われてきた。感度や選択性の向上を目指し、アゾ色素、トリフェニルメタン系色素、ポルフィリン、など多様な試薬群が検討されてきた。近年のいわゆる分子認識化学も「物質を認識する物質」の創製をモチーフとしており、分子設計に力点を置いている。

* 東北支部創立 50 周年記念

** 東北大学大学院工学研究科生物工学専攻: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

他方、試薬が働く“場”となる吸光光度法についても従来様々な検討がなされてきた。平衡論や速度論に基づくマスキング、液相や固相への抽出、クロマトグラフィーとの結合によって感度と選択性の向上が図られてきた。中でも吸光検出器を有する逆相分配 (RP) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、前段に金属錯体の高性能分離機能を有する吸光光度計と見ることができる。これは多成分の試料やマトリックスの複雑な試料に対処できる能力を有する。現在までに四ツ柳・星野らは、アゾ色素、シッフ塩基、ヒドラゾン、ホルマザン、ポルフィリン、ジチオレン等様々な種類の配位子について、RP-HPLC 用プレカラム誘導体化試薬としての特性を調べている^{1)~4)}。その結果、金属錯体の速度論的な安定性を識別するシステム、速度論的識別 (kinetic differentiation, KD) モード HPLC の概念を確立している。

一方、過去十年来、新しい分離法としてキャピラリー電気泳動 (CE) が脚光を浴びている。CE は内径 100 μm 以下のキャピラリー内で行う電気泳動分離である。これは基本的には均一溶液系での分離システムであるため、固定相との相互作用や物質移動から自由であり、KD の場としては RP-HPLC よりシンプルである。その一方で導電クロマトグラフィー (EKC) に象徴されるように多様な分離モードを構築できる魅力もある。そこで著者は KD モードの新しい場として CE に着目し、超微量金属錯体の分離検出に応用した。本稿ではまず KD-HPLC を例に KD の概念を紹介し、CE への展開^{5)~7)}、CE 分離システム設計指針の確立、KD の本質である金属錯体の加溶媒分解反応速度解析のための反応器の開発⁸⁾に至る研究の流れとその成果を紹介する。

2 速度論的識別モード HPLC^{1)~4)}

KD-HPLC 法では通常の吸光光度法と同じく、あらかじめ金属イオンを試薬によって錯体に誘導体化し、分光光度計の代わりに RP-HPLC に供する。このとき、移動相には誘導体化試薬を添加しない。そのためバックグラウンド吸収がなく、吸光検出器の性能を十分に活用し、高感度検出が可能である。また、RP カラム中では常に金属錯体の近傍から遊離の試薬が除去されるので、金属錯体の濃度は平衡論ではなく速度論によって支配される。錯体が解離反応活性であれば解離して検出されず、解離反応不活性であれば解離せずに検出される。注目すべきことは、分離カラムは単に過剰配位子や金属錯体を相互に分離するだけではなく、錯体の解離反応の場を提供し、その速度論的な安定性を“識別”する、という点である。分離を目的としてきたクロマトグラフィーの歴史の中で画期的なことである。

一方、KD-HPLC システムは吸光試薬の分子設計上の要件を大幅に緩和する。すなわち、生成した錯体はカラム内

で空間的に分離されるため、配位子の錯形成や吸収スペクトルにおける選択性は必ずしも必要ではなくなる。また、バックグラウンド吸収のないシステムなので、モル吸光係数が数万程度でもサブ ppb レベルの金属イオンの検出が可能となる。実際、性能が低いと思われていた試薬が KD システムでは立派に機能している。

以上の KD モードの高感度性や高選択性、更に試薬設計の容易さといった特徴は、HPLC だけではなく CE でも発現することは容易に予想できる。そこで KD-CE への展開を図った。

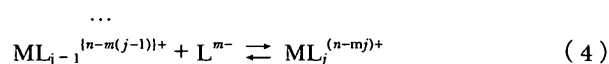
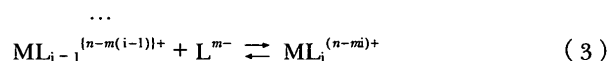
3 速度論的識別モード CE

3.1 金属イオンの電気泳動分離

粘度 η の溶液中で半径 a 、電荷 z のイオンが電場の印加により泳動し、定常状態にあるとき、媒体から粒子に働く摩擦力について Stokes の式が成立するとすると、電気泳動移動度 μ_{ep} は式(1)で与えられる。

$$\mu_{ep} = \frac{ze}{6\pi a\eta} \quad (1)$$

物質によって a や z が異なるので μ_{ep} も異なる。これが電気泳動の基本原理解である。しかし式(1)は同時に、遷移金属イオンのように電荷が同じで大きさが似通っている物質の電気泳動分離は難しいことを意味している。実際、モル伝導率 λ ($=\mu_{ep}zF$, F : ファラデー数) から μ_{ep} を見積もると、 μ_{ep} は互いに接近していることが分かる。そこで従来、電気泳動緩衝液に配位子を添加し、各金属イオンと配位子との錯形成平衡の偏りの差異を利用する分離が行われてきた。この基本原理は古くから汙紙電気泳動⁹⁾や等速電気泳動¹⁰⁾で確立されている。CE の出現とともにこの原理をそのまま CE に移行させた研究が数多く報告されている¹¹⁾。すなわち 8-ヒドロキシキノリン-5-スルホン酸 (HQS)¹²⁾¹³⁾、EDTA¹⁴⁾ 及び類縁体¹⁵⁾¹⁶⁾、そしてカルボン酸^{17)~20)}を泳動緩衝液に添加した CE 分離である。この原理を簡単に記述すると次のようになる。金属イオン M^{n+} と配位子 L^{m-} が 1 : j の錯体を生成する場合、考えるべき平衡は



である。ここで $ML_i^{(n-m)+}$ は 1 : i 錯体を表す。錯形成平衡は各錯体の安定度定数 β_i と泳動緩衝液中の遊離配位子の濃度 $[L^{m-}]$ で決まる。ここで β_i は式(5)で表される。

$$\beta_i = \frac{[ML_i^{(n-m)+}]}{[M^{n+}][L^{m-}]^i} \quad (i = 0 \sim j) \quad (5)$$

全金属に対する錯体 $ML_i^{(n-m)+}$ のモル分率を x_i とする.

$$x_i \equiv \frac{[ML_i^{(n-m)+}]}{M_T} \quad (i = 0 \sim j) \quad (6)$$

ここで M_T は全金属イオン濃度で式(7) で与えられる.

$$M_T = \sum_{i=0}^j [ML_i^{(n-m)+}] \quad (7)$$

式(5), (7) を式(6) に導入し, 式(8) が与えられる.

$$x_i = \frac{\beta_i [L^{m-}]^i}{\sum_{i=0}^j \beta_i [L^{m-}]^i} \quad (i = 0 \sim j) \quad (8)$$

錯体 $ML_i^{(n-m)+}$ の電気泳動移動度を $\mu_{ML_i^{(n-m)+}}$ とすると金属イオンの見掛けの電気泳動移動度 $\mu_{ep,M}$ は式(9) で与えられる.

$$\mu_{ep,M} = \sum_{i=0}^j x_i \mu_{ML_i^{(n-m)+}} \quad (9)$$

異種金属イオン M' についても式(9) と同様の式が得られる. 通常, 金属イオン種によって β_i は異なる. したがって泳動緩衝液中の配位子濃度を適当に選び, $\mu_{ep,M}$ と $\mu_{ep,M'}$ に差を持たせれば, 金属イオンの電気泳動分離が可能になる.

