



キャピラリー電気泳動法の高精度化・高感度化

(課題番号：14550782)

平成14年度～15年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 ^{ヒロ} 廣 ^{カワ} 川 ^{ケン} 健
(広島大学大学院工学研究科教授)



キャピラリー電気泳動の高精度化・高感度化

(課題番号 14550782)

平成14年度～平成15年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 廣川 健

(広島大学大学院工学研究科教授)

は し が き

キャピラリー電気泳動法 (CE) は絶対感度・分析の迅速性・メンテナンス・ランニングコストなどの点で優れた分析法である。本法はごく少量の試料・分析試薬しか必要とせずローエミッションであるため、次世代の分析法として期待されているが、CE や マイクロチップ電気泳動 (MCE) の濃度検出下限 (LOD) は試料負荷および検出に対する構造上の制約から他の分離分析法と比べてかなり高い。この欠点はレーザー励起蛍光検出のような高感度検出器や適切なオンライン前濃縮法の適用により改善できるが、後者はUV検出器のみを備えた通常のCE装置において有用であり汎用性に優れている。このため、各種のオンライン前濃縮法が考案されている。本研究では我々が開発した「過渡的等速電気泳動 (tITP) および試料の電氣的注入を併用する tITP (electrokinetic supercharging)」を使用して、CE および MCE の高感度化 (LOD 向上) および高精度分析を目的とした。応用としてCEによるアルカリ金属、アルカリ土類、希土類カチオン、海水や生体関連試料中のアニオン・カチオン分析、および MCE による DNA 断片や SDS タンパク質分析への適用例を示した。最適化された条件ではCEのLODはサブppbレベルに達し、これは金属カチオンやアニオンについてイオンクロマトグラフィー (IC) や誘導結合プラズマ原子発光分析法 (ICP-AES) に比肩する濃度感度である。MCE では DNA 断片について $0.02 \mu\text{g/ml}$ 、SDS タンパク質について $0.3 \mu\text{g/ml}$ と、通常法に比べ10~30倍程度良好な結果を得た。

本研究報告書は、平成14年度~15年度に基盤研究 (C) (2) として日本学術振興会科学研究費補助を受けて実施した「キャピラリー電気泳動の高精度化・高感度化 (課題番号 14557082)」に関する研究の成果をまとめたものである。本研究の内容は当該科学研究費の補助を受けて実現されたものであり、ここに深く謝意を表す。

研究組織

- 研究代表者 : 廣川 健 (広島大学大学院工学研究科教授)
研究分担者 : 育田 夏樹 (広島大学大学院工学研究科助手)
研究分担者 : 伊藤 一明 (近畿大学工学部助教授)

研究経費

交付決定額 (配分額)	金額単位: 千円		
	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	2,800	0	2,800
平成15年度	800	0	800
総計	3,600	0	3,600

研究成果の発表（平成14年度～15年度）

（1）学会誌など

- [1] Takeshi Hirokawa, Hikaru Okamoto, Bohuslav Gas, High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: Electrokinetic supercharging, *Electrophoresis*, 24, 498-504 (2003).
- [2] Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa, Tsutomu Nishine, Akihiro Arai, High-sensitive capillary gel electrophoretic analysis of DNA fragments on an electrophoresis microchip using electrokinetic injection with transient isotachophoresis preconcentration, *J.Chromatogr. A*, 990, 53-61 (2003).
- [3] Hikaru Okamoto and Takeshi Hirokawa, Application of electrokinetic supercharging capillary zone electrophoresis to rare-earth ore samples, *J.Chromatogr. A*, 990, 335-341 (2003).
- [4] Takeshi Hirokawa, Teppei Ichihara, Andrei R. Timerbaev, Specific analyte-electrolyte additive interaction in transient isotachophoresis-capillary electrophoresis, *J.Chromatogr. A*, 993, 205-209 (2003).
- [5] Takeshi Hirokawa, Teppei Ichihara, Kazuaki Ito, Andrei R. Timerbaev, Trace ion analysis of seawater by capillary electrophoresis: determination of iodide using transient isotachophoretic preconcentration, *Electrophoresis*, 24, 2328-2334 (2003).
- [6] Jong-Bok Kim, Philip Britz-McKibbin, Takeshi Hirokawa and Shigeru Terabe, Mechanistic Study on Analyte Focusing by Dynamic pH Junction in Capillary Electrophoresis Using Computer Simulation, *Anal. Chem.*, 75(16), 3986-3993 (2003).
- [7] Kazuaki Ito, Teppei Ichihara, Huang Zhuo, K Kumamoto, Andrei R. Timerbaev, Takeshi Hirokawa, Determination of trace iodide in seawater by capillary electrophoresis following transient isotachophoretic preconcentration. Comparison with ion chromatography, *Anal. Chim. Acta*, 497, 67-74 (2003)
- [8] Zhongqi Xu, Tomomi Ando, Tsutomu Nishine, Akihiro Arai, Takeshi Hirokawa, Electrokinetic supercharging preconcentration and microchip gel electrophoretic separation of SDS-protein complexes, *Electrophoresis*, 24, 3821-3827 (2003).
- [9] Hikaru Okamoto, Yasuaki Okamoto, Takeshi Hirokawa and Andrei R. Timerbaev, Trace ion analysis of sea-water by capillary electrophoresis: determination of strontium and lithium pre-concentrated by transient isotachophoresis, *The Analyst*, 128, 1439 - 1442 (2003).
- [10] 廣川 健、岡本 光、徐 中其、育田夏樹、オンライン前濃縮によるキャピラリー電

気泳動法およびマイクロチップ 電気泳動法の高感度化、分析化学、52、1069-1079 (2003) .

[11] Speciation studies by capillary electrophoresis - simultaneous determination of iodide and iodate in seawater, Zhuo Huang, Kazuaki Ito, Andrei R. Timerbaev, Takeshi Hirokawa, Anal. Bioanal. Chem., 378, 1836-1841 (2004).

[12] Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa, Optimization of the electrokinetic supercharging preconcentration for high-sensitivity microchip gel electrophoresis on a cross-geometry microchip, Electrophoresis, (2004) in press.

[13] Zhongqi Xu, Tsutomu Nishine, Akihiro Arai, Takeshi Hirokawa, Performance of electrokinetic supercharging for high-sensitivity detection of DNA fragments in chip gel electrophoresis, Electrophoresis, (2004) in press.

(2) 口頭発表

国際学会

[1] T.Hirokawa, H.Okamoto, Z.Q. Xu, N.Ikuta, T.Nishine, A.Arai, High-sensitive Analysis of Small Ions and DNA Fragments by Electrokinetic Supercharging - CZE, ITP2002, (Helsinki, Sept.,2002).

[2] H.Okamoto, T.Hirokawa, Application of Electrokinetic Supercharging - CZE to Real Samples, ITP2002, (Helsinki, Sept.,2002).

[3] N. Ikuta, Y. Hotta and T. Hirokawa, Development and optimization of Capillary electrophoresis - Electron Ionization - Mass Spectrometer (CE-EI-MS) (I) , ITP2002, (Helsinki, Sept.,2002).

[4] T. Hirokawa, Z.Q. Xu, T. Ando, T.Nishine, A.Arai, Performance of Electrokinetic Supercharging for High-sensitive Chip Gel Electrophoresis, ICES2003, (Glasgow, May, 2003).

