

オンライン試料濃縮による ナノ微粒子のキャピラリー 電気泳動分析



北川 文彦

1 はじめに

近年のナノ材料化学の進展により様々なナノ微粒子 (NPs) が開発され、多岐にわたる応用がなされているが、環境中に放出された NPs の悪影響は完全には解明されておらず、その高感度検出ならびにキャラクタリゼーションが重要となっている (表 1)¹⁾。極低濃度の金属 NPs を分析するために ICP-MS などの高感度検出器が利用されている一方で、フラーレンやカーボンナノチューブなどの炭素系 NPs も環境放出の影響を明らかにする必要性が増しているが、ICP を適用できないために測定が難しい。したがって、分析現場におけるサイズ分布や凝集状態の解析には、従来の DLS や電子顕微鏡測定に頼らざるを得ない状況である。最近の報告でも河川水中から ppt から ppq レベルの金属酸化物 NPs やフラーレン誘導体が検出されており²⁾、環境分析において NPs を高感度にサイズ分布解析できる新規な方法論の確立が急務である。

一方、キャピラリー電気泳動 (CE) は高い分離性能を有しているにもかかわらず、低い検出感度が問題となっており、感度を改善するために様々なオンライン試料濃縮技術が開発されてきた。特に、泳動液と組成の異なる試料溶液を注入し、二液間の速度差を利用して試料成分の濃縮を行う手法の開発が進められている。例えば、試料マトリックスと泳動液におけるイオン強度、pH、先行電解質 (LE)・終末電解質 (TE) 濃度やミセル濃度に差をつけて濃縮を行う技法はそれぞれ、電場増強試料スタッキング (FASS)、ダイナミック pH ジャンクション (DpHJ)、等速電気泳動 (ITP)、スウィーピングと呼ばれ、様々な分析に応用されている³⁾。本稿では、オンライン試料濃縮法による NPs の高感度 CE 分析について紹介する。

2 オンライン試料濃縮によるナノ微粒子の電気泳動分析

Baron らは最も基本的な濃縮法である FASS により、表面にカルボキシ基を有する直径 75 nm のコアシェル型の磁気 NPs (MNP) の濃縮を行い、塩基性の泳動液

を用いることで、NPs を 1 本のピークとして検出することに成功している⁴⁾。この方法では、濃縮効率 (SEF) は 76 倍となっており、FASS の標準的な濃縮効率を達成している。また、Nguyen らは、電圧極性切替を伴う大容量試料スタッキング (LVSS) 法を蛍光性のコアシェル型 MNPs の分析に適用し、350 倍の高感度化に成功している⁵⁾。一方、Baron らは、電場増強スタッキング試料注入 (FASI) 法により同一の NPs 試料を分析した試みを報告している。ポリビニルアルコール修飾キャピラリーおよびカチオン性界面活性剤を泳動液に添加することによって電気浸透流 (EOF) を抑制し、2 分間の電氣的注入を行うことで、860 倍の高感度化を達成している⁶⁾。また、NPs の FASI 分析の応用として、Oukacine らは FASI により 100~1000 倍に濃縮したピークの形状から、シリカ NPs の流体力学的径を見積もる方法を提案しており、DLS および TEM 測定の結果との良い一致が示されている⁷⁾。

Liu らのグループは、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) における逆極性スタッキング (REPSM) による金 NPs (AuNPs) の分析について網羅的な検討を行っており、種々の分析条件の最適化を通して、効率的な濃縮とサイズ分離を達成している。はじめに、SDS を含む泳動液を用い、極性切替時間、緩衝液濃度、pH、SDS 濃度、試料注入量の最適化により、17 nm の AuNPs および 60 nm の Au/Ag コアシェル型 NPs をそれぞれ 30 倍および 140 倍に濃縮しながら完全分離に成功している⁸⁾。同様のアプローチにより、サイズの異なる AuNPs の濃縮・分離についても検討されており、試料溶液への塩添加により分離効率が 2.1×10^6 まで向上することを明らかにするとともに、5 nm および 40 nm の AuNPs をそれぞれ 20 倍および 380 倍に濃縮しながら良好な分離を達成している⁹⁾¹⁰⁾。さらに、極性切替時間を最適化し、前記で用いたキャピラリーよりも 2.5 倍長いものを利用することによって、5 nm、40 nm および 60 nm の 3 種 AuNPs の完全分離を達成し、SEF を 500 倍に、分離効率も 1.15×10^7 までに向上できることを明らかにしている¹¹⁾。一方、Engelhard らのグループは、この REPSM によるオンライン試料濃縮法を AgNPs の分析に応用し、さらに CE 装置と ICP-MS 検出器を結合することにより、20, 40, 60 nm の AgNPs の分離ならびに $\sim 0.1 \mu\text{g/L}$ レベルの LOD を実現している¹²⁾。