このように, 本法の原理は溶液内錯形成平衡によって明確に記述できるが, 泳動緩衝液に配位子を添加すること起因する問題・制限がある. 第一に, 速度論的に活性な金属錯体に応用が制限される. つまり, 錯形成反応 {式(2~4)} の速度が小さければ, 各錯体種 $ML_i^{(n-m)+}$ ($i = 0 \sim j$) に応じた複数のゾーンが出現する. また, 電気泳動速度と同程度の場合, ブロードなゾーンとなる. 第二に, KD-HPLC の項で述べたように, 試薬流れに起因するバックグラウンドによって感度が十分に得られない. 高感度であるレーザー誘起蛍光法などもこの問題から逃れることはできず, 本来の感度を十分に発揮できない¹²⁾.

3.2 PAR 金属錯体の KD-CE⁵⁾

金属錯体の KD の場として CE を用いる場合, 配位子を泳動緩衝液に添加しない. したがって KD-CE で金属錯体を分離するためには, 上記のオンカラム錯形成平衡とは別の戦略が必要となる. 既に齋藤らにより, 4-(2-ピリジルアゾ)レソルシノール (PAR, H_2par) 錯体のミセル導電クロマトグラフィー (MEKC) 分離²¹⁾や, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -テトラキス(4-カルボキシフェニル)ポルフィン-Zn^{II} 錯体の MEKC に

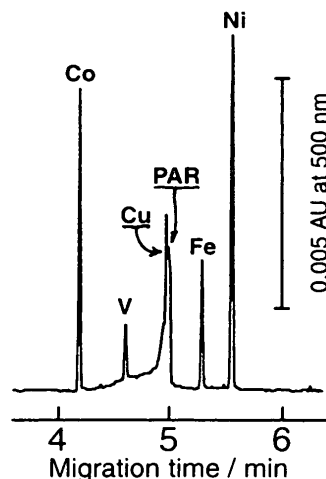
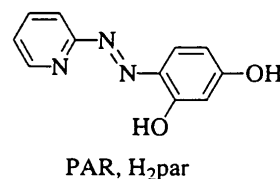


Fig. 1 Typical electropherogram for PAR chelates

Electrophoretic buffer: $[NaH_2PO_4]_T = [Na_2B_4O_7]_T = 0.01$ M, pH 8.4. $V = 21.9$ kV, $I = 20$ μ A. Total capillary length, $L = 70$ cm, effective capillary length, $l = 55$ cm. Sample: $[PAR]_T = 1 \times 10^{-3}$ M, $[M]_T = 10^{-5}$ M (Al 2.21, Cd 2.37, Co 2.04, Cr 1.98, Cu 1.83, Fe 2.00, Mn 2.14, Mo 2.0, Ni 1.74, V 2.08, Zn 1.97), 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0).



よる絶対微量検出などが報告されている²²⁾. ここではより単純に CE による PAR 金属錯体の分離を検討し, KD モードでの分離を制御する因子を調べた.

Fig. 1 に 11 種類の金属イオンに対する電気泳動図を示す. 6 分以内に PAR の Co^{III}, V^V, Fe^{II} 及び Ni^{II} 錯体が分離された. これらの錯体は速度論的に安定であるためにピークを与えたと考えられる. この選択性は KD-HPLC システムと同様である²³⁾²⁴⁾. 一方, Cd^{II}, Mn^{II} 及び Zn^{II} イオンは PAR と錯形成したがピークを与えなかった. これは速度

Table 1 Theoretical plate number of PAR chelates and total separation time

Chelate	KD-CE ^{a)}	MEKC ^{b)}	IP-RP-HPLC ^{c)}
Co	243000	114000	1800
V	246000		2900
Fe	425000	105000	1700
Ni	297000	120000	1200
$t^d)/min$	6	30	24
$l^e)/cm$	55	60	25

a) Ref. 5. b) Ref. 21. c) Estimated from a figure in ref. 23. d) Total separation time. e) Effective capillary or column length.

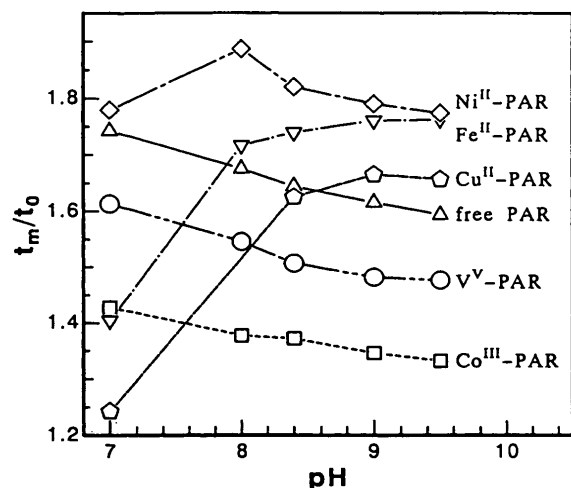


Fig. 2 The pH dependence of (t_m/t_0) for PAR and the chelates

Electrophoretic buffer: $[\text{NaH}_2\text{PO}_4]_{\text{T}} = [\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7]_{\text{T}} = 0.01 \text{ M}$. $I = 20 \mu\text{A}$. t_0 , t_m : migration time of solvent and solutes.

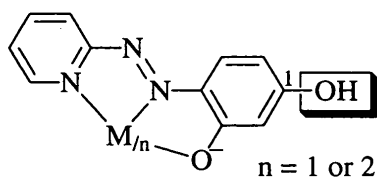


Fig. 3 Acid-dissociable 1-hydroxy group, the pK_a value of which is strongly dependent on the center metal ion

論的に不安定であるためにキャピラリー内で解離したためと考えられる。なお、用いた条件下では Al^{III} , Cr^{III} 及び Mo^{VI} イオンは錯形成しなかった。

Table 1 に全分離時間及び式 (10) で定義される理論段数 N を示す。

$$N = 5.54(t_m/W_{1/2})^2 \quad (10)$$

ここで t_m は各錯体の移動時間, $W_{1/2}$ はピークの半値幅である。注目すべきことは, イオン対逆相分配 HPLC²³⁾ や MEKC²¹⁾ に比較して分離時間が大幅に短縮されていることである。また, CE の理論段数が最も大きく, PAR 金属錯体を分離するには固定相や擬固定相を用いない単純な CE システムが適していることが分かった。Co, Ni に対する検出限界 ($S/N = 3$) はそれぞれ 1.80×10^{-7} , $1.41 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。絶対量に換算すると 1.08 fmol (63.6 fg) 及び 0.84 fmol (49.3 fg) である (試料注入量 6.0 nl)。

遊離 PAR 及び各錯体の泳動挙動への緩衝液 pH の影響を調べた (Fig. 2)。各移動時間 t_m の溶媒ピークの移動時

Table 2 Acid dissociation constants for PAR and the chelates

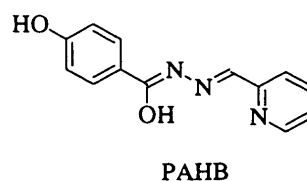
Species ^{a)}	pK_{a1}	pK_{a2}
PAR; H_2par	5.43	12.13 ^{c)}
$[\text{Co}^{\text{III}}(\text{Hpar})_2]^+$	3.64	4.41
$[\text{V}^{\text{VO}}_2\text{Hpar}]$	4.40	
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Hpar})_2]$	6.47	7.66
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Hpar})_2]$	6.2	7.1
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Hpar})\text{par}]$	8.2 ^{b)}	

a) Ref. 23. b) In 10% (v/v) aqueous acetone, from Ref. 25.

c) 3-Hydroxy group.

