

総合論文

リニアイメージング UV 検出器を用いるマイクロチップ電気泳動分析

北川 文彦^{®1,2}, 相沢 詩織¹, 大塚 浩二¹

マイクロチップ上に作製した微細な流路（チャンネル）における濃度プロファイルをリアルタイムで観測できるリニアイメージング UV 検出器を有するマイクロチップ電気泳動（MCE）装置を用いて、光学異性体のマイクロチップシクロデキストリン動電クロマトグラフィー（MC-CDEKC）分析およびタンパク質のマイクロチップ等電点電気泳動（MC-IEF）分析を行った。MC-CDEKC 分析では、硫酸化-β-シクロデキストリンを擬似固定相に用い、その濃度が 1-アミノインダンの光学異性体分離の過程に与える影響などについて検討を行った。一方 MC-IEF 分析では、pH 勾配の形成過程およびタンパク質の収束過程について検討を行い、チャンネル長さや印加電圧がタンパク質の分離に与える影響について評価を行った。

1 はじめに

数 cm 角のガラスやポリマー基板上に微細な溝（マイクロチャンネル）を作製し、そのチャンネル中でキャピラリー電気泳動（CE）の分離原理に基づく分析を行うマイクロチップ電気泳動（MCE）は、1990 年代初頭に Manz らによって最初に報告¹⁾²⁾されて以来、急速な進歩を遂げている。MCE は、従来の CE が有する特長（超微量分析・高分離能）に加え、分析の高速化やチャンネルの並列化によるハイスループット化が可能になるなどの利点を兼ね備えているため、マイクロチップ分析における最も重要な分離技術の一つとなったが、濃度感度が低いことがしばしば問題となっている。この検出感度の問題を解決するため、高感度なレーザー励起蛍光（LIF）検出や質量分析検出などの適用が図られてきたが、前者は煩雑な蛍光誘導体化が必要であり、後者は MCE デバイスと検出部のインターフェースがいまだ確立されていない。そこで、CE において最も一般的な検出法である UV 検出を MCE に適用する試みがなされてきた。

MCE における UV 検出は、光路長が短いために十分な感度が得られないことや、マイクロチップ基板の材質（ポリマー、パイレックスガラスなど）によっては紫外域の波長を利用できないなどの問題点がある。しかしながら、UV 検出は、誘導体化等の操作を必要とせずに様々な試料成分の検出が可能であるため、その利用価値は高い。1990 年代には MCE に UV 検出を適用した報告はほとんどなかったが、2000 年に UV 検出による MCE 装置が市販

された³⁾。同装置ではリニアフォトダイオードアレイ検出器により、分離流路全体における UV 吸収を測定（リニアイメージング）できることが特徴である。また、光学スリットを組み込んだ石英製チップを使用することにより、検出感度の向上が図られている。

本稿では、このリニアイメージング UV 検出器を有する MCE 装置を用いて著者らが行った光学異性体のマイクロチップ-シクロデキストリン動電クロマトグラフィー（microchip cyclodextrin electrokinetic chromatography ; MC-CDEKC）分離⁴⁾およびタンパク質のマイクロチップ等電点電気泳動（microchip isoelectric focusing ; MC-IEF）分離⁵⁾について述べる。

2 MCE-リニアイメージング UV 検出装置

2000 年に島津製作所から市販されたリニアイメージング UV 検出器を備えた MCE 装置の概略を Fig. 1 に示す。石英製マイクロチップの表面に厚さ 300 nm の SiO₂/Si 薄膜光学スリットが作製されており、チャンネル部分以外を透過する迷光成分を低減することができる。Si 膜における光の透過率は、UV 領域でほぼゼロであり、光源からの光を完全に遮断することができる。光学スリットを直接チップ上に作製することにより、シグナル強度を 2 倍以上改善することに成功しているが、十分な SN 比を得るためには 0.5 秒と比較的長い積算時間が必要となる。このようなマイクロチップとフォトダイオードアレイ検出器を組み合わせた MCE 装置においては、重水素ランプからの光を単色化し、チャンネルに沿った直線上の光に集光させ、チャンネルを透過した光の強度分布を 1024 チャンネルのフォトダイオードアレイで測定することで、分離チャンネル全体におけるリニアイメージング UV 検出が可能となっている。MCE 装置には PC 制御のオートサンプラーも備えられており、クロス型

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

² 現在所属 弘前大学大学院理工学研究科：036-8561 青森県弘前市文京町 3

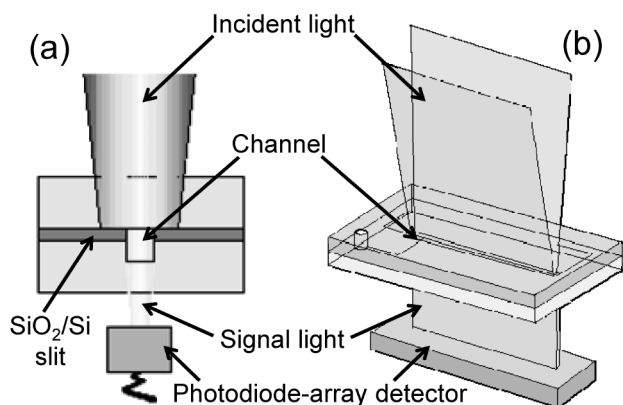


Fig. 1 Schematics of the linear-imaging UV detector. Location of (a) the optical slit and (b) a linear photodiode array. Data were taken from ref. 3, with permission from Electrophoresis.

