

総合論文

## オンライン試料前濃縮によるキャピラリー電気泳動法及びマイクロチップ電気泳動法の高感度化

廣川 健<sup>®1</sup>, 岡本 光<sup>1</sup>, 徐 中其<sup>1</sup>, 育田 夏樹<sup>1</sup>

### High-sensitive analysis by capillary electrophoresis and microchip electrophoresis using on-line preconcentration methods

Takeshi HIROKAWA<sup>1</sup>, Hikaru OKAMOTO<sup>1</sup>, Zhongqi XU<sup>1</sup> and Natsuki IKUTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University, 1-4-1, Kagamiyama, Higashi-hiroshima-shi, Hiroshima 739-8527

(Received 22 July 2003, Accepted 20 October 2003)

The concentration detection limit (DL) of capillary electrophoresis (CE) and microchip electrophoresis (MCE) is rather high due to geometrical restrictions of sample load. This drawback can be improved by applying high sensitivity detectors, such as a laser-induced fluorescence detector, and/or appropriate on-line preconcentration. Since the latter approach is useful even when using conventional instruments equipped with a UV detector, several on-line preconcentration methods have been devised. This paper emphasizes the effectiveness of transient isotachopheresis (tITP) and tITP with electrokinetic injection of sample (electrokinetic supercharging). Such advancing strategies for improving DL in CE and MCE were illustrated by applications to several metal cations and anions in seawater and biopolymers, such as DNA fragments and SDS-proteins. Under the optimized operational conditions, DLs of CE reached a sub-ppb level comparable with those of IC and ICP-AES for anions and metal cations, respectively. The DL of MCE was *ca.* 0.02 µg/ml for DNA fragments and *ca.* 0.3 µg/ml for SDS-proteins, which are 10~40 times better than of the conventional methods.

**Keywords :** Capillary electrophoresis; Microchip electrophoresis; On-line preconcentration; Transient isotachopheresis; Electrokinetic supercharging.

### 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いる。CE の場合、キャピラリーの内径 100 µm 以下長さ約 1 m, MCE ではチャンネル幅 100 µm 有効長が数十

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、最大の問題点となっている。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紫外線 (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。このためにはなんらかのオンライン前濃縮法の併用が不可欠である。CE におけるオンライン前濃縮法としてキャピラリーゾーン電気泳動

<sup>1</sup> 広島大学大学院工学研究科: 739-8527 広島県広島市鏡山 1-4-1

Table 1 Comparison of precision and detection limit in CE and IC

	CE	IC
Precision RSD	3~5% RSD	1%
Detection limit	200 ppb	10 ppb
Sample injection <sup>a)</sup>	30 s	50 $\mu$ l

a) Direct sample injection. Injection method was not specified for CE.

(CZE) では、① スタッキング (field-amplified sample stacking<sup>1)~2)</sup>, large-volume sample stacking<sup>3)~5)</sup>, ② 過渡的等速電気泳動 (coupled-capillary ITP preconcentration<sup>6)~9)</sup>, single-capillary ITP preconcentration<sup>7)10)~13)</sup>, ③ 電気的導入 (field-amplified sample injection<sup>5)14)~16)</sup> などが提案されている。ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) における前濃縮法であるスイーピングについては疎水性の高い試料が対象であるので本稿では割愛したが、1万倍程度の効果的な濃縮が可能なる方法である<sup>17)~19)</sup>。前濃縮法について幾つかの優れたレビューが報告されているので参照されたい<sup>20)~24)</sup>。最近著者らは過渡的等速電気泳動法と電気的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 レベルの分析が可能となることを示した<sup>25)</sup>。本稿では過渡的等速電気泳動前濃縮を中心として、CE・MCE の高感度化に関する最近の成果について報告する。

## 2 CE・MCE の検出限界

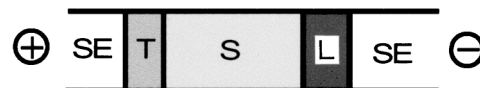
Table 1 に Haddad らによる CE とイオンクロマトグラフィー (IC) の比較を示した<sup>26)</sup>。検出限界は同じ UV 検出器を使用した場合である。CE が IC に比べ濃度感度が低い理由は、主として IC では 50~100  $\mu$ l の試料導入が可能であるのに対して、CE では 100 nl 程度の試料しか導入できないためである。これは CE で使用されるキャピラリーの内径 (<100  $\mu$ m) が細いという制約のため当然の帰結である。一方、IC では充填剤の存在のため分離場は本質的に拡散系であるのに対して、CE の分離場は自由溶液系である。したがって、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こと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、本稿では割愛した<sup>27)</sup>。

CE における紫外/可視吸光 (UV/VIS) 検出の濃度感度

### 1. Stacking



### 2. Transient isotachopheresis



### 3. Electrokinetic injection



### 4. Electrokinetic supercharging



Fig. 1 On-line preconcentration methods for CZE  
SE: Supporting electrolyte(back ground electrolyte);  
S: Sample cations; L: Leading electrolyte; T: Terminating electrolyte

がどのようにして決まるか、具体例を挙げて示す。キャピラリー内径 ( $l$ ) を 75  $\mu$ m, 試料あるいは UV 可視化剤のモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) を 3000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $S/N=3$  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。

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

試料ゾーン長を 5 mm と仮定すれば、検出可能な絶対量は 0.1 pmol となる。この条件では式 (1) 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

緒言で述べたように、CZE において各種のオンライン前濃縮法が報告されているが、それらの中から特徴的な 4 種 {① スタッキング, ② 過渡的等速電気泳動, ③ 電気的導入, ④ electrokinetic supercharging (② と ③ の組み合わせ)} について概略図を Fig. 1 に示した。

