

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21550081

研究課題名（和文）動電過給法の高効率化によるキャピラリー電気泳動分析の高感度化と水質分析への応用

研究課題名（英文）High-sensitive analysis by capillary electrophoresis by using highly efficient electrokinetic supercharging and its application to water analysis

研究代表者

廣川 健（HIROKAWA TAKESHI）

広島大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：30116652

研究成果の概要（和文）：

キャピラリーゾーン電気泳動法の高感度化を目的として、動電過給前濃縮法を最適化し、希土類金属イオン等を ppt レベルで検出する事が可能となった(例えばエルビウム(III)の場合、0.04 nM(6.7 ng/L))。これは ICP-MS にも比肩できる感度である。これは試料体積を 900 $\mu$ L、キャピラリー末端と電極の距離を約 40mm と通常より長くする事などによって、試料を効率的に注入する事ができたためである。濃縮率は 8 万倍であった。

研究成果の概要（英文）：

With the aim of high-sensitive analysis by capillary zone electrophoresis, electrokinetic supercharging preconcentration method was optimized to give ppt level LOD for rare earth ions etc (e.g. for Er(III), LOD was 0.04 nM (6.7 ng/L)). The LOD achieved is comparable to that of ICP-MS. By using 900  $\mu$ L sample in an elongated vial where the distance between the capillary end and the electrode was 40 mm, the analytes could be introduced efficiently. The proposed preconcentration strategy afforded an enrichment factor of 80,000.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分離分析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球規模の気候変動・人口増加に伴う水資源の枯渇が国際的な問題になりつつあり、世界では約 11 億人が安全な飲料水を

確保できない状況が現実にあると言われていている。我が国はもちろん、特にアジア・アフリカ諸国などにおいて「水の安全保障」が大きな課題となっている。安全な水資源の確保には適切な分析法が不可欠である。我が国に

においては、「水道水水質基準」に代表される厳格な規格があり、重金属等の許容濃度が定められている (Hg 0.5ppb, Pb 50ppb, Cr(VI) 50ppb など)。また、公定分析法としては、誘導結合プラズマ原子発光法 (ICP-AES) や原子吸光法 (AAS) を使用することが定められている。従来の分析法の感度から、これは止むを得ない選択であったが、今後は発展途上国でも調達・活用の容易な、よりコストパフォーマンスが高くローエミッションで簡便な高感度分析法で置換される事が望ましいと考えられる。

キャピラリー電気泳動法 (CE) は、これらの条件を満足する有望な分析法であるが、ICP-AES 等に比べ歴史が比較的浅いこと、また、従来、CE によるイオン分析は、ICP-AES やイオンクロマトグラフィー (IC) に比べ、格段に濃度感度が劣ると考えられてきたため、十分な普及には至っていない。しかしながら、近年、各種のオンライン前濃縮法の開発により、感度の改善が進んでいる。我々は過渡的等速電気泳動前濃縮を併用する電気的注入法を提唱し、各種の金属イオンについて **ppb レベル** の分析を可能にし、この方法を **Electrokinetic Supercharging (EKS)**、本研究課題では動電過給法と訳) と名付けている (図 1 参照)。本研究は前濃縮システムの改良により **EKS** の更なる高感度化・高精度化を旨とし、**EKS** が得意とする水質分析に貢献しようとするものである。

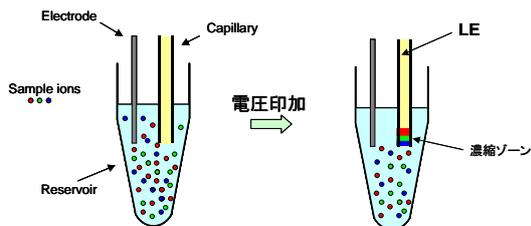


図 1. キャピラリー電気泳動法における EKS (過渡的等速電気泳動を伴う電気的注入) のイメージ。LE は等速電気泳動のリーディング液として作用し、試料成分が濃縮される。

## 2. 研究の目的

更なる高感度化を目指すこれまでの研究の過程において、現在一般に利用されている電気的注入法では、試料のごく一部しか利用されていない事が明らかになった。電圧印加初期には時間と導入量が比例するが、