間 t_0 に対する比 (t_m/t_0) の pH 依存性は, 大きく二つのグループに分けられる。すなわち, pH の増大とともに緩やかに減少するグループ (遊離 PAR, V^{V} 及び Co^{III} 錯体), 急激に増大するグループ (Fe^{II} 及び Cu^{II} 錯体) である。PAR は金属イオンに配位しない酸解離可能な OH 基を 1 位に有しており (Fig. 3), 星野らによってその pK_a 値が詳細に調べられている (Table 2)²³⁾。前グループの化学種は泳動緩衝液の pH 範囲内に pK_a 値を持たない。一方, 後グループの場合, 各化学種の pK_a は検討した pH 範囲内に存在する。pH の増大とともにこれらの錯体は酸解離し, 負電荷数が増大するため正極側への電気泳動移動度が増大したと考えられる (検出は負極側)。更に Cu^{II} 錯体の場合, pH の増大とともに組成が 1:1 から 1:2 に変化したと考えられる。すなわち pH 7 では $[\text{Co}(\text{par})_2]^-$ 錯体より速く移動しており, より電荷数が少ない錯体種 $[\text{Cu}(\text{par})]$ の存在が寄与している。一方, pH 9.5 では Hpar^- よりも遅く移動しており, より多くの負電荷数を持つ化学種 $[\text{Cu}(\text{par})_2]^{2-}$ の寄与が考えられる。これは PAR- Cu^{II} 錯体の平衡定数からも支持される結果である²⁵⁾。なお, Ni^{II} 錯体は検討した pH 範囲の境界に pK_a 値を持ち, 泳動挙動も両グループの中間に属する。

Fig. 2 の結果から, KD-CE 分離試薬の要件が明らかとなる。すなわち, 「配位子は中心金属イオンの個性を酸解離定数として反映できる酸性基を持つ必要がある」というものである。実際にこの概念を適用し 2-ピリジルアルデヒド-4-ヒドロキシベンゾイルヒドラゾン (PAHB) の Co^{III} , Ni^{II} 及び Cu^{II} 錯体の KD-CE 分離が可能であった²⁶⁾。このように, 金属錯体の pK_a 値の差異は KD-CE 分離に極めて有効であることが分かった。



PAHB

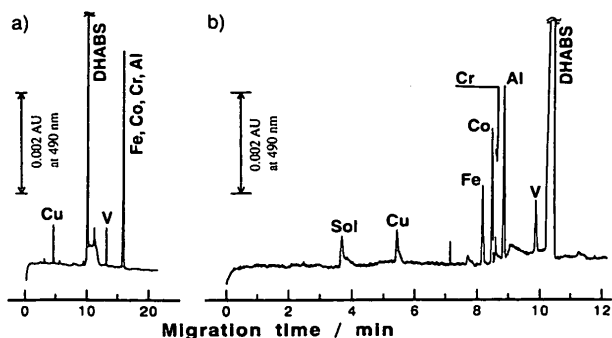
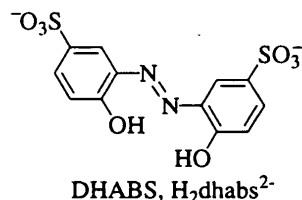


Fig. 4 Typical electropherograms for DHABS chelates

a) $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{T}} = 0.02 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$ (with NaOH), $V = 21.7 \text{ kV}$, $I = 20 \text{ }\mu\text{A}$. b) $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{T}} = 0.02 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$ (with NaOH), $[\text{TBABr}]_{\text{T}} = 25 \text{ mM}$, $V = 21.3 \text{ kV}$, $I = 40 \text{ }\mu\text{A}$. $L = 65 \text{ cm}$, $l = 50 \text{ cm}$. Sample: $[\text{DHABS}]_{\text{T}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{M}]_{\text{T}} = 10^{-5} \text{ M}$ (Al 2.21, Cd 2.37, Co 2.04, Cr 1.98, Cu 1.83, Fe 2.00, Mn 2.14, Mo 2.0, Ni 1.74, V 2.08, Zn 1.97), 0.01 M Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$).

3.3 イオン会合 $\text{CE}^{6)}$

2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン-5,5'-ジスルホネート (DHABS, $\text{H}_2\text{dhabs}^{2-}$) は Al^{III} , Co^{III} , Cr^{III} 及び Fe^{III} など三価の金属イオンと 1:2 の金属錯体 $[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ を生成する²⁷⁾. しかしこれらの金属錯体は通常の KD-CE では共泳動し、分離できなかった (Fig. 4(a)). これは $[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ が固定した電荷 (-5) を持ち、なおかつ互いの大きさがほぼ等しいためである (式(1) 参照). 前項の知見を援用すれば, DHABS に中心金属イオンの個性を pK_a 値として反映するフェノール性 OH 基を導入した, 2,2',4-トリヒドロキシ誘導体などを用いれば良いことになる. しかし非対称アゾ色素の非等価アゾ窒素の配位によって結合異性体が生成し²⁷⁾, 一つの金属に対し複数のピークを与えるという問題を生ずる²⁸⁾.



一方, 陽イオン性ミセルや高分子電解質を用いる EKC では, これらの擬固定相と $[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ との静電相互作用が強すぎ, 分離が不可能であった. そこで相互作用のより穏やかな, 第四級アンモニウムイオンなどのイオン会合試薬を用いる系を検討した. Fig. 4(b) に TBABr を泳動緩衝液に添加したときの電気泳動図を示す. 12 分以内でこれらの $[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ を分離することができた. 理論段数 N も Al: 253000, Co: 243000 及び Fe: 214000 ($l = 50 \text{ cm}$) と高い. 本システムでは DHABS の Cd^{II} , Ni^{II} , Mn^{II}

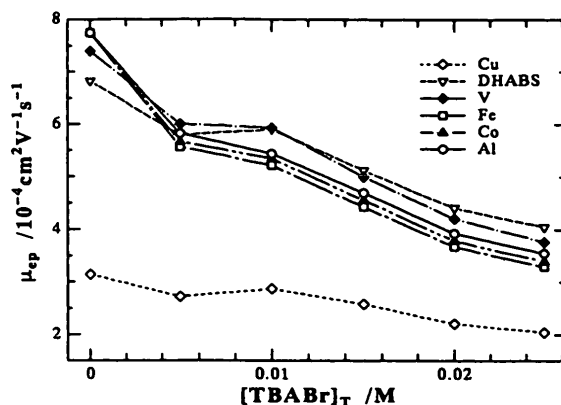


Fig. 5 The effect of TBA ion on the migration of DHABS chelates

Electrophoretic buffer: $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{T}} = 0.02 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$ (with NaOH), $[\text{TBABr}]_{\text{T}} = 0 \sim 25 \text{ mM}$. $L = 72 \text{ cm}$, $l = 57 \text{ cm}$. $I = 20$ (for 0 and 5 mM TBA) and $25 \text{ }\mu\text{A}$ (for 10 ~ 25 mM TBA).