国内学会

[1] 廣川 健、岡本 光、育田 夏樹、過渡的等速電気泳動-CZE 法における定性分析の問題点、第 63 回分析化学討論会 (平成 14 年 5 月、姫路)

[2] 育田夏樹、堀田 洋二郎、兵庫 隆雄、廣川 健、キャピラリー電気泳動-電子衝撃イオン化-質量分析装置の製作とその評価、第 63 回分析化学討論会 (平成 14 年 5 月、姫路)

- [3] 一原 哲平、伊藤 一明、育田 夏樹、廣川 健、CZEによる海水中微量ヨウ素の分析、第63回分析化学討論会（平成14年5月、姫路）
- [4] 伴 智晃、育田 夏樹、廣川 健、ミセル動電クロマトグラフィーにおける再現性の高い定性指標の開発、第63回分析化学討論会（平成14年5月、姫路）
- [5] 廣子 就一、育田 夏樹、廣川 健、キャピラリー電気泳動装置を用いる等速電気泳動、第63回分析化学討論会（平成14年5月、姫路）
- [6] 山崎 正吾、育田 夏樹、廣川 健、CZEにおける間接蛍光検出法の高感度化、第63回分析化学討論会（平成14年5月、姫路）
- [7] 岡本 光、育田 夏樹、廣川 健、電氣的注入-過渡的等速電気泳動前濃縮-CZEによる希土類イオン分離の最適化 (I)、第63回分析化学討論会（平成14年5月、姫路）
- [8] 上田 明日美、育田 夏樹、廣川 健、マイクロフリーフロー電気泳動装置によるDNA-タンパク質混合物からのDNAの分取、第63回分析化学討論会（平成14年5月、姫路）
- [9] 廣川 健、岡本 光、育田 夏樹、Electrokinetic supercharging-CZEのシミュレーションと実試料への応用、日本分析化学会第51年会（平成14年9月、札幌）
- [10] 育田 夏樹、堀田洋二郎、廣川 健、キャピラリー電気泳動-電子衝撃イオン化-質量分析装置（CE-EI-MS）の開発と応用（I）、日本分析化学会第51年会（平成14年9月、札幌）
- [11] 廣川 健、岡本 光、徐 中其、Electrokinetic Supercharging-CZEにおける試料導入・分離のシミュレーション、第22回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成14年12月、東京）
- [12] 廣子 就一、育田 夏樹、廣川 健、キャピラリー電気泳動装置を用いる等速電気泳動、第22回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成14年12月、東京）
- [13] 徐 中其、廣川 健、西根 勤、荒井 昭博、Electrokinetic supercharging-tr-IITPによるDNA断片の高感度CGE分析、第22回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成14年12月、東京）
- [14] 育田 夏樹、吉山 竜也、伴 知晃、廣川 健、キャピラリー電気泳動データの標準化法、第22回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成14年12月、東京）
- [15] 伴 智晃、育田 夏樹、廣川 健、ミセル動電クロマトグラフィーにおける再現性の高い定性指標の開発、第22回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成14年12月、

東京)

[16] 岡本 光、育田 夏樹、廣川 健、Electrokinetic supercharging の実試料への応用、第 22 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (平成 14 年 12 月、東京)

[17] 一原哲平、伊藤一明、Andrei Timerbaev、育田 夏樹、廣川 健、過渡的等速電気泳動-CZE による海水中微量ヨウ化物イオンの高感度分析、第 22 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (平成 14 年 12 月、東京)

[18] 廣川 健、キャピラリー電気泳動の高感度化・高精度化、第 64 回分析化学討論会 (平成 15 年 5 月、高知)

[19] 育田 夏樹、伴 知晃、廣川 健、ミセル導電クロマトグラフィーにおけるデータの標準化、第 64 回分析化学討論会 (平成 15 年 5 月、高知)

[20] 廣子 就一、育田 夏樹、廣川 健、キャピラリー電気泳動装置を用いる等速電気泳動 II、第 64 回分析化学討論会 (平成 15 年 5 月、高知)

[21] 山崎 正悟、育田 夏樹、廣川 健、間接蛍光法によるキャピラリー電気泳動検出の高感度化 (II)、第 64 回分析化学討論会 (平成 15 年 5 月、高知)

[22] 安東 知美、徐 中其、廣川 健、Supercharging preconcentration of SDS-protein in microchip gel electrophoresis、第 64 回分析化学討論会 (平成 15 年 5 月、高知)

[23] 廣川 健、徐 中其、岡本 光、マイクロチップ電気泳動の高感度化、Separation Sciences 2003 (平成 15 年 7 月、東京)

[24] 岡本 光、高垣 昌典、廣川 健、CZE による環境水中微量カチオン成分の分析、Separation Science 2003 (平成 15 年 7 月、東京)

[25] 育田 夏樹、伴 知晃、山崎 泰二、廣川 健、ミセル導電クロマトグラフィーにおけるデータの標準化 (1)、日本分析化学会第 52 年会 (平成 15 年 9 月、仙台)

[26] 岡本 光、廣川 健、CZE による海水中微量カチオン成分の分析 (1)、日本分析化学会第 52 年会 (平成 15 年 9 月、仙台)

[27] 徐 中其、廣川 健、A novel analytical procedure for achieving electrokinetic supercharging on a cross geometry microchip、日本分析化学会第 52 年会 (平成 15 年 9 月、仙台)

[28] 梶村 康平、上田 明日美、育田 夏樹、廣川 健、オンライン電気透析-フリーフロー電気泳動装置の開発 (1)、日本分析化学会第 52 年会 (平成 15 年 9 月、仙台)

[29] 岡本 光、高垣 昌典、廣川 健、Electrokinetic supercharging-CZE による環境水微量カチオン成分の高感度分析、2003 年日本化学会西日本大会（平成 15 年 10 月、東広島）

[30] 徐 中其、廣川 健、High-sensitivity analysis of DNA fragments in the microchip using electrokinetic supercharging preconcentration、2003 年日本化学会西日本大会（平成 15 年 10 月、東広島）

[31] 廣川 健、キャピラリー電気泳動・マイクロチップ電気泳動のシュミレーションー高感度化を目指してー、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[32] 育田 夏樹、伴 知晃、山崎 泰二、廣川 健、ミセル動電クロマトグラフィーにおけるデータの標準化（II）、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[33] 山崎 正悟、育田 夏樹、廣川 健、キャピラリー電気泳動間接蛍光法による銅イオンの選択的高感度検出、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[34] 梶村 康平、上田 明日美、育田 夏樹、廣川 健、オンライン電気透析-フリーフロー電気泳動装置の開発（II）、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[35] Zhongqi Xu、Tsutomu Nishine、Akihiro Arai、Takeshi Hirokawa、Electrokinetic supercharging preconcentration for protein separation based on microchip gel electrophoresis、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[36] Zhuo Huang、Takeshi Hirokawa、Simultaneous Determination of Iodide and Iodate in Seawater by Capillary Electrophoresis with Transient Isotachophoretic Preconcentration、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[37] 岡本 光、廣川 健、CZE による海水中微量カチオン成分の分析（2）、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

[38] 廣子 就一、廣川 健、キャピラリー電気泳動装置を用いる等速電気泳動（2）、第 2 3 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（平成 15 年 12 月、岡山）

研究成果

1. 緒言

キャピラリー電気泳動法 (CE) は絶対感度・分析の迅速性・メンテナンス・ランニングコストなどの点で優れた分析法である。本法はごく少量の試料・分析試薬しか必要とせずローエミッションであるため、次世代の分析法として期待されている。近年これらの特徴をより効果的に発揮させる目的で装置の小型化が進み、マイクロチップ電気泳動 (MCE) が注目され、装置が市販されるようになってきている。CE の場合、キャピラリーの内径 $100\ \mu\text{m}$ 以下長さ約 $1\ \text{m}$ 、MCE ではチャンネル幅約 $100\ \mu\text{m}$ 有効長が数 $10\ \text{mm}$ とより短く、このような幾何学的制約により CE・MCE では一般に濃度感度が低く、解決すべき最大の課題となっている。高感度化のためには、レーザー励起蛍光 (LIF) や質量分析 (MS) 等の高感度な検出法の使用など、ハードウェアの改良が有効であるが、例えば LIF の場合、対象は容易に誘導体化可能な試料に限定されるだけでなく、装置としての簡便性も失われがちである。一方、特殊なハードウェアに依存せず、従来広く使用されている UV 検出器を備えた CE 装置で高感度化を達成するためには、分離能を損なわずに可能な限り大量の試料を分離キャピラリーに導入する必要がある。このためには何らかのオンライン前濃縮法の併用が不可欠である。最近我々は過渡的等速電気泳動法と電氣的試料導入法を組み合わせた新規な試料導入法を開発し、CE ではサブ ppb レベルの、MCE ではサブ ppm レベルの高感度分析が高精度で可能であることを示した。本報告では過渡的等速電気泳動前濃縮を中心として、基盤研究 (C) の補助により行われた CE・MCE の高感度化に関する成果について報告する。

