

報 文*

キャピラリー電気泳動反応器を用いる亜鉛(II)-1,5-ビス(2-ヒドロキシ-5-スルホフェニル)-3-シアノホルマザン錯体のオンキャピラリー解離反応特性の評価

小笠原一孝^{®1}, 高橋 透¹, 壹岐 伸彦¹, 星野 仁¹

キャピラリー電気泳動反応器 (CER) を用いて Zn^{2+} -1,5-ビス(2-ヒドロキシ-5-スルホフェニル)-3-シアノホルマザン錯体 ($[\text{Zn-HSCF}]$) のオンキャピラリー解離反応特性について検討を行った。配位子置換モード CER により, $[\text{Zn-HSCF}]$ の CE 分離・検出の最適条件である pH 8.80 におけるその自己解離反応速度定数 (k_d) を測定したところ, $k_d = 4.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (半減期 4.5 時間) を得た。したがって, $[\text{Zn-HSCF}]$ は速度論的に極めて安定であることが分かった。一方, $[\text{Zn-HSCF}]$ は, pH 5.10 の CE 分離において検出されないが, このときの k_d を置換配位子としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を用いたバッチ系における配位子置換法で測定したところ, $k_d = 3.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ を得た。このときの半減期は 3 分であり, CE 分離の時間スケール内において錯体のほとんどが解離することが分かった。また, キャピラリー内における遊離の配位子の濃度プロファイルの推算から, CE 分離過程における $[\text{Zn-HSCF}]$ の平衡論的安定性の評価を行ったところ, pH 5.10 及び 8.80 いずれの条件においても $[\text{Zn-HSCF}]$ は平衡論的に存在し得ない環境下におかれていることが分かった。以上, プレキャピラリー誘導体化 CE において, 誘導体化の段階では金属錯体の平衡論的安定性は必要であるが, 特に配位子を添加しない泳動緩衝溶液を用いた場合, その金属錯体の CE 検出選択性を決定するものは, 錯体の速度論的特性 (解離反応不活性性) であることが明らかになった。

1 緒 言

速度論的識別モード (KD) キャピラリー電気泳動 (CE)¹⁾ は, 配位子として働く吸光試薬により金属イオンをオフラインで誘導体化後, これを試料として生じた錯体や過剰試薬を CE にて相互分離しオンライン検出するプレキャピラリー誘導体化 CE 法である。また, KD-CE の特徴は泳動緩衝液中に配位子を添加しない点である。これにより, 誘導体化試薬のバックグラウンド吸収の無い高感度な検出が実現することに加え, 解離反応活性な錯体種は泳動中に強力な解離反応場にさらされることにより解離し, 解離反応不活性な錯体種だけが検出されるため, 錯体の速度論的安定性に基づいた検出選択性が発現する。

KD-CE 用誘導体化試薬として, アゾ色素^{1)~5)}, ポルフィリン⁶⁾等の様々な種類の配位子について過去にその特性が調べられているが, ホルマザンもそのうちの一つである。ホルマザンとは, $\text{R}_1\text{-N}=\text{N-CR}_3\text{-N-NH-R}_2$ の構造を有する化合物であり, 金属イオンと呈色反応を示すことから, 分析試薬として利用が検討されてきた^{7)~9)}。当研究グループ

では, KD-CE のための誘導体化試薬として 1,5-ビス(2-ヒドロキシ-5-スルホフェニル)-3-シアノホルマザン (HSCF) の適合性を見いだした。特に Cu^{2+} , Zn^{2+} , 及び Mn^{2+} といった水和金属イオンの水分子交換反応速度定数の大きさから通常解離活性とされる金属錯体種の分離検出が可能であり, これらの金属イオン種の高感度定量法としての HSCF-KD-CE システムの有用性を見いだした¹⁰⁾。更に, KD-CE における金属錯体の検出選択性の起源が金属錯体の速度論的特性, もしくは平衡論的特性のどちらかによるのかを明らかにするために, CE 分離過程において Zn^{2+} -HSCF 錯体 ($[\text{Zn-HSCF}]$, Chart 1) をモデルとし, その速度論的及び平衡論的安定性について調査した¹¹⁾。速度論的特性については, CE 反応器 (CER)¹²⁾ を用いて $[\text{Zn-HSCF}]$ の自己解離速度定数 (k_d) を測定した。CE 分離・検出の最適条件である pH 8.8 では $[\text{Zn-HSCF}]$ の解離反応が極めて遅くその解離反応挙動を十分に追跡できなかったため, k_d の測定には至らなかったが, 泳動緩衝液中の水素イオン濃度の減少に伴って k_d も減少することから, $[\text{Zn-HSCF}]$ は pH 8.8 においても速度論的に安定 (解離反応不活性) であると推定した。また平衡論的特性については, 分光光度滴定法により $[\text{Zn-HSCF}]$ の安定度定数を決定し, これと KD-CE 分離過程における遊離の配位子濃度