スタッキングは最もよく利用されており、試料プラグが比較的短い条件では濃縮が起こりシャープなピークを得ることができる。しかし、希薄試料を大量導入すると (試料

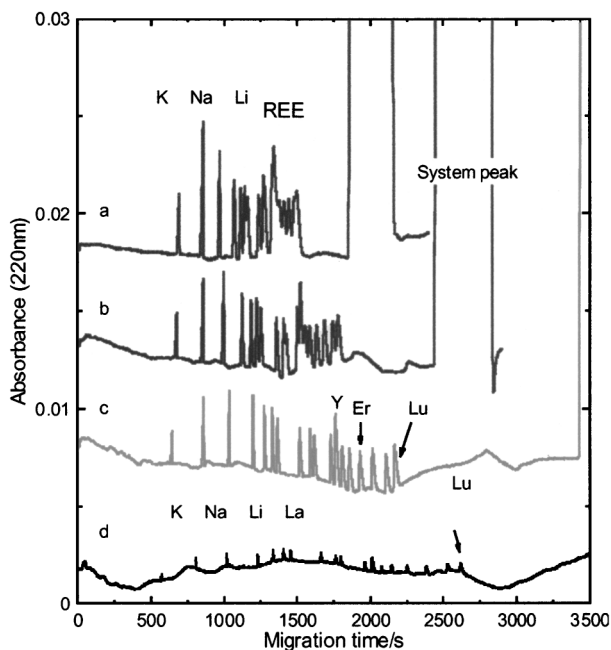


Fig. 2 CZE separation of lanthanide ions using stacking effect

The sample was a mixture of chloride of 18 cations (K, Na, Li, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Y, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, and Lu in order of appearance, 2 mg/l); SE: 30 mM creatinine, 4.0 mM HIBA, 0.4 mM malonic acid (pH 4.8, 2-ethylbutyric acid); Capillary: fused-silica, 100 cm (87.7 cm) × 75 μm I.D.; Injection: hydrostatic injection (estimated sample amount was 2.3 pmol each); Applied voltage: 20 kV; Detection: indirect UV at 220 nm; Temperature: 25°C; Sample volume: (a) 278 nl (b) 193 nl, (c) 107 nl, (d) 21 nl (estimated by hargen poiseuille equation); Injected sample plug length/capillary length: (a) 7%, (b) 5%, (c) 3%, (d) 0.6%

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<sup>28)</sup>.

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 μM 程度の希薄な試料の場合, 導入体積はキャピラリー長の数% 程度に限られる. 200 ppb の試料 (Er について 1.2 μM) を用いて検出濃度下限を推定したところ, 120 ppb (Er について 720 nM) であった. なお, CE 装置としては CAPI-3100 (大塚電子製) 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, 試料は導入プラグの濃度プロファイルを保ったまま泳動開始し, しだいに拡散する. したがって, CZE

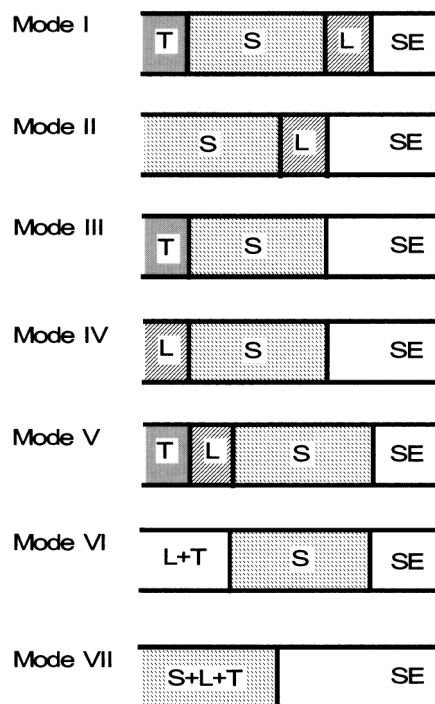


Fig. 3 Operational Modes of tITP-CZE Abbreviations as in Fig. 1

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) で挟むことにより, 等速電気泳動<sup>29)</sup>の濃縮効果及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<sup>13)</sup>. L は試料イオンより大きい移動度の co-ion (Cl<sup>-</sup> や K<sup>+</sup> など) を含む pH 緩衝液であり, 必要に応じて錯形成試薬が添加される. ITP による高い濃縮効果を得るためにリーディングイオンの濃度は比較的高く (数十 mM) 設定される. T は試料イオンより小さい移動度を持つ co-ion を含む電解液である. L, T 液の例, 及び ITP 状態における試料ゾーンの pH・実効移動度等については文献<sup>29)30)</sup>に詳しい.

Fig. 1 の模式図は最も基本的な充填方法 (Mode I<sup>28)</sup>) 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及び操作の煩雑性などから応用例は限られている. 著者ら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<sup>31)</sup>.