のチャンネルパターンを有するマイクロチップを装置にセットして測定を開始すると、自動的に試料リザーバーに試料溶液が注入された後、電圧が印加されて電気泳動分析を行うことができる。これまでにDNA、タンパク質、糖、光学異性体、薬物成分などへの分析例が報告されている。

3 MCE-リニアイメージング UV 検出装置を用いるキラル分析

光学異性体分離は診断や創薬などの分野において非常に重要であり、これまでにLCやCEによる分析システムが開発されている。特にCEにおいては、泳動液にイオン性のシクロデキストリン(CD)を擬似固定相として添加するだけでキラル分離が達成できるCDEKCモードがよく用いられており、様々な光学異性体に適用されてきた⁶⁾。MCEにおいてもCDEKCモードの適用は有効であり、高速かつハイスループットな光学異性体分析法を実現できるものと期待される。しかしながら、MC-CDEKCにおいては試料成分の検出法が分離性能を決定する因子となることが多く、MCEにおいて最もよく利用されているLIF検出においては、試料に対する煩雑な蛍光誘導体化操作が必要となり、誘導体化に伴うキラルセクターの選択性の低下が懸念される。また、オフチャンネル型の検出法、例えば一部の電気化学検出や化学発光検出の適用においては、分離チャンネルと検出部とのデッドボリュームにより分離性能が低下してしまうため、高い分離能が要求される光学異性体分離においてはその影響を大きくうけてしまう。そこで著者らは、市販のリニアイメージングUV検出器を備えたMCE装置をCDEKC分析に適用し、光学異性体の高速分離について検討を行った。UV検出を行うために試料成分の誘導体化を行う必要がなくなり、また、リニアイメージング検出により分離過程の観測も可能となることが特徴として挙げられる。

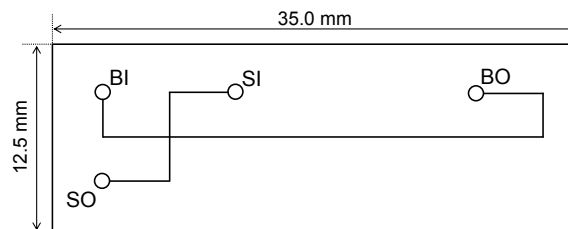


Fig. 2 Schematic Illustration of the microchip used in this study. BI, buffer inlet; BO, buffer outlet; SI, sample inlet; SO, sample outlet.

3・1 1-アミノインダンのMC-CDEKC分析

MC-CDEKC分析においては、試料としてアルツハイマー病やパーキンソン病の特効薬の基本骨格を成す1-アミノインダン(AI)を、泳動液にはキラルセクターである硫酸化-β-CD(S-β-CD)を含む10 mMリン酸塩緩衝液(pH 7.0)を用い、リニアイメージングUV検出器を有するMCE装置(MCE-2010, 島津製)を用いてキラル分離の過程をその場観測した。分離にはクロスチャンネル型の石英チップ(Fig. 2)を用い、ピンチドインジェクション法⁷⁾により試料溶液を短いプラグとして分離チャンネル内に注入した。

リニアイメージング検出で得られるエレクトロフェログラムは、一般的なエンドチャンネル検出で得られるエレクトロフェログラムと異なり、横軸が分離流路の検出位置に対応するため、分離過程の解析が可能となる。Fig. 3はAIのキラル分離をリアルタイムで観測した結果である。試料溶液を分離チャンネル内に注入した時間を0秒とすると、5秒後にはすでにAIが分離し始め、15秒後にはベースライン分離する様子が観測されている。この15秒という分離時間は、距離に換算するとわずか8.1 mmであり、MCEの高速かつ高効率な分離性能を反映したものである。分離流路の終点に到達(移動時間50秒, 移動距離25 mm)すると、分離度は3.4までに達することがわかった。したがって、従来の分離チャンネル終端における一点検出を行っても、AIの光学分割を1分以内に実現できることが確認された。

3・2 S-β-CD濃度が分離に及ぼす影響

キラルセクターの濃度効果について検討した結果をFig. 4に示した。試料を注入してから10秒後における分離度を比較したところ、S-β-CD濃度が1.3, 2.5, 5.0, 10 mMと増加するにつれて、短い分離長で高い分離度が得られることが明らかとなった。この結果をTable 1にまとめた。分離流路の終点(移動距離25 mm)で検出を行った際の分離度および検出時間を見ると、S-β-CD濃度が10 mMのときに最も高い分離度が得られるものの、検出にも最も長い時間(52秒)を要していることがわかる。これは、速い電気浸透流(EOF)が存在する条件で分析を行っており、

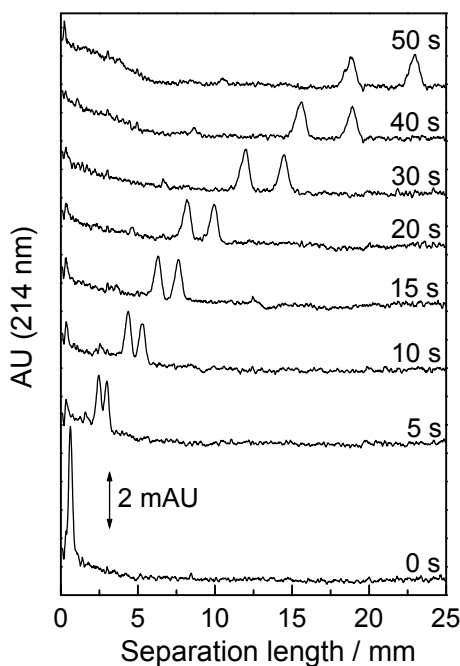


Fig. 3 Separation length-based electropherograms obtained by entire separation channel detection in the analysis of an AI racemic mixture. Running buffer, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 10 mM S- β -CD; detection wavelength, 214 nm; temperature, 25 °C. A sample solution of AI (1.0 mg/mL) was injected by the pinched injection technique.

S- β -CD はゆっくりと検出側へと移動するためであり、擬似固定相濃度が高くなるほど AI は S- β -CD に保持されやすくなり、移動速度が遅くなったことを反映している。通常の CE においても、CDEKC モードではキラルセクターの濃度を高くしすぎると、検出時間が遅くなる場合が多く、ピーク広がりをしてしまうため、キラルセクターの濃度を極力低くする必要があることが知られている。これに対し、UV リニアイメージング検出による MCE 分析では、キラルセクターの濃度を高くすることにより、短い分離長で分離が達成され、それをリアルタイムで観測できるものと期待される。実際に AI のベースライン分離に要する時間を異なる S- β -CD 濃度で比較すると、S- β -CD の濃度が高くなるほど、時間と距離が短縮されることが確認された (Fig. 5)。S- β -CD 濃度が 2.5 mM と最も低い条件においても、ベースライン分離に要する時間は 29 秒と一般的な一点検出で要する時間よりも短くなっており、S- β -CD 濃度が 10 mM では、52 秒から 14 秒までに短縮された (Table 1)。したがって、UV リニアイメージング検出器を備えた MCE 装置は、CDEKC によるキラル分析における分析時間の短縮化に非常に有効であることが示された。