* 若手研究者の初論文特集

¹ 東北大学大学院環境科学研究科自然共生システム学講座: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-20

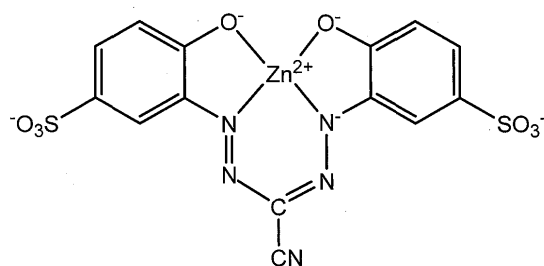


Chart 1 Structure of Zn^{2+} -HSCF complex

プロファイルの推算から、pH 8.8 における $[\text{Zn-HSCF}]$ のキャピラリー内錯形成平衡について検討したところ、 $[\text{Zn-HSCF}]$ は KD-CE 分離過程において平衡論的に存在し得ない環境下におかれていることが分かった。これらから、KD-CE における金属錯体の検出選択性は主に錯体の速度論的安定性に由来するものであることが示唆された。

先述のように、金属錯体のオンキャピラリー解離反応挙動は、KD-CE システムにおいてその検出選択性を決定する要素であるとともに、通常のプレキャピラリー誘導体化 CE においても検出感度や分離特性を左右する重要な因子であることが指摘されている¹³⁾。しかし、プレキャピラリー誘導体化 CE における金属錯体のオンキャピラリー解離反応挙動についてモデル計算による速度論的及び平衡論的シミュレーションを行った報告例はあるが¹⁴⁾、実際の金属錯体系の k_d 及び安定度定数を算出し、それらを用いて定量的に検討を行った報告は当グループの既報¹¹⁾においてほかにはない。本報告では、KD-CE において金属錯体の検出選択性が発現する要因を明らかにするため、KD-CE 分離過程における $[\text{Zn-HSCF}]$ のオンキャピラリー解離反応挙動についてより詳細な検討を行った。はじめに、解離が極めて遅く、配位子置換法¹⁵⁾¹⁶⁾や CER¹²⁾などの従来法では測定が不可能であった CE 分離・検出の最適条件である pH 8.8 における $[\text{Zn-HSCF}]$ の k_d を、当研究グループが最近開発した CER の新たな手法である配位子置換モード CER (Ligand Substitution Mode CER, LS-CER)¹⁷⁾¹⁸⁾を用いてその測定を行った。この手法は CER と配位子置換法を融合させたものであり、オンキャピラリー自己解離反応に加えて配位子置換反応が同時に起こり見かけ上錯体の解離反応が促進されるため、上記の様に、従来法では困難であった解離反応が極めて遅い (k_d が小さい) 反応系における測定が可能となる。次に、KD-CE では $[\text{Zn-HSCF}]$ が検出されない pH 5.1 において、配位子置換法により k_d を測定する一方、既報¹¹⁾と同様に KD-CE 分離過程における $[\text{Zn-HSCF}]$ のキャピラリー内錯形成平衡について検討した。 $[\text{Zn-HSCF}]$ の KD-CE システムにおける最適条件、及び検出されない各々の条件下での $[\text{Zn-HSCF}]$ のオンキャピラリー解離反応挙動について、速度論的、及び平衡論的

観点の双方から考察し、KD-CE における金属錯体の検出選択性発現の本質を定量的に調査した。

2 実 験

2.1 装 置

CE 装置は、日本分光製 CE-2070 Plus 型吸光検出器、及び松定プレシジョン製 HCZE-30P0.25 型高圧電源装置に、ジーエルサイエンス製溶融シリカキャピラリー (内径 0.050 mm × 外径 0.375 mm, 全長 45.5 cm, 有効長 33.0 cm) を装着して使用した。紫外・可視吸光分光光度計は、日立製 U-3310 を用いた。

2.2 試 薬

特級亜鉛 (関東化学製) を精秤し、6 M (= mol dm⁻³) 塩酸にて溶解した後、水を加えて定容として 0.01 M Zn 標準溶液を調製した。HSCF は既報¹⁹⁾に従って合成し、精製したものを所定量秤量し、水に溶解して、0.01 M とした。プロモフェノールブルー (BPB, 東京化成製) を所定量秤量し、水に溶解して、 1×10^{-3} M 溶液を調製した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (同人化学製) を所定量秤量し、水に溶解して、0.1 M 及び 0.01 M 溶液を調製した。