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<sup>28)32)</sup>. これらのモードは試料イオンと支持電解液中 co-ion の移動度の大小関係及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導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、リーディング電解液を導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電気浸透流によるかく(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 領域では有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ともに示した。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ミスマッチの抑制に有効であった。Mode I により試料導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 では約 20% までの試料導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  $0.1 \mu\text{M}$  (17 ppb) 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、Fig. 4 ではターミナル電解液として塩酸を用いている。本来他の陽イオンより移動度が大きいプロトンがターミナルイオンとして働く理由は、pH 調整のために L 液と泳動バッファーに添加されているカウンターイオン (2-ethylbutyric acid: 弱酸) との酸解離平衡により、移動度の小さいイオンとして挙動するためである。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。このため著者ら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。以下に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行っている。

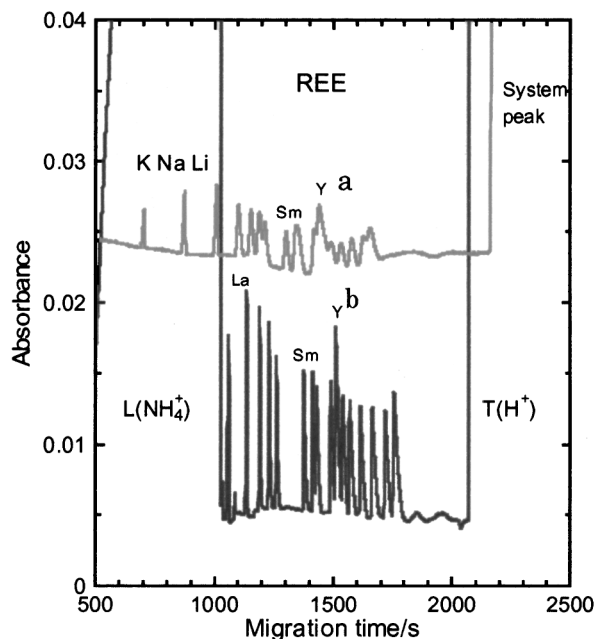


Fig. 4 Electropherograms of 18 cations obtained by stacking (a) and tTTP Mode I (b)

Sample as in Fig. 2; L: 100 mM aq  $\text{NH}_3$ , 7.5 mM HIBA, 2.0 mM malonic acid (pH 4.8, 2-ethylbutyric acid); T: 1 M HCl; Injected sample volume (hydrostatic injection): 193 nl each; Sample plug length/capillary length, 5%; tTTP (Mode I): (i) L (25 mm, 800 s), (ii) sample (25 mm, 900 s), (iii) T (25 mm, 80 s); Other conditions as in Fig. 2.

#### 4 electrokinetic supercharging-CZE (EKS-CZE) の原理

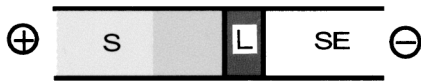
過渡的等速電気泳動法における試料充填量はキャピラリーのジオメトリーに制約され、キャピラリー全長の 20% 程度以上に試料充填量を増加させることは期待できない。ある物質の試料に対して等速電気泳動状態を実現するためには一定量の電気量が必要である (ほか<sup>31)</sup>)、その後の CZE における分離の場も確保する必要があるためである。より濃度感度を向上させるためには、試料を濃縮しながらキャピラリーに導入する方法が必要である。そこで著者らは electrokinetic supercharging と名付けた方法を開発した (Fig. 1 の ④<sup>25)</sup>)。これは従来行われてきた電氣的導入法 (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。

本法の試料導入手順を Fig. 5 に示した。支持電解液導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導入する。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

1. Fill leading electrolyte after SE



2. Electrokinetic injection of a sample



3. Fill terminating electrolyte, start tITP-CZE

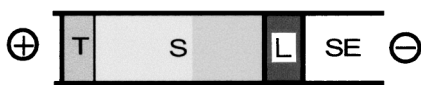


Fig. 5 Operational procedure of EKS  
Abbreviations as in Fig. 1.

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ともにしだいに 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ともに試料に応じて最適化する必要があるが、100  $\mu$ 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 に EKS-CZE の初期状態のシミュレーションを示した<sup>25)</sup>。使用したソフトウェアは Gas らによる SIMUL ver4.0 であり<sup>33)</sup>、フリーウェアとして配布されている<sup>34)</sup>。試料は移動度 50, 30,  $10 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  のモデルイオンである。図より明らかなように、リーディング電解液 (30 mM KOH + 60 mM 酢酸) の効果により、すべてのイオンについて前濃縮が起こっていることが明らかである。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確認できなかった。

Jandik ら<sup>15)</sup>がアニオンの CZE に適用して高感度を得た電氣的導入は、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ていると考えられる。通常の電氣的導入では co-ion の移動度に依存して濃縮効果は変化するが、本法ではすべ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. 7 は 100  $\mu$ l の 0.5 ppb 希土類イオン (Er 換算 3 nM) を EKS-CZE で分析した結果得られたフェログラムである。EKS-CZE により全イオン (La~Lu) を

