

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3807984号  
(P3807984)

(45) 発行日 平成18年8月9日(2006.8.9)

(24) 登録日 平成18年5月26日(2006.5.26)

(51) Int.C1.

F 1

GO1N 27/447 (2006.01)  
BO1D 57/02 (2006.01)GO1N 27/26 301B  
GO1N 27/26 331E  
BO1D 57/02

請求項の数 24 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2001-542199 (P2001-542199)  
 (86) (22) 出願日 平成12年11月30日 (2000.11.30)  
 (65) 公表番号 特表2003-515742 (P2003-515742A)  
 (43) 公表日 平成15年5月7日 (2003.5.7)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2000/032688  
 (87) 國際公開番号 WO2001/040785  
 (87) 國際公開日 平成13年6月7日 (2001.6.7)  
 審査請求日 平成14年9月10日 (2002.9.10)  
 (31) 優先権主張番号 60/168,427  
 (32) 優先日 平成11年11月30日 (1999.11.30)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502194436  
 エレクトリック パワー リサーチ イン  
 スティテュート  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 303 パロ アルト ピーオーボックス  
 10412  
 (74) 代理人 100059959  
 弁理士 中村 稔  
 (74) 代理人 100067013  
 弁理士 大塚 文昭  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 賢男  
 (74) 代理人 100065189  
 弁理士 宍戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】毛管電気泳動プローブ及びそれを用いる方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

毛管電気泳動を用いて試料中のイオンを検出するプローブであって、少なくとも1種のビニル性カルボン酸化合物(トロポロンを除く)から構成されていることを特徴とする、前記プローブ。

## 【請求項2】

少なくとも1種の前記ビニル性カルボン酸化合物が、1つ以上の炭素-炭素二重結合又は炭素-窒素二重結合を介して1つ以上のカルボニル官能基と結合している1つ以上のエノール官能基を有する、請求項1記載のプローブ。

## 【請求項3】

少なくとも1種の前記ビニル性カルボン酸化合物が前記化合物のケト-エノール互変異性体として存在している、請求項1記載のプローブ。

## 【請求項4】

少なくとも1種の前記ビニル性カルボン酸化合物がビニル性カルボン酸官能基の一部である安定化共鳴構造をもつ芳香族化合物である、請求項1記載のプローブ。

## 【請求項5】

少なくとも1種の前記ビニル性カルボン酸化合物がケト-エノール互変異性体のヘテロ原子類縁体である、請求項1記載のプローブ。

## 【請求項6】

少なくとも1種の前記ビニル性カルボン酸化合物がビニル性カルボン酸官能基の一部で

ある安定化共鳴構造をもつヘテロ原子芳香族化合物である、請求項1記載のプローブ。

**【請求項 7】**

1種以上の前記ビニル性カルボン酸化合物が3,4-ジヒドロキシ-3-シクロプロテン-1,2-ジオン；2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノン；4,5-ジヒドロキシ-4-シクロペンテン-1,2,3-トリオン；5,6-ジヒドロキシ-5-シクロヘキサン-1,2,3,4テトラオン；2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン；3-オキソ-1-グロフラノラクトン；2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-4,6-ジオン；4-ケトブチロラクタム；5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサンジオン；テトラヒドロフラン-2,4-ジオン；6-ヒドロキシ-1-テトラロン；2,3-ジヒドロキシ-2-シクロプロペン-1-オン及び尿酸からなる群より選ばれる、請求項1記載のプローブ。

**【請求項 8】**

少なくとも一種の前記ビニル性カルボン酸化合物が該ビニル性カルボン酸のUV発色団を変化させない周縁置換基を有する、請求項7記載のプローブ。

**【請求項 9】**

少なくとも1種のビニル性カルボン酸化合物が約2～5 mMの濃度で存在する、請求項1記載のプローブ。

**【請求項 10】**

前記プローブがビニル性カルボン酸化合物のカチオンエノールエステル誘導体またはカチオンエノールアミド誘導体を含む、請求項1記載のプローブ。

**【請求項 11】**

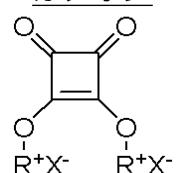
前記プローブが毛管電気泳動システムに用いられるキットに備えられている、請求項1～10のいずれか一項に記載のプローブ。

**【請求項 12】**

前記プローブが毛管電気泳動システムに備えられている、請求項1～10のいずれか一項に記載のプローブ。

**【請求項 13】**

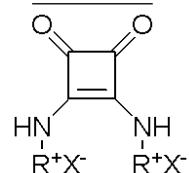
カチオンエノールエステル誘導体が下記構造を有する、請求項10記載のプローブ：



式中、X<sup>-</sup>はイオン化可能な対イオンであり、R<sup>+</sup>は有機カチオン基である。

**【請求項 14】**

カチオンエノールアミド誘導体が下記構造を有する、請求項10記載のプローブ：



式中、X<sup>-</sup>はイオン化可能な対イオンであり、R<sup>+</sup>は有機カチオン基である。

**【請求項 15】**

間接検出による毛管電気泳動を用いて試料中のイオンを検出するためのバックグラウンド電解液であって、

ビニル性カルボン酸化合物である少なくとも1種のプローブ；及び  
緩衝液

を含んでいる、前記バックグラウンド電解液。

**【請求項 16】**

1種以上の該ビニル性カルボン酸化合物が約2～5 mMの範囲にある濃度で存在している、請求項15記載のバックグラウンド電解液。

**【請求項 17】**

10

30

40

50

前記バックグラウンド電解液が毛管電気泳動システムに用いられるキットに備えられている、請求項15または16記載のバックグラウンド電解液。

**【請求項 18】**

毛管電気泳動法を用いて試料中のイオンを間接的に検出する方法であって、該試料を、少なくとも一つのプローブがビニル性カルボン酸化合物である一つ以上のプローブと緩衝液を含むバックグラウンド電解液を含む毛管に導入する段階；該毛管に沿って電場を加えて該試料中の該イオンを該毛管に沿って検出領域に移動させ及び毛管に沿って分離させる段階；及び紫外光度検出によって間接的に該イオンを検出する段階を含む、前記方法。