長時間電圧印加しても導入量は頭打ちになり、仕込量の 10% 程度の試料導入が、実用的な時間 (60s~100s 程度) で導入可能なレベルであった。CE では例えば試料溶液 100  $\mu$ L を試料バイアルに入れて使用するが、その 10  $\mu$ L 程度しか有効利用されていない事になる。これは、電気的注入時に、有効な電場が印加される部分が限られていること、また、電場が弱い部分に存在する試料イオンが、電気的注入の間に、電場の強い部分にまで十分には拡散しないためである。この改善には試料溶液中の電場をなるべく広くする工夫が必要である。

従来、CE の高感度化の主流は、検出ハードウェアの検出能力向上であった。例えば、通常広く用いられている UV 検出の代わりに、レーザー励起蛍光検出などが利用されるが、誘導体化など問題点も多い。本質的な問題解決のためには**導入可能な試料物質量を可能な限り増加させる**ことが必要である。構造的な制約から試料導入には高度な前濃縮が不可欠であり、この目的に **EKS** 法は最適な方法である。**EKS** で達成される感度は電気的注入プロセスに支配される。注入される物質量は対象試料溶液中の物質量・試料導入時の電流量・対象試料イオンの輸率 (共存イオンの種類と濃度) に影響されるが、いずれにせよ電気的注入を高効率化するためには、試料導入部の構造を検討し、キャピラリー末端と電極に挟まれる試料体積を出来るだけ大きく取る必要がある。このためには電極部の構造を改善することが最良であると考えられる。このような改良電極と、試料体積の増加 (例えば 0.5-10mL 程度) により、**サブ ppb レベル** の成分について実用的な CE 分析が可能になるはずであり、これは ICP-AES の感度に比肩するか、元素によってはそれを凌駕するものである。

我々は、以上の目的達成のため、電気的注入を高効率化するための基礎研究を行いそれらの成果を実試料の分析に適用し、**従来達成している検出限界 (LOD) を 1/10 にする事** (具体的には金属イオンで数 10 ppt) を目標とした。このための基礎研究として、有限要素法によるシミュレーションを有効利用し、有効電場範囲の広い新規な電極構造を持つ試料導入部 (一例としては後述する電極一体型試料リザーバーシステム) の開発を行ない、**動電過給前濃縮 (EKS) - キャピラ**

リー電気泳動法の究極的高感度化を目指す。一方、EKSに限らず電氣的試料注入を利用するCE分析では、圧力差導入などに比べて定量分析の再現性が良くないと言われている。これは電極など試料導入部の微妙な構造的変動（例えば白金線電極の曲がり）により試料導入時の電場が変化するためと推測されるが、これについて原理的な検証を行うとともに、**再現性の向上をはかる**よう十分剛性の高い構造を持つ試料導入部を開発する。

希薄な水試料をEKSで分析する際、試料組成およびキャピラリー中電解液の組成は時間とともに局所的に変化する。このとき、通電によりH<sup>+</sup>イオンやOH<sup>-</sup>イオンが生じる。これらは、場合によっては微量成分の輸率を下げるので一般的には高感度化に望ましくないが、これらをEKS前濃縮時のターミナルイオンとして利用することにより（別にターミナルイオンの導入をおこなわない）、**前濃縮操作を簡便化**する方法の原理の確立、およびこの方法を利用した簡便な分析メソッドを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) EKSのシミュレーションによる効果的試料導入法の模索

従来型試料電極部における有効電場の模式図を図2aに示した。これは有限要素法によるシミュレーション(CFD-ACE+, CFD-RC, USA)の結果を考慮した模式図で、有効電場(図中ハッチング部)に存在する試料イオンのみがキャピラリーに導入され、他の部分の試料は拡散が遅いため、寄与しない事を示している。すなわち高感度化には、有効電場を拡大し、試料を効率よく導入する必要がある。この実現にはEKS前濃縮に最適な電極構造(たとえばリング状の構造など)を実験的に探る必要があるが、単に電極とキャピラリー末端を離しただけでもある程度の効果が認められる事が明らかになった(発表論文7)。