以上の S- β -CD 濃度依存性についてさらに考察を行った。電気泳動における分離度 R_s は以下の式で表される。

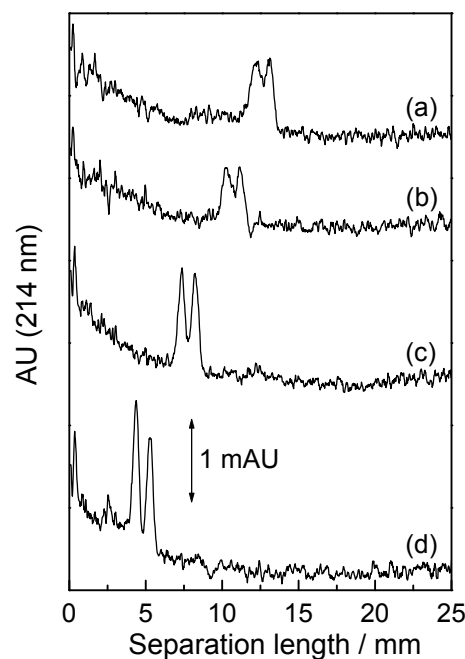


Fig. 4 Separation length-based electropherograms of the chiral separation of AI in 10 s. Running buffer consisted of (a) 1.3, (b) 2.5, (c) 5.0, and (d) 10 mM S- β -CD in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). Other conditions are shown in Fig. 3.

Table 1 Electrophoretic data for chiral separation of AI in MC-CDKEC^{a)}

[S- β -CD]/ mM	t_R ^{b)} /s	R_s ^{b)}	RSD for t_R , %	time for baseline separation/s	length for baseline separation/ mm
10	52	3.4	4.0	14	6.1
5.0	37	2.6	5.3	17	11.7
2.5	29	2.0	5.1	23	20.0
1.3	21	1.1	3.1	24	23.6

a) Conditions: running buffer, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0); temperature, 25 °C; detection wavelength, 214 nm. A sample solution of AI (1.0 mg/mL) was injected by the pinched injection technique. b) The migration time t_R and the resolution R_s were obtained using full separation length (25 mm).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\Delta\mu}{\mu_{av} - \mu_{co}} \right) \quad (1)$$

ここで N は段数、 μ_{av} は光学異性体の平均移動度、 μ_{co} は電気浸透移動度、 $\Delta\mu$ は異性体間の移動度の差である。 $\Delta\mu$ は分離係数を直接的に決める因子であり、CDEKC においては次式で表される⁸⁾。

$$\Delta\mu = \frac{[C](\mu_1 - \mu_2)(K_2 - K_1)}{1 + [C](K_1 + K_2) + K_1 K_2 [C]^2} \quad (2)$$

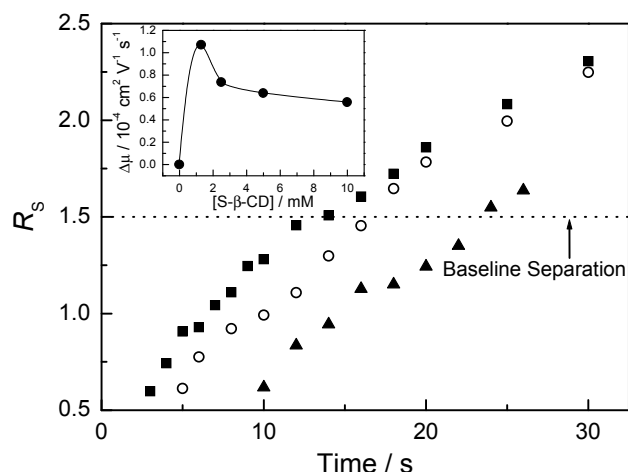


Fig. 5 Changes in the resolutions of AI enantiomers with the separation time. The running buffer consisted of 2.5 (closed triangles), 5.0 (open circles), and 10 mM S-β-CD (closed squares) in a 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). Other conditions are shown in Fig. 1. The inset represents the electrophoretic mobility differences of AI enantiomers as a function of the S-β-CD concentrations.

μ_1 は光学異性体の電気泳動移動度, μ_2 は光学異性体-S-β-CD 錯体の移動度, K_1 および K_2 は各々の異性体と S-β-CD 錯体の錯生成定数, $[C]$ は S-β-CD の濃度である。式(2)より, $\Delta\mu$ はある $[C]$ の値で極大をとることがわかる。そこで, 分離流路の終点で検出を行った際の $\Delta\mu$ を算出し, $[C]$ に対してプロットすると Fig. 5 の挿入図に示すような結果が得られた。 $[C] = 1.3$ mM のときに $\Delta\mu$ が最も大きく, それ以上の濃度にしても $\Delta\mu$ は低下することが明らかとなっている。したがって, 通常の CE 分析では $[C]$ を 1.3 mM 以上にしても, 分離は改善されないものと考えられる。しかしながら, UV リニアイメージング検出による MCE 分析では, S-β-CD が高濃度のときに, 短い分離長でベースライン分離を達成している。これは擬固定相濃度が高いために短時間で十分な包接作用が生じる上に, 移動時間が短くなるために縦拡散によるピーク広がりが増減されたことを反映しているものと考えられる。

3.3 バリデーション

AI のキラル分析について, 定量性および再現性の評価を行った。 Fig. 6 にベースライン分離した時点でのピーク面積を基にした検量線を示す。良好な直線性が得られており, 相関係数は 0.992~0.997 であった。検出時間およびピーク面積の相対標準偏差 (RSD) も良好であり, それぞれ 3.4 % および 5.1 % 以下であった。したがって, UV リニアイメージング検出による MCE キラル分析においても, 十分な定量性および再現性が得られることが確認された。しかしながら, 検出下限を求めると 0.51 mg/mL となり,

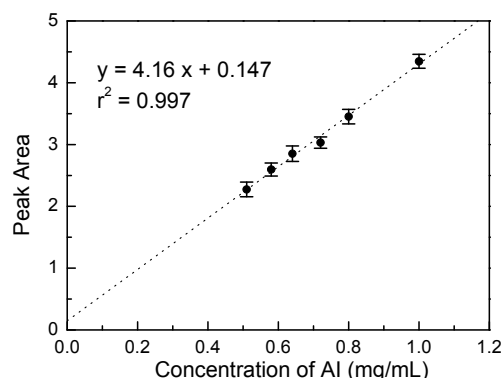


Fig. 6 Calibration curve of the peak areas for the first migrated AI enantiomer.

