

論文の内容の要旨

論文題名 蛍光検出法を用いた液体クロマトグラフィーの高性能化に関する研究

氏名 青山 千頭

序論

生命現象の詳細な解析を行うためには、その構成成分の存在量を定量し、量的変動を追跡する必要がある。近年、様々な研究により、生命活動において重要な役割を担う構成成分の一部は、生体内において微量にのみ存在することが明らかにされてきた。そのため、より微量にしか存在しない成分を分離し定量するための方法が必要とされている。

液体クロマトグラフィー (LC) は、多様な固定相が使用でき再現性が高いため、幅広い分野で用いられている分離分析法である。LC を用いて、生体内における微量物質の定量を行うためには、高感度な検出法及び高性能な分離カラムを用いる必要がある。

本研究において私は、第一に、NBD-F (4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole) を蛍光誘導体化試薬として用い、HPLC-蛍光検出法によりセレノメチオニン (Se-Met) を定量するための方法を確立した。NBD-F と Se-Met の反応生成物は弱蛍光性であったが、酸化反応を施すことにより蛍光強度が増大することを見出し、この性質を利用して高感度な定量法とすることを目的とした。

第二に、粒子充填型カラムよりも高性能な分離が期待されるピラー構造を用いた LC チップの開発を行った。ピラー構造を用いた LC では非常に規則性が高いピラー構造の表面において相互作用が行われるため、汎用されている粒子充填型カラムよりも優れた分離性能が得られると考えた。

1. オンライン酸化を用いた HPLC-蛍光検出法によるセレノメチオニンの高感度定量法の

開発

【背景・目的】

セレン (Se) は人体に必須な元素であることが明らかにされて以来、様々な報告により生体内における重要性が示唆されている。多くのセレン含有化合物の中で Se-Met は、Se による抗がん作用において中心的な役割を担うと考えられている。そのため Se-Met の高感度な定量法は、生体内でのモニタリングを可能にするだけでなく、セレンによる抗がん効果の作用機序の解明にも貢献することが期待できる。

Se-Met の定量法の多くは、HPLC と ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) を組み合わせた分析系によるものであるが、これらには定量精度に欠けるという短所があった。そこで、Se-Met の高感度かつ高精度な定量を行うために、HPLC-蛍光検出系を用いた分析法を確立することにした。

本研究では、NBD-F を蛍光誘導体化試薬として用いることにした。私は、NBD-F により蛍光誘導体化された Se-Met は酸化反応を施すことで蛍光強度が増大することを見出し、この性質を利用することで定量法をより高感度化できると考えた。

【方法】

蛍光誘導体化は、Se-Met 溶液にホウ酸緩衝液 (pH 8.5) を加え、60°C において 3 分間 NBD-F と反応させることで行った。分離カラムからの溶出液をクーロメトリック型電気化学検出器のフローセルにより酸化し、その後、蛍光検出 (Ex.: 470 nm, Em.: 540 nm) することにより、ポストカラム酸化反応装置を組み込んだ分析系とした。

【結果・考察】

作用電極にかける電位を最適化し、0.6 V (Pd reference) とした。これにより、酸化を行わない場合と比較して、NBD-Se-Met のピーク高さとして約 10 倍の蛍光強度の増大が達成された (図 1)。検出限界はインジェクト量あたり 50 fmol ($S/N = 3$) であり、既存の ICP-MS を用いた報告とほぼ同等の感度を有していることが示された。

【まとめ】

本研究で確立した Se-Met 定量法は、簡便かつ高感度であるため、少量の生体試料中の Se-Met を定量するための有用な方法となることが期待できる。

2. ピラー構造を利用した液体クロマトグラフィーチップの開発

【背景・目的】

1998 年に Regnier らにより、半導体加工技術を用いてチップ流路中にピラー状の構造体を規則的に並べ、そのピラー表面を相互作用表面として利用した電気クロマトグラフィーが報告された。その高い分離性能は圧力により移動相を流す通常の LC においても同様