#### (2) 具体的な試料導入部の改良

キャピラリー電気泳動では、従来、キャピラリーと白金線電極を平行におくタイプ(図2a)、および中空白金電極にキャピラリーを差し込むタイプが使用されてきた。本研究では、シミュレーションの結果を考慮しながら、まず「電極一体型リザーバー」を設計試作した。すなわち、金属(銅、アルミニウム)製あるいは内面に白金を蒸着した試料バイアル

を用い、壁面を電極とし、キャピラリー末端と電極間距離を十分広くする事により電場印加範囲を広げ、電氣的注入の効率を向上させようとしたが、低濃度試料ではコンタミの影響が大きく実用的でなかった。結局、図2bに示したように、使用する白金線を短くするだけの変更がもっとも簡便で高感度化(および分析の高精度化)に有用であることがわかった。現有のCE装置(大塚電子、CAPI-3300)では、体積約1mLの縦長ポリエチレンバイアルに900 $\mu$ Lの試料を入れ、キャピラリー末端・電極間距離を40mmとした場合が、もっとも実用的な条件と考えている。

この試料導入法の限界を知る目的で、より大型のガラスバイアル(電解液用、体積17mL)中にリング状の電極をとりつけ、試料バイアルとして使用した。この場合は有効電場範囲が狭くなるため、試料溶液全体をゆっくりと攪拌する必要があり、簡便とは言えないが、この方法によると、UV検出を使用するCZEとして、もっとも低いLODが得られた。

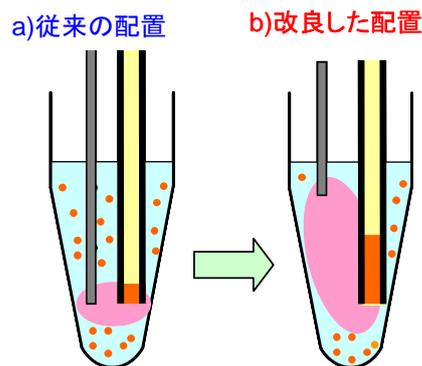


図2. 電極における有効電場範囲(従来配置と改良配置). 各図中左側が電極、右側がキャピラリー、間のハッチングは有効電場、黄色は泳動バッファー、赤色ゾーンは濃縮された試料。

### 4. 研究成果

従来のCZE-UV法の感度を向上させる目的で、動電過給前濃縮法(EKS)を改善させ、pptレベルのLODを達成した。使用した電解液中の4-メチルベンジルアミン(UV可視化剤、4MB)は、同時に希土類イオンに対してリーディングイオンとして作用し、CZE分離過程前に、カチオン試料を効果的に等速電気泳動濃縮することができる。この際、試料濃度が低下すると等速電気泳動濃縮を完了させるためにターミナルイオンを導入する必要がないことを見いだした。この理由は、

キャピラリー中の試料ゾーンの背後に、ターミナルイオンとして機能する高濃度の水素イオンゾーンが形成されるためである。このゾーンは、泳動開始後、試料側キャピラリー末端で、泳動バッファー中の 4MB カチオンが去ったあとに残ったゾーン（pH 調整用の酪酸が主成分）が、電気的中性則より低 pH となった結果、伝導度が低下し、ターミナルゾーンの役割を果たすためである(図 3)。詳細は省略するが、この現象は本研究で初めて明らかになった(発表論文 3)。

さらに、試料注入過程において有効電場内により多くの試料を蓄積させるために、通常の試料バイアルから細長バイアルに変更し、試料体積を 500  $\mu\text{L}$  から 900  $\mu\text{L}$  に増加させた。試料バイアルの変更は、同時にキャピラリー末端と電極の距離を長くとることができ、試料を効率的に注入することができる。試料注入段階におけるターミナルイオンの形成を説明するために、試料バイアル内での試料濃度、pH、電場強度の分布をコンピューターシミュレーションにより解析した。こうして、提案した前濃縮法を実験的に評価したところ、8 万倍の濃縮係数が得られ、希土類金属イオンを ppt レベルで検出することが可能となった(エルビウムの場合、0.04 nM(6.7 ng/L))。エレクトロフェログラムの試料濃度依存性を図 3 に示す。K, Na についてピークが観察できないのは、それらの移動度が 4MB カチオンのそれより大きいためである。