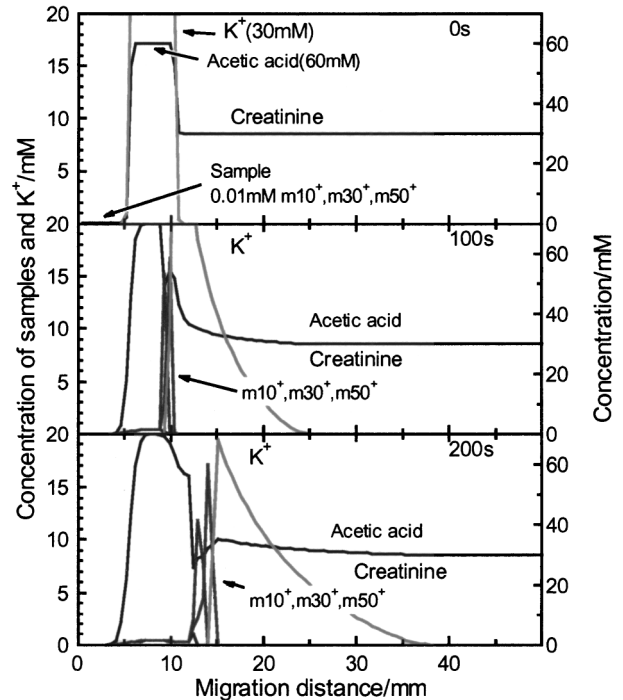


Fig. 6 Simulation of initial processes of EKS-CZE

Sample: a model mixture of three cations (0.01 mM, each) with different mobilities ( $50, 30$  and  $10 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ); SE: 30 mM creatinine (mobility:  $37.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $\text{p}K_a$ : 4.829,  $25^\circ\text{C}$ ), 30 mM acetic acid (mobility:  $42.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $\text{p}K_a$ : 4.756); Migration current:  $200 \text{ A/m}^2$ ; SIMUL (Version4) was used<sup>33)34)</sup>; L: 30 mM KOH (K,  $76.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), 60 mM acetic acid (pH 4.8)

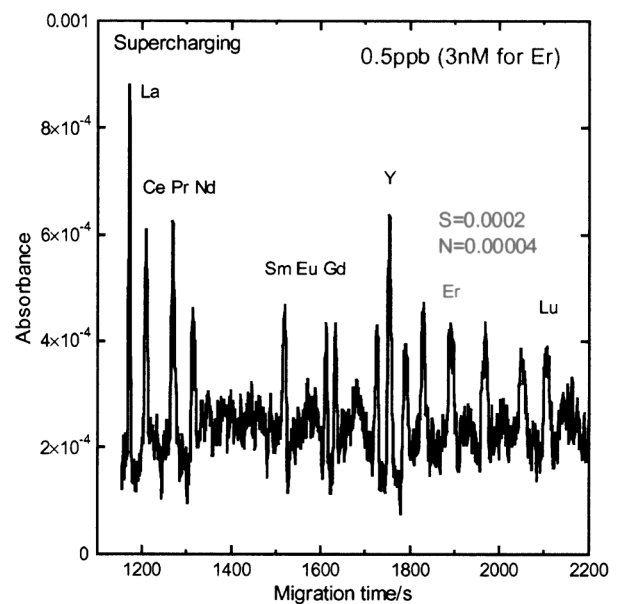


Fig. 7 Electropherogram obtained by EKS-CZE

Sample as in Fig. 2, 0.5  $\mu$ g/l; EKS-CZE procedure: (i) L injection (negative pressure, 0.5 atm for 5.3 s), (ii) EKI of the sample (20 kV, 250 s), (iii) T injection (0.5 atm for 1.5 s), (iv) separation (20 kV)

Table 2 Summary of the LOD of preconcentration methods in CZE

Preconcentration method	limit of detection
Stacking	120 ppb (720 $\mu$ M for Er)
Transient ITP	40 ppb (240 nM for Er)
EKI	2.6 ppb (16 nM for Er)
Electrokinetic supercharging	0.3 ppb (3 nM for Er)

検出できた。ErのS/Nは5で、検出濃度下限は0.3 ppb (1.8 nM)、吸光度から計算したErの最大濃度は9.2  $\mu$ Mと推定され、約3000倍の濃縮が達成できた。一方、EKI-CZEではco-ionより移動度の大きい軽希土類イオン(La, Ce, Pr, Nd)のピークは消滅してしまった。各種前濃縮法の検出濃度下限についてTable 2にまとめた。

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及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ことが可能である。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ている。

EKIにおける試料導入量に影響する因子はChienら<sup>35)</sup>によれば次式で与えられる。

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

ここに、 $C_i$ はリザーバー中の試料濃度、 $\mu_{cof}$ は電気浸透流移動度、 $\mu_{ep}$ は試料の電気泳動移動度、 $\gamma$ 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。式(2)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 $C_i$ は時間とともに減少し、定電流条件を満たすことは困難である。また、式(2)は電気浸透流の存在が有効であるとしているが、著者らはシミュレーション及び実験により、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ことを示した<sup>25)</sup>。

希土類イオンの場合について、ピーク面積の試料濃度依存性をEKI条件は一定(20 kV, 150秒)で調べた。低濃度では良好な直線性を示したが、濃度が増加するとともに直線性は失われた。これはEKI中における $C_i$ や $\gamma$ 式(2)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。なお、移動度が異なる3種の希土類イオンについてピーク面積と試料濃度の関係に大きな違いはなかった。すなわち、各イオンの移動度差による導入量の違いは見られなかった。これは希土類イオンがHIBAなどと錯形成する前には移動度が接近しているためである。式(2)はEKIによる試料導入量に移動度バイアスがあることを示してい

