

総合論文

オンライン試料濃縮法及び部分的注入法を用いる 高性能マイクロチップ電気泳動分析

末吉 健志^{®1}, 北川 文彦¹, 大塚 浩二¹

平板上に作製された微小流路内においてキャピラリー電気泳動の原理に基づく分離分析を行うマイクロチップ電気泳動 (MCE) は、微量の試料を高速かつ高い分離能で分析することが可能である。しかし、その反面、低い濃度感度が汎用化のための大きな障壁となっている。そこで、濃度感度の向上を目的として、オンライン試料濃縮法の MCE への適用が進められている。その結果、最大で百万倍程度の高感度化が達成されたが、その反面、分析時間の大幅な増加や分離能の低下を引き起こすことがある。この欠点を改善するために、著者らは分離溶液の部分的注入 (PF) 法を MCE に適用し、分離能の向上及び分析時間の短縮を達成した。また、PF 法をオンライン試料濃縮法と組み合わせることによりトランジエントトラッピング法を開発した。これらの新規な方法論に基づくより高度な MCE 分析について、新たに得られた知見とともに紹介する。

1 緒 言

マイクロチップ電気泳動 (microchip electrophoresis, MCE)^{1)~4)} は、平板上に作製した微小流路 (チャンネル) 内において、キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE)⁵⁾ の原理に基づく分離分析を行う手法である。一般的にはクロス型の流路形状を有するマイクロチップにおいて、挟み込み試料導入法 (pinched injection, PI (Fig. 1))³⁾ やゲート型試料導入法 (gated injection, GI)⁴⁾ により非常に短い試料バンドを分離チャンネルに導入することで、わずか数秒から数十秒程度の分析時間で高い分離効率を得られる²⁾。送液の駆動力には、チャンネル内壁のシラノール基の解離によって発生する電気浸透流 (electroosmotic flow, EOF) を用いる。EOF はプラグ状の速度分布 (栓流) を有し、チャンネルの微小化による影響をほとんど受けないため、微小領域における分離手法としての MCE は、液体クロマトグラフィーなどの圧力送液による分析手法よりも優れている。また、MCE には、試料の電荷の違いに基づいて分離を行うゾーン電気泳動 (zone electrophoresis, ZE)^{1)~5)} のみならず、生体高分子のサイズ分離が可能なゲル電気泳動 (gel electrophoresis, GE)⁶⁾⁷⁾、泳動液中に溶解した擬似固定相と試料との相互作用の差を利用して分離を行う動電クロマトグラフィー (electrokinetic chromatography, EKC)^{8)~11)}、試料の等電点により分離を行う等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF)^{12)~14)} など、様々な分離モー

ドを適用できるため、広範な試料に対する効果的な分離分析が可能となる。更に、MCE 分離用のチャンネルの上流や下流に他の化学操作を行うサイトを組み合わせることができ^{15)~17)}、様々な化学操作の微小化・統合化により高速・高効率な分析を実現する微小統合化分析システム (micro total analysis system, μ -TAS)¹⁸⁾ において重要な役割を果たしている。しかし、その反面、試料導入量が少ない上に、チャンネル深さが 20~30 μm と短く検出体積が小さいことに起因する低い濃度感度が問題となっている。そこで、試料を分離チャンネルに大量に導入し、分離の直前に試料を濃縮することで高感度化を実現するオンライン試料濃縮法の開発が進められてきた¹⁹⁾。

MCE におけるオンライン試料濃縮法は 2 種類に大別することができる。ひとつは、異なる組成の泳動液と試料溶液を用いることで、試料の泳動速度差が発生することを利用したオンライン試料濃縮法^{20)~31)} である。例として、アニオン性の界面活性剤ミセルを利用した中性試料のスイーピングが挙げられる (Fig. 2)^{20)~23)}。スイーピングでは、ミセルを含む泳動液で満たした分離チャンネルに対して、ミセルを含まない試料溶液を濃縮のために大量に導入する。分離電圧を印加すると、試料分子は試料溶液プラグ中では EOF と同じ速度で泳動する ($v_{\text{S,S}} = v_{\text{EOF,av}}$, Fig. 2b)。一方、泳動液中のミセルは界面活性剤の負電荷により、その実効泳動速度は小さい ($v_{\text{M,BGS}} < v_{\text{S,S}}$)。試料分子が界面に到達すると、泳動速度の遅いミセルへの疎水性相互作用に基づく保持により、試料の泳動速度は減少する ($v_{\text{S,BGS}}$)。このとき、ミセルとの相互作用の尺度である保持係数を k とす

¹ 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻: 615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂

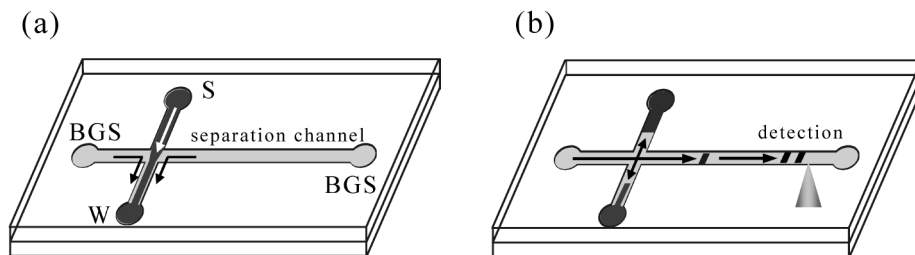


Fig. 1 Schematics of a pinched injection technique on a cross channel microchip
(a) Loading, (b) injection of sample solution and separation. S: sample solution ;
BGS: background solution ; W: waste ports

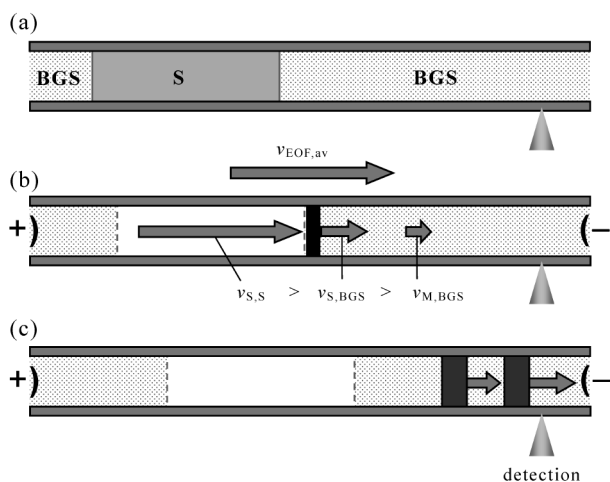


Fig. 2 Schematics of on-line sample preconcentration by sweeping

(a) Initial condition, (b) preconcentration and (c) separation based on MEKC. S: sample solution without micelle; BGS: background solution containing micelle; $v_{S,S}$ and $v_{S,BGS}$: effective velocity of the samples in the S and BGS, respectively; $v_{M,BGS}$: effective velocity of the micelle in the BGS; $v_{M,BGS}$: averaged EOF velocity