**【請求項 19】**

前記毛管の内部が陰極電気浸透流れを逆転させるように処理されている、請求項18記載の方法。

**【請求項 20】**

1種以上の前記プローブが、異なる分子量のイオンを前記試料中で検出することができるよう選ばれる、請求項18記載の方法。

**【請求項 21】**

前記イオンがアニオンであり、前記毛管が陽極毛管であり、及び前記アニオンの陽極流れが前記毛管内で生じる、請求項18記載の方法。

**【請求項 22】**

前記イオンがアニオンであり、前記バックグラウンド電解液が電気浸透流調整剤を含み、及び前記アニオンの陽極流れが前記毛管内で生じ、1種以上の前記プローブが十分に高いモル吸光度を有し、その濃度が該毛管内に該調整剤が沈殿することを避けるのに十分低い濃度である、請求項18記載の方法。

**【請求項 23】**

請求項1～10に記載のプローブを用いて、毛管電気泳動により試料中のイオンを間接的に検出する方法。

**【請求項 24】**

試料中のイオンを間接的に検出するための毛管電気泳動装置であって、

請求項15または16に記載のバックグラウンド電解液を有する毛管；

該毛管に沿って電場を加えて該イオンを該毛管に沿って検出領域まで移動させ及び毛管に沿って分離させる電源；及び

間接紫外光度検出によってイオンを検出する検出器を含んでいる、前記装置。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

**発明の簡単な説明**

本発明は、一般的には、毛管電気泳動用プローブ及び毛管電気泳動法に関する。更に詳細には、本発明は、ビニル性カルボン酸化合物から構成される新規な毛管電気泳動プローブの種類、及びそれを用いる毛管電気泳動法に関する。

**【0002】**

**発明の背景**

超純水、即ち、低濃度のイオン化学種を有する水は、多くの工業プロセスに必要とされている。例えば、超純水は、欠陥のないデバイスを生産する半導体デバイスの処理に必要とされている。超純水を必要とする他の工業は、医薬、農薬、化学及び食品工業である。超純水は、また、原子炉に、特に腐食防止のために必要とされている。加圧水型原子炉（PWR）や沸騰水型原子炉（BWR）のような軽水炉（LWR）内の水中のイオン化学種のモニタリングは、腐食を制御することが不可欠である。原子力プラント内のイオン化学種のモニタリングは、非常に低濃度を、一部の用途においては一兆分率（ppt）程度の濃度で監視することができなければならない。

10

20

30

40

50

水中のイオン化学種の存在を検出するために導電率検出や光度検出が用いられてきた。現在、ほとんど全部の原子力プラントには、イオン化学種の通常のモニタリングにインラインイオンクロマトグラフィー (IC) が用いられている。ICモニタリングに伴う多量のサンプリング量が必要とされることや分析時間が長いことと共に消費コストが高いことが、代替的測定法又はモニタリング法を開発させる少なからぬ動機になっている。

#### 【0003】

その代替法の1つが毛管電気泳動 (CE) であり、この方法は10分の1～100分の1のより少ない溶離体積ですみ、また測定時間が1桁速い（典型的には、ICの15～30分に対して3分未満）。更に、CEは3～6桁少ない量の分析試料ですみ、放射線廃棄物コストが増大している原子炉の水の分析に特に好ましい。CEは、また、ICでは簡単に行えない遷移金属同時分離も可能である。CEの概論は、テキス、Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions, Peter Jandik, Gunther Bonn, 1993, 特にChap. 3に見ることができる。

CEシステムの開発に多くの努力が集中してきた。Jonesらの特許第5,566,601号には、感度とイオン化学種の分解能が改善されたゾーン毛管電気泳動による溶液中のイオンを分離、同定及び測定する方法が記載されている。該方法には、選択された可視又はUV吸収アニオン又はプローブを含有する担体電解液で充填された小さい口径の毛管にイオン化学種を含有する試料を導入することが必要である。毛管カラムに電圧をかけ、イオンをその移動度に従って溶離させる。紫外 (UV) 吸収イオンもUV透過イオンもUV/可視光度モニタリングによって検出及び定量され得る。光吸収アニオンとして、例としてモリブデン酸、タンゲステン酸、フェロシアン酸、臭素、ヨウ素及び重クロム酸より選ばれたものを用いることが示されている。

文献に述べられているように、CEシステムの開発の態様は、CEに用いられるプローブの選択に集中してきた。認知できる吸光度がない無機化学種又は低分子量有機化学種（即ち、『問題の化学種』又は分析物）の検出の場合、CE検出は、典型的には、UV吸収化学種 プローブとも呼ばれる-を含むバックグラウンド電解液 (BGE) を用いた間接検出により行われる。UV透過分析物は、プローブを分析物で置き換えることにより検出される。

#### 【0004】

プローブの選択に多くの要素が重要であることが示されている。まず、プローブの電気泳動移動度 ( $\mu$ ) が考慮され、問題の分析物の移動度と厳密に同じでなければならない。第2に、CEシステムの検出可能最低濃度  $c_{lim}$  が考慮され、次の関係が確立している。

$$c_{lim} = c_m / (TR \times DR) \quad (1)$$

（式中、 $c_m$  はプローブの濃度であり、TRは移動比であり、DRは与えられたシグナルに対するシグナル-ノイズ比の基準 (a measure) である動的リバースである。）移動比は、各当量の分析物イオンによって置き換えられるプローブイオンの当量数である。例えば、一般的プローブのピロメリト酸の移動比は1価イオンについては0.25、2価イオンについては0.5である。動的リザープは、下記の関係によって示される。

$$DR = (\cdot L \cdot c_m) / AN \quad (2)$$

（式中、 $\cdot$  はプローブのモル吸光度であり、Lは毛管を通る光の路長であり、ANは検出波長の関数である吸光度ノイズレベルである。式2のDRを式1に挿入すると、次の検出可能最低濃度の式が得られる。

$$c_{lim} = AN / (\cdot L \cdot TR) \quad (3)$$

これらの原理と式の概論は、Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions, Peter Jandik, Gunther Bonn, 1993, Chap. 3, 特にp.134-150に見ることができる。