2.3 操 作

2.3.1 LS-CER による pH 8.80 における $[\text{Zn-HSCF}]$ の解離反応速度定数の測定 Zn 標準溶液 (6.3×10^{-5} M) に HSCF 水溶液 (6×10^{-4} M), リン酸-ホウ酸混合緩衝液 (5×10^{-3} M, pH 8.88) 及び BPB 水溶液 (4×10^{-5} M) を、各規定濃度となるように加え、塩酸にて pH 8.80 に調整して CE 注入試料溶液を調製した。また、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 水溶液にリン酸-ホウ酸混合緩衝液の濃度が各々 5×10^{-3} M となるように加え、水酸化ナトリウム水溶液にて pH 8.80 に調整して、EDTA 濃度がそれぞれ 3.15×10^{-3} , 6.30×10^{-3} , 9.45×10^{-3} , 1.26×10^{-2} M の泳動緩衝液を調製した。

キャピラリーをラウリル硫酸ナトリウム (0.005 M)-水酸化ナトリウム (0.05 M) 混合溶液に次いで、蒸留水で洗浄した後、泳動緩衝液を充填した。試料溶液は落差法 (落差 45 mm, 注入時間 60 秒) でキャピラリーに注入した。検出波長は 600 nm に設定した。印加電圧を調整して (5.0 ~ 20.0 kV) 泳動時間を変化させた複数の電気泳動図を取得した。各々の電気泳動図において、錯体のピーク高さを内標準物質として添加した BPB のピーク高さで規格化して、これを $[\text{Zn-HSCF}]$ のキャピラリー内解離反応のある反応時間 (= 泳動時間内) における $[\text{Zn-HSCF}]$ の残存率とし、これを泳動時間に対しプロットした。それを一次の解離反応として解析し、ある EDTA 濃度における

[Zn-HSCF] の見かけの解離反応速度 (k') を得た. 同様の操作を EDTA 濃度を変化させた各泳動緩衝液に対して行い, k' の EDTA 濃度依存性から [Zn-HSCF] の解離反応速度定数 (k_d) を求めた. また, 以上の操作はすべて室温で行った.

2.3.2 配位子置換法による pH 5.10 における [Zn-HSCF] の解離反応速度定数の測定 1 cm 角石英セルにあらかじめ錯形成させた [Zn-HSCF] 溶液を 300 μ L 入れ, 次いで, EDTA 溶液を 2700 μ L 加え, 600 nm における吸光度の時間変化を測定した. このとき [Zn-HSCF] (2.0×10^{-5} M) に対し, EDTA が大過剰となるように濃度条件 ($0.9 \times 10^{-3} \sim 4.5 \times 10^{-3}$ M) を設定した. 試料溶液のイオン強度は 0.1 (NaCl) とし, 恒温測定セルホルダーを用いて試料溶液を 25 $^{\circ}$ C に保った.

3 結果と考察

3.1 [Zn-HSCF] の解離反応速度論解析

既報¹¹⁾ の CER による k_d の測定は pH 6.4~8.0 の範囲に限られていたが, 泳動緩衝液中の水素イオン濃度の減少に伴って k_d も減少することが見いだされた. したがって, pH 8.80 では [Zn-HSCF] の解離反応は極めて遅いことが予想される. そこで本稿では遅い解離反応速度を解析する際に適した LS-CER¹⁷⁾ を採用した.

LS-CER では二つの経路により錯体が解離する. 配位子を添加しない泳動緩衝液を用いる KD-CE 分離プロセスでは, 過剰の配位子が金属錯体の近傍から CE 分離によって除去される. それゆえ, 金属錯体は解離方向への推進力を常に受けながらキャピラリー内を移動する. このとき, 錯体の解離に伴う分解生成物 (Zn^{2+} 及び L^{5-}) は電気泳動移動度の違いにより錯体バンドから直ちに分離されるため, その逆反応 ($\text{Zn}^{2+} + \text{L}^{5-} \rightarrow \text{ZnL}^{3-}$) は無視できる. 以上のオンキャピラリー解離反応の反応時間は, キャピラリー内での泳動時間に等しい. 金属錯体の解離反応を追跡するには, 金属錯体の残存濃度の時間プロファイルが得られればよい. CER では金属錯体のキャピラリー内解離反応プロファイルを反応時間 (= 泳動時間) の増加に伴う錯体のピーク高さの減少として獲得し, これを解析して k_d を算出する¹²⁾. LS-CER ではこれに加え, 泳動緩衝液中に競争配位子 (Y^{3-}) を添加しているため, 金属錯体 (ZnL^{3-}) の自己解離反応に加えて Y^{3-} による配位子置換反応 ($\text{ZnL}^{3-} + \text{Y}^{3-} \rightarrow \text{ZnY}^- + \text{L}^{5-}$) が同時に起こる. 上述の CER と同様の理由に加え, ここでは配位子置換反応が擬一次条件 (ZnL^{3-} に対し Y^{3-} が大過剰) となるように泳動緩衝液中の [Y] を設定しているため, 逆反応を考慮する必要はない. そのため, LS-CER における ZnL^{3-} の解離反応の速度式は, 次式で表すことができる.