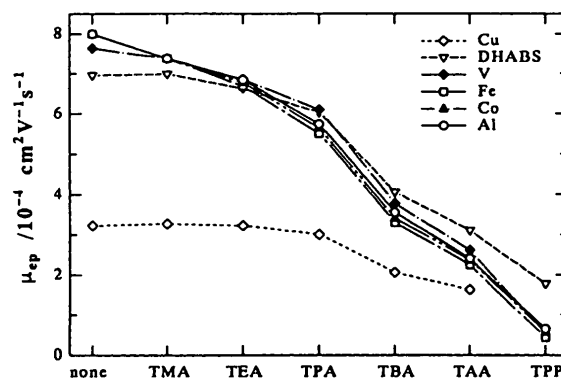


Fig. 6 The effect of counter cation on the migration of DHABS chelates

Buffer: $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{T}} = 0.02 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$ (with NaOH), $[\text{counter cation}] = 25 \text{ mM}$ except "none". $L = 72 \text{ cm}$, $l = 57 \text{ cm}$. $I = 20$ (none), 25 (TBA and TAA), 30 (TPP), 40 (TEA and TPA), and 50 (TMA) μA .

及び Zn^{II} 錯体は解離して検出されず, KD 機能が発現している. Fig. 4(b) の条件での各イオンに対する検出限界 ($S/N = 3$) は, Al: 1.67, Co: 3.16, Fe: $5.19 \times 10^{-7} \text{ M}$, 絶対量に換算して Al: 1.00, Co: 1.89, Fe: 3.11 fmol であった (注入量 6.0 nl).

TBA 濃度の各溶質の電気泳動移動度 μ_{ep} への影響を調べた (Fig. 5). 分離能は十分ではないが既に 5 mM の TBA イオンの添加で金属錯体の分離が見られた. TBA 濃度が増大すると μ_{ep} が減少した. これはより高次のイオン会合体を形成しているためと考えられる. ここで μ_{ep} は 0 ではなく, イオン会合体は電気的に中性ではない. ピークの順序はイオン会合体形成能が $\text{Fe}^{\text{III}} > \text{Co}^{\text{III}} > \text{Cr}^{\text{III}} > \text{Al}^{\text{III}}$ 錯体の順であることを示している. これには錯体の中心金属によ

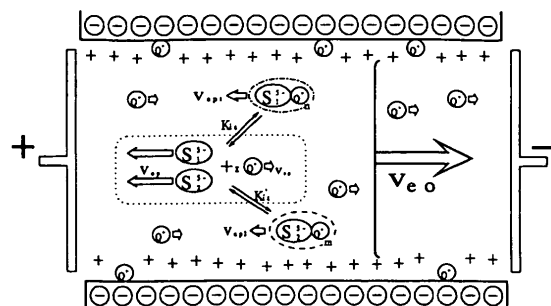


Fig. 7 Schematic diagram of ion-association capillary electrophoresis

S_1^{5-} , S_2^{5-} : solute anion; Q^+ : ion-association agent; $[S_1^{5-} \cdot Q_n^+]$, $[S_2^{5-} \cdot Q_m^+]$: sub-stoichiometric ion-associates ($0 < n, m < 5$). v_{ep} : electrophoretic velocity; v_{eo} : electroosmotic velocity; K : ion-association constant

って $-SO_3^-$ 基の電子密度に差異が生じているためと考えられる。

イオン会合試薬の種類について検討した (Fig. 6). 同一濃度で比較した場合, 大きな陽イオンになるほどイオン会合度が增大していることが分かる. これには錯体との最近接距離ではなく, 疎水性相互作用が寄与していると考えられる. またいずれの場合も不飽和のイオン会合体が形成している. 泳動図上では, テトラメチルアンモニウム (TMA) の場合, ピークがブロードになり $[M(dhabs)_2]^{5-}$ を分離することはできなかった. テトラエチルアンモニウム (TEA), テトラプロピルアンモニウム (TPA) とアルキル鎖が長くなるにつれ, 分離能が向上した. 一方テトラベンチルアンモニウム (TAA) やテトラフェニルホスホニウム (TPP) イオンになると 5 mM の添加で分離が見られるが, 25 mM 添加するとかえって分離能が低下した.

以上のことから本システムの原理を模式的に示した (Fig. 7). 同一の電荷を持つ溶質 S^{5-} もそれぞれ異なるイオン会合定数を持っており, 異なる組成のイオン会合体を形成し, 見掛けの電気泳動移動度に差が生じる. イオン会合そのものを CE 分離の原理として利用した例は初めてであったので, 本システムをイオン会合 (ion association, IA)-CE と命名した. イオン会合反応の分離分析への応用は, 分析化学における主要なモチーフの一つである²⁹⁾. イオン対抽出^{30)~32)}やイオン対逆相分配 HPLC³³⁾³⁴⁾ などへの応用例を挙げることができるが, 基本的には二相間分配を意識したものが多い. それに対し本システムは均一溶液中での不飽和イオン会合体の生成を直接に分離に利用しており, この点でユニークである. IA-CE の原理は金属錯体だけではなく, 荷電を有する分子一般に適用できる³⁵⁾³⁶⁾.

3.4 システム設計指針

以上 PAR や DHABS の KD-CE システムから, 配位子・

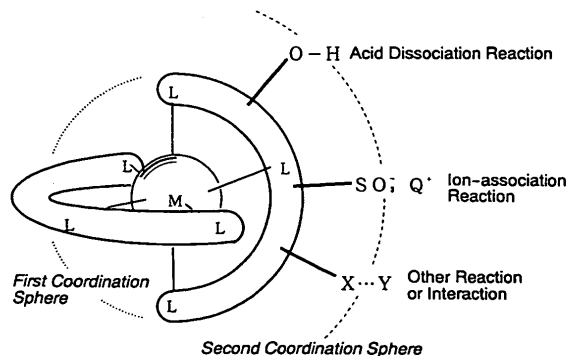


Fig. 8 Chemical system of KD-CE

L: chelating dentate atom; M: center metal ion. The ligand has functional groups, $-O^-$, $-SO_3^-$, and $-X$, which are the antennas to express the characteristics of M. The carrier contains interacting reagents such as H^+ , Q^+ and Y which interact with antennas by certain manners.

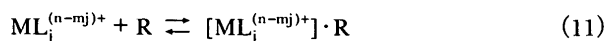
システム設計指針を得ることができる (Fig. 8). すなわち, ① 配位子には, 中心金属イオンの特性を酸解離反応やイオン会合などの特性として第二配位圏で発信できる, アンテナとなる官能基 ($-OH$, $-SO_3^-$) を導入する必要がある. ② 電気泳動緩衝液にはアンテナ官能基と相互作用する試薬 (プロトン, イオン会合試薬等) を導入する必要がある.

オンカラム錯形成平衡に基づく金属イオンの CE 分離の場合, 金属イオンの第一配位圏での反応であり, 金属イオン種によっては錯形成反応が電気泳動速度に追従しない場合もあることを 3.1 項で述べた. 一方これら KD-CE システムでの反応ないし相互作用は第二配位圏で起こり, その速度は泳動速度に比べて迅速である. この点でも KD-CE の自由度の大きさが示される.

CE では一般に, 適用範囲の拡大や分離選択性の向上の目的で様々な修飾剤 (modifier) が緩衝液に添加されてきた. 塩³⁷⁾, 有機溶媒³⁸⁾, 水溶性高分子³⁹⁾, 高分子電解質⁴⁰⁾, シクロデキストリン (CD)⁴¹⁾, 錯形成試薬¹¹⁾, ミセル⁴²⁾⁴³⁾ やエマルション⁴⁴⁾である. ここで特定の溶質と選択的に会合体ないし錯体を形成し, 直接的に電気泳動移動度を変化させるものを「相互作用試薬」と呼ぶ. 例えば MEKC ではミセルが, CD-EKC では CD が, イオン交換 EKC では高分子電解質が相互作用試薬である. 金属錯体の KD-CE では PAR 錯体の系ではプロトンが, DHABS 錯体のイオン会合 CE の場合イオン会合試薬が相互作用試薬と言える.

