

Focussing Review

マイクロチップ電気泳動：装置の作成、特徴、応用

多賀 淳、本田 進*

Microchip Electrophoresis: Apparatus Preparation,
Characteristic Features and Applications

Atsushi Taga and Susumu Honda*

Faculty of pharmaceutical Sciences, Kinki University 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

Received for review November 9, 2000. Accepted December 20, 2000.

Abstract

Recent status of microchip electrophoresis (ME) was reviewed, with emphasis on the preparation of apparatus, including micro-machining of chips, hardware for voltage control, and data processing. The advantages of ME were pointed out in comparison with capillary electrophoresis, and a number of applications were presented, in which such advantages were demonstrated.

Keywords: microchip electrophoresis, capillary electrophoresis, micro-machining, photolithography, micro-channels, cross junction, high-speed separation

1 はじめに

コンピューター技術にとっては集積回路 (Integrated Circuit, IC) の作成は基本的に重要であり、このために超微細加工技術が発展した。そしてこれに伴いさまざまな分野でマイクロチップ化が進んでいる。特にフォトリソグラフィ (写真製版) 技術は他に応用しやすい技術であるため、今後種々の装置の小型化に大いに貢献する技術であると思われる。

分析化学の分野、特に生体成分分析においては、このような超微細加工技術により大きく2つの面で新しい展開がみられた。1つはDNAチップの開発 [1, 2] にみられるように、特異的に反応する基質をガラスあるいはシリコン基盤上に多数固定化したマイクロアレイチップ作成技術の開発である。マイクロアレイチップ法では固定化されたそれぞれの物質に対応する相手物質の存在の有無が高速で明瞭に確認できるため、DNA診断等に特に有効に用いられている。2つ目は多行程の操作を1つの微小チップ上に集約させて行う微量流体分析装置の開発であり、微小なチップ上に複雑なチャンネルを

構築しそのチャンネル内で試料や分析用試薬等を送液・混合・反応させるものである。マイクロチップを用いる流体分析技術においては、ポンプや弁などバンドの乱れやデッドボリュームを生じやすい機械的な可動装置を用いなくても、単に電圧を印加するだけで均一速度の電気浸透流が得られるので、これを送液に利用することができる。このため、微量流体分析装置の開発においては、マイクロチャンネル中で電気泳動を行うマイクロチップ電気泳動 (microchip electrophoresis, ME) について盛んに研究が行われている。MEについては現在のところ装置の作成、試料および分離用緩衝液の導入、分析上の基本特性の検討などについて集中的に研究が行われており、MEは目下開発段階にあると言える。この微量かつ超高速で行う新分離分析技術を取り上げた総説はいくつかみられるが [3, 5] それらには主にMEをキャピラリー電気泳動 (CE) の発展型としてとらえ、分析の超高速性に注目したものが多い。MEにおいてはCEにおけるキャピラリーとは異なり、流路のレイアウトを自由にデザインできるので、本総説においては、装置の作成法や技術の特徴に重点をおい

て概観し、かついくつかの応用例を紹介する。

2 装置の作成

2.1 フォトリソグラフィ技術によるマイクロ流路作成

微小なチップ上で流体分析を行うためには非常に精巧な技術により均一なマイクロ流路を作成する必要がある、MEにおいてはチップの材質および流路の作成法について活発に研究が行われている。現代のハイテク電子製品などの製造にはフォトリソグラフィ技術は欠かせないものであるが、電気泳動用マイクロチップの作成においてもこの技術を応用すれば精密なマイクロ流路を構築することができる。フッ化水素を用いた湿式エッチングによるシリコンウェハー上へのマイクロ流路の作成を例にしてその原理を簡単に述べる。Figure 1にManzら [6,7] の報告を引用し、若干の説明を加える。

- (a)シリコン (Si) 表面を熱酸化させる。
- (b)フォトレジストを付着させ乾燥させる。
- (c)マイクロ流路のレイアウトパターンを感光フィルムにデザ