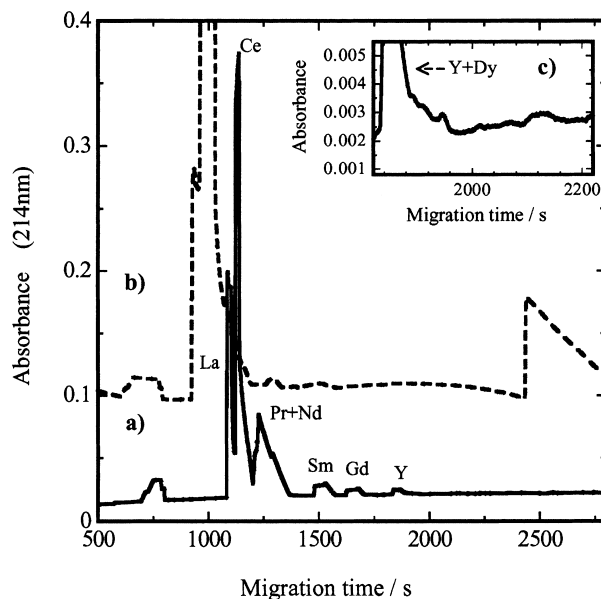


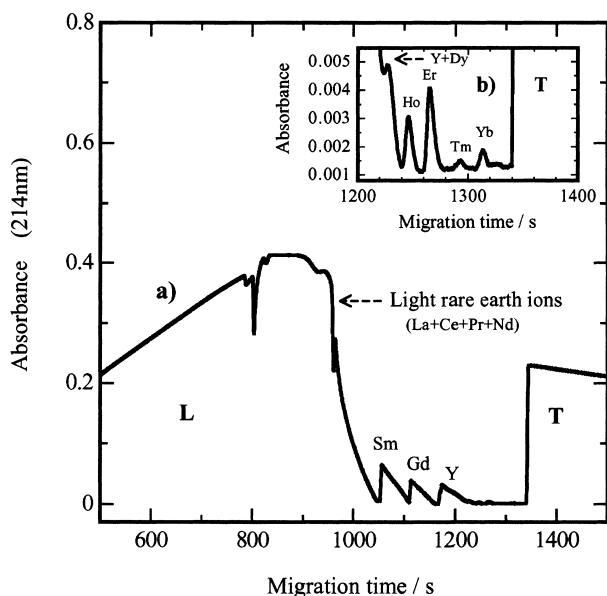
Fig. 8 Electropherogram obtained by EKI-CZE for monazite

Sample, 90 mg/l(100  $\mu$ l, 9  $\mu$ g); SE: 10 mM 4-methylbenzylamine, 4 mM HIBA, 0.4 mM malonic acid (pH 4.8, 2-ethylbutyric acid); capillary: 100 cm  $\times$  75  $\mu$ m I.D.; Applied voltage: 20 kV; Detection: indirect UV at 214 nm; Temperature: 25  $^{\circ}$ C; Injection: EKI(20 kV) (a) 100 s, (b) 250 s; (c) close-up of Fig. 8a

るが、このことは一般に正しく、希土類の場合はむしろ特殊である点に注意する必要がある。

## 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<sup>36)</sup>。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、4けた異なる。Fig. 8にEKI-CZEの結果を、Fig. 9にEKS-CZEの結果を示した。EKS-CZEを用いた場合、Fig. 9aから明らかのように、La-Ndの軽希土類イオンは過充填の結果巨大な未分離ピークを形成しているが、Sm, Gd及びYは分離している。一方EKI-CZEを用いた場合、これらのピークはブロードになっている(Fig. 8)。Fig. 9bにFig. 9aの拡大図を示した。図中のピークは標準添加によりHo, Er, Tm及びYbと同定された。これらはEKI-CZEでは検出できなかった微量成分である(Fig. 8c)。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  $\mu$ 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1.8~8.8 mgの試料が必要であったことに比べると<sup>37)</sup>、本法の濃度感度が格段に高いことが明らかであ



**Fig. 9** Electropherogram obtained by EKS-CZE for monazite

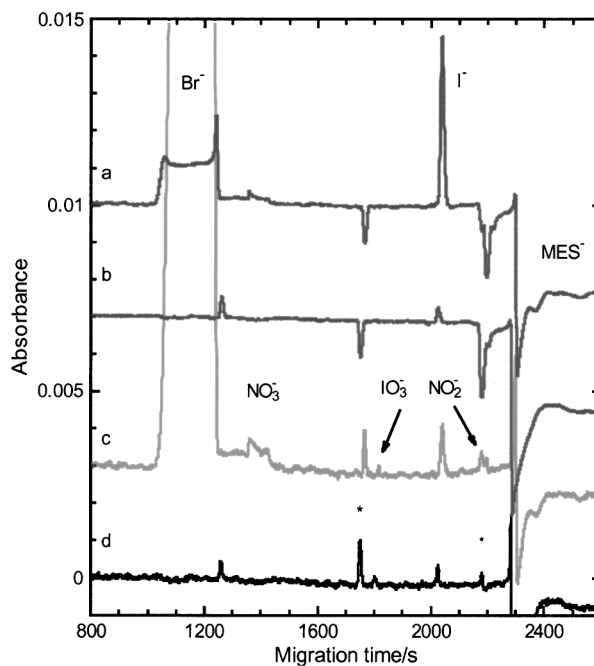
Sample as in Fig. 8; (a) EKS (i) L (0.5 atm, 5.3 s); (ii) EKI, (20 kV, 500 s), (iii) T (0.5 atm, 1 s); (b) close-up of Fig. 9a; L and T as in Fig. 4, other conditions as in Fig. 8

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。試料導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 のほうが適している。

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前濃縮を用いた例である<sup>38)</sup>。海水を希釈せずに試料とするため、支持電解液には 0.5 M 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 ( $79.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 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ことはできない。そのため、25 mM 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が必要となる。このため *N*-morpholinoethanesulfonic acid (MES,  $pK_a = 6.095$ ) を使用した。更に、試料・ター