#### 【0005】

多くのプローブが従来技術において教示されている。例えば、米国特許第5,128,005号には、クロム酸イオンを用いることが教示されている。米国特許第5,156,724号には、UV吸収アミン又は複素環式硫酸化合物を用いることが教示されている。米国特許第5,104,506号には、クロム酸塩とアルキル第四級アンモニウム塩を用いることが教示されている。CEにおいて間接検出するために従来技術において用いられた他のプローブは、芳香族化合物のピロメリト酸である。

10

20

30

40

50

一般的には、満足すべきプローブの多くの基準は、従来技術に述べられている。特に分析物の移動度は、プローブの移動度と一致させることが重要である。プローブの高モル吸光度も重要である。高モル吸光度がプローブによって示される検出波長は他の重要な基準である。例えば、検出波長は、ANを最低にする値、及び分析物の吸光バンドとの矛盾を避ける値であることが有益である。更に、アニオンプローブの溶解度は、逆方向電気浸透流れ(EOF)調整剤を用いて沈殿を避ける場合に重要である。モル吸光度の小さいプローブについては、十分な検出可能最低分析物濃度を得るために高いプローブ濃度が必要である。高いプローブ濃度は、毛管内の動的EOF調整剤の『プローブ誘導』沈殿による潜在的問題が生じ得る。これらの及び他の基準の概論は、例えば、James S. Fritz, Recent developments in the separation of inorganic and small organic ions by capillary electrophoresis; J. of Chromatography A, 884(2000) 261-275; Philip Doble, Miroslav Macka, Paul R. Haddad, Design of background electrolytes for indirect detection of anions by capillary electrophoresis, Trends in Analytical Chemistry, vol. 19, no. 1, 2000, pgs 10-17に見ることができる。10

#### 【0006】

プローブの開発に多くの努力が集中されてきたが、今日までのところ用いられる従来技術のプローブは十分に満足なものではない。上述した所望の基準とは反対に、従来技術のプローブは、低UVスペクトル、即ち、検出波長における吸光度が強い結果となり、これは分析物又は問題の化学種が強い吸光度を示すまさにその領域である。問題の分析物の吸光度のこの類似性は、分析物の間接検出を難しくする。また、これらの低い波長では吸光度ノイズが高くなり、よって動的リザーブが減少する。更に、検出可能最低濃度 $c_{lim}$ は、他の最適検出波長のモル吸光度 $\epsilon$ が多くは小さいために半導体、原子力及び他の工業における多くの用途にはしばしば高すぎる。更に、ピロメリト酸のような多重イオン化プローブの移動比は低く、高い最低検出可能濃度になる。更に、そのようなプローブは、典型的には、狭い範囲の分析物を検出するのにだけ用いられ、広い範囲の用途には適用できない。従つて、プローブとCE法の改善の継続した開発が興味深い。20

#### 【0007】

##### 発明の要約

一般的には、本発明の目的は、新規な毛管電気泳動プローブの種類、及びそれを用いる毛管電気泳動法を提供することである。30

本発明者らは、1種以上のビニル性カルボン酸化合物から構成される新規な種類の毛管電気泳動プローブを発見した。特に、本発明のビニル性カルボン酸化合物は、1つ以上の炭素-炭素二重結合又は炭素-窒素二重結合を介して1つ以上のカルボニル官能基と結合している1つ以上のエノール官能基を含む化合物として定義される。好ましくは、本発明のビニル性カルボン酸化合物は環状化合物である。本発明のビニル性カルボン酸化合物には、更に、互変異性体、特にケト-エノール互変異性体が含まれる。本発明のビニル性カルボン酸化合物には、更に、上記結合が芳香族化合物の1つ以上の安定化共鳴形態によって得られる化合物が含まれている。本発明のビニル性カルボン酸化合物は、また、カチオン化合物であってもよい。即ち、正に荷電した基を用いることにより正に荷電してもよい。例においては、カチオン化合物には、ビニル性カルボン酸化合物のカチオンエステル誘導体が含まれる。他の例においては、カチオン化合物には、ビニル性カルボン酸化合物のカチオンアミド誘導体が含まれる。40

#### 【0008】

本発明の他の態様においては、毛管電気泳動により水中のイオンを検出する方法であって、一部の水がUV吸収化学種又は1種以上のビニル性カルボン酸化合物から構成されるプローブを含んでいるバックグラウンド電解液で充填された毛管に水を導入する、前記方法が提供される。水中に存在するイオンを毛管に沿って移動させ分離するために毛管に沿って電圧がかけられる。イオンがUV吸収化学種に置き換えられ、UV/可視光光度検出器によつて間接的に検出される。

本発明の他の態様においては、毛管電気泳動装置であって、1種以上のプローブ又は1種以50

上のプローブの組合わせ及び緩衝液を含むバックグラウンド電解液を該毛管に入れ、1種以上の該プローブが1種以上のビニル性カルボン酸化合物から構成されている、前記装置が提供される。

本発明の他の態様においては、毛管電気泳動を行うための1種以上の試薬を含有するキットが提供され、1種以上の該試薬が1種以上のビニル性カルボン酸化合物から構成されている1種以上のプローブを含んでいる、前記キットが提供される。また、該試薬は、1種以上の緩衝液を含んでいてもよい。