ると、泳動液中での試料の泳動速度は次式で表される。

$$v_{S,BGS} = \frac{k}{k+1} v_{M,BGS} + \frac{1}{k+1} v_{EOF,av} \quad (1)$$

したがって、泳動速度の変化に伴い、試料は泳動液との境界面付近に濃縮される。このとき、濃縮完了直後の試料バンドの幅 l_{sweep} は初期導入長さ l_{inj} に対して、

$$l_{sweep} = \frac{1}{k+1} l_{inj} \quad (2)$$

となる。試料濃縮完了後は、拡散によってバンド幅が増加するとともに、EKCの原理により分離される (Fig. 2c)。

スウィーピング以外にも、電場増強スタッキング (field

amplified stacking, FAS)^{24)~27)}、過渡的等速電気泳動法 (transient isotachopheresis, tITP)^{28)~31)}などの適用により、MCEの高感度化が達成されてきた。これらの手法は、CEにおいて既に研究が進展しており、MCEにも容易に適用できる。しかし、有効分離長がCEの数10 cmに対して、MCEでは数 cmと短いことから、CEほど試料溶液を大量に導入できない。そのため、CEでは数十万倍の高感度化が達成されているような手法でも、MCEへの適用時には濃縮効率が数十倍から数百倍程度に低下することが多い。更には、試料の大量導入による有効分離長の減少が、分離能の低下を引き起こすことも懸念されている。

一方、チップ分析の利点を生かし、試料を濃縮するサイトとMCE分離を行うチャンネルをオンラインで結合する手法についても開発が進んでいる^{32)~38)}。固相抽出 (solid phase extraction, SPE)³²⁾³³⁾、フィルタリング³⁴⁾³⁵⁾や電気的トラッピング³⁶⁾³⁷⁾などの手法がMCEと結合され、最大で100万倍程度の高感度化も実現されてきた³⁸⁾。しかし、30分以上の濃縮操作が必要となり、MCEの高速分析という特徴が失われてしまうことや、固定相を充填するためのフリット構造やフィルタリング用のナノチャンネル構造などの特殊な微細加工が必要となる場合もあり、チップ製作及び分析操作の複雑化に伴うコストの増加が問題となる。したがって、これまでのMCEにおけるオンライン試料濃縮法では、低い濃度感度を補うことができる代償として、高分離能もしくは高速分析というMCEの利点が犠牲となってしまう。そのため、高感度化を主目的としたオンライン試料濃縮法ではなく、より短時間で高い濃縮効率と高分離能を兼ね備えた手法の開発が望まれている。

著者らのグループでは、MCEのオンライン試料濃縮による高感度化と高分離能の両立を目指して、「分離溶液の部分的注入 (partial filling, PF)」に関する研究を遂行してきた³⁹⁾⁴⁰⁾。その結果、ミセル溶液を部分的に注入し、試料溶液を大量に注入すると、新規な濃縮・分離機構による高感度、高速かつ高分離能を有するMCE分析法を実現できることが分かった。本論文では、PF法の概略とMCEへの適用について紹介し、新規な濃縮・分離機構である「ト

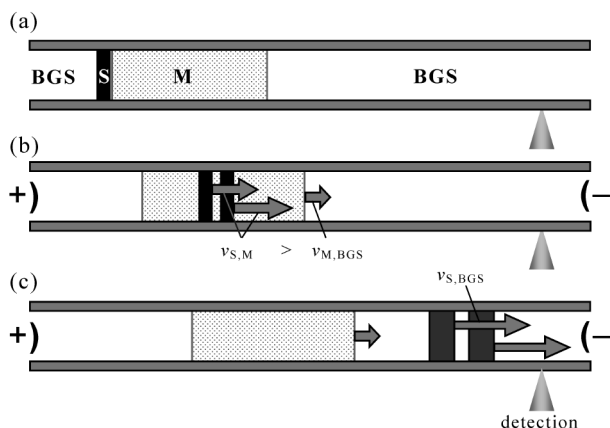


Fig. 3 Schematics of a partial filling technique with M plug

(a) Initial condition, (b) separation in the M plug and (c) detection after overtaking the M plug. $v_{S,M}$: effective velocity of the analytes in the M zone

ランジエント-トラッピング (transient-trapping, tr-trapping)⁴⁰⁾」について述べる。更に, tr-trapping を MCE に適用することで, 高速・高感度かつ高分離能な分析を実現した例について報告する。

2 PF法の適用による分離能の向上

2.1 PF法の開発

Terabe らによって開発されたミセル動電クロマトグラフィー (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) を端緒とする EKC 分析^{8)~11)}は, 分析対象に合わせて適切な擬似固定相を選択することで容易に高い分離能を得ることができる。様々な擬似固定相の適用が多く研究者によって試みられ, 高度な分離が可能となったが, 擬似固定相が試料の検出を妨害する場合もある。例えば, アルカロイド類の光学認識能を利用したアミノ酸のキラル分離では, 擬似固定相となるアルカロイド自体が紫外 (UV) 吸収を示すため, 試料を UV 検出するとバックグラウンドが上昇し, 感度は低下する⁴¹⁾。また, 質量分析 (MS) 検出と結合する際には, 不揮発性の擬似固定相が検出器に導入されると, 装置が汚染され, 感度が低下してしまう。このような場合には, 分離チャンネル内に作製した固定相との相互作用を利用する電気クロマトグラフィー (electrochromatography, EC)^{42)~44)}などを適用する必要があるが, 固定相の作製法, 固定化法, 充填法に技術的な問題を有している。

そこで Tanaka らは, 擬似固定相による検出の妨害を解決するために PF 法を EKC に適用した (Fig. 3)⁴⁵⁾。PF 法は試料の泳動方向前方に分離用の擬似固定相溶液を部分的に注入することで, 分離能の向上を図る手法である^{45)~47)}。アニオン性界面活性剤である硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を用いた MEKC の原理に基づく PF 法を例に説明