$$-\frac{d[\text{ZnL}]}{dt} = k_Y[\text{ZnL}][\text{Y}] + k_d[\text{ZnL}] \quad (1)$$

k_Y は Y^{3-} による ZnL^{3-} の配位子置換速度定数である. ここで,

$$k' = k_Y[\text{Y}] + k_d \quad (2)$$

として, 両辺を積分すると次式 (3) を得る.

$$\frac{[\text{ZnL}]}{[\text{ZnL}]_0} = \exp(-k't_m) \quad (3)$$

ここで, t_m は錯体の泳動時間, $[\text{ZnL}]_0$ は $t_m = 0$ における錯体の濃度である. LS-CER でも CER と同様に, 泳動時間の増加に伴う錯体のピーク高さの減少の度合いから, 錯体のキャピラリー内解離反応プロファイルを得る. 式 (3) は更に, 錯体と内標準物質のピーク高さ H_{ZnL} , H_{BPB} , 係数 α を用いて¹²⁾, 次式のように表せる.

$$\frac{H_{\text{ZnL}}}{H_{\text{BPB}}} = \frac{1}{\alpha} \exp(-k't_m) \quad (4)$$

Fig. 1 は, 印加電圧を変化させて, 泳動時間を制御した ZnL^{3-} の一連の電気泳動図である. 各々の電気泳動図から, BPB に対する ZnL^{3-} の相対ピーク高さ ($H_{\text{ZnL}}/H_{\text{BPB}}$) を求め, これに対して t_m をプロットして, LS-CER における ZnL^{3-} の残存率の時間プロファイルを得た. これを Fig. 2 に示す. これを式 (4) でフィットして $[\text{Y}] = 6.3 \times 10^{-3}$ M の時の見かけの解離速度定数 (k') として $4.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を得た. 更に, 式 (2) の k_Y と k_d の関係を利用して k_d を算出するため, [Y] を変えた種々の泳動緩衝液を用いて上と同様の実験及び解析を行い, その各々について k' を得た. このように, 得られたそれぞれの k' を EDTA 濃度に対してプロットした結果を Fig. 3 に示す. これを, 式 (2) で直線近似し, その切片として $k_d = 4.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ を得た. これより, [Zn-HSCF] の半減期は 4.5 時間となり, 錯体の泳動時間を Fig. 1 と同一の 4~20 分とすると, わずか 1~5% しか解離しないことになる. すなわち, pH 8.80 において [Zn-HSCF] は, CE 分離のタイムスケール内ではほとんど解離せず, 速度論的に極めて安定であることが明らかとなった. また逆に, このような [Zn-HSCF] の解離反応不活性性が, 通常 CER ではそのオンキャピラリー解離反応挙動の追跡と, k_d の測定を不可能にしていたと言える.