本発明は、次の詳細な説明が添付の図面と共に読み取られるときに更に明らかに理解されるであろう。

#### 【0009】

10

#### 発明の詳細な説明

本発明者らは、毛管電気泳動(CE)に用いられるUV吸収化学種又はプローブの新規な種類及びそれを用いる方法を発見した。プローブとUV吸収化学種という用語が同意語であり、本説明全体で同じ意味に用いることができる。特に、本発明の毛管電気泳動プローブは、1種以上のビニル性カルボン酸化合物から構成されている。これらの化合物のプローブとしての適合性は予想できなかった。特に、本発明のビニル性カルボン酸化合物は、1つ以上の炭素-炭素二重結合又は炭素-窒素二重結合を介して1つ以上のカルボニル官能基と結合している1つ以上のエノール官能基を含んでいる化合物として定義されている。ビニル性カルボン酸化合物の概説は、G.V.Perz & Alice L. Perez, *Organic Acids without a Carboxylic Acid Functional Group*, J. of Chemical Education, Vol. 77, No. 7, Jul. 2000, pgs.910-915に見ることができる。好ましくは、本発明のビニル性カルボン酸化合物は環状化合物である。また、本発明のビニル性カルボン酸化合物には本発明のビニル性カルボン酸化合物ケト-エノール互変異性化を行った他の構造の互変異性体が含まれることは当業者によって理解されなければならない。また、本発明のビニル性カルボン酸化合物には芳香族構造が含まれることは当業者によって理解されなければならない。下記に記載されるように、本発明のビニル性カルボン酸化合物は、アニオンであってもカチオンであってもよい。これにより、アニオン分析物とカチオン分析物双方の検出が可能である。

#### 【0010】

本発明のビニル性カルボン酸化合物は、結合している。結合は2つの形を取ることができる。まず、結合は、1つ以上の炭素-炭素二重結合又は炭素-窒素結合を介して存在することができる。即ち、線状結合である。また、結合は、芳香族化合物の1つ以上の安定化共鳴構造がビニル性カルボン酸である場合に芳香族系を介して存在することができる。線状結合と芳香族結合は、ヘテロ原子を含む化合物中に存在することもできる。結合が芳香族系か又はヘテロ芳香族系を介して存在する場合、本発明の適切な化合物は安定化共鳴構造を生じる。

ビニル性カルボン酸化合物から構成される本発明のプローブの代表例としては、次の化合物：3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン(スクエア酸)；2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノン；4,5-ジヒドロキシ-4-シクロペンタ-1,2,3-トリオン(クロコン酸)；2-ヒドロキシ-2,4,6-シクロヘプタトリエノン(トロポロン)；6-ヒドロキシ-1-テトラロン又は5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサンジオン(ジメドン)が含まれるがこれらに限定されない。これらの化合物は、下記式として示される。

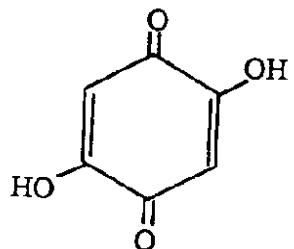
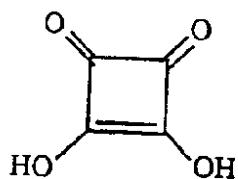
#### 【0011】

#### 【化1】

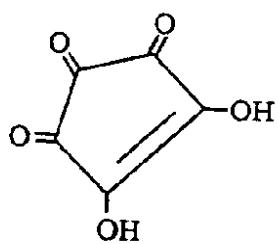
20

30

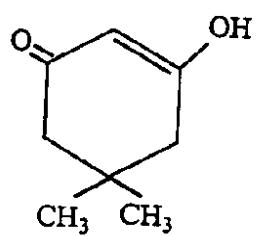
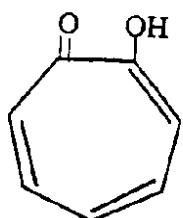
40



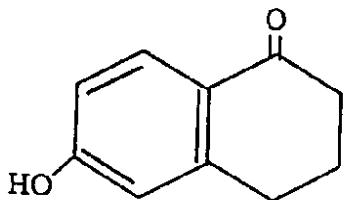
10



20



30



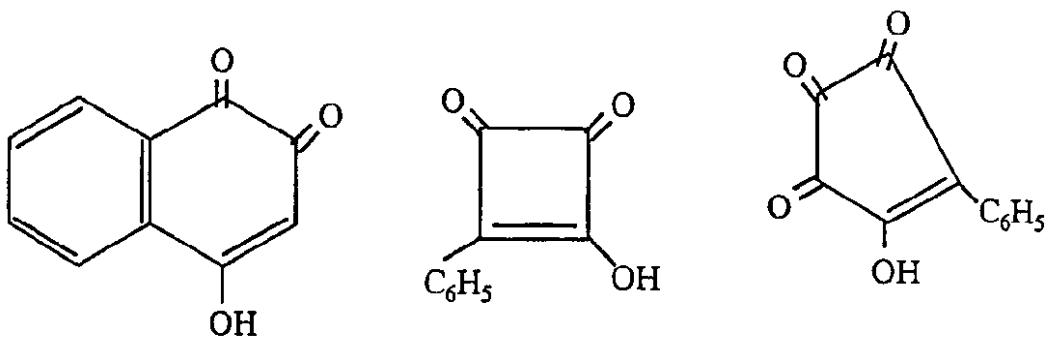
【0012】

40

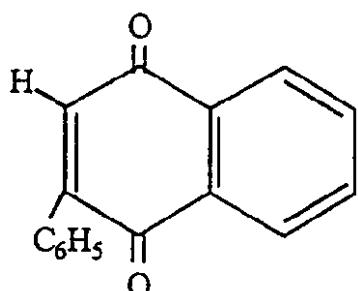
本発明の化合物には、例えば、下記に示されるビニル性カルボン酸UV発色団を変化させない周縁置換が含まれる。