一般的な CE 装置に比べても低いことがわかった。この低濃度感度は MCE-UV リニアイメージング検出装置における致命的な問題点であり, オンライン試料濃縮技術の適用などを通して改善が望まれる。また, UV 検出における低感度を補うために, 検出の際の積算時間を長くする必要が生じ, 十分な時間分解能が得られない場合がある。さらに, 位置分解能が約 25 μm とチャンネル幅の 1/2 程度であるのも問題であり, AI の MCE 分析においてはピーク上のポイント数が少なくなるため, ピーク幅が広く検出されてしまうことが問題となっている。高速かつ高い分離能を要求される MCE キラル分析において, この点は致命的であり, ハードウェア的な改良が今後望まれる。

4 MCE-リニアイメージング UV 検出装置におけるタンパク質の等電点分離

ペプチドやタンパク質の分離分析における高性能分離分析手法の一つとして, 等電点電気泳動 (IEF) が知られている⁹⁾。IEF は, 種々の等電点を持つ両性電解質の混合物により形成した pH 勾配を利用してタンパク質などの両性成分を含む試料を分離する分析手法である。なかでもキャピラリー IEF (CIEF) は分析時間の短縮, 自動化, 定量化, オンライン検出が可能な点など, 従来のスラブゲル IEF と比較して多くの利点を有する。しかも, キャピラリーにおいては熱放出が非常に高いため, 固定化ゲルを用いなくても, 自由溶液中で分析を行うことができる点でも優れている。典型的な CIEF においては, 検出用の窓を作製した 10~100 cm のキャピラリーを用いてオンカラム UV 検出により分析を行う。様々な等電点を持つ両性電解質混合物をキャピラリーに充填し, 酸性の溶液を陽極液とし, アルカリ性の溶液を陰極液として電圧を印加すると, それぞれの両性電解質は等電点の位置まで移動したのち停止し, その結果, 分離の場には pH 勾配が形成される。この際, 試料タンパク質を溶液に加えておくと, 形成された pH 勾配上の等電点の位置で濃縮された細いゾーンとなり分離され

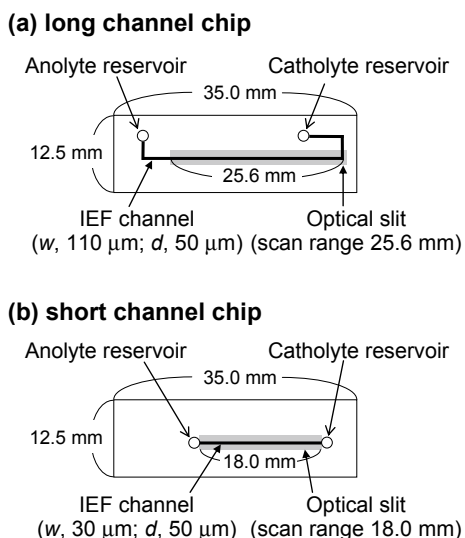


Fig. 7 IEF microchips used in this study.

る。最終的には収束した試料成分を検出部まで移動させて検出が行われるが、CIEFにおいては、この移動過程にともなう様々な問題点が指摘されている。

CIEFは試料成分の移動過程により、二段階CIEFおよび一段階CIEFに分類することができる。二段階CIEFでは、電圧を印加して両性成分を等電点濃縮する過程と、収束した成分を検出器まで移動させる過程を二段階で行う。検出器までの移動方法には、陽極液もしくは陰極液を入れ替えて移動を促す手法や、キャピラリーを加圧することで検出器まで移動させる手法などが用いられる。この二段階CIEFにおいて良好な分離を達成するためには、電圧印加の際に生じるEOFをキャピラリーの内面処理により抑制し、収束時のバンド広がりを最小限にすることが重要となる。これに対し、一段階CIEFでは未修飾のキャピラリーを用いる。電圧を印加すると速いEOFが生じるため、タンパク質を等電点収束させながら検出部まで移動させることで、分析手順の簡略化を達成できる。これらの移動過程における問題点として、二段階CIEFでは分析時間が長い、タンパク質が沈殿する可能性が高い、pH勾配がゆがむ、移動速度が一定でないために分離能が変わりやすいことなどが挙げられる。一方、一段階CIEFでは分析時間の問題は解消できるが、二段階CIEFと比較すると分離能は劣り、さらに、検出部近傍に存在するタンパク質が等電点の位置に収束する前に検出部に到達してしまうという問題が生じる。

このような移動過程により生じる欠点を克服するために、全カラム検出法の適用が検討されている¹⁰⁾。全カラムのイメージング検出を用いることで、収束した試料ゾーンは移動過程を必要とせずに定常状態で検出できる。したがって、目的成分の収束・分離が達成されたことが確認で

きるようになり、さらには、過度に電圧印加を続けることによるタンパク質の沈殿をも回避できる。しかしながら、キャピラリーをベースとしたCIEFでは、光源となるレーザーを広範囲にスキャンする必要があり、キャピラリー中心に光照射するのも難しいため、特殊な装置が必要となる。そこで著者らは、リニアイメージング検出器を有するMCE装置を用いてMC-IEF分析を行い、試料タンパク質がチャンネル内で分離の様子を観測し、その収束過程について検討を行った。前述のように分離流路全体の濃度プロファイルをイメージングすることが可能であり、移動過程で生じる試料バンド幅の広がりがなくなるため、分離能の向上が期待される。さらに、UV検出を用いるために試料の蛍光誘導体化が不要となり、誘導体化に伴う等電点変化のおそれもなくなくなるため、分析時間の短縮化とも相まって、タンパク質のIEF分析に適した装置であると考えられる。市販のクロス型チャンネルチップでは、IEF過程において試料成分のリークがクロス部で生じ、分離能が低下するものと予想されたため、本研究では直線状のチャンネルチップを作製し、MC-IEF分析へ適用した。