一方, pH 5.1 において [Zn-HSCF] は KD-CE で検出されない. それゆえ, 解離反応速度の解析に CER が適用で

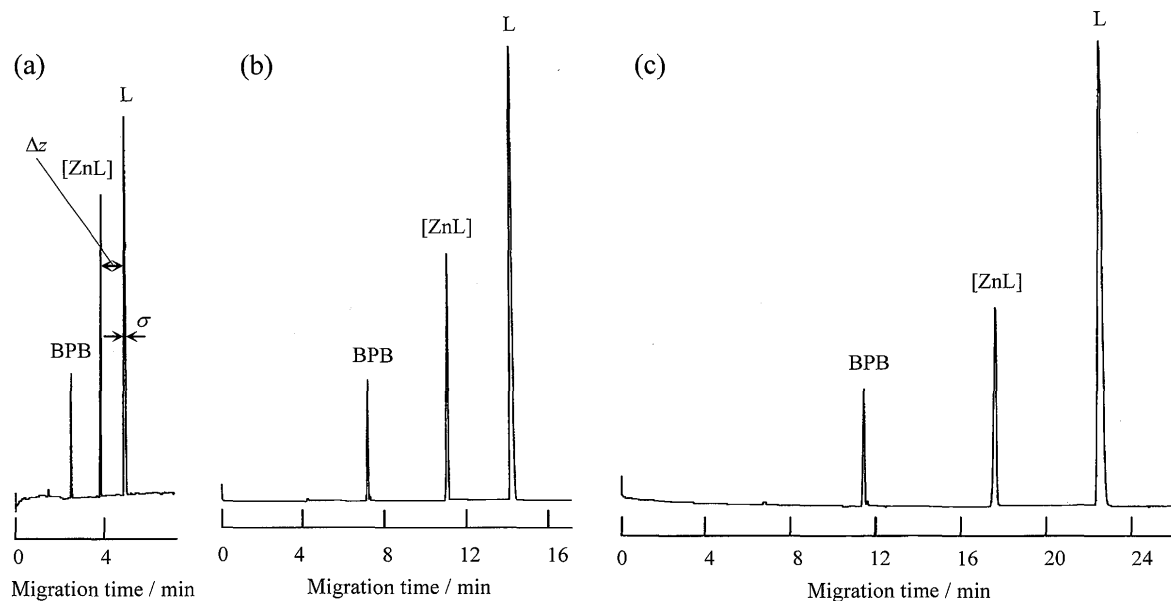


Fig. 1 Typical electropherograms for Zn^{2+} -HSCF complex and BPB by LS-CER

Sample: $[\text{Zn}^{2+}] = 6.3 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{HSCF}] = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{BPB}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_3\text{BO}_3] = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$ (pH 8.80). Electrophoretic buffer: $[\text{EDTA}] = 6.3 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{H}_3\text{BO}_3] = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$ (pH 8.80). Sample injection method: hydrodynamic action (height difference, $\Delta h = 45 \text{ mm}$, 60 s). Capillary: fused-silica capillary tube (50 μm i.d., total length = 45.5 cm, effective length = 33.0 cm). Applying voltage: (a) 20.0 kV; (b) 8.0 kV; (c) 5.0 kV. Detection wavelength: 600 nm.

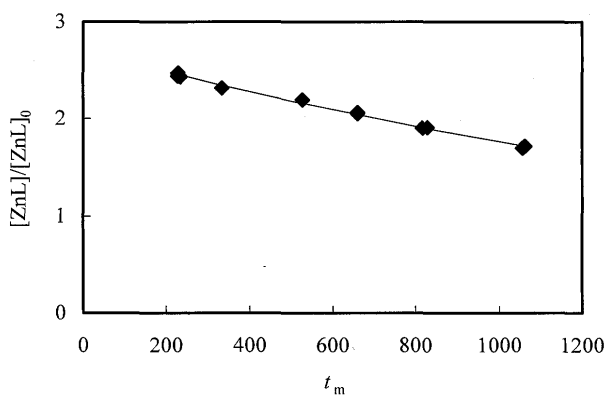


Fig. 2 Reaction profile obtained for Zn^{2+} -HSCF complex by LS-CER at pH 8.80 and $[\text{EDTA}] = 6.3 \times 10^{-3} \text{ M}$

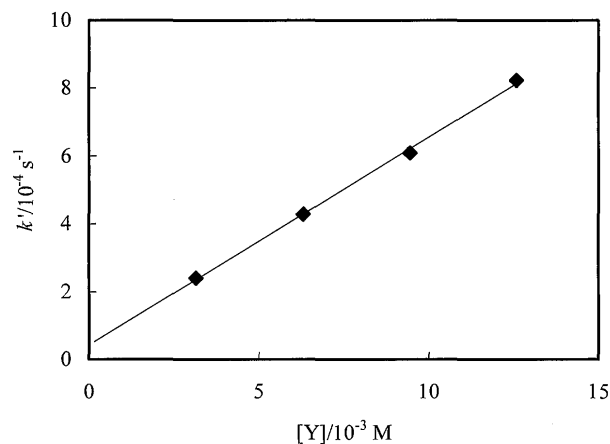


Fig. 3 Relationship between k' of Zn^{2+} -HSCF complex and EDTA concentration in electrophoretic buffer solution

きない。そこで、この pH 条件において配位子置換法によって k_d の測定を試みた。配位子置換法においても錯体は自己解離反応と配位子置換反応の二つの経路により解離し、競争配位子が錯体に比して大過剰に存在するので逆反応が無視可能である。したがって、配位子置換法の解離反応の速度式は、式(1)と同一である。ここでは、

$$k_{\text{obs}} = k_Y[\text{Y}] + k_d \quad (5)$$

として、式(1)を積分すると次式(6)及び(7)を得

る。

$$\frac{[\text{ZnL}]}{[\text{ZnL}]_0} = \exp(-k_{\text{obs}}t) \quad (6)$$

$$\ln \frac{[\text{ZnL}]}{[\text{ZnL}]_0} = -k_{\text{obs}}t \quad (7)$$

ここで、 t は反応開始時からの経過時間である。式(7)は更に、反応開始時の吸光度 E_0 、平衡時の到達吸光度 E_∞ 、 t 秒後の吸光度 E を用いて、次式のように表せる。

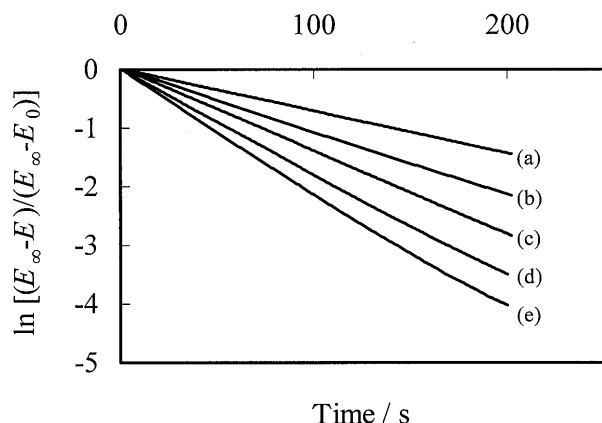


Fig. 4 Ligand exchange reaction profiles of Zn^{2+} -HSCF complex at various EDTA concentration