【0013】

【化2】



10



20

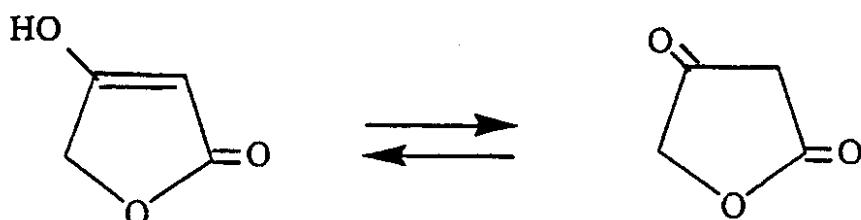
## 【0014】

本発明の定義と一致する化合物の他の例としては、更に、5,6-ジヒドロキシ-5-シクロヘキセン-1,2,3,4-テトラオン（ロジゾン酸）；2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン；3-オキソグロフラノラクトン；2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン；4,6-ジオン-4-ケトブチロラクタム；テトラヒドロフラン-2,4-ジオン；2,3-ジヒドロキシ-2-シクロプロベン-1-オン（デルタ酸）又は尿酸が含まれる。上記のように、本発明の実施態様には、互変異性体、特にケト-エノール互変異性体が含まれる。本発明のケト-エノール互変異性化平衡の例を次に示す。

## 【0015】

30

## 【化3】



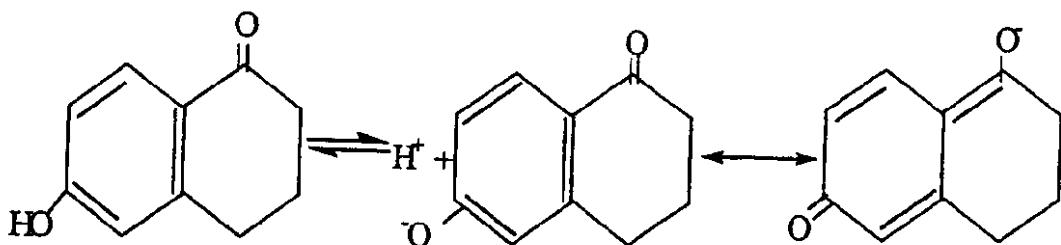
## 【0016】

40

また、上記のように、本発明の実施態様には、ビニル性カルボン酸が安定化共鳴形態である芳香族構造を介した結合が含まれる。この例を下記に示す。

## 【0017】

## 【化4】



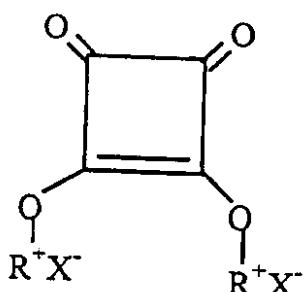
## 【0018】

10

特に有利には、本発明のビニル性カルボン酸化合物は、また、正に荷電した基を用いることにより正に荷電することができる。そのようなカチオンビニル性カルボン酸誘導体の例としては、ビニル性カルボン酸化合物のカチオンエステル誘導体が含まれる。そのエステル誘導体化合物の例は、下記に示されるスクエア酸のエステル誘導体である。

## 【0019】

## 【化5】



20

X<sup>-</sup>はイオン化する対イオンである

R<sup>+</sup>は有機カチオン基である

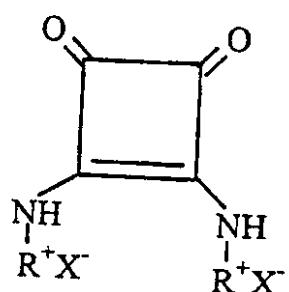
## 【0020】

30

他の実施態様においては、カチオンビニル性カルボン酸誘導体としては、ビニル性カルボン酸化合物のカチオンアミド誘導体が含まれる。そのアミド誘導体化合物の例は、下記に示されるスクエア酸のアミド誘導体である。

## 【0021】

## 【化6】



40

X<sup>-</sup>はイオン化する対イオンである

R<sup>+</sup>は有機カチオン基である

## 【0022】

本発明のプローブは、毛管電気泳動バックグラウンド電解液（BGE）を得るために緩衝液と混合することができる。また、BGEは、緩衝液を含めずにプローブのみを含むこともできる。緩衝液が用いられる場合、本発明と共に用いられる適切な緩衝液の例としては、ト

50

リス塩基、アミン又は有機塩基が挙げられるがこれらに限定されない。本発明のプローブは、通常は約2~5 mM、更に通常は約2.5~3.5 mMの範囲にある濃度でBGE中に存在する。BGEのpHは、一般的には約7~10の範囲にあるが、2~3程度もあり得る。

BGEは、プローブのほかに動的電気浸透流れ調整剤も含むことができる。しかしながら、これは必ずしも必要でない。流れ調整剤は、担体電解液の電気浸透流れEOFを停止又は逆転するように作用する。本発明に用いられる適切な動的流れ調整剤の例としては、セチルトリメチルアンモニウムプロミド(CTAB)又はジドデシルジメチルアンモニウムプロミド(DDAB)が挙げられる。BGEは、緩衝液の水と混合できる有機溶媒を含むこともできる。その溶媒は、例えば、メタノール、エタノール及びアセトンであり得る。

#### 【0023】

特に有利には、本発明は、CE測定の改善を促進し、検出レベルの限界のために用いられないCEの新しい分野への適用を可能にする。その新しい工業には、特に、原子力水化学や半導体処理水化学の適用が含まれる。詳しくは、本発明のビニル性カルボン酸化合物プローブは、問題の分析物に匹敵する移動度( $u$ )を有する。モル吸光度が高い。移動比は高くすることができる(即ち、 $\text{SO}_4^{2-}$ から $\text{PMA}^{4-}$ まで)。吸光ノイズは、高い波長で低く、分析妨害は高い波長で低い。更に、EOF沈殿の問題がない。

本発明によって検出される問題のアニオン分析化学種の例としては、低分子量有機アニオンを含む臭素、塩素、フッ素、硝酸、亜硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられる。代替的実施態様においては、ビニル性カルボン酸化合物は正に荷電され、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{+2}$ 、又は $\text{Ca}^{+2}$ 、又は低分子量有機カチオンのようなカチオン分析物の検出に適している。