3.1 項にならって KD-CE での金属錯体の見掛けの電気泳動移動度 $\mu_{ep,M}$ を記述すれば次のようになる. まず, KD-CE では速度論的に安定な錯体 $ML_j^{(n-mj)+}$ をあらかじめ定量的に生成させ, 相互作用試薬 R を用いる CE に供する.

キャピラリー内では $ML_j^{(n-mj)+}$ と R との会合平衡



が生ずる。このとき $\mu_{ep,M}$ は

$$\mu_{ep,M} = (1-x)\mu_{ML_j^{(n-mj)+}} + x\mu_{[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]} \quad (12)$$

で与えられる。ここで $\mu_{[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]}$ は会合体 $[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]$ の移動度、 x は全錯体に対する会合体のモル分率である。

$$x \equiv \frac{[[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]]}{[ML_j^{(n-mj)+}] + [[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]]} = \frac{K[R]}{1 + K[R]} \quad (13)$$

K は式(11)の平衡定数である。

$$K = \frac{[[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]]}{[ML_j^{(n-mj)+}][R]} \quad (14)$$

式(12)は

$$\mu_{ML_j^{(n-mj)+}} \neq \mu_{[ML_j^{(n-mj)+} \cdot R]} \quad (15)$$

であれば、泳動緩衝液中の $[R]$ を変化させ、 $\mu_{ep,M}$ を制御できることを意味している。また、中心金属によって K が異なる R を設計すれば金属錯体の相互分離が可能となる。このように、Fig. 8 や式(12)は相互作用として酸解離やイオン会合以外のものも利用できることを示唆している。実際、次に述べるように水素結合を用いる分離システムへ展開することができ、システム設計指針の普遍性が示される。

3・4 非イオン性相互作用試薬を用いる CE 分離システム⁴⁵⁾

一般に物質を CE で分離しようとするとき、相互作用試薬 R として荷電性のものを用いるのが有効である。これは式(1)から予見されるように、 R との会合体の有効電荷が物質本来の電荷と差異を生じ、式(15)が容易に満足されるためである。特にこれは分離対象物質が電気的に中性であっても電気泳動分離できることを意味している。MEKC が電気泳動法のブレイクスルーであるゆえんはここにある。一方、式(1)は溶質が電荷を持っている場合、 R との会合体の大きさが溶質そのものの大きさと大きく異なれば、 R は必ずしも荷電性である必要はないことを示唆している。そこでモデル溶質として DHABS 金属錯体 $[M(dhabs)_2]^{5-}$ を用い、非イオン性の相互作用試薬を用いる CE 分離システムを検討した。

3・3 項で述べたように $[M(dhabs)_2]^{5-}$ はイオン性ミセルを用いる MEKC では分離できなかった。しかし非イオン

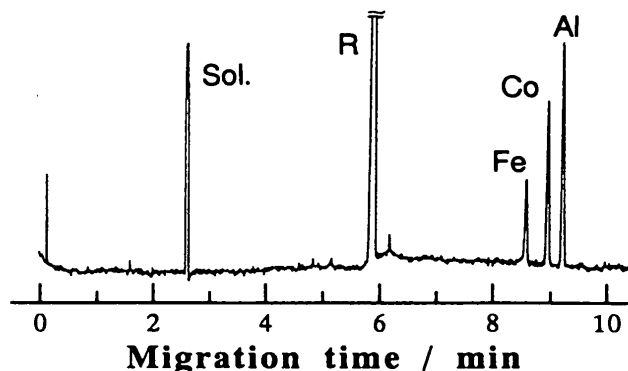


Fig. 9 Separation of $[M(dhabs)_2]^{5-}$ complexes by KD-CE using electrophoretic buffer containing Triton X-100

Electrophoretic buffer: $[H_3PO_4]_T = 0.02$ M, pH = 7.0 adjusted with NaOH. $[Triton\ X-100] = 0.05$ M, $V = 21.7$ kV, $I = 20$ μ A. Sample: $[DHABS]_T = 1 \times 10^{-3}$ M, $[M]_T = 10^{-5}$ M (Al 2.21, Co 2.04, Fe 2.00), 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0).

界面活性剤 Triton X-100 のミセルを用いた場合、簡単にこれらを分離することができた (Fig. 9)。IA-CE の系よりも迅速にベースライン分離を達成した。泳動緩衝液中の Triton X-100 濃度を増加させると錯体の電気泳動移動度が減少した。これは錯体 $[M(dhabs)_2]^{5-}$ が非イオン性ミセルと相互作用し、会合体 $[M(dhabs)_2]^{5-} \cdot R$ が生成していることを示唆している。同時に電気泳動移動度が

$$\mu_{M(dhabs)_2^{5-}} > \mu_{[M(dhabs)_2^{5-} \cdot R]} \quad (16)$$

であることを示唆している。これは Triton X-100 ミセルの大きさ⁴⁶⁾⁴⁷⁾を考慮すれば理解できる。特筆すべきことはほかの非イオン界面活性剤ミセルを用いた場合、ポリオキシエチレン (23) ドデカノール (Brij-35) や Brij-58 も同様の分離挙動を示すのに対し、オクチル- β -D-グルコシド (OG) はこれらの錯体を分離できない点である。これらの界面活性剤の構造的な違いは親水基にあり、相互作用として $[M(dhabs)_2]^{5-}$ のミセル内部への分配ではなく、ポリオキシエチレン (POE) 鎖とのなんらかの会合を考慮しなければならない。そこで POE 鎖からなる高分子、ポリエチレングリコール (PEG) と錯体との相互作用を調べた。

様々な鎖長の PEG を緩衝液に添加し、 $[M(dhabs)_2]^{5-}$ の泳動挙動を調べた。0.5 (w/v)%⁴⁸⁾ の PEG #20000 の添加でも、3 種類の $[M(dhabs)_2]^{5-}$ の分離が可能であった (Fig. 10)。非イオン性高分子鎖の絡まりで生ずる‘ふるい効果’による CE 分離³⁹⁾が報告されている。しかしこの濃度では PEG #20000 分子は分散し互いに絡まっていないこと⁴⁹⁾、検討した $[M(dhabs)_2]^{5-}$ 錯体はいずれもほとんど

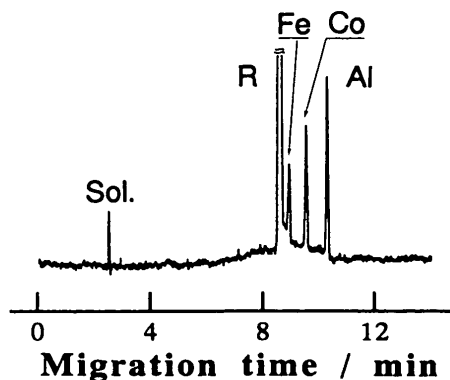


Fig. 10 Separation of $[M(dhabs)_2]^{5-}$ complexes by KD-CE using electrophoretic buffer containing PEG #20000

Electrophoretic buffer: $[H_3PO_4]_T = 0.02$ M, pH = 7.0 adjusted with NaOH. PEG #20000: 0.5 (w/v)% (ca. 0.25 mM). $V = 20.5$ kV, $I = 20$ μ A.