$[\text{Zn}^{2+}\text{-HSCF}] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{EDTA}]$; (a) $0.9 \times 10^{-3} \text{ M}$; (b) $1.8 \times 10^{-3} \text{ M}$; (c) $2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$; (d) $3.6 \times 10^{-3} \text{ M}$; (e) $4.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 5.10, $I = 0.1$ (NaCl), $\lambda = 600 \text{ nm}$, 25°C .

$$\ln \frac{E_\infty - E}{E_\infty - E_0} = -k_{\text{obs}} t \quad (8)$$

反応開始時から平衡状態が確認できるまで吸光度を測定し, t に対して吸光度から求められる金属錯体残存度の自然対数値のプロットを Fig. 4 に示す. 式(8) でフィットして各 EDTA 濃度に対する k_{obs} を得た. 更に, Fig. 5 に示すように k_{obs} を EDTA 濃度に対してプロットし, 式(5) でフィットして $k_d = 3.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ を得た. この場合の半減期はわずか 3 分であり, pH 5.1 において $[\text{Zn-HSCF}]$ が KD-CE で検出されなかったのは, 通常の CE 分離のタイムスケールでは錯体が生検出器に到達する前にほとんど解離した(速度論的に不安定である)ためである.

以上, 本節では pH 8.80 と pH 5.10 における $[\text{Zn-HSCF}]$ の速度論的特性を定量的に明らかにした. 本節で得た k_d はどちらも既報¹¹⁾のプロトン濃度の増加に伴って k_d の値も増加する傾向と一致し, 泳動緩衝液中のプロトン濃度の増加によって $[\text{Zn-HSCF}]$ の自己解離反応速度が加速される既報の説を支持するものである.

3.2 CE 分離過程における $[\text{Zn-HSCF}]$ の平衡論的安定性の推算

CE 注入前の試料溶液には配位子が過剰に存在するので金属錯体は, 平衡論的に安定であると言えるが, CE 分離中の場合, 電気的移動度の違いにより配位子は錯体から直ちに分離され, 錯体は解離方向への推進力を受ける. これは言い換えると錯体は平衡論的に不安定な環境下にあるということであり, その詳細な検討が必要となる. そこで, 実際の CE 分離過程における $[\text{Zn-HSCF}]$ の平衡論的安定

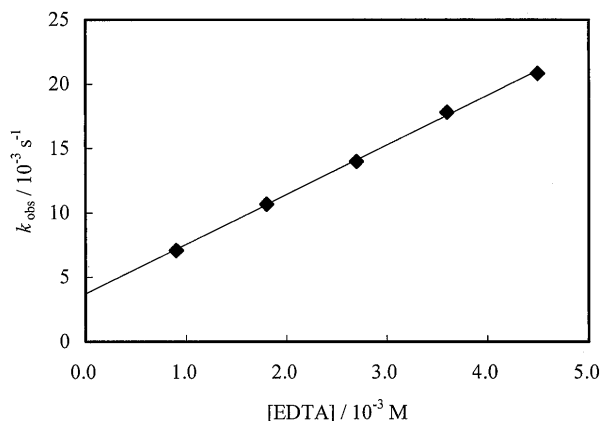


Fig. 5 Relationship between k_{obs} of Zn^{2+} -HSCF complex and EDTA concentration

性の評価を行うために, 副反応(亜鉛のヒドロキシ錯体の形成と HSCF のプロトン化)を考慮した, 条件安定度定数 (K'_{ZnL} , 次式)に基づく検討を行った.

$$K'_{\text{ZnL}} = \frac{[\text{ZnL}]}{[\text{Zn}'][\text{L}']} \quad (9)$$

ここで, $[\text{Zn}']$, 及び $[\text{L}']$ はそれぞれ遊離の亜鉛, 及び HSCF の全濃度である. また, キャピラリーにおける HSCF ピークから Δz だけ離れた場所での HSCF 濃度は, 以下の式で推算することができる¹¹⁾.

$$C_{\Delta z} = C_{\text{peak}} \exp \left[\frac{-(\Delta z)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (10)$$

ここで, C_{peak} は HSCF ピークにおける HSCF 濃度, σ は HSCF ピークの半値幅, $C_{\Delta z}$ は HSCF ピークから Δz だけ離れた場所における HSCF 濃度である. 本報告の場合, 泳動緩衝液と CE 注入試料溶液の緩衝液の組成と濃度は同一であり, スタッキングによる濃縮は起こらないと考えられるので $C_{\text{peak}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ と仮定する.