2. 背景 — CE・MCE の検出限界 —

Table 1 に Haddad らによる CE と IC の比較を示した¹⁾。検出限界は同じ UV 検出器を使用した場合である。CE がイオンクロマトグラフィー (IC) に比べ濃度感度が低い理由は、主として IC では $50\sim 100\ \mu\text{l}$ の試料注入が可能であるのに対して、CE では $100\ \text{nL}$ 程度の試料しか注入できないためである。これは CE で使用されるキャピラリーの内径 ($< 100\ \mu\text{m}$) が細いという制約のため当然の帰結である。一方、IC では充填剤の存在のため分離場は本質的に拡散系であるのに対して、CE の分離場は自由溶液系である。従って試料拡散の点では CE が格段に有利であり、もし希薄な試料を効率よく濃縮することができれば CE が IC の検出濃度下限に並ぶ事も不可能ではないと考えられる。なお Table 1 で CE の分析精度がやや劣るのは、IC では高精度のポンプを使用して送液が行われるのに対して、CE では電気浸透流や電気泳動速度の変動を完全に除去することが原理的に不可能であるためである。この点についてはエレクトロフェログラムの時間軸を移動度軸に変換することで解決できることを明らかにしているが、本稿では割愛する²⁾。(科学技術振興事業団の補助により、国内特許はもとより、アメリカ特許および EU 特許を申請中である。研究年度

Table 1
Comparison of Precision and Detection limit in CE and IC

	CE	IC
Precision	3-5% RSD	1% RSD
Detection limit	200ppb	10ppb
Sample injection*	30s	50 μl

* Direct sample injection. Injection method was not specified for CE.

内に該当する特許申請については本報告書の付録に示した。)

CEにおけるUV/VIS 検出の濃度感度がどのようにして決まるか、具体例を上げて示す。キャピラリー内径 (I) を $75\ \mu\text{m}$ 、試料あるいはUV可視化剤のモル吸光係数 (ϵ) を $3000\ \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $S/N=3$ の吸光度 (A) を 0.0001 とすれば、検出可能な濃度 C は次式で与えられる。

$$C = A / \epsilon I = 0.0001 / 3000 / 0.0075 = 4.4\ \mu\text{M} \quad (1)$$

試料ゾーン長を $5\ \text{mm}$ と仮定すれば、検出可能な絶対量は $0.1\ \text{pmol}$ となる。この条件では1式以下の濃度で試料が検出器に達した場合、有意なシグナルとして検出できない。以上のことからCE・MCEの濃度感度を上げるには大量の希薄試料の導入とオンライン前濃縮が必要不可欠である。

3. オンライン前濃縮

CEの濃度感度を向上させるためには種々の前濃縮法が考案されている³⁾⁻⁵⁾。CZEでは①スタッキング (Field enhanced sample stacking)、②過渡的等速電気泳動 (transient isotachopheresis)³⁾⁻⁹⁾、③電気的注入 (Electrokinetic injection with stacking)^{10), 11)}、④Electrokinetic supercharging (②と③の組み合わせ)¹²⁾などのオンライン前濃縮が報告されている。MEKCのスイーピング³⁾については疎水性の高い試料が対象であるので本稿で

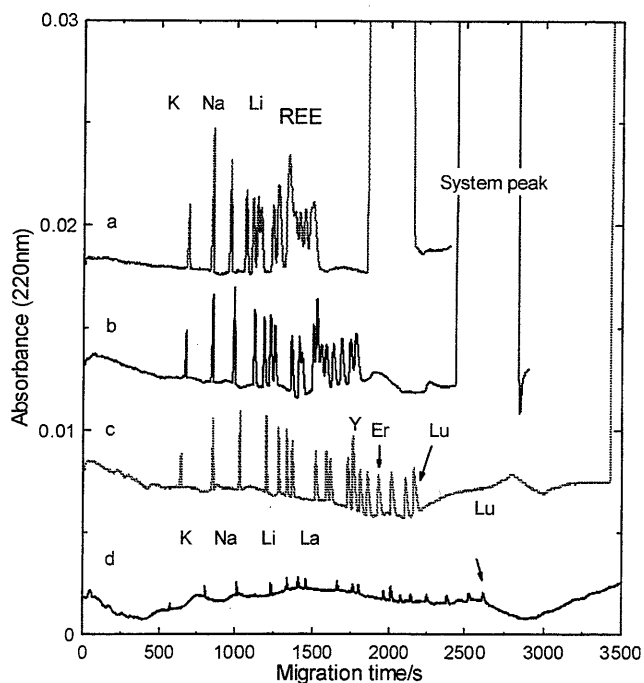
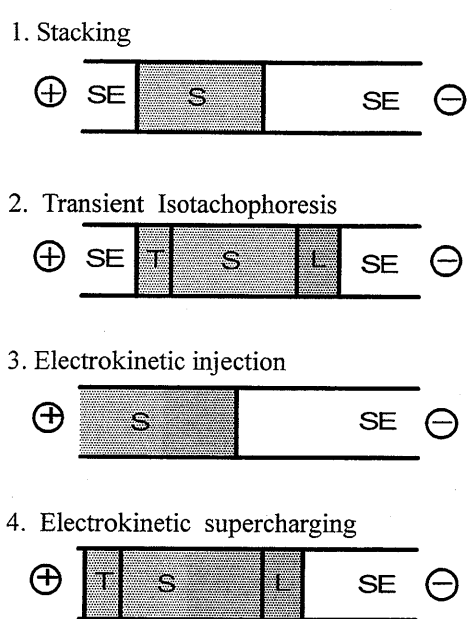


Fig. 1 (左) CZE 用オンライン前濃縮法: SE, 支持電解液; S, Sample cations; L, リーディング電解液; T, ターミナル電解液.

Fig. 2 (右) スタッキング効果による希土類イオンの CZE: 試料 18 種カチオンの塩化物 (K, Na, Li, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Y, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, and Lu; $2\ \text{mg/L}$); SE, $30\ \text{mM}$ creatinine, $4.0\ \text{mM}$ HIBA, $0.4\ \text{mM}$ malonic acid (pH 4.8, 2-ethyl-n-butyric acid); キャピラリー, fused-silica, $100\ \text{cm}$ ($87.7\ \text{cm}$) \times $75\ \mu\text{m}$ I.D.; 試料注入, 落差法 (試料絶対量推定値 $2.3\ \text{pmol}$); 印加電圧, $20\ \text{kV}$; 間接 UV 吸収; 温度, $25^\circ\ \text{C}$.; 推定試料体積とキャピラリー中% (a) $278\ \text{nL}$, 7% (b) $193\ \text{nL}$, 5% (c) $107\ \text{nL}$, 3% (d) $21\ \text{nL}$ 0.6%.