#### 【0024】

更に著しく有利には、本発明のプローブは、光度検出器の高UVスペクトル領域のモル吸光度が大きい。上記背景で述べたように、従来技術のプローブの不十分な態様の1つは、分析物の同じ吸光度領域の吸光が強いことである。対照的に、本発明のプローブは、たいていの分析物より高いUV領域のモル吸光度が大きく、これによりCEシステムの検出及び感度が高められる。一般的には、本発明のビニル性カルボン酸化合物は、約270 nm以上の波長でモル吸光度を示している。プローブが、例えば、スクエア酸(SQ)である実施態様においては、SQは約270 nmの波長のモル吸光度が大きいことがわかる。プローブが2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノン(BZ)である他の実施例においては、BZが約320 nmの波長のモル吸光度が大きいことがわかる。下記の実験に示されるように、これらの波長値は、典型的には、約214 nmの波長のモル吸光度が大きいピロメリト酸(PMA)のような従来のプローブより非常に高い。重要な波長値だけでないことは指摘されなければならない。本発明のプローブが高い波長のモル吸光度が大きいことは事実である。例えば、PMAは270 nmにおける吸光度を示すが、その値の一部であり、本発明によって得られた検出及び/又は感度のレベルを示さない。例えば、下記の実験、クロム酸に示されるように、従来のプローブは、270 nm以上でモル吸光度を示すが、その値はその波長において本発明のプローブによって示されたものの一部である。高い検出波長において本発明のプローブによって示される大きいモル吸光度は、波長が大きくなるにつれてANが小さくなるのでモル吸光度が大きくなるにつれて動的リザーブが大きくなる動作が可能である。上記式1と2に示されるように、動的リザーブ(DR)が大きくなると、結果として検出可能最低濃度 $c_{\text{low}}$ が小さくなるので、感度の高いCE装置及び方法を与える。更に上記のように、本発明のプローブのこの高い検出波長は、分析物の吸収波長より大きいので、本発明のプローブは、従来技術のプローブにおいて見られる妨害問題がない。

#### 【0025】

本発明は、図1の概略図に示されるようなCEシステムにおいて行うことができる。CEシステム10には、2つのレザバー11、12が含まれ、2つのレザバーに伸びている毛管と同じBGE溶液で満たされている。高圧は、適切な電圧源14によって毛管に沿って加えられる。毛管の内径は、一般的には小さく、典型的には5~100 μmであり、熱の消散を可能にする。毛管は、一般的には、溶融シリカからつくられている。イオンは、正味の電気泳動移動度に基づいて分離する。検出アセンブリ、本発明においてはUV/可視光検出アセンブリは、毛

10

20

30

40

50

管に沿って配置されている。検出アセンブリは、一般的には、ビームを毛管を介して検出器18に向ける光源17を含んでいる。光は、光源17と検出器18間を通過するイオンによって吸収される。出力シグナルは、イオンによる光の吸収度及び電解液を通る光の路長に左右される。毛管は、プローブ、又はプローブと緩衝液を含有するBGEで充填され、イオンは相対電荷や水和量に基づいて分離する。実施態様においては、溶融シリカ毛管を用い、BGE中の正に荷電したカチオンを毛管壁上のイオン化シラノール基に引きつけるために毛管表面に電気二重層をつくる。電場の存在下にこの二重層の拡散部分のカチオンは、陰極に向かって移動し、それらと共に電解液の大部分の液体を引っ張り、陰極電気浸透流れを生じる。また、陽極流れ毛管を用いることができ、これは、陽極電気浸透流れを与えるための動的EOF調整静的コーティングのいずれかの使用により調製される。

10

#### 【0026】

問題のほとんどの分析物イオンは、光を吸収せず、光度検出器によって検出することができない。従って、間接光度検出が用いられる。プローブのUV吸収化学種がUV透過分析物イオンで置換するために、UV透過分析物イオンが低吸光度又はボイドのゾーンとして検出される。間接光度検出のこの方法は、周知であるが、上記のように、間接検出に用いられる従来技術のプローブは、超純水が必要とされる用途において水の試験に必要とされる低濃度で分析物イオンの検出を可能にするほど十分な高UVモル吸光度をもたない。

我々は、非常に低レベル、例えば、500 ppt範囲程度での無機アニオンの検出を得るために、通常の陰極電気浸透流れが、好ましくはBGE中に調整剤を用いずに逆になるに違いないことがわかった。本発明の実施態様においては、これは、毛管の内部表面を処理してコーティングを施すことによりシラノール遊離基をマスクすることにより達成される。本発明に用いられる逆方向電気浸透流れ毛管は、メタケム (Metachem)、ロサンゼルス、カリフォルニア州から入手できる。

20

本発明の具体的な実施態様においては、スクエア酸 (SA) が好ましいプローブである。SAを有利にする特徴としては、a) 270 nmのピロメリト酸よりモル吸光度が大きい、b) 電気泳動移動度が低式量無機アニオンに匹敵する、c) 完全にイオン化したピロメリト酸に比べて完全にイオン化したスクエア酸の移動比を2倍にする、及びd) ピーク吸光度の検出波長が大きいことが挙げられる。

#### 【0027】

##### 実験

30

新規なCEプローブと方法を証明するために広範囲の実験を行った。次の実験は、教示と説明のためだけに示すものであり、本発明の範囲を制限するものではない。下記の表題の項に示される種々の態様を試験した。

##### CEシステム

毛管電気泳動装置において実験を行った。装置には、35 cmの有効長と43 cmの全長をもつ75 μm (μ) 毛管を正の壁面 (陽極EOF) とともに含まれる。スクエア酸をトリス塩基を添加したBGE中に用い、スクエア酸の濃度は2.5 mMであり、BGDのpHは約8.0を示した。BGEを0.45 μm (μ) 膜でろ過した。注入は電気運動 (-10 kVで5~15秒) 及び水力学的 (0.8 bar(12 psi)で3~10秒) であり、-25 kVの運転電圧は581ボルト/cmの電界強度において全実験中約11~12 μampを生成した。検出は、約270 nmの最大吸光度の波長設定において間接的にモニターした。