4・1 タンパク質の収束過程の観測

MC-IEF分析においては、石英基板に幅110 μ m、深さ50 μ m、有効長38.8 mm（スキャン範囲25.6 mm）の直線状チャンネルを作製したロングチャンネルチップ（Fig. 7a）および幅30 μ m、深さ50 μ m、有効長18.0 mm（スキャン範囲18.0 mm）のチャンネルを有するショートチャンネルチップ（Fig. 7b）を用いた。特に断りのない限り、ロングチャンネルチップを用いて実験を行った。なお、チャンネル表面にはタンパク質の吸着およびEOFを抑制するために非架橋ポリアクリルアミド修飾を施した¹¹⁾。分離においては、あらかじめ試料を加えた両性電解質混合物溶液（2 % Ampholyte 3-10）をチャンネル全体に満たし、陽極液として2 % hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)を含む10 mM リン酸水溶液（pH 2.4）を、陰極液として2 % HPMCを含む40 mM 水酸化ナトリウム水溶液（pH 12.6）を各リザーバーに注入した。溶液を満たしたチップを、リニアイメージング検出器を有するMCE装置（MCE-2010、島津製）にセットして、印加電圧440 V/cm、検出波長280 nmにて分析を行った。

Fig. 8aはミオグロビンをロングチャンネルチップにおいてMC-IEF分析した結果である。図の横軸は流路の検出位置を示しており、左側は陽極液側、右側は陰極液側に対応している。電圧を印加してから50秒後には、試料成分が両極側より現れ、二つのピークとして観測されている。150秒後には、この二つのピークは10.5 mmの位置に一つの大きなピークとして収束した。このピークは、等電点が7.2のミオグロビン主要成分に帰属された。200秒後には、8.5 mmの位置に等電点が6.8のアイソザイムに由来する小さな

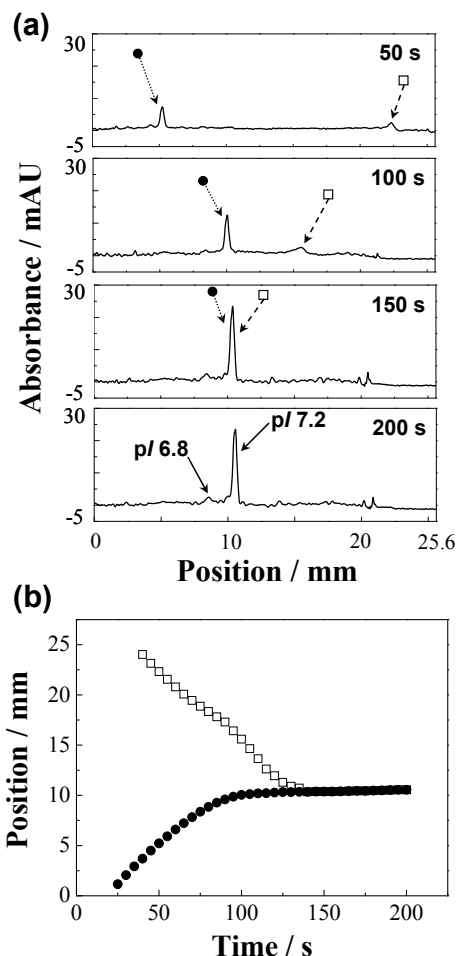


Fig. 8 (a) MC-IEF analysis of myoglobin on the long channel chip. (b) Changes in the peak position with the separation time. Sample, 59 $\mu\text{g/mL}$ myoglobin in neat eCAP cIEF Gel containing 2 % ampholyte; anolyte, 10 mM phosphoric acid containing 2 % HPMC; catholyte, 40 mM sodium hydroxide containing 2 % HPMC; electric field strength, 450 V/cm; detection, 280 nm.

ピークが観測され、等電点分離が達成された。分析時間に対して、陰極側および陽極側から現れた二つのピークの位置をプロットすると Fig. 8b の結果が得られ、140 秒で収束が完了していることが確認された。なお、この図からわかるように、収束が完了した後に電圧を印加し続けてもピーク位置は変化しておらず、EOF がポリアクリルアミド修飾および泳動液に含まれる HPMC によって完全に抑制されていることが確認された。EOF が抑制され、ピーク位置が一定となることは、未知試料の等電点を見積もるうえで非常に重要であり、最適化した分析条件においてはタンパク質の定性分析が可能になるものと考えられる。

4.2 pH 勾配形成過程の観測

MC-IEF によるタンパク質の収束過程の解析においては、アンフォライトによってチャンネル内に pH 勾配が形成

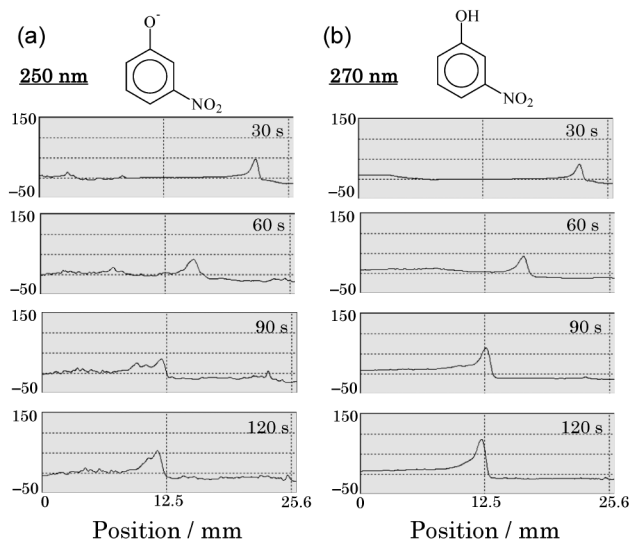


Fig. 9 Changes in the UV absorption of mNP at (a) 250 nm and (b) 270 nm in the microchannel during the MC-IEF process. Sample, 0.5 mM *m*-nitrophenol in cIEF Gel containing 2 % ampholyte.