は割愛したが、1万倍程度の効果的な濃縮が可能な優れた方法である。

Fig. 1は①-④の各濃縮法の概念図を示したものである。スタッキングはもっとも良く利用されており、試料プラグが比較的短い条件では濃縮がおこりシャープなピークを得ることができる。しかし、希薄試料を大量注入すると（試料プラグが長すぎると）試料プラグ部で発生した高い電位勾配のため、系全体の電気浸透流が増加し、その結果分離ウインドウが狭くなり分離不十分となるほか、試料プラグ部と泳動バッファー部での電気浸透流のミスマッチが深刻な分離パターンの劣化を引き起こす¹³⁾。

このような分離劣化の例を希土類イオンについてFig. 2に示した。結局 μ M程度の希薄な試料の場合、注入体積はキャピラリー長の数%程度に限られる。200ppbの試料（Erについて 1.2μ M）を用いて検出濃度下限を推定したところ、120ppb（Erについて720nM）であった。なおCE装置としてはCAPI-3100（大塚電子）を、分離用電解液系としては2-ヒドロキシイソ酪酸（HIBA）・マロン酸を錯形成剤とする希土類分離用電解液を使用した。ゾーンの検出にはクレアチニンのUV間接吸収を利用した。

なお支持電解液のイオン強度と試料のイオン強度が全く同じ場合、試料は注入プラグの濃度プロファイルを保ったまま泳動開始し次第に拡散する。従ってCZEで鋭いピークを得るために適度のスタッキングは不可欠である。

過渡的等速電気泳動前濃縮（tITP）では試料（S）をリーディング電解液（L）とターミナル電解液（T）で挿む事により、等速電気泳動¹⁴⁾の濃縮効果およびゾーン自己保持効果を利用して単純なスタッキングの欠点を抑制することができる⁹⁾。Fig. 1の模式図は最も基本的な充填方法（Mode I¹³⁾）を示している。

この前濃縮法は電解液設定の自由度が高い点からも優れているが、等速電気泳動法特有の電解液条件設定の難しさおよび操作の煩雑性などから応用例は限られている。我々はこの点を改善するため、シミュレーションによる原理的な考察から過渡的等速電気泳動の方法論を確立した¹⁵⁾。

過渡的等速電気泳動法にはFig. 3に示したように種々の電解液充填法が考えられる^{13), 16)}。これらのモードは試料イオンと支持電解液中 co-ion（支持電解液中、試料イオンと同符号の主成分イオン）の移動度の大小関係および試料溶液のイオン強度に応じて選択する。Mode IIは co-ion の移動度が試料より小さい場合 co-ion がターミナルイオンとして作用するため、ターミナル電解液を改めて注入する必要がないモード、Mode IIIは逆に co-ion の移動度が試料より大きく、リーディングイオンとして作用するため、ターミナル電解液を注入する必要がない場合である。また試料が希薄でイオン強度が低く、かつ co-ion の移動度が試料より小さい場合には

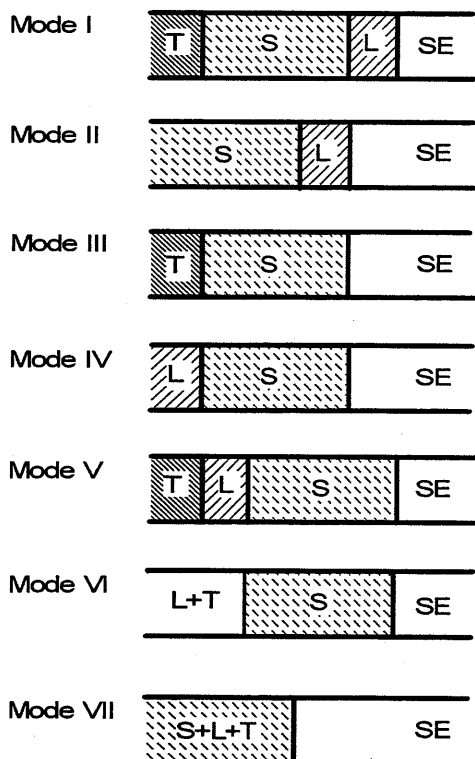


Fig. 3 過渡的等速電気泳動-CZE (tITP) のモード (記号は Fig. 1 と同じ)

リーディング電解液を試料の後端に充填しても効果がある (Mode IV)。これは試料ゾーンに入ったリーディングイオンが試料ゾーン先端でスタッキングし、リーディング電解液の役割を果たすためである。更に試料の後部に L, T を順次あるいは混合充填することも可能である (Mode V, VI)。また試料中にリーディング電解液あるいはターミナル電解液に相当する試薬を添加する方法 (Mode VII) は試料プラグの電位勾配を低下させ EOF による攪乱を抑える点から有効な濃縮法であるが、場合によっては試料を不純物で汚染する可能性があるため注意が必要である。

なお、リーディング電解液を試料の後方に充填する方法は等速電気泳動で重要になるカウンターイオンを選ばないため広い pH 領域で汎用性があるだけでなく、実験操作も容易であるという特徴がある。ただしこのモードは試料溶液のイオン強度が高い場合、スタッキングが期待できないため濃縮効果がない点に注意する必要がある (Mode IV, V, VI も同様)。

Fig. 4 に Mode I の例をスタッキングの場合と共に示した。図より明らかなように、過渡的等速電気泳動法は試料プラグ部の浸透流 mismatch の抑制に有効であった。Mode I により試料注入体積をキャピラリー長の 5% 程度にまで増大させることができた。Mode VII (組成に基づく過渡的等速電気泳動) では約 20% までの試料注入が可能になり希土類イオン (Er) について S/N=3 に対応する試料濃度として $0.1 \mu\text{M}$ (17ppb) を達成した。吸光度から

算出すると試料は 54 倍濃縮されていた。なお、このように低濃度の試料を間接吸収法を使用して分析する場合、バックグラウンドの変動が無視できない。このため我々は多項式近似やフーリエ変換を適用して低周波成分 (長周期変動) を除去している。以下示すエレクトロフェログラムの一部ではこのような処理をおこなっている。

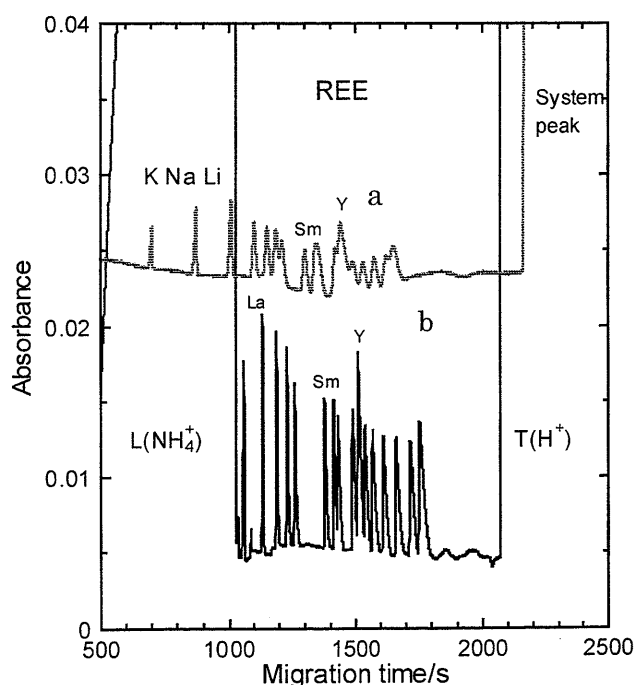
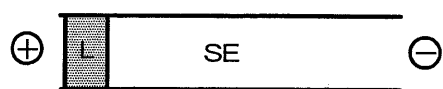


Fig. 4 18 種カチオンのエレクトロフェログラム (a) スタッキング, (b) tITP Mode I、試料は Fig. 2 と同じ; L, 100mM aq NH_3 , 7.5mM HIBA, 2.0mM malonic acid (pH 4.8, 2-ethyl-n-butyrac acid); T, 1M HCl; 落差法 (推定注入体積 193nL, 5%); tITP (Mode I) の操作 (i) L (25mm, 800s), (ii) sample (25mm, 900s), (iii) T (25mm, 80s); 他の条件は Fig. 2 と同じ。

4. Electrokinetic Supercharging - CZE (EKS- CZE)の原理

過渡的等速電気泳動法における試料充填量はキャピラリーのジオメトリーに制約され、キャピラリー全長の 20%程度以上に試料充填量を増加させる事は期待できない。ある物質量の試料に対して等速電気泳動状態を実現するためには一定量の電気量が必要であるほか¹⁵⁾、その後の CZE における分離の場も確保する必要があるためである。より濃度感度を向上させるためには、試料を濃縮しながらキャピラリーに導入する方法が必要である。そこで我々は electrokinetic supercharging と名付けた方法を開発した (Fig. 1 の④¹²⁾)。これは従来行われてきた電氣的注入法 (EKI) と過渡的等速電気泳動法を組み合わせた方法で、現在 CZE では最高レベルの濃度感度を達成している。この方法は後述するように、試料体積の少ないマイクロチップ電気泳動にも有用である。