する。初期条件として, 界面活性剤ミセルを含まない泳動液 (BGS) をチャンネル内に充填し, ミセル溶液 (M) を部分的に注入した後, 試料溶液 (S) を導入する (Fig. 3a)。その際, 試料分子の実効泳動速度が SDS ミセルよりも大きくなるような実験条件下で電気泳動分析を行うことで, 試料分子は M プラグを通過する際に MEKC の原理に基づいて分離され (Fig. 3b), M プラグを追い越した後で検出部に到達する (Fig. 3c)。PF 法の開発により, EKC 分離に MS 検出を適用することが可能となり, CE-MS の分離能の向上に大きく寄与することとなった^{48)~50)}。本章ではこの PF 法を MCE に適用した結果について紹介する。

2.2 PF法の適用による分離能の向上

PF 法を MCE へ適用するためには, 分離用のミセル溶液を試料溶液の泳動方向前方に部分的に注入しなければならない。しかし, 一般的に使用されるクロス型の流路形状を有する電気泳動分析用マイクロチップ (Fig. 1) では, 泳動液以外には 1 種類の試料溶液のみしか導入できない。そこで著者らは, クロス型チップに T 型の試料導入チャンネルを加えた T-クロス型チップを開発した (Fig. 4a)。分離溶液として SDS 溶液を選択し, Fig. 4b-4d に示す電圧操作によって, M プラグを部分的に分離チャンネルに導入することに成功した。PF 法に基づくマイクロチップ MEKC (PF-MCMEKC) と, PI 法を用いた一般的なマイクロチップゾーン電気泳動 (PI-MCZE) との比較を行ったところ, Fig. 5 のようなエレクトロフェログラムが得られた。PI-MCZE においては, ほぼ同一の電気泳動移動度を有するスルホローダミン B (SRB) とスルホローダミン 101 (SR101) の混合試料を分離することができなかった (Fig. 5a)。一方, 1.0 秒の導入時間でミセル溶液を部分的に注入した PF-MCMEKC により, SRB と SR101 の良好な分離を達成した (Fig. 5b)。また, ミセル溶液の導入時間を 0.5 秒から 3.0 秒まで増加すると, MEKC の原理に基づく有効分離長が増加するため, 分離度も 1.3 から 1.7 まで向上した。

一方, ピーク強度に関しては, PF-MCMEKC では PI-MCZE と比較して 10 倍程度高くなることが分かった。PF-MCMEKC においては, T 型とクロス型の試料導入チャンネルの間のオフセット部に充填された試料が分離チャンネルに導入される。PI-MCZE と比較して約 20 倍の体積の試料溶液が分離チャンネルに導入される際に濃縮されたために, ピーク高さの増加が観測されたものと考えられる。

以上の結果より, PF 法の適用による MCE の分析性能の向上を達成し, 分離溶液導入量の操作により分離度を制御可能であることが分かった。PF-MCMEKC と MS 検出との結合による高速・高分離能かつ物質の構造情報を取得可能な高性能分析法の実現が今後期待される。また, オンラ

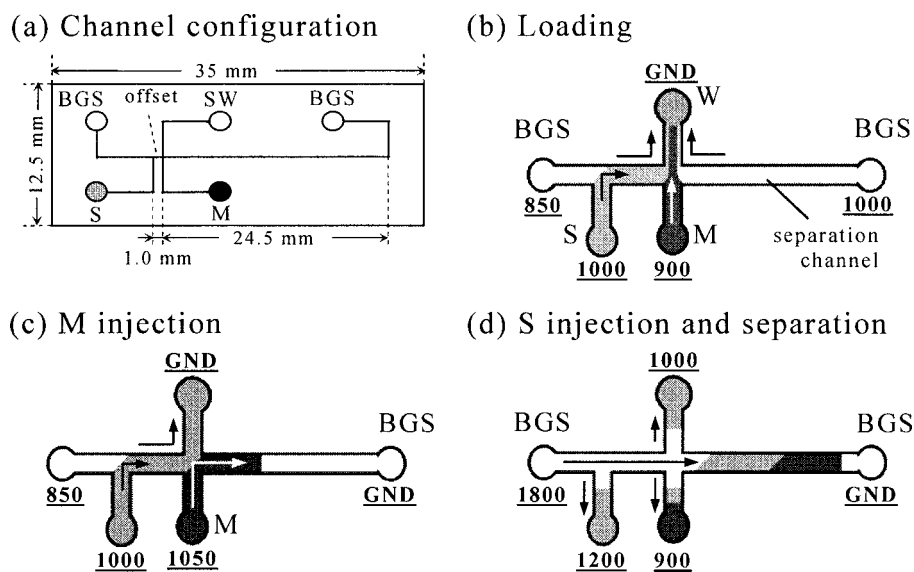


Fig. 4 PF-MCMEKC on a T-cross chip
Underlined values indicate the applied voltages (V).

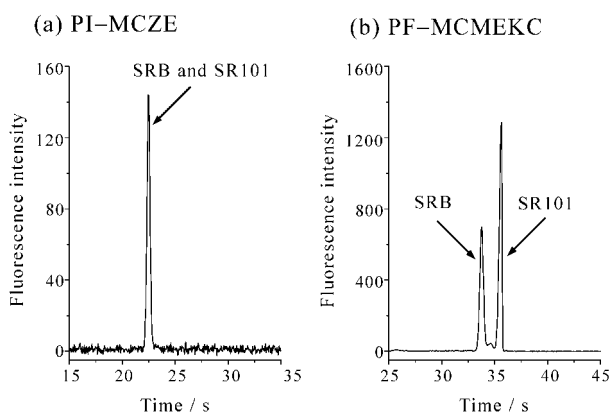


Fig. 5 Electropherograms of SRB and SR101 obtained with (a) PI-MCZE and (b) PF-MCMEKC on the T-cross microchip at the M injection time of 1.0 s

Sample concentration : 1 μ M ; detection point : 24 mm from the injection cross.