される過程を明らかにすることが重要であると考えられる。そこで pH 指示薬として *m*-ニトロフェノール (mNP) を用い、二波長の吸光度を測定することでチャンネル内の溶液の pH を測定した¹²⁾。mNP の pK_a は 8.3 であり、次式より溶液の pH を求めることができる。

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left\{ \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \right\} \quad (3)$$

ここで HIn は mNP の非解離体、 In^- は解離体であり、それぞれ 270 nm および 250 nm に極大を示す。Beer 則より、

$$A_{250} = \varepsilon_{250\text{HIn}} l [\text{HIn}] + \varepsilon_{250\text{In}^-} l [\text{In}^-] \quad (4)$$

$$A_{270} = \varepsilon_{270\text{HIn}} l [\text{HIn}] + \varepsilon_{270\text{In}^-} l [\text{In}^-] \quad (5)$$

ε はモル吸光係数、 l は光路長を表す。式(4)、(5)を式(3)に代入すると、

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left\{ \frac{(A_{250}\varepsilon_{270\text{HIn}} - A_{270}\varepsilon_{250\text{HIn}}) / (A_{270}\varepsilon_{250\text{In}^-} - A_{250}\varepsilon_{270\text{In}^-})}{\varepsilon_{250\text{HIn}} - \varepsilon_{270\text{HIn}}} \right\} \quad (6)$$

となり、吸光度を二波長で測定することで、溶液の pH を求めることができる。なお、 $\varepsilon_{250\text{HIn}}$ 、 $\varepsilon_{250\text{In}^-}$ 、 $\varepsilon_{270\text{HIn}}$ 、 $\varepsilon_{270\text{In}^-}$ はそれぞれ 328, 6660, 3270, 335 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ である。

そこで両性電解質溶液 (2 % Ampholyte 3-10) に 0.5 mM mNP を加えたものをロングチャンネルチップに満たし、陽極液および陰極液をリザーバーに注入してから電圧を印加して、波長 250 nm および 270 nm の吸光度を測定した (Fig. 9)。その結果、両波長において、陰極側よりピークが観測され、チャンネル中央部に収束していく様子が観測され

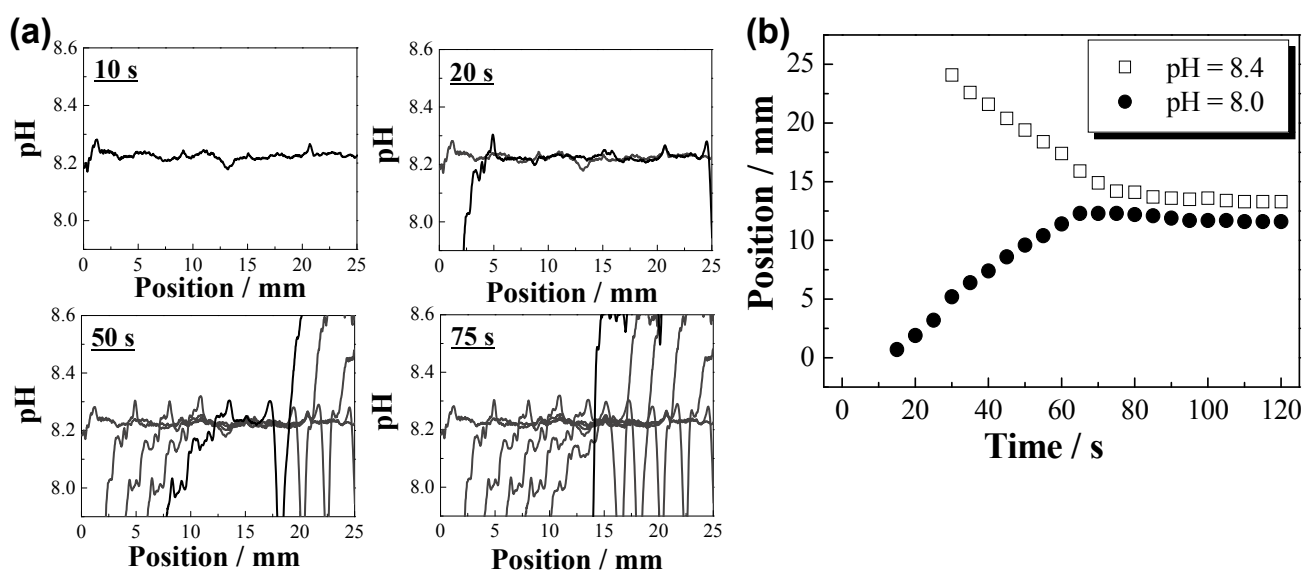


Fig. 10 (a) pH profiles in the microchannel during the MC-IEF process. (b) Changes in the channel position giving pH 8.0 and 8.4 with the separation time. Conditions as in Fig. 9.

た. これは次のように解釈できる. 0.5 mM mNP を含む両性電解質溶液の pH と mNP の pK_a はほぼ等しいため, mNP の解離体と非解離体がほぼ同濃度でチャンネル内に満たされていると考えられる. 電圧が印加されると, 解離体の mNP アニオンは陽極側へ電気泳動するが, 陽極側からはプロトンが供給され, pH が低下するため, 解離体の割合が減少する. その結果, 非解離体が濃縮されたゾーンが形成し, ピークとして観測されたものと考えられる.

この吸光度変化と式(6)より, チャンネル内の溶液の pH を算出したところ, Fig. 10a に示すような pH 勾配の形成過程を観測することができた. 電圧印加 10 秒後では, 観測範囲における pH はほぼ一定であったに対し, 50 秒後には 0~10 mm の位置で pH の低下が, 19~25 mm の位置では pH の上昇が観測された. 75 秒後には, 急峻な pH 勾配のみが 13.8~14.6 mm の位置で観測されている. pH 8.0 および 8.4 を与えるチャンネル位置を電圧印加時間に対してプロットした結果を Fig. 10b に示す. この結果より, ロングチャンネルチップにおいては, チャンネルのほぼ中心部である pH 8 付近の pH 勾配形成が約 70 秒で完了することが明らかとなった. 同様の MC-IEF 実験条件下においては, タンパク質の収束に 120~210 秒要したことから, pH 勾配がチャンネル全域で形成された後に, 試料タンパク質の収束が完了することがわかった. したがって, MC-IEF における収束時間は pH 勾配の形成速度に依らず, タンパク質の泳動速度によって決まることが確認された. これは, pH 勾配形成に使われる両性電解質の平均分子量が 600 なのに対し, タンパク質の分子量は数万であり, 電気泳動移動度の差が顕著であるためと考えられる.