1. Fill leading electrolyte after SE



2. Electrokinetic injection of a sample (supercharging)



3. Fill terminating electrolyte, start tITP-CZE

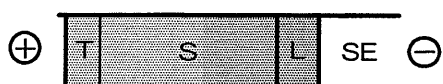


Fig.5 EKS の操作手順

本法の試料導入手順を Fig.5 に示した。支持電解液注入後あらかじめリーディング電解液を充填しておき、その後試料を電氣的に注入する。この際、試料は過渡的等速電気泳動により濃縮されながら導入されるので、多量の試料をシャープなゾーンとして導入できる。その後ターミナル電解液を導入して通電することにより試料は一段と濃縮され、等速電気泳動状態の終了と共に次第に CZE 状態に移行する。リーディング電解液の充填量は過渡的等速電気泳動の継続時間を決定するので、ターミナル電解液と共に試料に応じて最適化する必要があるが、100 μ L の試料を使用してサブ ppb レベルの検出濃度下限を達成している。

リーディング電解液充填の重要性を示すため、Fig.6 および Fig.7 に EKI-CZE および EKS-CZE の初期状態のシミュレーションを示した¹²⁾。使用したソフトウェアは Gas らによる SIMUL ver4.0 であり¹⁷⁾、フリーウェアとして配布されている¹⁸⁾。試料は移動度 50, 30, 10 $\times 10^{-5}$ cm²V⁻¹s⁻¹ のモデルイオンである。Fig.6 より明らかなように、EKI のみの場合、移動度が大きい成分は全く濃縮されず、電気泳動拡散を起こしているのに対して、Fig.7 ではリーディング電解液 (30mMKOH+60mM 酢酸) の効果により、全てのイオンについて前濃縮が起こっている事が明らかである。

Jandik ら¹⁰⁾がアニオンの CZE に適用して高感度を得た電氣的注入は、試料組成に基づく過渡的等速電気泳動と説明されているが、シミュレーションの結果を考慮すると、導入された試料が先端でスタッキングを起こしながら浸透流により試料が連続的に導入されると考えられる。通常電氣的注入では co-ion の移動度に依存して濃縮効果は変化するが、本法では全ての試料イオンより移動度の大きいイオンをリーディングイオンとしてあらかじめ充填しているため、広範な移動度の試料について高度の濃縮効果が期待できる。Fig.8 は 2ppb の試料について、EKS-CZE と EKI-CZE の濃縮効果を比較したエレクトロフェログラム

ムである。20ppb 試料の EKI-CZE では co-ion より移動度の大きい軽希土類についてはブロードなピークが観測されたが、2ppb の EKI-CZE では軽希土類イオンのピークは消滅してしまう。これに対して、EKS-CZE では全イオンを検出可能であった。

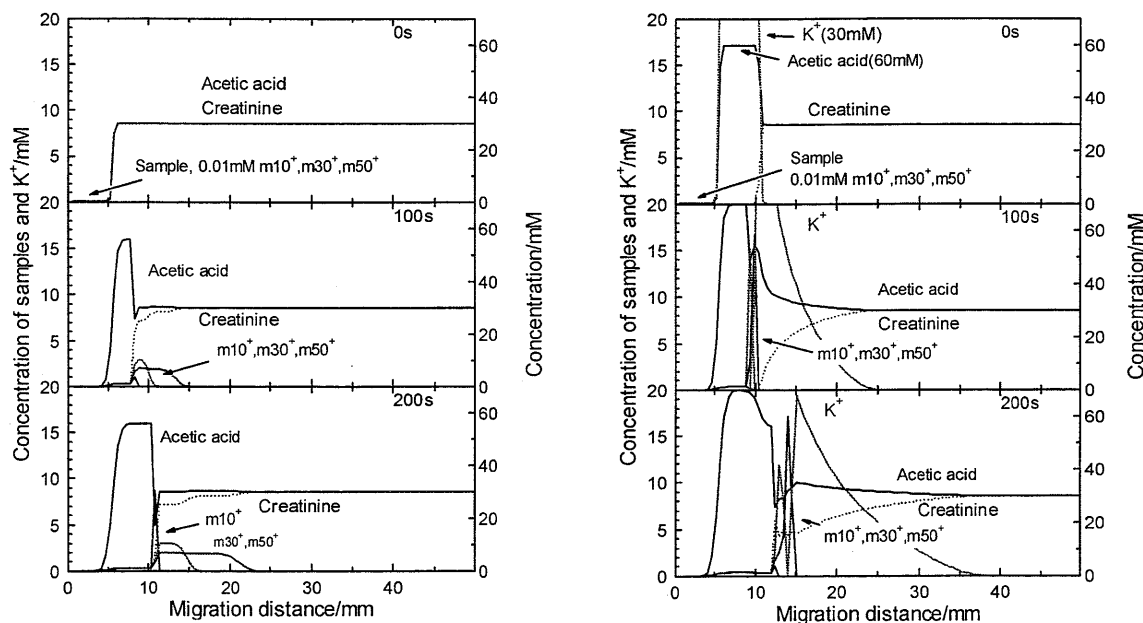


Fig. 6(左) EKI-CZE 初期過程のシミュレーション: モデル試料 3 種カチオン (0.01mM, 移動度 (m) 50, 30, 10 $\times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$); SE, 30mM creatinine (m : $37.2 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, pKa: 4.829, 25° C), 30mM acetic acid (mobility: $42.4 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, pKa: 4.756); 泳動電流, 200A/m²; SIMUL (Version4) ^{17), 18)}.

Fig. 7 (右) EKS-CZE 過程のシミュレーション: 試料、SE は Fig. 6; L, 30mM KOH (K, $76.2 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), 60mM acetic acid (pH 4.8).

こうして 100 μL の 0.5ppb 希土類イオン (Er 換算 3nM) を EKS-CZE で分析したところフェログラム (Fig. 9) の S/N は 5 で、検出濃度下限は 0.3 ppb (1.8nM)、吸光度から計算した Er の最大濃度は 9.2 μM と推定され、約 3000 倍の濃縮が達成できた。各種前濃縮法の検出濃度下限について Table 2 にまとめた。

Table 2 Summary of the LOD for preconcentration methods in CZE

Preconcentration method	Lower limit of detectable concentration
Stacking	120ppb (720 μM for Er)
Transient ITP	40ppb (240nM for Er)
EKI	2.6ppb (16nM for Er)
Electrokinetic supercharging	0.3ppb (3nM for Er)

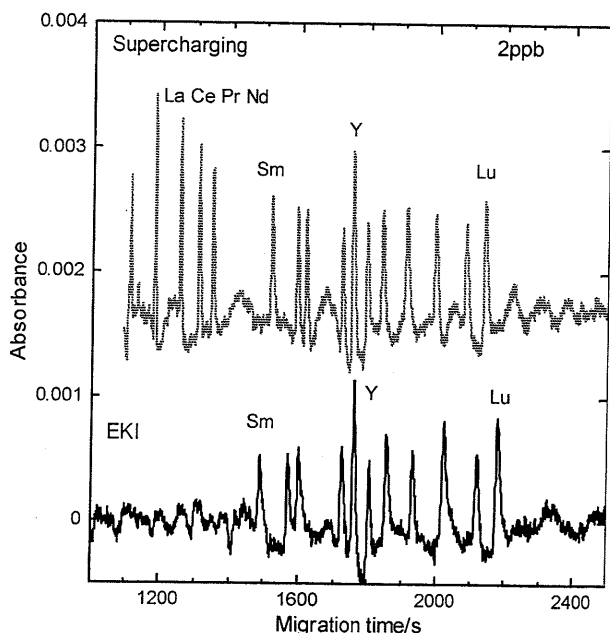


Fig. 8 EKS-CZE および EKI-CZE による希土類イオンのフェログラム: 試料成分は Fig. 2 と同 (各 $2 \mu\text{g/L}$); EKS-CZE の手順, (i) L 注入(負圧, 0.5 kg/cm^2 for 5.3s), (ii) 試料の電氣的注入 (EKI, 20kV, 150s), (iii) T 注入(負圧, 1.5s), (iv) 分離, 20kV; EKI-CZE: (i) EKI (20kV, 150s), (ii) 分離 (20kV); 他の条件は Fig. 4 と同じ.