同じ大きさであることから、本システムでの分離はふるい効果によるものではないと考えられる。PEG 濃度が增大するにつれ、 $[M(dhabs)_2]^{5-}$ の μ_{ep} は減少した。これは $[M(dhabs)_2]^{5-}$ と PEG とのなんらかの会合体 ($[M(dhabs)_2]^{5-} \cdot PEG$ と表記) の生成と、電気泳動移動度が³

$$\mu_{[M(dhabs)_2]^{5-}} > \mu_{[M(dhabs)_2]^{5-} \cdot PEG} \quad (17)$$

であることを示唆している。単一 PEG #20000 分子の回転半径 ($R_G = 7.2$ nm)⁵⁰⁾ は錯体の半径よりも大きく、したがって式(17)は妥当と思われる。このことは、「分離対象物自体が電荷を持っている場合、相互作用試薬 R が電気的に中性であっても分子量 (サイズ) が大きければ分離が可能である」という作業仮説を支持する。これは Triton X-100 など非イオン性ミセルを用いる MEKC の系でも同様である。

なお、PEG の分子量効果 (F.W. = 200 ~ 20000) を調べ

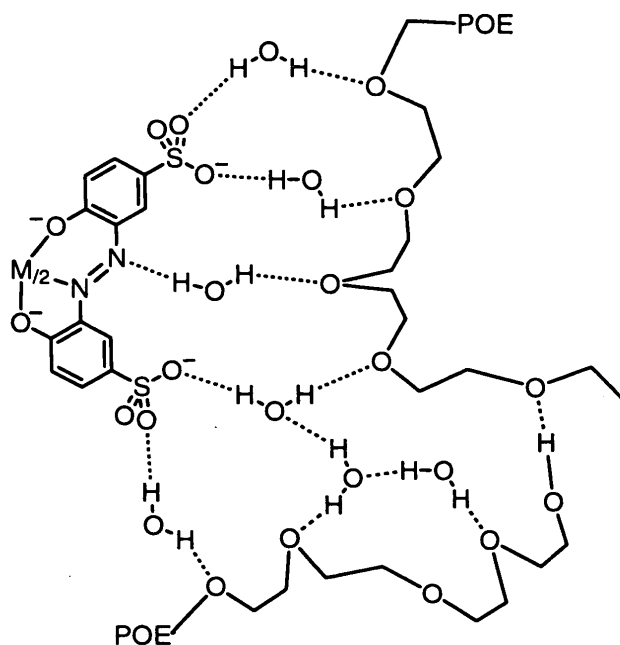
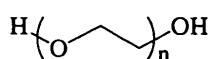
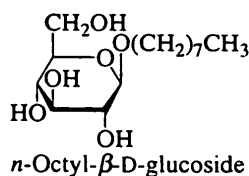
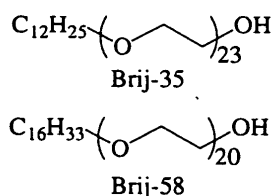
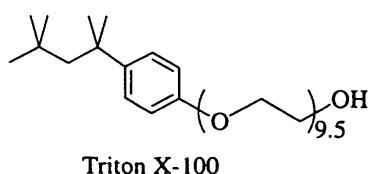


Fig. 11 Schematic diagram showing a possible interaction between PEG and $[M(dhabs)_2]^{5-}$ via network of hydrogen bonding

たところ、鎖長が長いほど分離能が大きいことが分かった。相互作用の機構としては、PEG 自体は疎水ドメインを持っていないこと、分子動力学により POE 鎖のオキシエチレン単位の水和水の数は 2.9 個と計算されていること⁵¹⁾、錯体自体が $-N=N-$ 、 $-SO_3^-$ 及び $-O^-$ の親水基を有していることから、水和水を経由した水素結合相互作用を考察した (Fig. 11)。配位子の持つこれらの親水基は中心金属イオンによって異なる水素受容性を持っていると考えられ、これが錯体の相互分離に寄与していると考えられる。なおこれとは独立に、江坂らは水素結合に基づく CE や MEKC を提案している⁵²⁾。

以上、新しい相互作用として水素結合を利用した分離モードを開発した。錯体は水和水と水素結合できる官能基を持つ必要がある。また、錯体が電荷を持っていれば、相互



PEG #200 ($n \approx 4$)
PEG #1,000 ($n \approx 22$)
PEG #20,000 ($n \approx 340 \sim 570$)

作用試薬の分子量が大きい場合、相互作用試薬自体が電気的に中性でも構わない。このように本システムは、分析対象に合わせた多様な CE 分離システム設計の可能性の一端を示している。

4 CE による金属錯体の解離反応速度解析⁸⁾

以上のシステムで、KD-CE における金属錯体の分離戦略を中心に議論した。一方、金属錯体の検出選択性については、その速度論的な安定性が関与していることが示唆されている。ここで問題となる反応は、他の配位子や Lewis 酸の攻撃による金属錯体の解離ではなく、加溶媒分解反応である。これは KD-CE や KD-HPLC だけではなく、過剰の配位子及び金属イオンがその錯体近傍より除去されるシステムでは常に問題となる。例えば、金属錯体の各種 *in vivo* 診断試薬には、生体内での速度論的な安定性が要求される⁵³⁾。このように加溶媒分解反応速度は、分析化学の様々な局面で問題となっている。しかし金属錯体の加溶媒分解反応速度を直接的に求めることは難しい。ここでは KD-CE が加溶媒分解反応を起こし、生じた試薬や金属イオンを定常的に分離することに着目し、解離反応速度解析のための CE 反応器 (CER) に応用した。モデル錯体として DHABS の Al^{III} 及び Ga^{III} 錯体 ($[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$) を扱い、加溶媒分解反応速度定数 k_d を求めた。

金属錯体の加溶媒分解反応を追跡するには、ある反応時間後に残存する金属錯体濃度が分かればよい。ここで、金属錯体はキャピラリー内を泳動している間、加溶媒分解反応にさらされる。したがって反応時間は金属錯体が検出器に達するまでの泳動時間 t_m に等しい。また、反応後の残存金属錯体濃度 $[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ は、解離反応不活性な外標準 $[\text{Co}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ とのピーク高さの比較から定量できる。反応解析手順としては t_m を変化させ $[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ を計測すれば良い。ここで、温度や pH などキャピラリー内での加溶媒分解反応の条件を一定に保ちながら t_m を変化させる方法が必要となる。そこでキャピラリー内壁の ζ 電位の回復速度が遅いこと⁵⁴⁾⁵⁵⁾ を利用し、電気浸透流の新しい制御法を開発した。これはキャピラリーを一定時間酸性・弱酸性の緩衝液で洗い、その後、pH 7.0 の反応用緩衝液を導入する、という簡単なものである。このとき、 ζ 電位は pH 変化に追随せず、酸性の時の値を保持する。キャピラリー有効長にもよるが、現在のところ t_m = 数分～数十分までの変化が可能である。

$[\text{Al}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ 、 $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ とも t_m を増加させると残存濃度を減少させた (Fig. 12)。これは t_m が大きいほど解離反応が進行するためと考えられる。 $[\text{Al}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ 、 $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ の t_m とも、外標準 $[\text{Co}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ のそれに一致し、 $[\text{M}(\text{dhabs})]^-$ のそれとは異なる。このため、観測している解離反応過程は

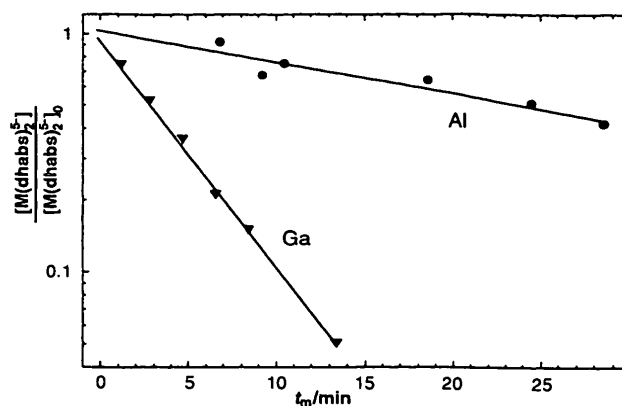


Fig. 12 Reaction profile obtained for $[\text{Al}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ and $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ by CER

Straight lines are obtained by fitting of $\ln\{[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}/[\text{M}(\text{dhabs})_2]^{5-}_0\} = -k_d t_m$.