イン試料濃縮法との結合の可能性が示されたため、より大量の試料を分離チャンネルに導入することができれば、高効率な試料濃縮が可能になると予想された。しかし、Tクロス型チップを用いたPF-MCMEKCでは、試料の導入量がオフセット部の体積に限定され、それ以上の体積の試料導入は困難であった。そこで、流路形状の改良による試料体積導入量の増加を試みた。

3 tr-trapping の開発

3.1 tr-trapping の概要

Tクロス型チップを用いたミセル溶液の部分的注入により、PF-MCMEKCの条件下で大量の試料を導入することで

試料濃縮効果が得られることが示された。そこで、より大量の試料を分離チャンネルに導入するために、Fig. 6aに示すような5叉路型の流路形状を有するマイクロチップ（5叉路型チップ）を作製した。これを用いて、Fig. 6b-6fの電圧操作により、ミセル溶液・試料溶液ともに任意の体積で分離チャンネルに導入できるようになった。

ここで、Fig. 5に示したPF-MCMEKCにおける試料濃縮がミセルによる保持に基づくスウィーピング効果であると仮定すると、試料プラグはミセル溶液プラグに進入する際に、式(2)に基づいて $1/(k+1)$ の長さに濃縮されることになる。しかし、PF-MCMEKCの条件下では、ミセル溶液プラグを通過して泳動液ゾーンへ移動する際に、ミセルに保持されなくなる。そのため、再び試料の実効泳動速度がEOFと同じ速度に増加し、スウィーピングとは逆の現象が起こるため、試料バンド長さが $(k+1)$ 倍に増加すると推測される。したがって、ミセル溶液プラグへの進入前後では試料プラグ長さは変化せず、PF法においては、スウィーピング機構による試料濃縮効果が検出時には失われていると考えられる。また、分離に関しても、PF-MCMEKCの原理に基づくならば、チャンネル全体をミセル溶液で満たしたPI-MCMEKCと比較してMEKC分離に寄与する有効分離長は短いため、その分離能は減少するはずであるが、実験で得られた分離度はPF-MCMEKCのほうが高い値を示した。

5叉路型チップを用いて、観察された高い濃縮効果や分離能についてより詳細に検討した結果、新たな試料濃縮及び分離機構が働いていることが明らかとなった。著者らはこの新規オンライン試料濃縮法をトランジエントトラッピング (tr-trapping) と命名し、高速・高感度かつ高分離

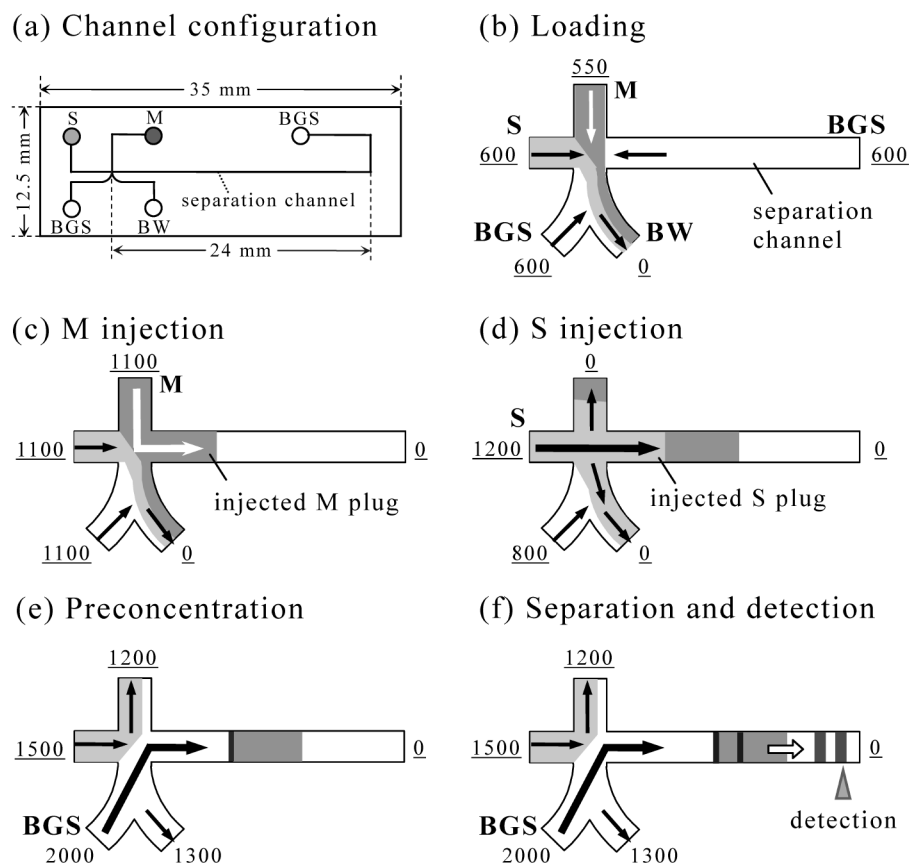


Fig. 6 PF-MCMEKC on a 5 way-cross microchip
Underlined values indicate the applied voltages (V).

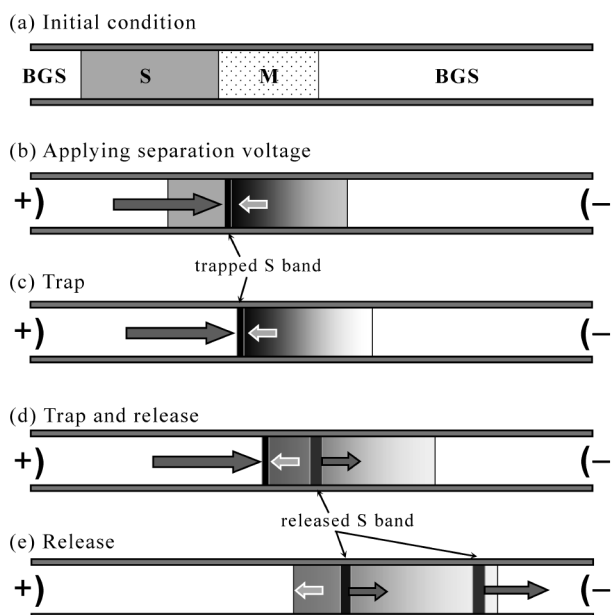


Fig. 7 Fundamental mechanism of tr-trapping

能を有する MCE の実現について検討を行った。

3・2 tr-trapping の原理

tr-trapping の基本的な原理を Fig. 7 に示す. 分離・濃縮用の擬似固定相溶液としては, リン酸塩緩衝液に SDS を溶解した M を用いた. BGS としてはミセルを含まないリン酸塩緩衝液を, S としては SRB 及び SR101 を BGS に溶解した溶液をそれぞれ調製した. また, BGS, S 及び M に電気伝導度差があると, スタッキング効果により溶液間の境界面が歪曲して濃縮効率が低下すると予想されたため, すべての溶液の電気伝導度が一定 (2.9 mS/cm) になるようにリン酸の塩濃度を調製した.