pH 8.80 の場合, $K'_{\text{ZnL}} = 10^{14.7}$ であり¹¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾, 錯体が 99.9% 平衡論的に安定に存在するために必要な HSCF 濃度は式(9) から $[\text{L}'] = 10^{-11.7} \text{ M}$ となる. その一方, 印加電圧 20.0 kV の時に得られた電気泳動図の場合 {Fig. 1 (a)}, $\Delta z = 11\sigma$ であり, 式(10) から $C_{\Delta z} = 10^{-29.3}$ を得るが, これは $[\text{L}'] = 10^{-11.7} \text{ M}$ を大きく下回っている. したがって, $[\text{Zn-HSCF}]$ は平衡論的にほとんど存在し得ない条件下におかれていることが分かる. また, 印加電圧が低くなるに従って Δz も増大するので, いずれの印加電圧においても $[\text{Zn-HSCF}]$ は平衡論的に存在し得ないと言える.

pH 5.10 の時, $K'_{\text{ZnL}} = 10^{5.3}$ であるから¹¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾, 錯体が

99% 平衡論的に安定に存在するために必要な HSCF 濃度は式(9) から $[L'] = 10^{-3.3} \text{ M}$ となる. また, 式(10) から HSCF 濃度が $10^{-3.3} \text{ M}$ 以上になる Δz は 1.2σ 以内となる. すなわち, $[\text{Zn-HSCF}]$ と HSCF のピークが重複しない限り, $[\text{Zn-HSCF}]$ は平衡論的に不安定であることを表している. 実験の項に記した操作とは別に, Zn 標準溶液を Fig. 1 の 10 倍添加して金属過剰とし, ほとんどの配位子が錯体を形成する注入試料を用いて, 実際に pH 5.10 における電気泳動図を取得した. その結果, 印加電圧が 25.0 kV の場合, HSCF のピークの 3.5σ 離れた位置に $[\text{Zn-HSCF}]$ の痕跡が確認できたが, HSCF のピークからは 1.2σ 以上離れており, この場合も $[\text{Zn-HSCF}]$ は平衡論的に存在し得ないと言える.

以上, $[\text{Zn-HSCF}]$ の安定性について, 本節においてはどちらの pH についても平衡論的に不安定であることを推算により示した. これに対し, 前節では, 速度論的に pH 8.80 の時 $[\text{Zn-HSCF}]$ は速度論的に極めて安定 (解離反応不活性) であり, KD-CE 分離過程においてほとんど解離せずに検出される一方, pH 5.10 の時は速度論的に不安定 (解離反応活性) なため, CE 分離の時間スケール内ではほとんどが解離し検出されないことを明らかにした. これらから, KD-CE において錯体がオンキャピラリー検出される本質は, 錯体の速度論的特性が支配していると言える.

4 結 言

以上, 本報告では, 解離反応が極めて遅いため測定が困難であった pH 8.80 における $[\text{Zn-HSCF}]$ の k_d を LS-CER を用いて測定することに成功した. 更にこれに基づいて, KD-CE における $[\text{Zn-HSCF}]$ のオンキャピラリー解離反応挙動について, 速度論的, 及び平衡論的観点の双方から考察し, $[\text{Zn-HSCF}]$ の CE 分離・検出の最適条件である pH 8.80 において, $[\text{Zn-HSCF}]$ は, 平衡論的には存在し得ない環境下におかれているにもかかわらず速度論的に極めて安定 (解離反応不活性) であり, KD-CE 分離過程においてほとんど解離せずに検出されることを明らかにした. 一方, KD-CE では検出されない pH 5.10 において, $[\text{Zn-HSCF}]$ は平衡論的に不安定である上, 速度論的に不安定 (解離反応活性) なため, CE 分離の時間スケール内ではほとんどが解離し検出されないことを明らかにした. 以上から, キャピラリー注入前の誘導体化段階では金属錯体の平衡論的安定性は必要であるが, プレキャピラリー誘導体化 CE における金属錯体の検出選択性の本質は, 錯体の速度論的特性にあることが明らかになった. また, 水和金属イオンの水分子交換反応速度定数の大きさから, 通常解離活性とされる Zn^{2+} の錯体であるにもかかわらず, $[\text{Zn-HSCF}]$ は速度論的に安定であるこの事実は, HSCF がつくる比較的剛直な配位環境によりもたらされるものと言え

る¹⁹⁾. それゆえ, HSCF を基にして比較的ソフトなドナー原子 (N) を導入した 1,5-ビス(4スルホ-8キノリン)-3-シアノホルマザンを設計・合成したところ, 同様に解離活性とされるソフト重金属イオン (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) と速度論的に安定な錯体を形成し, プレキャピラリー誘導体化 CE でこれらの錯体種の同時検出が可能であることを見いだした²¹⁾.