4.3 タンパク質の MC-IEF 分離

標準タンパク質 4 種 [a, カーボニックアンヒドラーゼ II (pI 5.9); b, ミオグロビン (pI 6.8, 7.3); c, レンチルレクチン (pI 8.2, 8.6); リボスクレアーゼ A (pI 9.5)] の MC-IEF をロングチャンネルチップ上で行った結果を Fig. 11a に示す. 電圧を印加すると, 複数のピークが両極側から現れ, 6 本のピークに収束する様子が観測された. 全タンパク質の分離・収束に要した時間は 210 秒であり, キャピラリーベースの CIEF (~40 分) に比して約 10 倍の高速化を達成した. pI が 5.9~8.6 の成分については良好な分離が得られたものの, リボスクレアーゼ A のピーク形状は悪くなった. これは, 用いた両性電解質の pI が 3 から 10 の範囲であり, リボスクレアーゼ A の pI が適用範囲外に極めて近かったことに起因するものと考えられる. Fig. 11b は各タンパク質の等電点に対して, 210 秒後に得られた収束位置をプロットした結果である. 約 6~9 の pH 範囲で良好な直線関係が得られたことから, MC-IEF においても未知タンパク質の等電点の推定が検量線より可能であることが確認された.

ピークの収束位置の再現性を見積もったところ, RSD で 5.4 % となり, マイクロチップベースの分析としては良好な値を示した. この RSD から生じる等電点の誤差は 0.07 以下であり, MC-IEF の分離能よりも低いため, 十分な定性能を有することがわかった. また, ピーク高さの RSD も 1.9 % 以下と良好な値を示し, 定量分析にも利用できることが示唆された. しかしながら, ミオグロビンの検出下限は 3 $\mu\text{g/mL}$ と高い値になった. IEF では収束に伴う濃縮が起きるため, ある程度の感度向上が実現できるものの, リニアイメージング UV 検出器の低感度を補うためにさらな

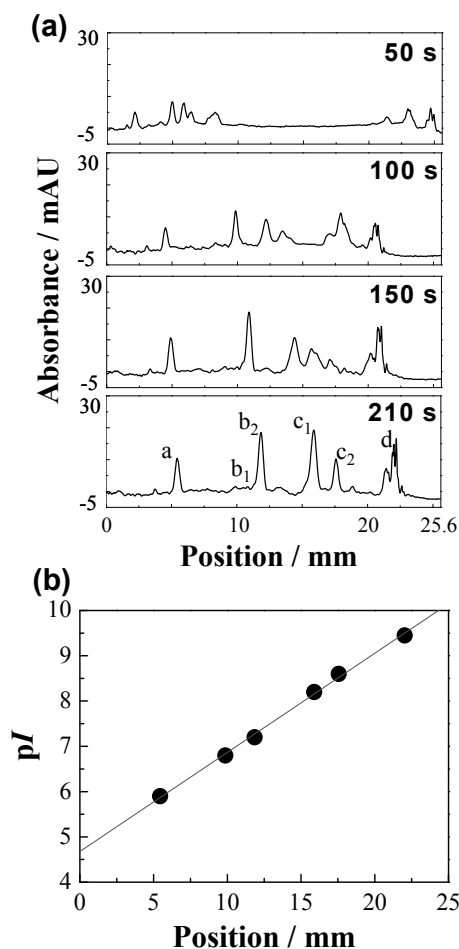


Fig. 11 (a) MC-IEF separation of the standard proteins on the long channel chip. a, 28 $\mu\text{g/mL}$ carbonic anhydrase II ; b₁, b₂, 56 $\mu\text{g/mL}$ myoglobin ; c₁, c₂, 170 $\mu\text{g/mL}$ lentil lectin ; d, 150 $\mu\text{g/mL}$ ribonuclease A. (b) Calibration curve for the focusing position versus the pI value of the standard proteins.

る工夫が必要であるように思われる。

4.4 ショートチャネルチップにおける MC-IEF 分離

MC-IEF の分析性能を高める試みとして、ショートチャネルチップの適用について検討を行った。分離長が短くなるため、分析時間の短縮化が期待される。試料としてミオグロビンを用い、ロングチャネルチップと同じ電場強度 (450 V/cm) を印加したところ、収束に要する時間は 140 秒から 47 秒までに短縮できた。しかしながら、4 種の標準タンパク質の分離について比較したところ、ショートチャネルチップでは分離能が低下し、ロングチャネルチップでは観測されていた b₁ のピークが観測されなくなり、c₁ と c₂ の分離度は明らかに悪くなった (Fig. 12a)。これは、同じ両性電解質と陽極・陰極液を用いているため、短いチャネルでは pH 勾配が急になったためと考えられる。

ショートチャネルチップの分離チャネル幅は 30 μm と

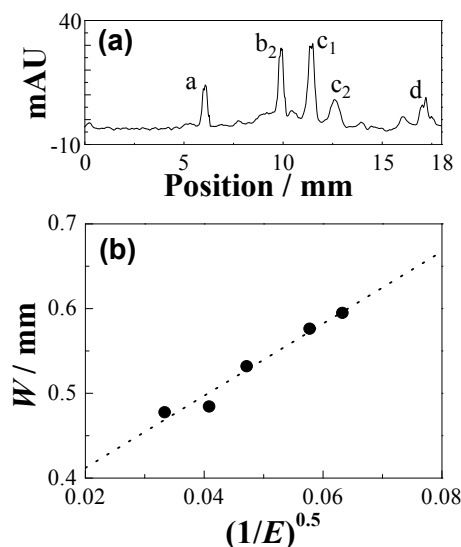


Fig. 12 (a) MC-IEF separation of the standard proteins on the short channel chip at the separation time of 130 s (a, 110 $\mu\text{g/mL}$ carbonic anhydrase II ; b₂, 210 $\mu\text{g/mL}$ myoglobin ; c₁, c₂, 620 $\mu\text{g/mL}$ lentil lectin ; d, 550 $\mu\text{g/mL}$ ribonuclease A). (b) Effect of the applied voltage on the peak width of myoglobin.