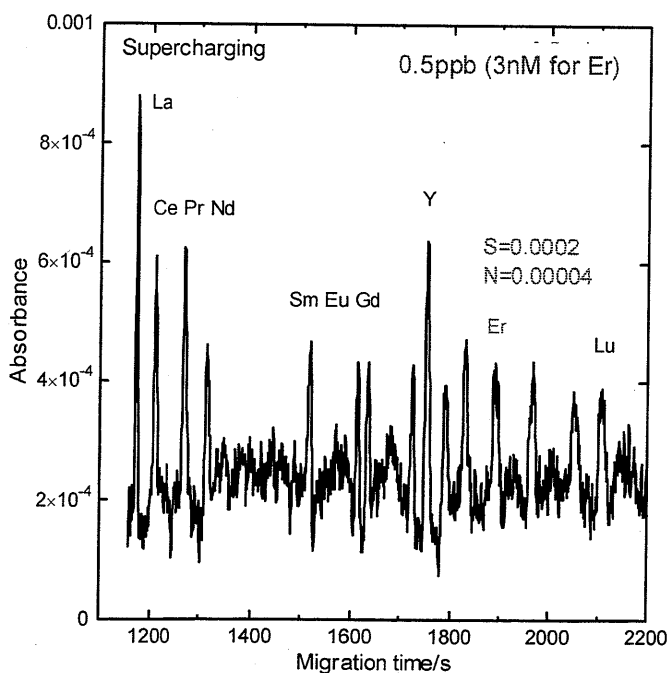


Fig. 9 EKS-CZE による希土類イオンのフェログラム: 試料成分は Fig. 2 と同 (各 $0.5 \mu\text{g/L}$); EKS-CZE: (i) L (負圧, 0.5 kg/cm^2 for 5.3s), (ii) EKI (20kV, 250s), (iii) T 注入(負圧, 1.5s), (iv) 分離, 20kV.

なお本法では Fig. 4 に見られるようにリーディングイオンおよびターミナルイオンに起因する巨大なピークが観測され、その間に有意なエレクトロフェログラムが出現する。吸光度の違いを検出すれば、有意な部分だけを検出する事が可能である。このアイデアは「オンライン前濃縮付きキャピラリー電気泳動装置」として、科学技術振興事業団の有用特許出願制度に採用された (付録参照)。

EKIにおける試料導入量に影響する因子はChienら¹⁹⁾によれば次式で与えられる。

$$N_i(t_{inj}) = \pi r^2 C_i (\mu_{eof} + \gamma \mu_{ep}) E_0 t_{inj} \quad (2)$$

ここに、 C_i はリザーバー中の試料濃度、 μ_{eof} は電気浸透流移動度、 μ_{ep} は試料の電気泳動移動度、 γ は電位勾配比 (プラグ部の電位勾配 E_p/E_0)、 E_0 は支持電解液の電位勾配、 t_{inj} は試料導入時間である。2式は定電流条件が満たされれば成立するが、有限体積の試料を使用する実際の実験系では C_i は時間と共に減少し、定電流条件を満たすことは困難である。また2式は電気浸透流の存在が有効であるとしているが、我々はシミュレーションおよび実験により、定電圧で実験を行う限り、電気浸透流の存在はむしろ試料導入量を減少させる事を示した¹²⁾。

例えば希土類イオンの場合のピーク面積の試料濃度依存性は、低濃度では良好な直線性を示すが、濃度が増加すると共に直線性は失われる。これは EKI 中における C_i や γ (2式) の変化が試料濃度が高いほど顕著であることを示している。

5. EKS- CZE の適用例

EKS-CZE を希土類鉱石の微量成分の分析に対して適用した²⁰⁾。試料はモナザイト由来で、軽希土類が主成分である。軽希土類 (Ce) と重希土類 (Tm) の存在率はそれぞれ 47.8%、0.002% (希土類/全希土類) で、最大 4 桁異なる。微量成分のピークを標準添加により Ho, Er, Tm 及び Yb と同定することができた。これらは EKI-CZE では検出できなかった微量成分である。Lu を検出することはできなかったが、これは Lu のピークがターミナルに取り込まれたためと考えている。これら微量成分の分析に使用した試料量はわずか $9 \mu\text{g}$ であった。ITP-PIXE 法 (等速電気泳動分離したフラクションを粒子励起 X 線法で分析する方法) では $1.8 \text{ mg} \sim 8.8 \text{ mg}$ の試料が必要であったことに比べると²¹⁾ 本法の濃度感度が格段に高いことが明らかである。以上のように EKS-CZE は Matrix 中微量成分の分析法としても有用である。

6. 高濃度の塩類を含む試料の過渡的等速電気泳動-CZE による海水試料の分析

高濃度の塩類を含む試料 (海水・体液など) 中の微量成分の分析には EKS を適用することはできない。試料注入時の電流が大部分試料中の matrix 成分により運ばれるためである。このような場合、試料の主成分をリーディングイオンとする過渡的等速電気泳動-CZE の方が適している。

Fig. 10 は I⁻ など海水中微量成分の分析に過渡的等速電気泳動法電気泳動前濃縮を用いた

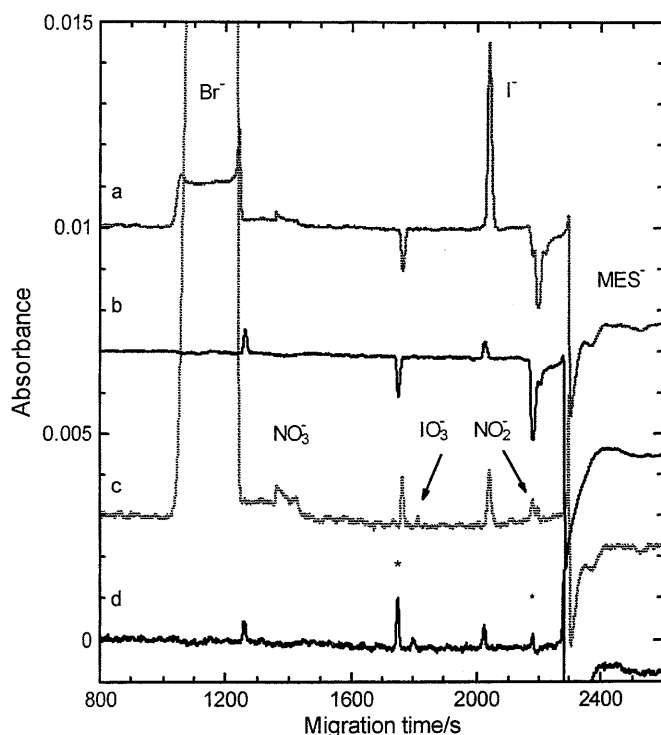


Fig. 10 過渡的等速電気泳動法による海水中微量元素の分析: (a, c) 海水、(b, d) ブランク (SE); CE 条件: SE, 0.5M NaCl, 25mM CTAC (pH 2.4, HCl); sample ($0.5 \text{ kg}/\text{cm}^2$, 10 s); TE (MES, 8 s); 検出波長, (a, b) 226 nm; (c, d) 210 nm; キャピラリー, $100 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$; 印加電圧, -8 kV ; * は電解液不純物.