Oszwałdowski らのグループは、強い発光を示すことで知られる半導体結晶の Cd/Se NPs のオンライン試料濃縮について検討を行い、ミセル溶液と泳動液の境界面に Cd/Se NPs が濃縮される機構を提案している。はじめに試料として疎水性の trioctylphosphine (TOP) 修飾された Cd/Se NPs を用い、中性ならびにアニオン性界面活性剤を含む水に分散してから CE 分析することで良好なピークが得られることを明らかにした¹³⁾。また、界面活性剤を含まない泳動液との境界面で濃縮が進行していることが示唆されている。試料溶液中ではアニオン性ミセルに取り込まれて負電荷を帯びていた NPs が、泳動液中の有機溶媒や高い塩濃度により境界面付近でミセルが不安定化して、表面電荷が低下することによって泳動速度の差が生じるために、濃縮が進行するものと推測されている¹³⁾¹⁴⁾。さらに、試料溶液と泳動液の間に

表 1 従来の NPs 測定技術

ナノ微粒子	環境中への放出例	高感度分析法	サイズ分析法
金属 NPs	Au, Ag など	ICP-MS	TEM, DLS
金属酸化物 NPs	TiO ₂ , ZnO など	ICP-MS, SERS	
炭素系 NPs	C ₆₀ , CNT など	TG-MS	
マイクロプラスチック	ポリエチレン, PET など	Py-GC-MS	DLS
大気中浮遊粒子	PM _{2.5} , PM _{0.1} など	ICP-MS, TOT	

C₆₀: fullerene, CNT: carbon nanotube, PET: polyethylene terephthalate, PM: particulate matter, ICP: inductively-coupled plasma, MS: mass spectrometry, SERS: surface-enhanced Raman scattering, TG: thermogravimetry, Py: pyrolysis, GC: gas chromatography, TOT: thermal optical transmittance, TEM: transmission electron microscope, DLS: dynamic light scattering.

ミセル溶液を注入する濃縮モードを提案し、最大で 60 倍の濃縮率を達成した^{15)~17)}。

Petr らのグループは、カルボキシ基修飾 MNPs の DpHJ によるオンライン試料濃縮について検討を行っており、酸性の試料溶液とアルカリ性の泳動液の境界面に MNPs を濃縮することに成功している¹⁸⁾。キャピラリー内 pH 変化のコンピュータシミュレーションしながら、濃縮における pH や緩衝液の種類、試料注入量の影響について調べている。その結果、pH 4.5 および pH 9.5 の緩衝液を試料マトリックスおよび泳動液としたときに MNPs が効率よく DpHJ されて細かいピークを与え、12 倍の高感度化を達成した。

ITP による NPs の濃縮についても、複数のグループによって検討されている。Nann らのグループは、クエン酸で安定化された AuNPs について ITP によりサイズ分離が可能であることを示した¹⁹⁾。Pyell らは AuNPs, Cd/Te NPs およびウシ血清アルブミン (BSA) コロイド NPs といった種々の NPs の ITP 分析について検討し、検量線を作成せずに定量が可能となる新たなアプローチを提案している²⁰⁾。Praus らは AgNPs の ITP 分析について検討し、LE として硝酸イオン、TE として MES や カプロン酸を用いることで 4~22 nm の粒径を有する AgNPs の濃縮・分離に成功している²¹⁾。Riley らは、AuNPs および金ナノロッド (AuNRs) の分析に過渡的 ITP (tITP) の適用について検討を行っており、クエン酸イオンや塩化物イオンを LE とすることで、通常の CE 分析に比べピークの段数を 2.5 倍向上できることを示している²²⁾。さらに、アスペクト比の異なる AuNRs の分離にも成功していることから、tITP による NPs の高感度分析法の確立が望まれる。