なっており、ロングチャネルチップの 110 μm に比して細くなっているため、ジュール熱の放散効率が高まり、より高い電場強度を印加できることが期待される。ここで IEF におけるピーク幅は以下の式で表すことができる¹³⁾。

$$W = 4 \sqrt{\frac{D}{E(-d\mu/d\text{pH})(d\text{pH}/dx)}} \quad (7)$$

ここで W , D , E , $d\text{pH}/dx$, $d\mu/d\text{pH}$ はそれぞれピーク幅、試料成分の拡散係数、電場強度、pH 勾配、pH 変化に対する試料成分の電気泳動移動度変化の度合いである。式 (7) から明らかなように、IEF においては高電場強度の印加により、より細いピーク幅が得られ、分離効率が向上する。そこでショートチャネルチップにおいて電場強度を 250 から 900 V/cm まで変化させたところ、ミオグロビンのピーク幅は 0.60 mm から 0.48 mm までに細くなった (Table 2)。収束時間も 85 秒から 26 秒に短縮され、pI が 6.8 と 7.2 の成分の分離度も 1.18 から 1.97 へと向上した。したがって、MC-IEF においては、高電場強度の印加が分析時間の短縮および分離度の向上に有効であることが実験的にも確認された。なお、ジュール熱の影響についても確認を行った。 $E^{-1/2}$ に対して W をプロットしたところ、250 から 900 V/cm の範囲では良好な直線が得られており、式 (7) の予測と良い一致を示した。ジュール熱が発生していればピーク幅が広がり、直線から外れると予想されるため、ショートチャネルチップにおいて 900 V/cm の電場を印加しても、

Table 2 Effect of the applied voltage on the MC-IEF separation of myoglobin

E (V/cm)	focusing time (s)	W (mm)	R_s ^{a)}
900	26	0.48	1.97
600	40	0.49	1.90
450	47	0.53	1.64
350	67	0.58	1.25
250	85	0.60	1.18

a) The resolutions were calculated by the equation $R_s = 1.18 \cdot (x_2 - x_1) / (W_{1/2,1} + W_{1/2,2})$, where x and $W_{1/2}$ are the peak position and the peak width at the half peak height, respectively.

ジュール熱の影響は無視できることが確認された。ピーク容量や検出感度については改善の余地があるものの、リニアイメージング検出器を有する MCE 装置により高速かつ高効率な MC-IEF 分析を実現できた。

5 おわりに

本研究ではリニアイメージング UV 検出器を有する MCE 装置を用いて、光学異性体の MC-CDEKC 分析およびタンパク質の MC-IEF 分析を行った。MC-CDEKC 分析では、リニアイメージング UV 検出によりチャンネル全体の濃度プロファイルをリアルタイムで観測できる利点を活かし、キラルセクターの濃度を高くすることで、分離に要する時間を大幅に短縮することに成功した。MC-IEF 分析では、リニアイメージング UV 検出により CIEF において改良が重ねられてきた検出器までの移動過程における問題点を解決できた。ロングチャンネルチップを用いて MC-IEF 分析を行ったところ、わずか 140 秒で標準タンパク質の分離・収束を達成することができた。ショートチャンネルチップを用いて MC-IEF の高性能化を図ったところ、電場強度 900 V/cm の条件下ではわずか 26 秒で細いバンドに収束させることに成功した。このようなチャンネル全体をイメージングできる利点を活かし、複雑な過程を伴う分離モードやオン

ライン試料濃縮のように試料溶液と分離溶液の組成が異なる系におけるメカニズムの解明への適用が期待される。さらに、前処理プロセス等と分離およびリニアイメージング検出をオンチップで統合した装置の開発などにより、ハイスループットかつ高性能なマイクロ化学分析システムの構築が望まれる。

謝 辞

リニアイメージング UV 検出-MCE 装置の使用に際し技術的なご支援を頂き、また、直線状チャンネルチップをご提供頂いた島津製作所の中西博昭氏ならびに荒井昭博氏に深謝致します。

文 献

- 1) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer : *Sens. Actuators B*, **1**, 244 (1990).
- 2) D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H. M. Widmer : *Anal. Chem.*, **64**, 1926 (1992).
- 3) H. Nakanishi, T. Nishimoto, A. Arai, H. Abe, M. Kanai, Y. Fujiyama, T. Yoshida : *Electrophoresis*, **22**, 230 (2001).
- 4) F. Kitagawa, S. Aizawa, K. Otsuka : *Anal. Sci.*, **21**, 61 (2005).
- 5) F. Kitagawa, S. Aizawa, K. Otsuka : *Anal. Sci.*, **25**, 979, (2009).
- 6) R. Vespalec, P. Bocek : *Chem. Rev.*, **100**, 3715 (2000).
- 7) S. C. Jacobson, R. Hergenroder, A. W. Moore, J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 4127 (1994).
- 8) S. A. C. Wren, R. C. Rowe : *J. Chromatogr. A*, **603**, 235 (1992).
- 9) T. Pritchett, F. A. Robey : "Handbook of Capillary Electrophoresis", Edited by J. P. Landers, p. 259 (1997), (CRC Press, Boca Raton).
- 10) T. Wang, R. A. Hartwick : *Anal. Chem.*, **64**, 1745 (1992).
- 11) S. Hjertén : *J. Chromatogr.*, **347**, 191 (1985).
- 12) J.-B. Kim, P. Britz-McKibbin, T. Hirokawa, S. Terabe : *Anal. Chem.*, **75**, 3986 (2003).
- 13) J. Wu, J. Pawliszyn : *Anal. Chem.*, **64**, 219 (1992).

Microchip Electrophoresis Using Linear-Imaging UV Detector

Fumihiko KITAGAWA¹, Shiori AIZAWA¹ and Koji OTSUKA¹

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

(Received 31 January 2011, Accepted 26 April 2011)

We have studied on microchip–cyclodextrin electrokinetic chromatography (MC–CDEKC) analysis of enantiomers and microchip–isoelectric focusing (MC–IEF) of proteins by using a commercially available microchip electrophoresis (MCE) instrument equipped with a linear-imaging UV detector, which allows real-time measurements of concentration profiles in a microchannel. In the MC–CDEKC analysis of racemic 1-aminoindane, sulfated- β -cyclodextrin (S- β -CD) was used as a pseudo-stationary phase. Effect of the concentration of S- β -CD on the separation process was investigated. In the MC–IEF analysis of proteins, on the other hand, we studied the processes of a pH gradient formation and protein focusing. Furthermore, effect of the channel length and applied electric field strength on the separation performance of proteins in MC–IEF was studied.

Keywords : microchip electrophoresis ; cyclodextrin electrokinetic chromatography ; isoelectric focusing ; linear-imaging UV detector.