例である²²⁾。海水を希釈せずに試料とするため、支持電解液には 0.5M NaCl を使用した。これより薄いと destacking が起こり、濃いと電流が流れすぎ支障がある。更に I⁻ は本来移動度が大きく ($79.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 25°C、無限希釈)、このままでは matrix 成分である Cl⁻ (移動度 $79.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) をリーディングイオンとする事はできない。そのため、25mM CTAC を添加し移動度を遅らせた。また本電解液システムは非緩衝系であるため (カウンターイオン Na⁺ には緩衝能がない)、等速電気泳動ゾーンの pH は中性に近づく。そのため、中性近傍で移動度が小さいターミナルイオン (T) が必要となる。このため T として N-morpholinoethane-sulfonic acid (MES、pKa=6.095) を使用した。更に、試料・ターミナル液の注入量を最適化した結果、検出濃度下限として $0.6 \mu\text{g}/\text{l}$ を達成した。最近同様な方法により海水中の

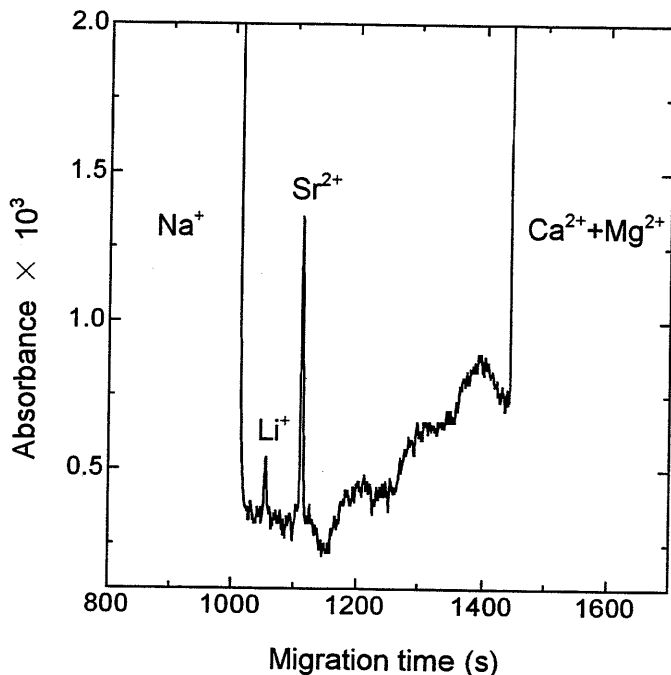


Fig. 11 最適 tITP 条件における海水中 Li^+ , Sr^{2+} の分析: SE, 10 mM 4-methylbenzylamine, 1.5 mM citric acid, (pH 4.8, 2-ethyl-n-butyric acid); キャピラリー, 100 cm x 75 μm ; 印加電圧, 20 kV; 検出, 214 nm; 試料導入, 落差法(25mm) 10 s.

ヨウ化物イオン、ヨウ素酸イオン(IO_3^-)の speciation にも成功した。²⁸⁾

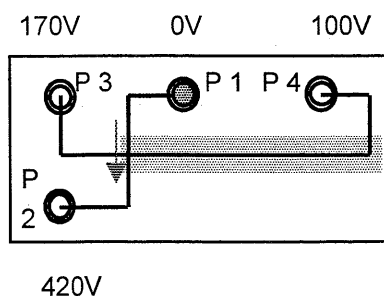
海水中のカチオンの分析にも過渡的等速電気泳動が利用できる。Fig. 11 は 1.5mM クエン酸を錯形成剤として Li^+ , Sr^+ の分析をおこなったものである²³⁾。これまで CE 法による海水中 Li^+ , Sr^+ の分析例はなく、また他法の場合でも希釈した海水が試料とされることが多いが、本法では希釈せずに分析に成功した。これは海水中の Na^+ がリーディングイオンの役割を果たし、クエン酸との錯形成で移動度が遅れた Ca や Mg イオンが、ターミナルイオンの役割を果たした結果と理解でき、過渡的等速電気泳動の Mode VII¹⁶⁾ (組成に基づく過渡的等速電気泳動、試料中に等速電気泳動過程が成立する成分を混入させる) の一例とみなすことができる。通常なら destacking してしまうような系であっても前濃縮が可能な例として重

要であると考えられる。

7. マイクロチップ電気泳動(MCE)への応用

1992年 Manz と Harison^{24), 25)} により MCE が発表されて以来、生化学関連試料の迅速分析に使用されるようになった。近年では我が国でも市販装置(島津製作所、MCE2010)が入手可能になっている。MCE2010 用マイクロチップの分離チャンネル有効長は 25mm (幅 110 μm 深さ 50 μm)、試料・電解液リザーバー(ポート)は約 3 μL と大変小型である。従って分離に使用できる試料体積は CE に較べ格段に小さく分離場も短いので、少量の試料を導入・分離し、高感度で分析する必要がある。プラグ長が長くなると分離能が低下するため、MCE では通常 Fig. 12 に示したようなクロスタイプのチップが使用される。P1 に試料を入れ、P2 に電圧を印可してクロス部分まで電気泳動させ、クロス部分(110 μm x 110 μm x 50 μm) に存在する試料を P3-P4 間に電圧を印可して電気泳動させる。分離の原理はゲル電気泳動(MCGE)、電解液系は TBE 系で、445mM Tris-Borate (pH=8.3)、12.5mM EDTA、0.1% NaN_3 に hydroxyethylcellulose (HEC) 2% が sieving 剤としてが添加してある。Fig. 13 はこのようにして分離した 50 bp DNA ステップラダー標品のエレクトロフェログラムで、検出には有効長 25mm の linear imaging detector が使用されている (Fig. 12 のハッチング部)。標品調製時の濃度を 1/10 とするとかなり S/N が低下し、1/100 まで希釈するとほぼ検出限界となる。

1. Sample injection (40s)



2. Separation (100s)

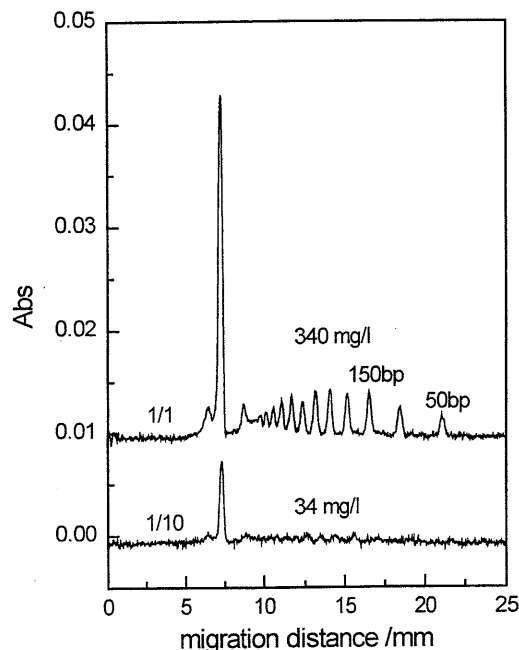
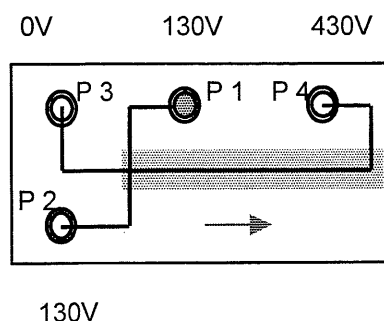
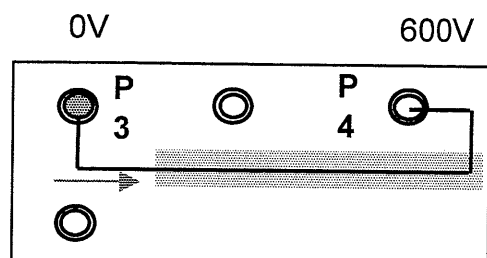


Fig. 12 (左) 通常法によるマイクロチップ電気泳動の手順 (1) “pinched injection” 電圧を印加し試料を P1 から P2 に移動; (2) 分離過程、電圧を P3 と P4 に印加しクロス部の試料を分離チャンネルに導き分離・検出。電圧時間は DNA 断片についての最適化条件。

Fig. 13 (右) Fig. 12 の手順で得られたフェログラム: DNA 断片の総濃度は 340mg/l. SE: 445 mM Tris-Borate (pH=8.3), HEC 2%, 12.5 mM EDTA, 0.1% NaN_3 , 検出, 260 nm.