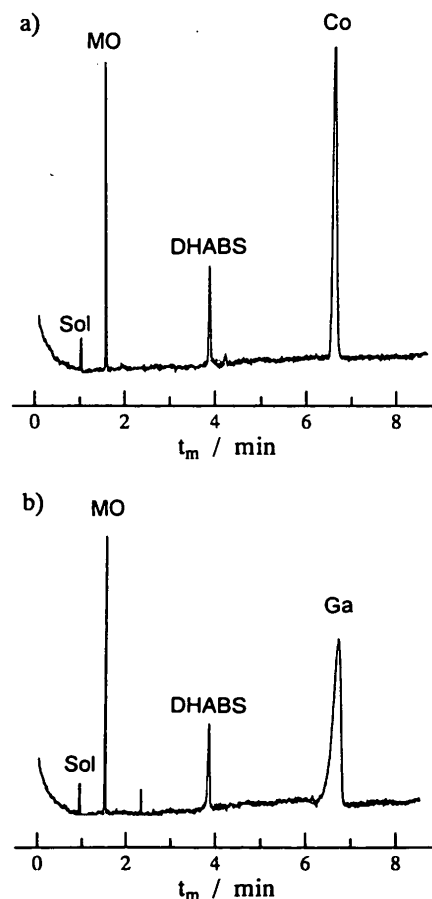


Fig. 13 Typical electropherogram for $[\text{Co}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ and $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ chelates at longer t_m

(a) $[\text{Co}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ system as an outer standard, (b) $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ system. MO: methyl orange as an internal standard; Conditioning Buffer: $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{T}} = [\text{CH}_3\text{COOH}]_{\text{T}} = 0.02 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{cond}} = 5.10$. Electrophoretic Buffer: $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{T}} = 0.02 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7.0 with NaOH. Electrophoresis at $T = 30^\circ\text{C}$, $I = 20 \mu\text{A}$, $V = 16.2 \sim 16.4 \text{ kV}$, $l = 15 \text{ cm}$, $L = 60 \text{ cm}$.

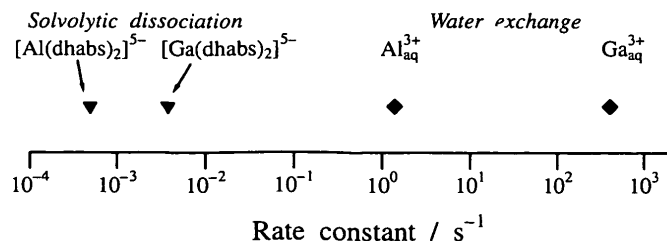
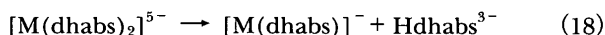


Fig. 14 Rate constants of solvolytic dissociation and water exchange

▼: solvolytic dissociation rate of $[\text{Al}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ and $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ at 30°C , ◆: water exchange rate of $\text{Al}_{\text{aq}}^{3+}$ and $\text{Ga}_{\text{aq}}^{3+}$ at 30°C .



である。 $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ 錯体の場合 $t_m = 6.64$ 分でリーディングを起こした (Fig. 13). これは式 (18) により生じた $[\text{Ga}(\text{dhabs})]^-$ がピークのすそに現れているためと考えられる。 t_m に対する残存率について一次の反応速度解析を行った (Fig. 12). k_d は各々 $[\text{Al}(\text{dhabs})_2]^{5-}$: $(4.9 \pm 1.0) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$: $(3.7 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ となった. これは 30°C での Al^{3+} 及び Ga^{3+} の水交換速度定数 k_{ex} (各々 1.39 s^{-1} , $4.00 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$)⁵⁶⁾ よりも格段に小さい. 更に $[\text{Al}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ と $[\text{Ga}(\text{dhabs})_2]^{5-}$ の間の k_d の比は, Al^{3+} 及び Ga^{3+} の k_{ex} の比よりも小さくなっている (Fig. 14). 錯形成反応について Eigen 機構によれば, その速度は中心金属イオンの性質が支配する. それに対して本結果は, 加溶媒分解反応速度は配位子の性質に大きく依存することを示すものである. このことは, 配位子設計によって金属錯体の加溶媒分解反応速度を制御できることを示唆している. 換言すれば, 試薬設計による KD モード選択性の制御が可能であるということになる.

CER は原理を KD-CE においているので, 時間スケール的には KD モードで検出・非検出の境界域の反応速度を決めるには, まさに最適のツールと言える. 現在までにクロマトグラフィーを用いる速度解析法が報告されているが⁵⁷⁾, 固定相と移動相での反応速度の差異や物質移動の影響を考慮する必要がある. また, 金属錯体の解離反応に対しては, 固定相上の残存シラノール基の触媒作用⁵⁸⁾⁵⁹⁾も報告されており, 加溶媒分解反応以外の反応経路の影響も考慮する必要が出てくる. これに対し CER は均一溶液中での反応を扱うため, より簡単に解離反応速度を計測できる. 今後 KD モード適合性試薬の分子構造と, その金属錯体の加溶媒分解反応速度の相関についてデータの集積が期待される.

5 結 言

以上, fmol レベルの金属イオンの分離定量に対するシステム論的アプローチである, 吸光試薬による前段誘導体化と, キャピラリー電気泳動による分離検出システムの可能性を検討した. このとき, KD-HPLC で明らかになっている KD モード由来の高選択性と高感度性を活用するため, 泳動緩衝液には吸光試薬を添加していない. このため, 古典的な電気泳動や金属イオンの CE で一般に見られるオンカラム錯形成モードにはよらない, 新しい分離の原理を開発した. すなわち, 誘導体化して生じた金属錯体について, その中心金属イオンの「個性」が泳動場で見分けられるシステムを設計した. 具体的には, 配位子には金属イオンの特性を第二配位圏で発信できる官能基を導入する必要がある. 泳動緩衝液にはその官能基と相互作用できる試薬を添加する必要がある. 実際に, イオン会合 CE や水素結合を用いる CE システムを創成し, 設計指針の有用性を示した. 本論文で取りあげた以外にも, 本設計指針を適用してほかの CE 適合性試薬や CE 分離システムを構築することは十分に可能であると考えられる. 一方, KD の選択性を支配する金属錯体の加溶媒分解反応速度を解析するために, 電気浸透流制御と KD-CE を用いた反応器 (CER) を開発した. このように現在までに, 速度論的識別の概念を CE に移植し, 金属錯体の新しい CE 分離システムを開発した. 更に CER を開発し, 金属錯体の速度論的識別の本質に迫りつつある.