3 おわりに

CE で開発されてきた種々のオンライン試料濃縮法が NPs の分析にも有効であることが示されつつある現状を紹介した。今後も、様々な新規ナノ材料の開発ならびに応用が進んでいくことに疑いはなく、CE の特徴である高分離能分析とオンライン試料濃縮による高感度分析を組み合わせることで、特に環境中に放出された極微量の新規 NPs の分析に有効な手段となりうることを期待される。

文 献

- 1) J. R. Lead, G. E. Batley, P. J. J. Alvarez, M. N. Croteau, R. D. Handy, M. J. McLaughlin, J. D. Judy, K. Schirmer: *Environ. Toxicol. Chem.*, **37**, 2029 (2018).

- 2) S. D. Richardson, S. Y. Kimura: *Anal. Chem.*, **92**, 473 (2020).
- 3) F. Kitagawa, K. Otsuka: *J. Chromatogr. A*, **1335**, 43 (2014).
- 4) D. Baron, P. Dolanská, Z. Medříková, R. Zbořil, J. Petr: *J. Sep. Sci.*, **40**, 2482 (2017).
- 5) N. V. T. Nguyen, C. Smadja, M. Taverna, S. El Mousli, E. Secret, J. M. Siaugue, L. T. H. Nguyen, T. D. Mai: *Anal. Chim. Acta*, **1161**, 338466 (2021).
- 6) D. Baron, C. Cacho, J. Petr: *J. Chromatogr. A*, **1499**, 217 (2017).
- 7) F. Oukacine, A. Geze, L. Choïnard, J. Putaux, J. Stahl, E. Peyrin: *Anal. Chem.*, **90**, 2493 (2018).
- 8) K. Lin, T. Chu, F. Liu: *J. Chromatogr. A*, **1161**, 314 (2007).
- 9) F. Liu: *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2554 (2009).
- 10) F. Liu: *Anal. Sci.*, **26**, 1145 (2010).
- 11) F. Liu: *Anal. Chim. Acta*, **694**, 167 (2011).
- 12) D. Mozhayeva, I. Strengge, C. Engelhard: *Anal. Chem.*, **89**, 7152 (2017).
- 13) S. Oszałdowski, K. Z. Gibuła, K. P. Roberts: *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 2831 (2011).
- 14) S. Oszałdowski, K. Zawistowska-Gibuła, K. P. Roberts: *Microchim. Acta*, **176**, 345 (2012).
- 15) S. Oszałdowski, K. P. Roberts, A. R. Timerbaev: *J. Chromatogr. A*, **1305**, 320 (2013).
- 16) S. Oszałdowski, P. Kubán: *Anal. Chim. Acta*, **864**, 85 (2015).
- 17) S. Oszałdowski: *J. Chromatogr. A*, **1601**, 365 (2019).
- 18) C. Cacho, Z. Marková, J. Sevcik, R. Zboril, J. Petr: *J. Chromatogr. A*, **1364**, 59 (2014).
- 19) W. Bücking, T. Nann: *IEEE Proc. Nanobiotecnol.*, **153**, 47 (2006).
- 20) U. Pyell, W. Bücking, C. Huhn, B. Herrmann, A. Merkoulou, J. Mannhardt, H. Jungclas, T. Nann: *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 1681 (2009).
- 21) P. Praus, M. Turicova, P. Suchomel, L. Kvittek: *RSC Adv.*, **5**, 59131 (2015).
- 22) K. R. Riley, H. El, J. Tan, V. A. Hackley, W. A. Maccrehan: *J. Chromatogr. A*, **1598**, 216 (2019).



北川 文彦 (Fumihiko KITAGAWA)

弘前大学大学院理工学研究科 (〒036-8561 弘前市文京町 3)。北海道大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》高性能マイクロスケール電気泳動分析システムの開発。《趣味》スポーツ観戦。