**Fig. 10** Analysis of trace level elements in seawater using tITP

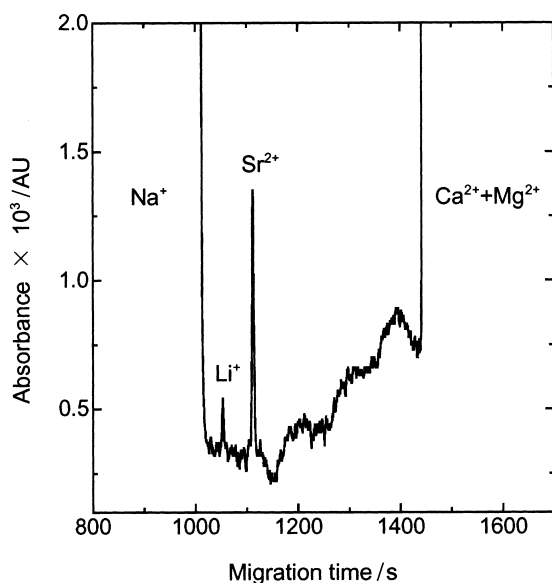
Electropherograms for (a, c) seawater (Nagahama seashore sample), (b, d) Blank run (SE): seawater as a sample was not injected.; CE conditions: SE, 0.5 M NaCl, 25 mM CTAC (pH 2.4, HCl); Sample (0.5 atm, 10 s); TE (MES, 8 s); Detection: (a, b) 226 nm; (c, d) 210 nm; Capillary: 100 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$ ; Applied voltage: -8 kV; Asterisks denote the electrolyte impurities.

ミナル液の導入量を最適化した結果、検出濃度下限として 0.6  $\mu\text{g/l}$  を達成した。

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 1.5 mM クエン酸を錯形成剤として  $Li^+$ ,  $Sr^+$  の分析を行ったものである<sup>39)</sup>。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 VII<sup>32)</sup> (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) の一例と見なすことができる。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<sup>40)41)</sup> 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, MCE2010) が入手可能になっている。MCE2010 用マイクロチップの

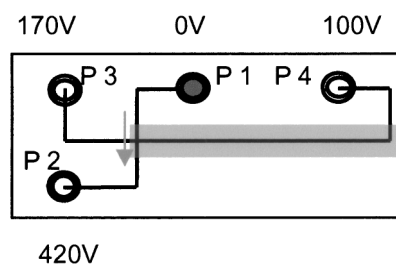


**Fig. 11** Electropherogram of  $\text{Li}^+$  and  $\text{Sr}^{2+}$  in sea-water at optimal tTTP conditions

SE: 10 mM 4-methylbenzylamine, 1.5 mM citric acid (pH 4.8, 2-ethylbutyric acid); Capillary: 100 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$ ; Applied voltage: 20 kV; Detection, 214 nm; Sample introduction: 10 s from 25 mm; Temperature: 25  $^{\circ}\text{C}$

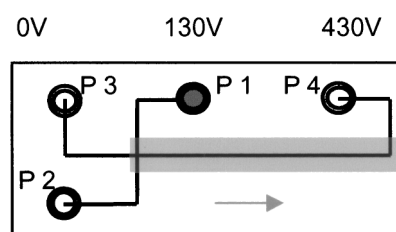
分離チャンネル有効長は 25 mm (幅 110  $\mu\text{m}$ , 深さ 50  $\mu\text{m}$ ), 試料・電解液リザーバー (ポート) は約 3  $\mu\text{l}$  とたいへん小型である。したがって, 分離に使用できる試料体積は CE に比べ格段に小さく分離場も短いので, 少量の試料を導入・分離し, 高感度で分析する必要がある。プラグ長が長くなると分離能が低下するため, MCE では通常 Fig. 12 に示したようなクロスタイプのチップが使用される。P1 に試料を入れ, P2 に電圧を印可してクロス部分まで電気泳動させ, クロス部分 (110  $\mu\text{m}$   $\times$  110  $\mu\text{m}$   $\times$  50  $\mu\text{m}$ ) 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, 445 mM tris-borate (pH = 8.3), 12.5 mM EDTA, 0.1%  $\text{NaN}_3$  に hydroxyethylcellulose (HEC) 2% が sieving 剤として添加してある。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 25 mm 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。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

### 1. Sample injection (40s)



420V

### 2. Separation (100s)



130V

**Fig. 12** Schematic of a cross microchip and protocol of analysis

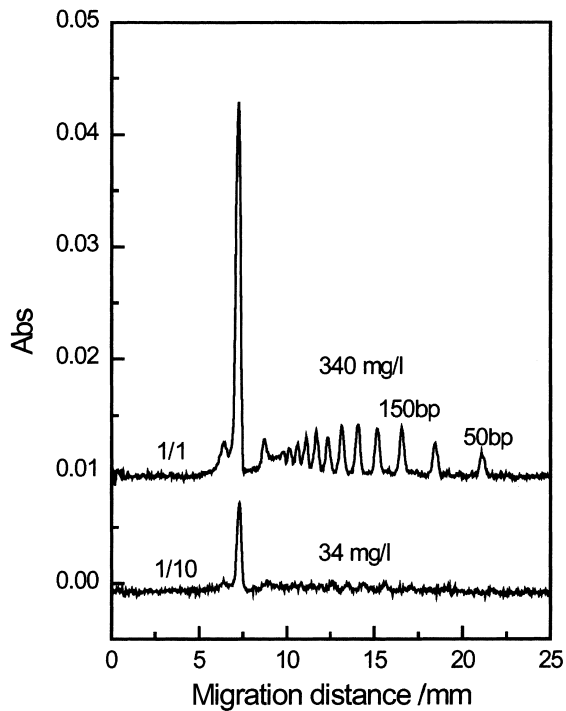
(1) "pinched injection", by adding voltage between P1 and P2 to introduce sample from P1 to P2; (2) "separation", switch the voltage between P3 and P4 to separate the sample at the cross part migrating in the separation channel. The voltage and time given were optimized typical values.