5 叉路型マイクロチップの各チャンネルに BGS を充填後, 分離チャンネルに濃縮・分離用の M プラグを導入し, S を大量に導入する (Fig. 7a). チャンネル両端に電圧を印加すると, M プラグとその他の溶液とのリン酸塩濃度の差及び SDS ミセルとリン酸塩イオンの電気泳動移動度の差から M プラグ内では SDS ミセルが過渡的等速電気泳動に似た挙動を示し, S プラグとの境界面付近に濃縮される. 一方, 試料分子は S プラグ中では速い EOF によって泳動し, M プラグに到達する. M プラグ内に進入した試料は, ミセルとの相互作用により実効的な電気泳動速度が減少す

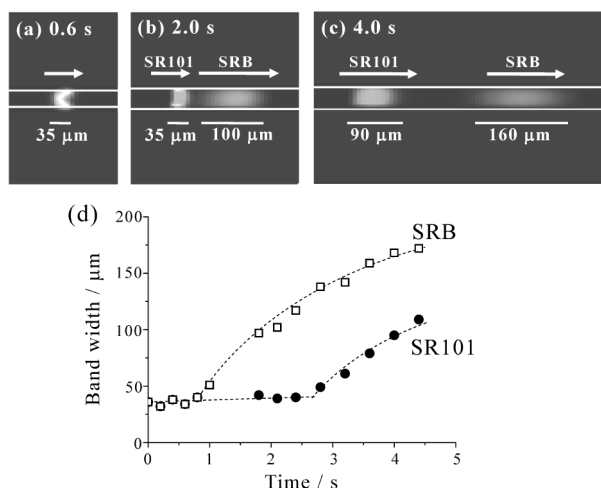


Fig. 8 (a)~(c) Fluorescence imaging of the tr-trapping process and (d) variation of the length of the S zone after applying the separation voltage

る。このとき、ミセルによる保持係数が大きな試料は、ミセルの過渡的等速電気泳動によってSプラグとの境界面近傍に押しとどめられるため、非常に狭いゾーンに濃縮される。これがトラップ機構による試料濃縮の原理である (Fig. 7b, 7c)。

その後、Mプラグも非常に短く濃縮されていることもあり、拡散等によりMゾーンの幅が増加すると、ミセル濃度はそれに応じて徐々に減少する。ミセル濃度の減少に伴い、試料とミセルとの相互作用も減少するため、トラップされている試料のうち保持係数の小さいものから順に、SプラグとMプラグの境界面からMプラグ内へとリリースされる。このとき、保持係数が大きくトラップされたままの試料と、保持係数が小さくリリースされた試料が分離される (Fig. 7d, 7e)。このリリース機構による分離が、トラップ機構による濃縮と過渡的かつ連続的に発生することで、tr-trappingによる分離分析が可能となると考えられる。

3.3 原理の検証

tr-trappingの濃縮及び分離機構を詳細に検討するために、蛍光顕微鏡を利用した泳動過程の直接観察を行った。SDSミセルに保持されないウランを試料としたところ、濃縮される様子は全く観察できなかった。したがって、部分的に注入されたMプラグにおける試料濃縮効果は、泳動中に発生するプラグ間の電気伝導度差に起因するFASやイオン輸送率の差に基づくtITPによるものではなく、ミセルによる保持が必要不可欠であることが示唆された。

SDSミセルに対する保持係数が大きいSRB及びSR101を試料として同様の実験を行うと、Fig. 8a-8cに示ような濃縮及び分離挙動が観察された。また、各試料のバンド

幅の経時変化を解析し、Fig. 8dにまとめた。ここで、観察された試料濃縮効果がスウィーピングに基づくものと仮定すると、試料濃縮完了直後から試料バンド幅が増加し始めるはずである²²⁾。また、式(2)より、保持係数の異なる試料では濃縮完了直後のバンド幅が異なるはずである。しかし、本実験条件下では分離電圧印加後わずか0.6秒で試料濃縮が完了したが (Fig. 8a)、その後SRBで0.2秒間、SR101では2.0秒間、試料のバンドは一定のままであった (Fig. 8d)。また、保持係数の異なるSRB ($k_{\text{SRB}} = 10.1$) とSR101 ($k_{\text{SR101}} = 27.2$) では、試料濃縮完了直後のバンド幅はほぼ同じであった。以上の結果より、本実験系における試料濃縮効果はスウィーピングによるものではなく、トラップ機構に基づくものであることが明らかとなった。

また、濃縮された試料の分離に関して検討するために、チャンネル全体をミセル溶液で満たしたPI-MCMEKCとの比較を行った。分析開始後4.0秒の時点での分離挙動を蛍光画像により観察したところ、PI-MCMEKCでは試料は分離されなかった。一方、tr-trappingでは、わずか2.0秒で分離されはじめ (Fig. 8b)、4.0秒でベースライン分離が完了した (Fig. 8c)。このように高速な分離は、試料のバンド幅の増加が開始する時間、つまり分離電圧印加後にトラップされた試料が境界面からリリースされるために必要な時間が、SRBで0.8秒、SR101で2.6秒と保持係数によって異なることに起因していると考えられる。したがって、ミセル溶液プラグ中におけるMEKC分離によってではなく、リリース機構によって試料の分離が達成されたことが分かった。

3.4 濃縮効率及び分離能の評価

3.4.1 PI-MCMEKCとの比較 5又路型マイクロチップを用いたtr-trappingにおける濃縮及び分離性能について検討を行った (Fig. 9)。長さ24 mmの分離チャンネルすべてにミセル溶液を満たしたPI-MCMEKCでは、約80秒で分析は完了し、分離度は2.2となったのに対し (Fig. 9a)、tr-trappingでは、1.0秒 (0.15 mm) のMプラグの部分的注入によって、約25秒で分析が完了した (Fig. 9b)。このときの分離度は2.7となり、より高効率な分離を達成した。以上の結果は、PF法に基づきMプラグ通過後にMCZEモードに移行したことに起因する分析の高速化と、リリース機構に基づく分離度の向上を反映していると考えられる。

tr-trappingの濃縮効率について、以下の式よりSEF (sensitivity enhancement factor) を定義した。

$$\text{SEF} = \frac{C_{\text{PI}}}{C_{\text{tr}}} \times \frac{h_{\text{tr}}}{h_{\text{PI}}} \times \frac{Q_{\text{M}}}{Q_{\text{S}}} \quad (3)$$

C は試料濃度, h はピークの蛍光強度であり, PI 及び t_r はそれぞれ PI-MCMEKC 及び t_r -trapping を, Q_M/Q_{BGS} はミセル溶液中とミセルを含まない BGS 中での試料の蛍光量子収量の比である. 式(3)に基づき SEF を算出すると, 試料を 2.0 秒 (～1.2 mm) 注入した際には SRB 及び SR101 で約 80 となり, 高感度化が達成された.