本研究を遂行するにあたり御指導・御助言いただいた東北大学大学院 四ツ柳隆夫教授, 星野 仁助教授に謝意を表する.

文 献

- 1) 星野 仁: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, No.9 (2002) 印刷中.
- 2) 四ツ柳隆夫, 星野 仁: “クロマトグラフィーの新展開”, 季刊化学総説 No. 9, 日本化学会編, p73 (1990), (学会出版センター).
- 3) 壹岐伸彦, 星野 仁: *Dojin News*, **48**, 3 (1989).
- 4) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Mikrochim. Acta*, **113**, 137 (1994).
- 5) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1993**, 701.
- 6) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr. A*, **652**, 539 (1993).
- 7) 壹岐伸彦, 四ツ柳隆夫: 化学, **48**, 434 (1993).
- 8) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Anal. Chem.*, **72**, 4812 (2000).
- 9) 木曾義之: “ゾーン電気泳動 イオニクスの新しいこころみ”, 化学の領域選書 3, (1972), (南江堂).
- 10) Y. Nakabayashi, K. Nagaoka, Y. Masuda, R. Shinke: *Talanta*, **36**, 639 (1989).
- 11) 最近の総説として例えば A. R. Timerbaev: *J. Chromatogr. A*, **792**, 495 (1977).
- 12) D. F. Swaile, M. J. Sepaniak: *Anal. Chem.*, **63**, 179 (1991).

- 13) A. R. Timerbaev, W. Buchberger, O. P. Semenova, G. K. Bonn: *J. Chromatogr.*, **630**, 379 (1993).
- 14) S. Motomizu, M. Oshima, S. Matsuda, Y. Obata, H. Tanaka: *Anal. Sci.*, **8**, 619 (1992).
- 15) S. Motomizu, S. Nishimura, Y. Obata, H. Tanaka: *Anal. Sci.*, **7** supplement, 253 (1991).
- 16) 本水昌二, 森本浩司, 桑原正良, 小畑義光, 泉国辰: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 873 (1993).
- 17) F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Bocek: *Electrophoresis*, **11**, 780 (1990).
- 18) A. Weston, P. R. Brown, P. Jandik, W. R. Jones, A. L. Heckenberg: *J. Chromatogr.*, **593**, 289 (1992).
- 19) M. Chen, R. M. Cassidy: *J. Chromatogr.*, **640**, 425 (1993).
- 20) Y. Shi, J. S. Fritz: *J. Chromatogr.*, **640**, 473 (1993).
- 21) T. Saitoh, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr.*, **469**, 175 (1989).
- 22) T. Saitoh, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Anal. Sci.*, **7**, 495 (1991).
- 23) H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Talanta*, **31**, 525 (1984).
- 24) H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Anal. Chem.*, **57**, 625 (1985).
- 25) L. Sommer, V. Kuban, M. Langova: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **310**, 51 (1982).
- 26) 稲垣孝志, 壹岐伸彦, 四ッ柳隆夫: 日本分析化学会第42年会講演予稿集, p30 (1993).
- 27) D. F. Evans, N. Iki: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1990**, 3773.
- 28) N. Iki: 未発表データ.
- 29) 四ッ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **34**, 583 (1985).
- 30) 四ッ柳隆夫, 星野 仁: 化学の領域, **33**, 746 (1979).
- 31) K. Tōei: *Anal. Sci.*, **3**, 479 (1987).
- 32) 本水昌二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 151 (1999).
- 33) 四ッ柳隆夫, 星野 仁: *ぶんせき (Bunseki)*, **1983**, 566.
- 34) P. R. Haddad, P. E. Jackson: "Ion Chromatography", *J. Chrom. Lib.* **46**, p. 165 (1990), (Elsevier, Amsterdam).
- 35) T. Takayanagi, E. Wada, M. Oshima, S. Motomizu: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 1785 (1999).
- 36) 高柳俊夫: 化学と工業, **55**, 117 (2002).
- 37) M. W. F. Nielen: *J. Chromatogr.*, **542**, 173 (1991).
- 38) C. Schwer, E. Kenndler: *Anal. Chem.*, **63**, 1801 (1991).
- 39) C. Heller: *J. Chromatogr. A*, **698**, 19 (1995).
- 40) S. Terabe, T. Isemura: *Anal. Chem.*, **62**, 652 (1990).
- 41) S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka, T. Ando: *J. Chromatogr.*, **332**, 211 (1985).
- 42) S. Terabe, K. Otsuka, T. ando: *Anal. Chem.*, **57**, 834 (1985).
- 43) K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando: *J. Chromatogr.*, **332**, 219 (1985).
- 44) H. Watarai: *Chem. Lett.*, **1991**, 391.
- 45) この項の内容は, 壹岐伸彦, 四ッ柳隆夫: 1993年10月, 日本分析化学会第42年会において発表.
- 46) R. J. Robson, E. A. Dennis: *J. Phys. Chem.*, **81**, 1075 (1977).
- 47) T. Saitoh, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **90**, 479 (1994).
- 48) 100 (w/v)% = 1 mg/cm³.
- 49) "Entanglement threshold c^* " は文献 39) の式(4)を用い, 2.1 (w/v)% と計算される. 固有粘度については M. Kurata, Y. Tsunashima: "Polymer Handbook", Edited by J. Brandrup, E. H. Immergrut, p. VII/1-60 (1989) を参照, (Wiley, New York).
- 50) 回転半径 R_G は文献 39) の式(2)を用いて計算した.
- 51) K. Tasaki: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8459 (1996).
- 52) 江坂幸宏: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **47**, 819 (1998).
- 53) D. Parker: *Chem. Br.*, **1994**, 818.
- 54) W. J. Lambert, D. L. Middleton: *Anal. Chem.*, **62**, 1585 (1990).
- 55) C. Schwer, E. Kenndler: *Anal. Chem.*, **63**, 1801 (1991).
- 56) S. F. Lincoln, A. E. Merbach: *Adv. Inorg. Chem.*, **42**, 1 (1995).
- 57) C-Y. Jeng, S. H. Langer: *J. Chromatogr.*, **589**, 1 (1992).
- 58) N. Uehara, T. Kurahashi, Y. Shijo: *Anal. Sci.*, **10**, 31 (1994).
- 59) 竹原由佳, 高橋 透, 星野 仁, 四ッ柳隆夫: 日本化学会第79春季年会講演予稿集 2, p. 12 (2001).

要 旨

速度論的識別 (KD) モード分離分析法は, 吸光試薬により金属イオンを誘導体化後, 生じた錯体や過剰試薬を相互分離し, 検出する方法である. これは金属錯体の速度論的安定性の識別に由来する高選択性と, バックグラウンド吸収がないことによる高感度性を備えている. 本研究はこれらの KD モードの利点と, 新しい分離法であるキャピラリー電気泳動 (CE) とに着目し, 超微量金属錯体の KD モード-CE システムを構築すること, 及びその設計指針を得ることを目的としている. アゾ色素をモデル試薬として用い, fmol レベルの金属錯体のシンプルな KD-CE 分離システムのほかに, イオン会合 CE や水素結合を用いる CE システムを創成した. その過程で, 中心金属イオンの個性を第二配位圏で識別するための試薬・システム設計が肝要であることを知った. 一方, KD の検出選択性を決める金属錯体の加溶媒分解反応速度解析のための反応器を開発した.