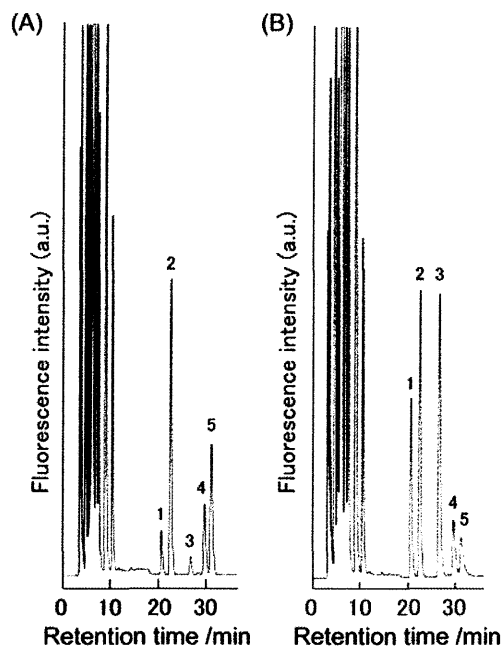


図 1 酸化電位を印加しない条件(A)及び最適な酸化電位を印加した条件(B)においてアミノ酸標準溶液を分離した時に得られたクロマトグラム。

1. NBD-Met, 2. NBD-Val, 3. NBD-Se-Met, 4. NBD-cystine, 5. NBD-ornithine.

に得られることが、理論計算により予想されている。そこで本研究において私は、ピラー構造を用いた LC チップを開発することを目的とした。

【方法】

使用した LC チップは、一辺 20 mm の Si 基板を原料とし、フォトリソグラフィとドライエッチングにより流路パターンを形成した (図 2)。ピラー構造を有する分離流路と共に試料注入用流路も作製し、この 2 つの流路が交差する部分を分離流路への試料注入部として用いた。流路パターンを形成した Si 基板は、その表面に酸化膜を形成させた後、ガラス基板と陽極接合により貼り合わせることで LC チップとした。ピラーは一辺が $3\ \mu\text{m}$ の正方形、ピラー間の幅は $2\ \mu\text{m}$ となるように設計した。分離部のピラー部分を含めた流路幅はそれぞれ $400\ \mu\text{m}$ 、流路深さは $25\ \mu\text{m}$ とした。この LC チップ表面に octadecylsilyl 基を化学的に結合させることで、ピラー構造の表面を逆相分離の相互作用の場とした。

【結果・考察】

はじめに、ピラー構造を用いた LC の分離性能を、直線流路を用いて評価を行うことにした。長さ $6.7\ \text{mm}$ の直線流路を有する LC チップを用いて 2 種類のクマリン色素 (C525, C545) を分離し、そのクロマトグラムから理論段数を算出した。この時の各ピークの理論段数は 800 程度であり、長さあたりの分離性能が市販の粒子充填型カラムよりも高いことが明らかになった。これにより、理論的に予想されていたピラー構造による LC の高い分離性能を、実験的に示すことができた。

チップ内において得られる直線流路の長さは限られる。そのため、より長い分離流路をチップ上に作製するには曲線流路を伴う必要がある。そこで近年 Griffiths らが流体力学解析により提案した低拡散曲線構造を LC チップに適用することにした。これは曲線部分に起因する拡散を最大限に抑制することを目的とした曲線構造であり、その特長は曲線部分の内側と外側を流れる液体がそれぞれ通過する距離がほぼ等しくなるように設計されている点にある。

はじめに低拡散曲線流路が、内部にピラー構造がある流路において理論結果と同様に機能するかを確認した。表面修飾を行う前の円弧型曲線流路もしくは低拡散型曲線流路を有する LC チップを用い、バンド状の C525 溶液がそれぞれの曲線部分を流れる様子を蛍光顕微鏡を用いて観察した (図 3)。その結果、円弧型曲線流路 (A) ではターンの内側と外側とで距離差が存在するため蛍光バンドの形状が大きく変化するのに対し、低拡散型曲線流路 (B) ではターン前後でほとんどバンドの形状に変化が見られなかった。この結果から、流路内部にピラー構造を有する場合において、低拡散型曲線は有用であることが明らかとなった。

次に、逆相分離条件下において、円弧型曲線流路もしくは低拡散型曲線流路を有する LC チップを用いて C525 と C545 を分離し、そのクロマトグラムから理論段数を算出した。その結果、両者において分離流路が長くなるほど理論段数が向上したが、低拡散型曲線流路を有する LC チップの方が高い値が得られた。

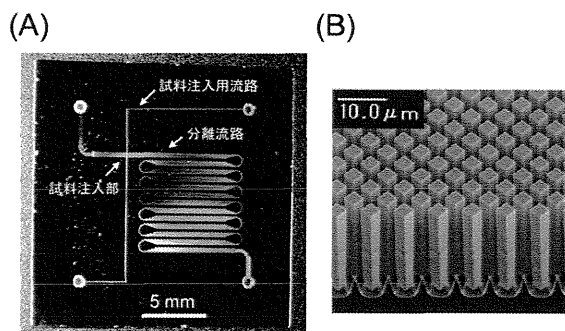


図 2 低拡散曲線を有する LC チップの全景 (A) 及びその分離流路断面の SEM 像 (B)。

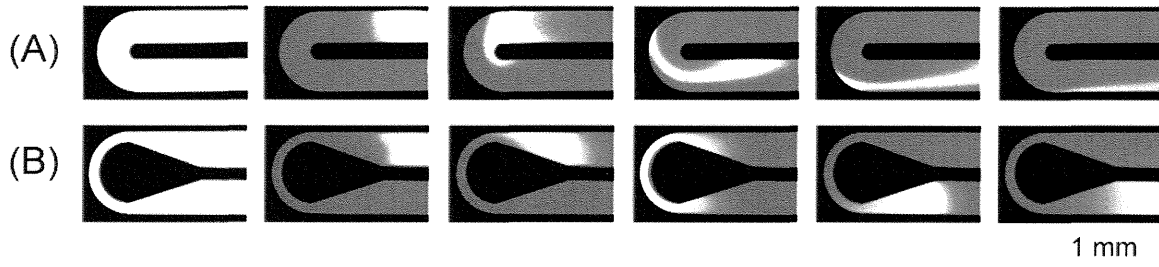


図3 保持が起こらない条件において、バンド状の C525 溶液が円弧型流路 (A) および低拡散型曲線流路 (B) を通過した様子の 0.5 秒ごとの静止画像。一番左の図は、流路全体に色素溶液を満たした時のもの。