40

下記表1に示されるようにそれぞれの塩がppb濃度の5つのアニオン塩マトリックスによる分析物を用いてイオン分析を行った。

#### 【0028】

表1

分析化合物	濃度 (ppb)	
塩化ナトリウム ( $\text{Cl}^-$ )	160	
臭化ナトリウム ( $\text{Br}^-$ )	160	
硫酸ナトリウム ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	160	
フッ化ナトリウム ( $\text{F}^-$ )	80	
リン酸二ナトリウム ( $\text{HPO}_4^{2-}$ )	320	10

## 【0029】

分析の結果を図2の電気泳動図に示し、注入後2.5分以内に全アニオンの分離を示し、ピークシグナルはバックグラウンドよりかなり高い。試験条件は、2.5 mMトリススクエア酸塩、pH = 8、10秒水力学的注入、-25 kV、25 °C、270 nmで検出、電流7.1 μampとし、分光泳動法1000 CEシステムを用いた。イオンの溶離順序は、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{F}^-$ 及び $\text{HPO}_4^{2-}$ である。ベースラインドリフトが認められるが、他の結果は安定なベースラインを示し、この非最適化法は再現性があり強靭であると思われる。

本発明のCEプローブと方法は、適切なタイプのCEシステムと用いることができる。本発明の教示を考えると、それぞれのCEシステムは、当該技術の熟練の範囲の通常の実験を用いて最適化することができ、例えば、a) 毛管長とピーク分解能の有効長を最適化して分離を最大にし、最少電流で電圧をかける、b) BGE濃度とシグナル-ノイズ比の毛管径を最適化し、BGE感度に対するpHの影響を調べる、c) 電気運動注入電圧と電圧印加時間及び水力学的注入を最適化する、d) 等速電気泳動スタッキングによって分析物をBGE界面に輸送する注入緩衝液を最適化する、e) 2~10倍だけ検出シグナルの増加を得るために気泡、『L』又は『Z』セル検出形を用いる、f) 単一分析物緩衝標準を用いて確実に同定可能な標準ピークを得る、g) 高純度水源からオンライン試料供給を用いることにより空気からの二酸化炭素汚染を排除する、及びh) プローブの対イオンの影響を研究することを含むことができる。

## 【0030】

## 実験移動度

本発明のある種のビニル性カルボン酸化合物の移動度を実験で評価した。特に、スクエア酸と2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノンを従来のプローブ、クロム酸イオン及びピロメリト酸と共に実験で測定した。これらの化合物は、高計算電荷-質量比を示すものである。陽極EOFを有する毛管を用いた。これらの化合物は、共電気浸透流れを有する。それぞれの化合物を、中性マーカー、ベンジルアルコールの存在下に実験した。本発明の緩衝液は、20 mMトリス塩化物、pH = 8.0とした。クロム酸とピロメリト酸の同じ緩衝液も20 mMトリス塩化物、pH = 8.0とした。スクエア酸と2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノンが酸性であるので、それぞれの試料を0.1 M NaOHでpH 7.0に中和した。以前の研究から、pH 7.0がまだ酸性であり実験中に注入先端を劣化させるのでトリス塩化物緩衝液が試料を溶解するために用いられる場合にはこれらの2つの化合物は電気泳動が不十分であることがわかった。

## 【0031】

移動度を次のように計算した。

$$u^{\text{obs}} = \text{eof} + u^{\text{true}}$$

(式中、 $u^{\text{true}}$ は上記条件下のプローブの実際の移動度であり、移動度測定値 $u^{\text{obs}}$ 及びeofは下記式によって測定した。)

$$u^{obs} = (I)(L)/(V)(t)(60)$$

(式中、Iは毛管の有効長であり、Lは毛管の全長であり、Vは毛管の電圧であり、tは検出窓を通過する試料の時間(分)である。)

eofは同じ式で計算され、時間は中性マーカー(ベンジルアルコール)から得られ、眞の移動度は $u^{obs}$ とeof間の差として計算する。浸透流れとプローブ泳動が共に陽極へのものであることから、移動度は慣例により負の符号をもっている。

眞の移動度を表2に示す。

### 【0032】

表2

眞の移動度 (cm <sup>2</sup> /V sec)	
クロム酸塩	-7.96×10 <sup>-4</sup>
ピロメリト酸	-6.12×10 <sup>-4</sup>
スクエア酸	-5.45×10 <sup>-4</sup>
2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノン	-2.01×10 <sup>-4</sup>

10

### 【0033】

実験プローブ移動度と文献値との比較は、プローブの移動度がpH、緩衝液、及び緩衝液のイオン強度の影響の関数であるので一般的な意味でのみ使用し得る。簡単な比較を表3に示す。表中、プローブは移動度が小さくなる順序で示されている。

### 【0034】

表3

本発明の実験	Soga <sup>1</sup>	Haddad <sup>2</sup>
クロム酸塩	クロム酸塩	クロム酸塩
PMA	PMA	PMA
スクエア酸塩		
ベンゾキノン		

20

Soga<sup>1</sup> : Tomoyoshi Soga, Gordan Ross, J. of Chrom. A, 767(1997), pgs. 223-230;  
Haddad<sup>2</sup> : Philip Doble, Miroslav Macka, Paul R. Haddad, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 19, No. 1(2000) pgs. 10-17.