以上の結果から, t_r -trapping の適用により高速・高感度かつ高い分離性能を有する MCE 分析を実現できることが示された.

3.4.2 ミセル溶液導入量の効果 更に高度な分離を目指して, ミセル溶液導入量が t_r -trapping に与える影響について検討を行った. 試料溶液導入時間 ($t_{inj,S}$) を 2.0 秒に固定し, ミセル溶液導入時間 ($t_{inj,M}$) を 1.0 秒から 5.0 秒まで増加させたところ, 分離度は 2.7 から 5.0 まで向上した (Fig. 10a). ミセル溶液を長さ 24 mm の分離チャネ

ル全体に満たした PI-MCMEKC における分離度は 2.2 であるので, この分離度の向上は M プラグ長さの増加に伴いリリース機構の影響が大きくなったためであると考えられる. そこで, 蛍光画像解析により各 M プラグ導入時間における SRB と SR101 のリリース時間の差を測定したところ, $t_{inj,M}$ が 1.0 秒から 5.0 秒へと増加するのに伴い, リリース時間の差が 3.7 秒から 20.7 秒まで増大することが明らかとなった. このリリース時間差の増加について考察すると, ミセル溶液導入量 (長さ) が増加しても分子拡散等による電気泳動分析中の M プラグ長さの増加速度はほとんど変わらないため, M プラグが長いほどミセル濃度の減少速度が低下すると考えられる. 試料の保持係数はミセル濃度に比例するため, $t_{inj,M}$ が増加するにつれて保持係数もゆっくりと減少するようになる. その結果, 各試料のリリースに必要な時間が増加し, その差も顕著になったものと推測される.

以上をまとめると, $t_{inj,M}$ が大きくなると, 保持係数が異なる試料のリリース時間差も増加するため, 分離度が向上することが明らかとなった. よって, t_r -trapping ではミセル溶液導入時間を操作するだけで一般的な MCMEKC よりも高い分離能が容易に得られることが示された.

3.4.3 試料溶液導入量が与える影響 更に MCE 分析を高感度化するために, 試料溶液導入量が濃縮効率に与える影響について検討を行った. $t_{inj,M}$ を 2.0 秒に固定し, $t_{inj,S}$ を 1.0 秒 (0.7 mm) から 8.0 秒 (4.2 mm) まで増加させたところ, SR101 ではピーク強度が導入時間に対してほぼ線形に増加し, 8.0 秒注入時に最大で約 400 の SEF が得られた (Fig. 10b). 実験条件が異なるために直接的な比較はできないものの, これまでに報告された MCMEKC におけるスウィーピングよりも t_r -trapping で得られた SEF は大きく⁴⁰⁾, トラップ機構に基づく高い濃縮効率が示唆された.

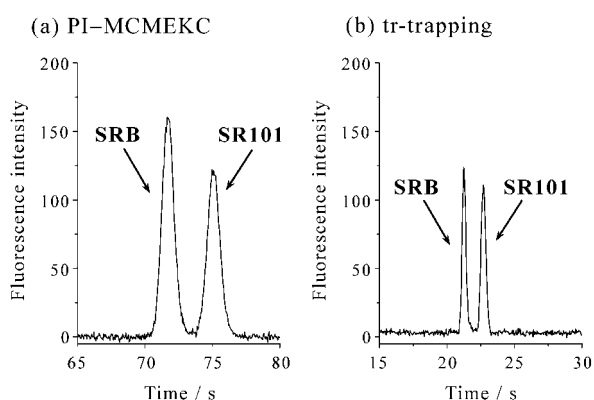


Fig. 9 Electropherograms of SRB and SR101 obtained with (a) PI-MCMEKC and (b) t_r -trapping on the 5 way-cross microchip at the M and S injection time of 1.0 and 2.0 s, respectively

Sample concentration: (a) 10 μ M and (b) 100 nM; detection point: 24 mm from the injection cross

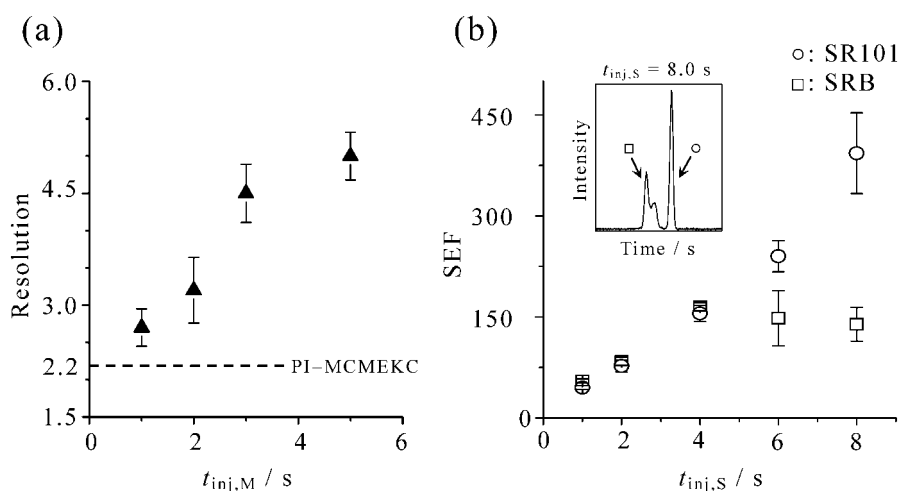


Fig. 10 Effect of the injection time of the (a) M and (b) S on resolution and SEF, respectively

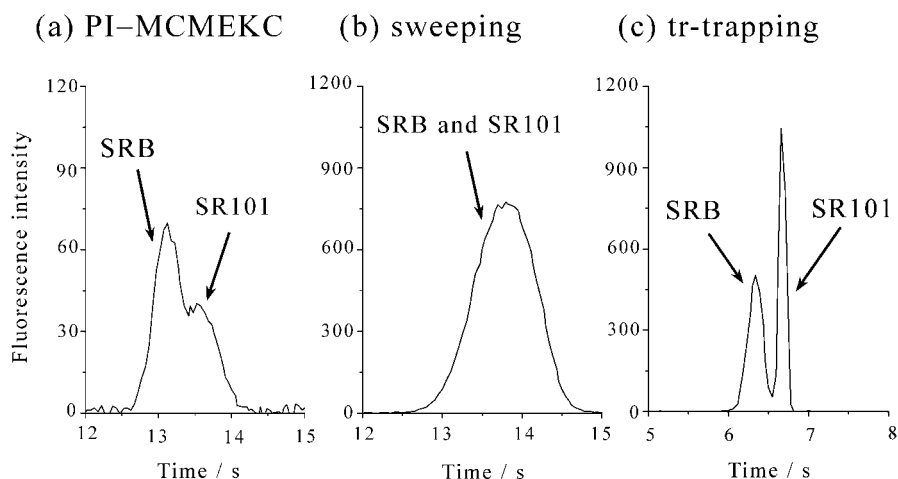


Fig. 11 Electropherograms of SRB and SR101 obtained at the detection point of 5.0 mm from the injection cross