更なる高感度化を目指す場合、より大量の試料を必要とする。試料バイアルを縦長にすることは装置上の限界があるので、試料バイアルの容量を 1 ml から 17 ml(電解液用バイアルを使用)に増加し、試料導入用の白金電極をワイヤー状からリング状へ変更し、さらに、試料溶液を攪拌しながら試料導入を行った。これらの工夫により、電気的注入の過程において、より多くの試料が電場内に蓄積され、かつ、過渡的等速電気泳動の効果により試料ゾーンを狭めることができる。本手法により、希土類 7 種の混合試料を用いた場合、濃縮係数は約 50 万となり、1ng/L 以下の検出限界を達成した。本法で得られた検出限界は、通常の圧力注入法を用いた手法と比較すると 10 万倍、誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)と比較すると 1000 倍向上し、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)と同等の感度が得られた(発表論文 1)。

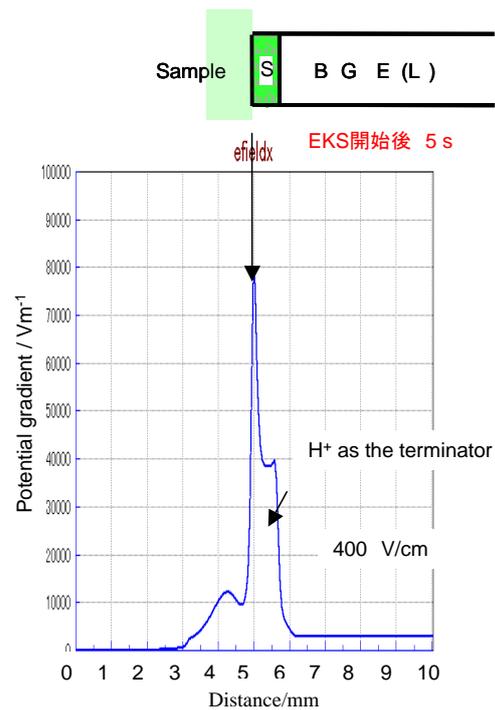


図 3. キャピラリー末端におけるターミナルゾーンの自動生成 (シミュレーション、詳細は参考文献 3 参照)