そこで検出濃度下限を向上させるため、EKS の原理を応用した。クロスチップでも以下の手順は可能であるが、簡単のため、シングルチャンネルチップ (Fig. 14) を使用した。EKS の手順は Fig. 5 に示したとおりで、P3 からより多量の試料をシャープなゾーンとして導入し、クロスチップを用いた標準法に較べて高感度化をはかった。EKS には従来の電解液系は使用できないため、TBE 系の代わりに支持電解液 (Fig. 14 の SE) にリーディング電解液としての効果を持たせるため、50mM HCl-Tris (pH=8.1) を使用し (HEC 2%)、ターミナル電解液としては 20mM Glycine-Tris (pH=8.1) を使用した。結果、Fig. 15 に示すように、標品原液を 1/100 まで希釈した試料も分析可能であり、濃度感度を 10 倍向上させることができ、検出濃度下限は $0.015 \mu\text{g/ml}$ (S/N=3) であった²⁶⁾。本法は SDS タンパク質についても応用可能であった²⁷⁾。得られたフェログラムは省略するが、EKS を応用した場合、検出濃度下限は通常法の 30-40 倍向上し $0.27 \mu\text{g/ml}$ (S/N=3) であった。なお最近 EKS-MCE における印加電場の最適化について詳しく検討し報告した。²⁹⁾

1. Sample injection (20s)



2. TE (Gly) injection (tr-I TP)

P3=0V. P4=600V. 15s

3. Replace P3 with SE (no HEC)

4. Separation

P3=0V. P4=430V. 120s

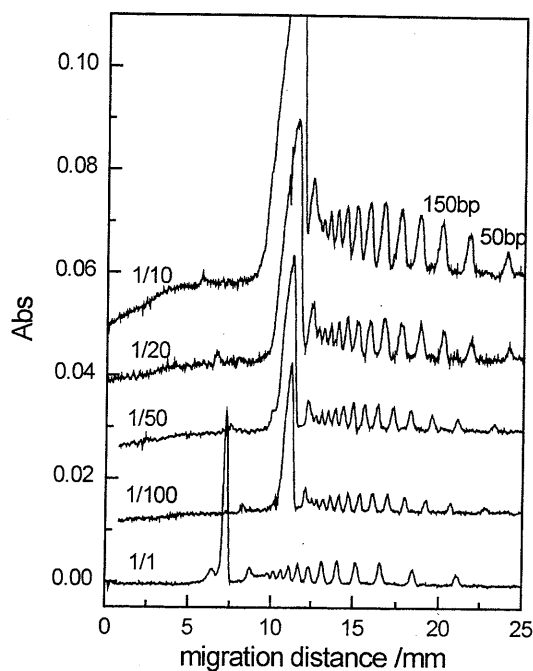


Fig. 14 (左) シングルチャンネルチップを用いる EKS-CGE の手順: SE (L), 50 mM HCl-Tris (pH=8.1), HEC 2%; T, 20 mM glycine-Tris (pH=8.1).

Fig. 15 (右) 通常の MCGE および EKS-CGE で得られたフェログラム (分析手順は Fig. 12 および 14) . 1/1 は未希釈試料の MCGE、他は表示の希釈率における EKS-MCGE.

8. 結語

以上、過渡的等速電気泳動前濃縮法を中心として CE・MCE の高感度化の手法および得られた成果について述べた。現時点で CZE の感度は IC や ICP-AES に比肩できるところまで到達したと考えている。EKS-CZE、EKS-MCE は UV 以外の他の高感度な検出法と組み合わせればより高感度な分析法となることが期待できる。ただし、対象試料に応じて電解液系を最適化する必要がある。例えば金属イオンの分析には適切な錯形成剤の選択が必要であり、微量のタンパク質の分析には SDS やデキストランを含む電解液系が必要である。また本稿で紹介した濃縮法のうち、スタッキング、EKI、EKS-CZE、EKS-MCE は希薄な溶液に有効な方法である。海水など高濃度の塩類を含む試料中の微量成分の分析には tITP-CZE (過渡的等速電気泳動前濃縮-CZE) が適当である。例えば海水に微量に含まれるヨウ化物イオンに対しては UV 検出器を用いて ppb レベルの分析が可能である。このように試料の性質に応じて適当な電解液系・前濃縮法を選択し最適化する必要があるものの、本報告で用いた過渡的等速電気泳動前濃縮法は広範な試料の CE・MCE 分析に適用可能であると考えている。

謝 辞

本研究の遂行に協力いただいた広島大学大学院工学研究科応用化学講座応用分析化学研究室のスタッフ、大学院生および卒業生諸氏に感謝の意を表します。株式会社島津製作所からは共同研究のためマイクロチップ電気泳動装置 MCE-2010 およびシングルチャンネルチップを提供していただきました。また島津製作所ライフサイエンス研究所の西根勤氏、荒井昭博氏には貴重なご助言をいただきました。深く感謝の意を表します。

文献

- 1) P. R. Haddad, P. Doble, M. Macka : *J. Chromatogr. A*, 856, 145 (1999).
- 2) T. Hirokawa, N. Ikuta, T. Yoshiyama, H. Okamoto : *Electrophoresis*, 22, 3444 (2000).
- 3) P. Quirino, S. Terabe : *J. Chromatogr. A*, 902, 119 (2000) and references cited therein.
- 4) A. R. Timerbaev, W. Buchberger : *J. Chromatogr. A*, 834, 117 (1999) and references cited therein.
- 5) J. L. Beckers, P. Boček : *Electrophoresis*, 21, 2747 (2000).
- 6) P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček : *J. Chromatogr.*, 608, 47 (1992).
- 7) F. Foret, E. Szoko, B. L. Karger : *J. Chromatogr.*, 608, 3 (1992).
- 8) P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček : *Electrophoresis*, 16, 2039 (1995).
- 9) L. Krivánková, P. Pantůčková, P. Boček : *J. Chromatogr. A*, 838, 55 (1999).
- 10) P. Jandik and W. R. Jones : *J. Chromatogr.*, 546, 431 (1991).
- 11) Z. Krivacky, A. Gelencer, J. Hlavay, G. Kiss, Z. Sarvari : *J. Chromatogr. A*, 834, 21 (1999) and references cited therein.
- 12) T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš : *Electrophoresis*, 24, 498 (2003).
- 13) T. Hirokawa, H. Okamoto, N. Ikuta : *Electrophoresis*, 22, 3483 (2001).
- 14) F. M. Everaerts, J. L. Beckers and Th. P. E. M. Verheggen : "Isotachopheresis. Theory, Instrumentation and Application", Elsevier (1976).
- 15) T. Hirokawa, H. Okamoto, N. Ikuta and B. Gas : *Anal. Sci.*, 17, i185 (2001).
- 16) H. Okamoto, N. Ikuta and T. Hirokawa : *Anal. Sci.*, 17, i925 (2001).
- 17) C. Schwer, B. Gas, F. Lottspeich, E. Kenndler : *Anal. Chem.*, 65, 2108 (1993).
- 18) B. Gas : <http://prfdec.natur.cuni.cz/~gas/>
- 19) R.-L. Chien, D. S. Burgi : *Anal. Chem.*, 64, 489 (1992).
- 20) H. Okamoto, T. Hirokawa : *J. Chromatogr. A*, 990, 335 (2003).
- 21) J. Hu, T. Hirokawa, F. Nishiyama, Y. Kiso : *J. Chromatogr. A*, 594, 117 (1992).
- 22) T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, A. R. Timerbaev : *Electrophoresis*, 24, 2328 (2003)
- 23) H. Okamoto, T. Hirokawa, A. R. Timerbaev : *The Analyst*, 128, 1439 (2003).
- 24) A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte : *J. Chromatogr.* 593, 253 (1992).
- 25) D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Luedi, H. M. Widmer : *Anal. Chem.*, 64, 1926 (1992).
- 26) Z. Q. Xu, T. Hirokawa, T. Nishine, A. Arai : *J. Chromatogr. A*, 990, 53 (2003).
- 27) Z. Q. Xu, T. Ando, T. Nishine, A. Arai, T. Hirokawa : *Electrophoresis*, 24, 3821 (2003).
- 28) Z. Huang, K. Ito, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa : *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 1836 (2004).
- 29) Z. Q. Xu, T. Hirokawa : *Electrophoresis*, 25 (2004) in press.