また, 本報告では遅い解離反応速度を解析するために新しく開発された LS-CER を主要な解析手段として利用し, その結果以上の結論を得た. これは, 速い解離反応速度を解析するために開発された μCER ²²⁾ に並び, CER の解析範囲を拡張し, 解離反応速度解析のツールとしてこれらの手法の有用性を強く支持するという「副産物」を得た事に相当する. 更には, 金属錯体に限らず, 生体分子を始めとした種々の複合体の解離反応解析法としてもこれらの手法が有用であると考ええる.

文 献

- 1) 壹岐伸彦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 495 (2002).
- 2) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **4**, 701 (1993).
- 3) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr. A*, **652**, 539 (1993).
- 4) 壹岐伸彦, 四ツ柳隆夫: 化学, **48**, 434 (1993).
- 5) T. Saitoh, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr. A*, **469**, 175 (1989).
- 6) T. Saitoh, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Anal. Sci.*, **7**, 495 (1991).
- 7) R. M. Rush, J. H. Yoe: *Anal. Chem.*, **26**, 1345 (1954).
- 8) M. A. Koupparis, P. I. Anagnostopoulou: *Analyst*, **111**, 1311 (1986).
- 9) M. I. Ermakova, N. L. Vasil'eva, Y. Postoskii: *J. Anal. Chem. USSR*, **16**, 8 (1961).
- 10) 竹原由佳, 高橋 透, 星野 仁: 日本分析化学会第 49 年会講演予稿集, p. 184 (2001).
- 11) T. Takahashi, Y. Takehara, H. Hoshino: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 910 (2007).
- 12) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Anal. Chem.*, **72**, 4812 (2000).
- 13) M. Macka, P. Nesterenko, P. Anderson, P. R. Haddad: *J. Chromatogr. A*, **803**, 279 (1998).
- 14) J. E. Sonke, V. J. M. Salters: *Analyst*, **129**, 731 (2004).
- 15) 荻野 博訳: “化学反応の速度と機構”, (1984), (マクローヒルブック); J. H. Espenson: “CHEMICAL KINETICS AND REACTION MECHANISMS”, (1981), (McGraw-Hill, Inc.).
- 16) A. A. Frost, R. G. Pearson: “KINETICS AND MECHANISM”, (1961), (John Wiley & Sons, Inc.).
- 17) M. Takahashi, N. Iki, T. Takahashi, H. Hoshino: “Final Program and Abstracts: Sixth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis”, p. 83 (2006).
- 18) 高橋真理子: 修士学位論文, 東北大学 (2007).
- 19) W. Buddesinsky, J. Svec: *Inorg. Chem.*, **10**, 313 (1971).
- 20) 日本分析化学会北海道支部・東北支部共編: “分析

化学反応の基礎 演習と実験”, (1994), (培風館).

- 21) ダバアサムブ サランゲレル, 高橋 透, 星野 仁: 平成十八年度化学系学協会東北大会講演予稿

集, p. 78 (2006).

- 22) T. Takahashi, K. Ohtsuka, N. Iki, H. Hoshino: *Analyst*, **130**, 1337 (2005).

Estimation of On-Capillary Dissociation Characteristics of Zn(II) Complex with 1,5-bis(2-hydroxy-5-sulfophenyl)-3-cyanoformazan by a Capillary Electrophoretic Reactor

Kazutaka OGASAWARA¹, Toru TAKAHASHI¹, Nobuhiko IKI¹ and Hitoshi HOSHINO¹

¹ Division of Environmentally Benign Systems, Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, 6-6-20, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579

(Received 15 June 2007, Accepted 22 August 2007)

The on-capillary dissociation reaction properties of the Zn(II) complex with 1,5-bis(2-hydroxy-5-sulfophenyl)-3-cyanoformazan ([Zn-HSCF]) have been studied using the Capillary Electrophoretic Reactor (CER). The solvolytic dissociation reaction rate constant (k_d) of [Zn-HSCF] under the optimal conditions for CE separation at pH 8.80 was determined to be $4.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (half-life period was 4.5 hours) with ligand substitution mode CER. Thus, it is clear that [Zn-HSCF] is extremely inert at pH 8.80 in a kinetic sense. On the other hand, [Zn-HSCF] was not detected at pH 5.10 in the CE system. The k_d value at pH 5.10 was determined to be $3.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ by a batch-wise method with a ligand substitution technique using EDTA as a substitution ligand. The half-life period was calculated to be only 3 minutes, suggesting that almost all [Zn-HSCF] dissociates on the time scale of CE separation at pH 5.10. From an estimation of the free ligand concentration profiles in the capillary during CE separation processes, it was shown that CE separation gives an almost thermodynamically unsuitable environment for [Zn-HSCF] at both pH 8.80 and 5.10. Thus, it is concluded that the detection selectivity of metal complexes in the pre-capillary derivatization CE depends on the kinetic stability, *i.e.* the dissociation reaction inertness of the metal complexes, though their thermodynamic stability is necessary only for the pre-capillary derivatization step.

Keywords : metal complex; dissociation kinetic analysis; capillary electrophoresis; dissociation rate constant; detection selectivity.