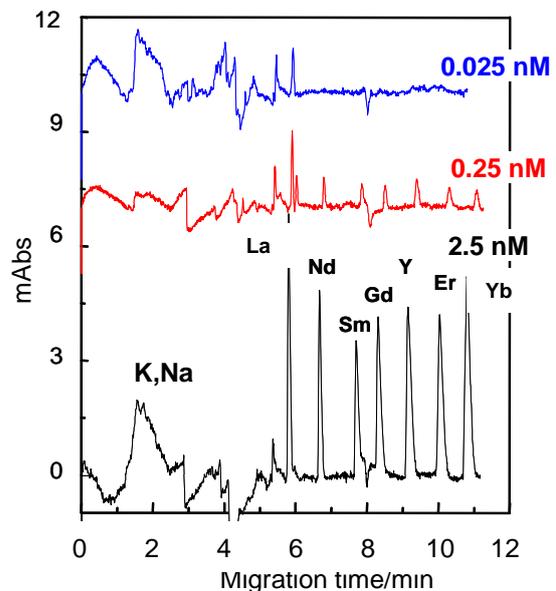


図 4. 1 mL 縦長バイアルを用い、カチオン試料 900  $\mu\text{L}$  を分析した例 (成分 K, Na, Li, La, Nd, Sm, Gd, Y, Er, Yb、濃度は図中に表示)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Zhongqi Xu, K. Nakamura, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Another approach toward over 100000-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis: Electrokinetic supercharging with optimized sample injection, *Anal. Chem.* 83, 398-401 (2011). (査読有)
- 2) N. Kaewchuay, Y. Yakushiji, K. Fukushi, K. Saito, T. Hirokawa, A novel hybrid mode of sample injection to enhance CZE sensitivity for simultaneous determination of a pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and its degradation products, *Electrophoresis*, 32, 1486-1491 (2011). (査読有)
- 3) Zhongqi Xu, K. Kawahito, X. Ye, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Electrokinetic supercharging with a system-induced terminator and an optimized capillary versus electrode configuration for parts-per-trillion detection of rare earth elements in CZE, *Electrophoresis*, 32, 1195-1200 (2011). (査読有)
- 4) Zhongqi Xu, N. Okabe, A. Arai, T. Hirokawa, Investigation of the pH gradient formation and cathodic drift in microchip isoelectric focusing with imaged UV detection, *Electrophoresis*, 31, 3558-3565 (2010). (査読有)
- 5) Zhongqi Xu, Kenji Murata, Akihiro Arai, T. Hirokawa, Band-broadening suppressed effect in long turned geometry channel and high-sensitive analysis of DNA sample by using floating electrokinetic supercharging on a microchip, *Biomicrofluidics*, 4, Article Number: 014108 (2010). (査読有)
- 6) Zhongqi Xu, Jiro Okada, Andrei R. Timerbaev, T. Hirokawa, Sensitive profiling of biogenic amines in urine using CE with transient isotachopheric preconcentration *J. Sep. Sci.*, 32, 4143-4147 (2009). (査読有)
- 7) Zhongqi Xu, Eiji Koshimidzu, T. Hirokawa, Electrokinetic sample injection for high-sensitive capillary zone electrophoresis (part 2): Improving the quantitative repeatability and application of EKS-CZE to the detection of atmospheric electrolytes, *Electrophoresis*, 30, 3534-3539 (2009). (査読有)
- 8) Zhongqi Xu, T. Hirokawa, Preconcentration and separation of DNA fragments based on microchip electrophoresis, *Chinese Journal of Chromatography*, 27: 102-106 (2009). (査読有)
- 9) Zhongqi Xu, T. Esumi, N. Ikuta, T. Hirokawa, High-sensitive analysis of DNA fragments by capillary gel electrophoresis using transient isotachopheric preconcentration and

fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 1216, 3602-3605 (2009). (査読有)

- 10) Zhongqi Xu, Andrei R. Timerbaev, T. Hirokawa, High-sensitivity capillary and microchip electrophoresis using electrokinetic supercharging preconcentration: Insight into the stacking mechanism via computer modeling, *J. Chromatogr. A*, 1216, 660-670 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 40 件)

1. 叶 曉雪、徐 中其、井上 淳司、廣川 健、High-sensitive analysis of DNA fragments by EKS-CGE using a low-viscosity BGE and a modified electrode (第 60 回分析化学会年会、2011/9/14、名古屋大学)
2. 藤岡 直人、杉原 優子、井上 淳司、徐 中其、廣川 健、動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による高感度アニオン分析 (II) (第 60 回分析化学会年会、2011/9/14、名古屋大学)
3. 森 聡美、叶 曉雪、徐 中其、井上 淳司、廣川 健、動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による DNA 断片の高感度分析 - 低濃度における妨害ピークについて - (第 60 回分析化学会年会、2011/9/14、名古屋大学)
4. 廣川 健、等速電気泳動の分離濃縮機構の解明と超高感度キャピラリー電気泳動法への展開 (第 60 回分析化学会年会、学会賞講演、2011/9/15、名古屋大学)
5. T. Hirokawa, Zhongqi Xu, Capillary Zone Electrophoresis Using Electrokinetic Supercharging Preconcentration - from Small Ions to DNA Fragments (ICAS2011, 2011/5/22、京都国際会議場)
6. N. Kaewchuay, K. Fukushi, K. Saito, T. Hirokawa, Sensitivity Enhancement for Capillary Zone Electrophoresis Using Field Amplified Sample Injection and Hybrid Sample Injection (ICAS2011, 2011/5/22、京都国際会議場)
7. K. Ito, T. Shinoda, N. Miyamoto, T. Kuromoto, H. Morikawa, Y. Okamoto, T. Fujiwara, T. Hirokawa, Determination of Iodine in Food-related Substances (ICAS2011, 2011/5/22、京都国際会議場)
8. 森 聡美、廣川 健、動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による DNA 断片の高感度・高精度分析と低濃度試料における妨害ピークについて (第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2011/11/9、慶應義塾大先端生命研、鶴岡)
9. 廣川 健、キャピラリーゾーン電気泳動法 - 高感度化のストラテジーと応用例 (第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2011/11/9、慶應義塾大先端生命研、鶴岡)
10. T. Hirokawa, A. Timerbaev, Zhongqi Xu,