(a) conventional PI-MCMEKC, (b) sweeping at the S injection of 2.0 s, and (c) tr-trapping at the M and S injection times of 1.0 and 2.0 s, respectively. Sample concentration: (a) 1.0 μ M, (b) and (c) 100 nM

一方, SRB では $t_{inj,S}$ が 6.0 秒以上になるとピーク強度が増加せず, ショルダー型のピークが観察された (Fig. 10b). この試料濃縮挙動の違いは, 試料溶液導入中にもミセル濃度の低下が発生していることに起因すると考えられる. つまり, 保持係数の大きい SR101 では $t_{inj,S}$ を増加しても十分にトラップされているのに対して, 保持係数の小さい SRB では試料導入中にリリースされてしまうため, それ以降に導入された試料が濃縮されなかったためであると考えられる. また, 4.0 秒以下の $t_{inj,S}$ では, 得られる SEF は保持係数の異なる SRB と SR101 でほぼ同一であった. この結果もまた, 試料のトラップ機構に基づく濃縮効果が保持係数に依存せず, 2つのプラグの境界面近傍の非常に限定された領域に一定の幅で濃縮されていることを示唆している.

したがって, 長時間の試料導入時にオーバーロードが発生してしまうこともあるため, $t_{inj,S}$ の十分な最適化が必要であることに留意しなければならないものの, 試料の導入量を増加させることでより高い濃縮効率を得られることが明らかとなった.

3.5 より高度な MCE 分析の実現を目指して

3.3 の蛍光画像解析において, 分離電圧印加後わずか 5.0 秒程度で濃縮及び分離がほぼ完了していたことから, より短い有効分離長でも十分な濃縮・分離が実現できる可能性が示された. そこで, 新たに有効分離流路長を 5.0 mm に設定して tr-trapping を行い, PI-MCMEKC 及びスウィーピングと比較した (Fig. 11).

PI-MCMEKC においては, 有効分離長が 5.0 mm では短すぎるため, 不十分な分離となった (Fig. 11a). また,

スウィーピングでは試料の大量導入によりピーク強度は増加したものの, 有効分離長が更に減少するため, 全く分離されなかった (Fig. 11b). 一方, tr-trapping では, スウィーピングと同様に有効分離長が減少しているにもかかわらず, 良好な分離が達成された (Fig. 11c). この結果からも, リリース機構に基づく分離が短い有効分離長で迅速かつ有効に働くことが示された. また, tr-trapping ではスウィーピングよりも高いピークが観察された. 特に検出時に S と M の境界面にトラップされていると予想される SR101 に関しては, わずか 2.0 秒の試料注入時間で約 280 倍の高感度化が達成されている.

tr-trapping の MCE への適用により, わずか 5 mm の有効分離流路長, 10 秒以下の分析時間で, 280 倍の高感度化と高い分離能を同時に実現できることが明らかとなった. 今後, より高速・高感度かつ高分離能を有する MCE 分析の実現にむけて tr-trapping が一つの大きな指針となるであろう.

4 総括

高速かつ高分離能を有する分析法である MCE において, 欠点のひとつであった低濃度感度は, オンライン試料濃縮法の適用により解決されつつある. しかし, これまでの適用例には「高速分析か高分離能のどちらかを犠牲にせざるを得ない」という問題点があった. 著者らの開発した tr-trapping はトラップ機構に基づく高効率な試料濃縮, リリース機構に基づく高分離能及び PF 法に基づく高速分析を兼ね備えた優れた分離分析手法である. tr-trapping の MCE への適用により, 短い有効分離長でも高い分離能が得られるため, 小型化・集積化の進展が目覚ましいマイク

ロ化学チップにおいて, より短い流路, 狭いスペース, 低い電圧での分離分析が可能となる。また, PF 法に基づいた手法であることから MCE-MS 検出への適用も可能であり, メタボローム解析やプロテオーム解析への応用も期待される。

しかし, 現時点では PF-MCMEKC 及び tr-trapping は開発段階にあり, 擬似固定相として用いた SDS ミセルに強く保持されるモデル試料の SRB 及び SR101 について有効性を確認したにすぎない。現在, tr-trapping の適用範囲を拡張するため, 疎水性の高い蛍光誘導体化試薬を用いたアミノ酸の tr-trapping について検討を行っている。しかし, 紫外可視吸収を示さないために検出が困難なアミノ酸類の分析が誘導体化により可能となる反面, オフラインで誘導体化する場合は実験操作の煩雑化が, オンラインではチャンネル形状及びチップ上における液体操作の複雑化がそれぞれ問題となる。そのため, 分析対象範囲を拡張するためには, SDS 以外の擬似固定相についても検討する必要があると考えられる。tr-trapping の基盤となった CE における PF 法では, タンパク質やシクロデキストリン類を用いた医薬品成分の光学異性体分離や, カリックスアレン類を用いたフェノール類の構造異性体分離など, 広範な試料の分離が達成されている^{45)~47)}。同様の擬似固定相を用いて tr-trapping を行うことにより, 単純な疎水性相互作用のみならず, 多様な分子間相互作用に基づく試料濃縮・分離が可能となると予想される。MS 検出との接続も含めた tr-trapping の発展的な研究の進展による, より高度な分離分析の実現が期待される。

本論文で新たに加えた 3・5 のデータを含む tr-trapping に関する内容は, 日本学術振興会特別研究員制度による助成をいただき, 博士課程における研究の一環として実験したものです。石英製マイクロチップの作製には, 産業技術総合研究所関西センターの永井秀典氏, 脇田慎一氏, 西井準治氏にご協力いただきました。深謝致します。