標準法に比べて高感度化を図った。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, 50 mM HCl-tris (pH = 8.1) を使用し (HEC 2%), ターミナル電解液としては 20 mM glycine-tris (pH = 8.1) を使用した。その結果, 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (S/N = 3) であった<sup>42)</sup>。本法は SDS タンパク質についても応用可能であった<sup>43)</sup>。Fig. 16 はその一例である。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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (S/N = 3) であった。

## 8 結 語

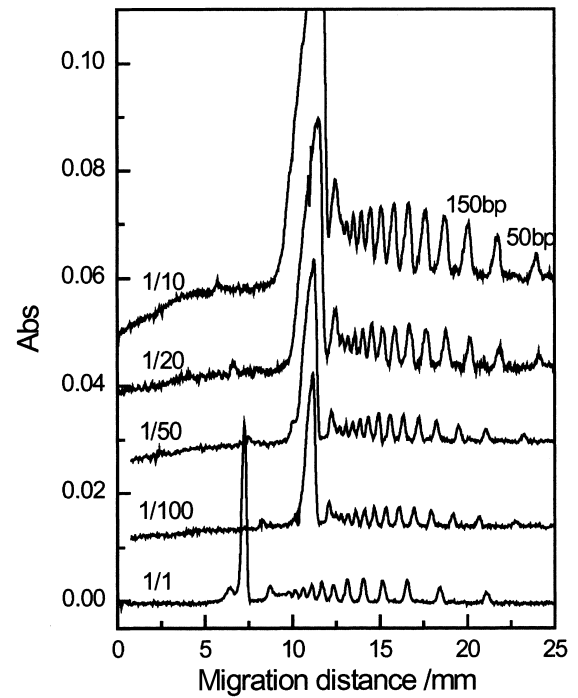
以上, CE・MCE の高感度化の手法について述べた。現時点で CZE の感度は IC や ICP-AES に比肩できるところまで到達したと考えている。EKS-CZE, EKS-MCE は UV 以外の他の高感度な検出法と組み合わせればより高感度な分析法となることが期待できる。ただし, 対象試料に応じて電解液系を最適化する必要がある。例えば, 金属イオンの分析には適切な錯形成剤の選択が必要であり, 微量のタ





**Fig. 13** Electropherograms obtained using the protocol shown as Fig. 12

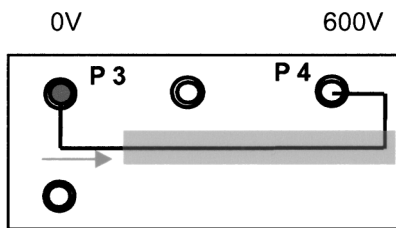
The concentration of all DNA fragments in original sample was 340 mg/l. SE: 445 mM tris-borate (pH = 8.3), HEC 2%, 12.5 mM EDTA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, detection: 260 nm



**Fig. 15** Electropherograms of original and diluted samples obtained by CGE and EKS-CGE

The used protocol as in Fig. 12 and 14.

1. Sample injection (20s)



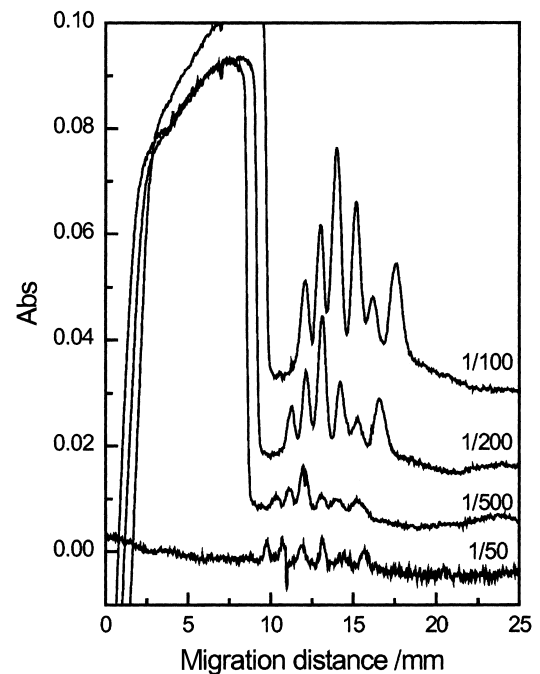
2. TE (Gly) injection (tr-ITP)  
P3=0V, P4=600V, 15s

3. Replace P3 with SE (no HEC)

4. Separation  
P3=0V, P4=430V, 120s

**Fig. 14** Protocol for EKS-CGE on a single channel microchip

SE (L), 50 mM HCl-tris (pH = 8.1), HEC 2%; T, 20 mM glycine-tris (pH = 8.1)



**Fig. 16** Separation patterns of SDS-proteins complexes for CGE and EKS-CGE mode

The 1/50 diluted sample was analyzed using conventional CGE method. Other diluted sample were analyzed by EKS-CGE method. detection: 214 nm

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、本稿で紹介した過渡的等速電気泳動前濃縮法は広範な試料の CE 分析に適用可能であると考えている。