The First Decade of Electrokinetic Supercharging for CZE - A Summary of Methodological and Practical Developments, (18th International Symposium on Electro- and Liquid Phase Separation (ITP2011), Tbilisi, Georgia, USA, 2011/8/11)

11. T. Hirokawa, A Timerbaev, Zhongqi Xu, The First Decade of Electrokinetic Supercharging for CZE - A Summary of Methodological and Practical Developments, (11th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2011) Hobart, Tasmania, Australia, 2011/11/27)

12. 廣川 健、徐 中其、川人浩司、中村 健太郎、動電加給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による水中極微量成分の分析-試料導入時ターミナルゾーンの自動生成- (第71回分析化学討論会, 2010/5/15, 島根大学)

13. 徐中其、岡部昇、荒井昭博、廣川健、Investigation of cathodic drift and pH gradient compression of isoelectric focusing in microchip with imaged UV detection (第71回分析化学討論会, 2010/5/15, 島根大学)

14. 福永義樹、徐 中其、廣川 健、キャピラリー電気泳動法による生体中微量試料の分取・分析(第71回分析化学討論会, 2010/5/15, 島根大学)

15. 川人浩司、徐 中其、廣川 健、動電過給前濃縮キャピラリーゾーン電気泳動法によるサブ ppb レベルイオンの分析 (第71回分析化学討論会, 2010/5/15, 島根大学)

16. ネトナピット ケオチューイ、福士 恵一、齋藤 恵逸、廣川 健、電場増幅試料導入法及びハイブイド試料導入法によるキャピラリーゾーン電気泳動法の高感度化 (第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2010/11/15, 長良川国際会議場、岐阜)

17. 廣川 健、徐 中其、川人 浩二、森 聡美、藤岡 直人、動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法(EKS-CZE)による高感度分析・濃縮メカニズム (第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2010/11/15, 長良川国際会議場、岐阜)

18. 藤岡 直人、廣川 健、徐 中其、動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による痕跡濃度アニオンの分析 (第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2010/11/15, 長良川国際会議場、岐阜)

19. 福永 義樹、徐 中其、廣川 健、キャピラリー電気泳動法による生体関連試料の精密分取・分析 (第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2010/11/15, 長良川国際会議場、岐阜)

20. 森 聡美、山田 美穂路、徐 中其、廣川 健、

動電過給前濃縮-キャピラリーゲル電気泳動法によるDNA断片の高感度・高精度・高分離能分析 (第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2010/11/15, 長良川国際会議場、岐阜)

21. T. Hirokawa, Zhongqi Xu, K. Nakamura, K. Kawahito, M. Yamada, Capillary Zone Electrophoresis using Electrokinetic Supercharging Preconcentration. From Small Ions to DNA Fragments (ITP2010 17th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, Baltimore, USA, 2010/8/29)

22. T. Hirokawa, Capillary Zone Electrophoresis using Electrokinetic Supercharging Preconcentration. From Small Ions to DNA Fragments (16th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, LACE2010, Florianopolis, Brazil, 2010/12/3)

23. 徐 中其、川人 浩司、廣川 健、動電過給前濃縮キャピラリー電気泳動法によるイオンの高感度・高精度分析と検出濃度下限 (日本分析化学会第58年会、2009/9/24, 北海道大学)

24. 徐 中其、荒井 昭博、廣川 健、動電過給法によるマイクロチップ電気泳動分析の高感度化と生体高分子への応用 (日本分析化学会第58年会、2009/9/24, 北海道大学)

25. 徐 中其、小清水 栄治、廣川 健、Electrokinetic supercharging: The powerful CE preconcentration method and its applications in environmental analysis (第70回分析化学討論会、2009/5/16, 和歌山大学)

他15件

[その他]  
ホームページ  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/hiro77/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣川 健 (HIROKAWA TAKESHI)  
広島大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号: 30116652

### (2) 研究分担者

徐 中其 (ZHONQI XU)  
広島大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号: 30457270 (H21→H22)

### (3) 連携研究者

伊藤 一明 (ITO KAZUAKI)  
近畿大学・工学部・教授  
研究者番号: 80151497