文 献

- 1) A. Manz, D. J. Harrison, E. Verpoorte, J. C. Fetters, A. Paulas, H. Lüdi, H. M. Widmer : *J. Chromatogr.*, **593**, 253 (1992).
- 2) D. J. Harrison, P. G. Glavina, A. Manz : *Sens. Actuators B*, **10**, 244 (1990).
- 3) S. C. Jacobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 1107 (1994).
- 4) S. C. Jacobson, L. B. Koutny, R. Hergenröder, A. W. Moore, Jr., J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 3472 (1994).
- 5) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs : *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- 6) A. S. Cohen, B. L. Karger : *J. Chromatogr.*, **397**, 409 (1987).
- 7) C. S. Effenhauser, A. Paulus, A. Manz, H. M. Widmer : *Anal. Chem.*, **66**, 2949 (1994).
- 8) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando : *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- 9) S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando : *Anal. Chem.*, **57**, 834 (1985).
- 10) F. V. Heeren, E. Verpoorte, A. Manz, W. Thormann : *Anal. Chem.*, **68**, 2044 (1996).
- 11) F. Kitagawa, S. Aizawa, K. Otsuka : *Anal. Sci.*, **21**, 61 (2005).
- 12) S. Hjertén, M.-D. Zhu : *J. Chromatogr.*, **346**, 265 (1985).
- 13) O. Hofmann, D. Che, K. A. Cruickshank, U. R. Müller : *Anal. Chem.*, **71**, 678 (1999).
- 14) J. Han, A. K. Singh : *J. Chromatogr. A*, **1049**, 205 (2004).
- 15) S. C. Jacobson, R. Hergenröder, A. W. Moore, Jr., J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 4127 (1994).
- 16) C. L. Easley, J. M. Karlinsey, J. M. Landers : *Lab Chip*, **6**, 601 (2006).
- 17) M. J. A. Shiddiky, Y.-B. Shim : *Anal. Chem.*, **79**, 3724 (2007).
- 18) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer : *Sens. Actuators B*, **244** (1990).
- 19) M. C. Breadmore : *Electrophoresis*, **28**, 254 (2007).
- 20) J. P. Quirino, S. Terabe : *Science*, **282**, 465 (1998).
- 21) J. P. Quirino, S. Terabe : *Anal. Chem.*, **71**, 1638 (1999).
- 22) Y. Sera, N. Matsubara, K. Otsuka, S. Terabe : *Electrophoresis*, **22**, 3509 (2001).
- 23) Y. Liu, R. S. Foote, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey : *Lab Chip*, **5**, 457 (2005).
- 24) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen : *J. Chromatogr.*, **169**, 11 (1979).
- 25) D. S. Burgi, R.-L. Chien : *Anal. Chem.*, **63**, 2042 (1991).
- 26) S. C. Jacobson, J. M. Ramsey : *Electrophoresis*, **16**, 481 (1995).
- 27) B. Jung, R. Bharadwaj, J. G. Santiago : *Electrophoresis*, **24**, 3476 (2003).
- 28) F. Foret, E. Szoko, B. L. Karger : *J. Chromatogr.*, **608**, 3 (1992).
- 29) T. Hirokawa, A. Ohmori, Y. Kiso : *J. Chromatogr.*, **634**, 101 (1993).
- 30) B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger, F. Foret : *Anal. Chem.*, **71**, 3258 (1999).
- 31) B. Jung, R. Bharadwaj, J. G. Santiago : *Anal. Chem.*, **78**, 2319 (2006).
- 32) R. D. Oleschuk, L. L. Shultz-Lockyear, Y. Ning, D. J. Harrison : *Anal. Chem.*, **72**, 585 (2000).
- 33) Z. Long, Z. Shen, D. Wu, J. Qin, B. Lin : *Lab Chip*, **7**, 1819 (2007).
- 34) J. Khandurina, S. C. Jacobson, L. C. Waters, R. S. Foote, J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **71**, 1815 (1999).
- 35) A. V. Hatch, A. E. Herr, D. J. Throckmorton, J. S. Brennan, A. K. Singh : *Anal. Chem.*, **78**, 4976 (2006).
- 36) J. Dai, T. Ito, L. Sun, R. M. Crooks : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13026 (2003).
- 37) Y.-C. Wang, A. L. Stevens, J. Han : *Anal. Chem.*, **77**, 4293 (2005).
- 38) S. M. Kim, M. A. Burns, E. F. Hasselbrink : *Anal. Chem.*, **78**, 4779 (2006).
- 39) K. Sueyoshi, H. Nagai, S. Wakida, J. Nishii, F. Kitagawa, K. Otsuka : *Meas. Sci. Technol.*, **17**, 3154 (2006).

- 40) K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka : *Anal. Chem.*, **80**, 1255 (2008).
- 41) B. A. Ingelse, M. Flieger, H. A. Claessens, F. M. Everaerts : *J. Chromatogr. A*, **755**, 251 (1996).
- 42) T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa : *J. Chromatogr.*, **248**, 241 (1982).
- 43) S. C. Jacobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 2369 (1994).
- 44) I. M. Lazar, L. Li, Y. Yang, B. L. Karger : *Electrophoresis*, **24**, 3655 (2003).
- 45) Y. Tanaka, S. Terabe : *J. Chromatogr.*, **694**, 277 (1995).
- 46) A. Amini, N. Merclin, S. Bastami, D. Westerlund : *Electrophoresis*, **20**, 180 (1999).
- 47) H. Xu, X.-D. Yu, H.-Y. Chen : *Electrophoresis*, **24**, 4254 (2003).
- 48) W. M. Nelson, Q. Tang, A. K. Harrata, C. S. Lee : *J. Chromatogr. A*, **749**, 219 (1996).
- 49) K. Koezuka, H. Ozaki, N. Matsubara, S. Terabe : *J. Chromatogr. B*, **689**, 3 (1997).
- 50) L. K. Amundsen, J. T. Kokkonen, S. Rovio, H. Sirén : *J. Chromatogr. A*, **1040**, 123 (2004).

High-Performance Microchip Electrophoresis by Using On-Line Sample Preconcentration and Partial Filling Techniques

Kenji SUEYOSHI¹, Fumihiko KITAGAWA¹ and Koji OTSUKA¹

¹ Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 615-8510

(Received 10 August 2008, Accepted 29 August 2008)

Microchip electrophoresis (MCE), which is based on capillary electrophoresis, is performed in a microchannel fabricated on a planner plate. MCE provides rapid and high-resolution analyses for a small amount of analytes. In MCE, however, a low concentration sensitivity is often problematic, which interferes further progress of MCE. To improve the sensitivity, several on-line sample preconcentration techniques have been applied to MCE. However, they sometimes cause a decrease in the separation efficiency and/or an increase in the analysis time. To overcome these problems, we applied a partial filling technique to MCE, and developed an on-line sample preconcentration technique, named "transient-trapping". These novel approaches should provide a high-performance MCE analysis.

Keywords : microchip electrophoresis ; on-line sample preconcentration ; partial filling technique ; transient-trapping.