### 文 献

- 1) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen: *J. Chromatogr.*, **169**, 11 (1979).
- 2) D. S. Burgi, R.-L. Chien: *Anal. Chem.*, **63**, 2042 (1991).
- 3) R.-L. Chien, D. S. Burgi: *Anal. Chem.*, **64**, 1046 (1992).
- 4) D. S. Burgi, R.-L. Chien: *Anal. Biochem.*, **202**, 306 (1992).
- 5) J. P. Quirino, J.-B. Kim, S. Terabe: *J. Chromatogr. A*, **580**, 339 (1999).
- 6) F. Foret, V. Sustacek, P. Bocek: *J. Microcol. Sep.*, **2**, 229 (1990).
- 7) F. Foret, E. Szoko, B. L. Karger: *J. Chromatogr.*, **608**, 3 (1992).
- 8) T. Hirokawa, A. Ohmori, Y. Kiso: *J. Chromatogr.*, **634**, 101 (1993).
- 9) D. Kaniansky, I. Zelensky, A. Hybenova: *Anal. Chem.*, **66**, 4258 (1994).
- 10) P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček: *J. Chromatogr.*, **608**, 47 (1992).
- 11) P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček: *Electrophoresis*, **16**, 2039 (1995).
- 12) L. Krivankova, A. Vrana, P. Gebauer, P. Bocek: *J. Chromatogr. A*, **772**, 283 (1997).
- 13) L. Krivankova, P. Pantuckova, P. Bocek: *J. Chromatogr. A*, **838**, 55 (1999).
- 14) R.-L. Chien, D. S. Burgi: *J. Chromatogr.*, **559**, 141 (1991).
- 15) P. Jandik, W. R. Jones: *J. Chromatogr.*, **546**, 431 (1991).
- 16) Z. Krivacky, A. Gelencer, J. Hlavay, G. Kiss, Z. Sarvari: *J. Chromatogr. A*, **834**, 21 (1999) and references cited therein.
- 17) J. P. Quirino, S. Terabe: *Science*, **282**, 465 (1998).
- 18) J. P. Quirino, S. Terabe: *Anal. Chem.*, **71**, 1638 (1999).
- 19) J. P. Quirino, J.-B. Kim, S. Terabe: *J. Chromatogr. A*, **965**, 357 (2002).
- 20) M. C. Breadmore, P. R. Haddad: *Electrophoresis*, **22**, 2464 (2001).
- 21) J. L. Beckers, P. Bocek: *Electrophoresis*, **21**, 2747 (2000).
- 22) M. Urbanek, L. Krivankova, P. Bocek: *Electrophoresis*, **24**, 466 (2003).
- 23) J. P. Quirino, S. Terabe: *J. Chromatogr. A*, **902**, 119 (2000).
- 24) A. R. Timerbaev, W. Buchberger: *J. Chromatogr. A*, **834**, 117 (1999).
- 25) T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš: *Electrophoresis*, **24**, 498 (2003).
- 26) P. R. Haddad, P. Doble, M. Macka: *J. Chromatogr. A*, **856**, 145 (1999).
- 27) T. Hirokawa, N. Ikuta, T. Yoshiyama, H. Okamoto: *Electrophoresis*, **22**, 3444 (2000).
- 28) T. Hirokawa, H. Okamoto, N. Ikuta: *Electrophoresis*, **22**, 3483 (2001).
- 29) F. M. Everaerts, J. L. Beckers, Th. P. E. M. Verheggen: "Isotachopheresis. Theory, Instrumentation and Application", (1976), (Elsevier).
- 30) T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi: *J. Chromatogr.*, **271**, D1 (1983).
- 31) T. Hirokawa, H. Okamoto, N. Ikuta, B. Gaš: *Anal. Sci.*, **17**, i185 (2001).
- 32) H. Okamoto, N. Ikuta, T. Hirokawa: *Anal. Sci.*, **17**, i925 (2001).
- 33) C. Schwer, B. Gas, F. Lottspeich, E. Kennedler: *Anal. Chem.*, **65**, 2108 (1993).
- 34) B. Gaš: <http://prfdec.natur.cuni.cz/~gas/>.
- 35) R.-L. Chien, D. S. Burgi: *Anal. Chem.*, **64**, 489 (1992).
- 36) H. Okamoto, T. Hirokawa: *J. Chromatogr. A*, **990**, 335 (2003).
- 37) J. Hu, T. Hirokawa, F. Nishiyama, Y. Kiso: *J. Chromatogr. A*, **594**, 117 (1992).
- 38) T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, A. R. Timerbaev: *Electrophoresis*, **24**, 2328 (2003).
- 39) H. Okamoto, Y. Okamoto, T. Hirokawa, A. R. Timerbaev: *Analyst*, (2003), in press.
- 40) A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte: *J. Chromatogr.*, **593**, 253 (1992).
- 41) D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Luedi, H. M. Widmer: *Anal. Chem.*, **64**, 1926 (1992).
- 42) Z. Q. Xu, T. Hirokawa, T. Nishine, A. Arai: *J. Chromatogr. A*, **990**, 53 (2003).
- 43) Z. Q. Xu, T. Ando, T. Nishine, A. Arai, T. Hirokawa: *Electrophoresis*, **24**, 3821 (2003).

## 要 旨

キャピラリー電気泳動 (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、後者は紫外線検出器のみを備えた通常の CE 装置においても有用であるため、各種のオンライン前濃縮法が考案されている。本論文では過渡的等速電気泳動 (tIPT) 及び試料の電氣的導入を併用する tIPT (electrokinetic supercharging) に重点を置き、CE 及び MCE の LOD 向上の戦略を解説し、数種のカチオン、海水中のアニオン及び DNA 断片や SDS タンパク質への応用例を示した。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や誘導結合プラズマ原子発光分析法に比肩する濃度感度である。MCE では DNA 断片について  $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、SDS タンパク質について  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  と通常法に比べ 10~40 倍良好な結果を得た。