30

PMAはピロメリト酸であり、ベンゾキノンは2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノンである。上記で証明されたように、本発明のプローブは、低及び高移動度アニオンの移動度が十分であり、他の吸収分析物を妨害しない場合及び検出器が良好なシグナル-ノイズ比を与える安定なベースラインを示す場合に検出器の高UVスペクトル領域のモル吸光度が高いという追加の利点を有した。従来のプローブに比べた本発明のプローブのモル吸光度と波長値の比較を下記表4に示す。

### 【0035】

表4

40

50

プローブ	モル吸光度 ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	波長 (nm)	
スクエア酸	26,942	270	
ベンゾキノン	30,347	320	
PMA	23,088 2,577	214 270	
クロム酸塩	5,089 4,585 5,864	205 274 374	10
トリメシン酸	37,144	209	
オルトフタル酸	13,812	208	

20

## 【0036】

従来のプローブの一部はモル吸光度が高いが、上記のように分析物の吸収スペクトルを妨害するUV領域が高いことは認識されなければならない。

## プローブを吸収する波長の関数としてのノイズ評価

3種類のプローブ、2つは本発明で1つは従来のプローブを検出器のノイズを評価するために試験した。装置を緩衝液のみでゼロにした後7.3 mg/100のトリス塩化物 (pH = 8.0) の濃度のPMAを75 μm (μ) 毛管にポンプで送った。プローブ溶液は、0.02548の吸光度を与える溶液を非常にゆっくりと通過した。このベースラインノイズを、表5に示されるように吸光度が同じ程度のスクエア酸と2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノンにおいて繰り返した。

30

## 【0037】

表5

プローブ	波長 (nm) 測定値	初期吸光度	濃度 (mg/100ml)
PMA	214	0.02548	7.3
スクエア酸	270	0.03187	3.6
ベンゾキノン	320	0.03290	4.5

40

## 【0038】

電圧の関数として高及び低振幅シグナルを測定することによりノイズを15分間評価した。従来のPMAプローブのノイズは、本発明のスクエア酸とベンゾキノンの約2倍である。これらの結果から、分光光度計としての毛管検出器は、UV領域の高い波長でノイズが少ないのと、本発明のプローブは高い波長で用いられるこの追加の利点を与える。

## 【0039】

50

### 検出器ノイズとドリフトの評価

4種の波長において検出器ノイズとドリフトを評価するために実験を行った。プローブは用いなかった。毛管を非常に遅い流れのDI水で充填して毛管窓の過熱を防止した。吸光度は、0.02 AUFSにおいてゼロに設定した。初期波長は、214 nmで7分間、次に254 nmに設定し、更に7分間自動的にゼロにし、次に、270 nmに設定し、更に7分間自動的にゼロにし、最後に320 nmにした。それぞれの波長において214 nmから320 nmまで行くにつれて吸光度の下向きのドリフトがあったが、それぞれの新しい波長設定でのドリフトは減少した。

4種類の波長の評価ノイズは、214 nmで見られ、254、270及び320 nm波長値での2倍程度であった。従って、高い波長でモル吸光度が大きい本発明のプローブは、検出器ドリフトの小さい波長で用いられている。

上記結果によって証明されるように、CEに用いられる改善されたプローブが開発された。概要としては、本発明のプローブは、問題のイオンと実質的に一致する移動度を示すものである。本発明のプローブは、モル吸光度が高くかつ移動比が大きく、既存技術より感度を改善する可能性が大きくなり、更に新しい工業や検出可能な低い最低分析物濃度を必要とする用途にCEの利用を非常に増大させる。更に、本発明のプローブは、高い吸光度値を示す高い検出波長を可能にし、吸光度ノイズ(AN)が小さいこと及び分析物の吸光度による妨害が少ないと二重の利点を与える。更に、本発明のプローブは、高モル吸光度が低濃度で用いることができるため陽極流れEOF調整剤を不利に沈殿させないと思われる。

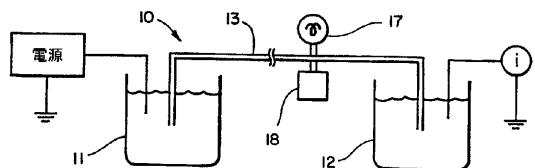
本発明の個々の実施態様と実施例の上記説明は、例示と説明のために示してきた。本発明をいくつかの特定の実施態様について記載してきたが、記載は例示であり、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。本発明の真意と範囲から逸脱することなく当業者は様々な変更を行うことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の毛管電気泳動プローブとそれを用いる方法と共に用いることができる毛管電気泳動装置の概略図である。

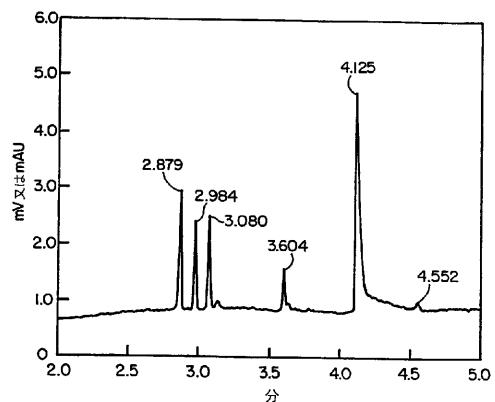
【図2】 本発明の実施態様に従ってスクエア酸緩衝液を用いた毛管電気泳動(CE)により5種類のアニオンを分離したことを示す電気泳動図である。

【図1】



FIG\_1

【図2】



FIG\_2

---

フロントページの続き

(74)代理人 100096194  
弁理士 竹内 英人

(74)代理人 100074228  
弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009  
弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821  
弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771  
弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663  
弁理士 箱田 篤

(72)発明者 イエンゴヤン レオン エス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95120 サンホセ リーランド パーク ドライヴ  
6714

(72)発明者 フラッティーニ ポール エル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94022 ロス アルトス ロス アルトス アベニュー  
400

審査官 野村 伸雄

(56)参考文献 特開平09-171020(JP,A)  
特開平10-197481(JP,A)  
特開平09-325130(JP,A)  
特開平11-118761(JP,A)  
特開平06-082423(JP,A)  
特表平05-504299(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/447

B01D 57/02

JICSTファイル(JOIS)

CA(STN)