また低拡散型曲線流路を有する LC チップにおいて、移動相の流速を変化させた時の理論段高さから van Deemter's plot を作成した (図 4)。市販の粒子充填型カラムを用いた実験により得られたグラフと比較すると、それぞれの最適流速における理論段高さは、低拡散型曲線を有するピラー-LC チップの方が小さな値を示していた。また、移動相の流速が最適条件よりも大きな場合、低拡散型曲線を有する LC チップは粒子充填型カラムと比べて高い分離性能を維持していた。以上より、低拡散型曲線を有する LC チップが、円弧型曲線を有する LC チップよりも分離性能が高いこと、粒子充填型カラムよりも優れた性質を持つことが示された。

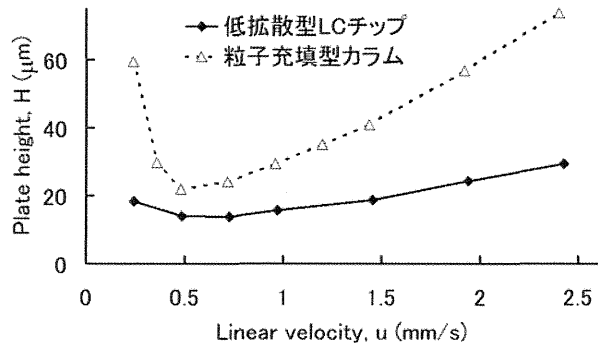


図4 低拡散型曲線を有する LC チップ及び粒子充填カラムによる van Deemter's plot。

この低拡散型曲線流路を有する LC チップを用いて、あらかじめ蛍光誘導体化したアミノ酸類を分離した時に得られたクロマトグラムが図 5 である。最初のターンに入るまでの短い直線の分離流路のみでは、7 種類の蛍光物質は 4 本のピークにしか分離されない (A)。しかし、分離流路が一往復分長くなることでより分離され (B)、さらに一往復することで 7 本のピークとして検出されるようになった (C)。この結果は、低拡散曲線流路を用いて長い分離流路を設計することで、短い直線流路だけでは分離できない成分の分離が可能になることを示すものである。

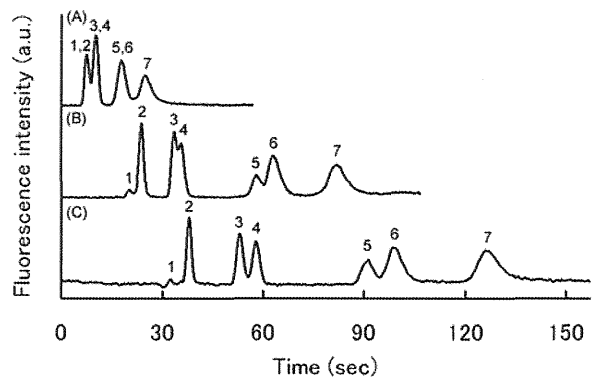


図5 低拡散型曲線流路を有する LC チップによりアミノ酸標準溶液を分離した時に得られたクロマトグラム。検出はそれぞれ、試料注入部から数えて (A) 1 つ目のターンが始まる直前、(B) 3 つ目のターンが始まる直前、(C) 5 つ目のターンが始まる直前に行った。
1, NBD-OH; 2, NBD-Pro; 3, NBD-Val; 4, NBD- ϵ -amino-*n*-caproic acid; 5, NBD-Ile; 6, NBD-Leu; 7, NBD-Phe.

【まとめ】

本研究において私は、従来のカラムよりも分離性能の高いピラー構造を用いた LC チップを開発した。低拡散曲線流路を適用した長い流路を作製することで、より多くの成分の

分離が可能となることを示した。本研究で示された知見はマイクロ化学チップを用いて高性能な分離を行うための重要なものであり、今後、他の様々な分析手法と組み合わせた応用が期待される。

総括

本研究は、LCの高性能化を目的として行った。Se-Metの定量法の確立により得られた知見は、HPLCにおける高感度な検出法である蛍光検出法を、より多くの分子へ適用するための一助となると考えられる。また、ピラー構造を用いたLCチップにおいて高い分離性能が示され、従来のLCでは分離が困難であった微量物質の定量を可能にするものと期待される。