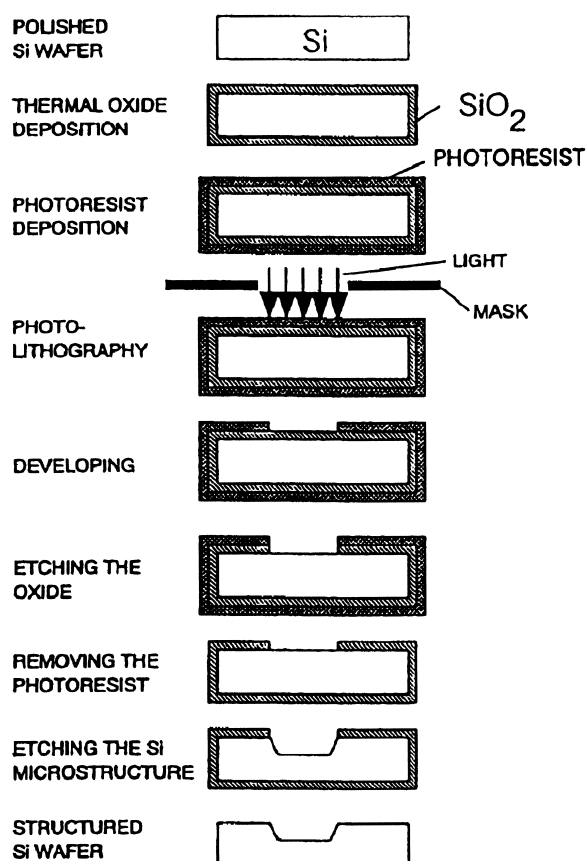


Figure 1. Process steps of a one-mask micromachining procedure to etch a channel structure into silicon. Reproduced from Ref.7 with permission of the publisher. Some additions were made to the original figure.

インしてフォトマスクを作成し、密着させたマスク上から紫外線を照射する。

(d)露光部分のフォトレジスト (ポジレジスト) を可溶化させてSiO₂上にレジストパターンを形成させる。

(e)SiO₂をエッチングする。

(f)外壁のフォトレジストをすべて取り除く。

(g)Siをエッチングする。

(h)酸化物 (SiO₂) をはく離させる。

これら一連の操作により作成したマイクロ流路上にパイレックスガラスプレートを重ね、加熱により接着して密閉することにより電気泳動用マイクロチップを作成することができる。

2.2 ガラス製マイクロチップ

前述のように流路を掘ったシリコンウェハーにガラスを接着することにより比較的容易にマイクロチップを作成することができる。この場合2種類の材質からなるチャンネル中で電気泳動を行うと、試料とチャンネル内壁との相互作用や部位による電気浸透流の違いにより試料ゾーンに乱れが生じてカラム効率が低下するため、カバープレートには基盤と同一の素材を用いることが望ましい。しかし、シリコンのカバープレートを用いると紫外部における吸収が強くて検出が困難になる上、材質の脆弱性のため取り扱いが難しくなる。脆弱性を軽減するためにはパイレックスガラスなどを素材にする方がよい。そこで、ガラス基盤上に流路を作成しガラスプレートを接着する、ガラス製マイクロチップの作成法が検討された。この場合には、流路の作成そのものが困難であることに加えてガラス同士の接着に高温での加熱が必要であるため歪みや破損を起こしやすいという問題点があった。FanとHarrison [8] のガラス製マイクロチップ作成法の概要をFigure 2に示す。

ガラス基盤上に流路を作成する場合にはフッ化水素 (フッ化水素 - 硝酸 - 水混合液) を用いてガラス表面を腐食させることによりエッチングを行うため、ガラス表面をクロムと金の合金によりマスクしたのちフォトレジストをコーティングし、シリコン基盤を用いた場合と同様にフォトリソグラフィを行う。これにより露出した金属を王水で除去しガラス基盤上にフッ化水素で流路パターンをエッチングする。これらの操作によりガラス平板上にマイクロ流路を作成することができる。一般に、ガラス同士の接着には高温での加熱が必要であるが、急激に加熱すると歪みや破損が起こり易いため段階的に加熱を行う必要がある。例えば、FanとHarrison [8] の方法によると、40 /minで550 まで温度を上昇させ合計30 min加熱し、続いて20 /minで610 にし合計30 min加熱し、さらに635 で30 min加熱後10 /minで最終的な温度650 にして6 h加熱するという操作により接着を行う。続いて炉を室温まで自然冷却する。接着していない部分がある場合は、全てが接着するまでこの行程を繰り返すこと

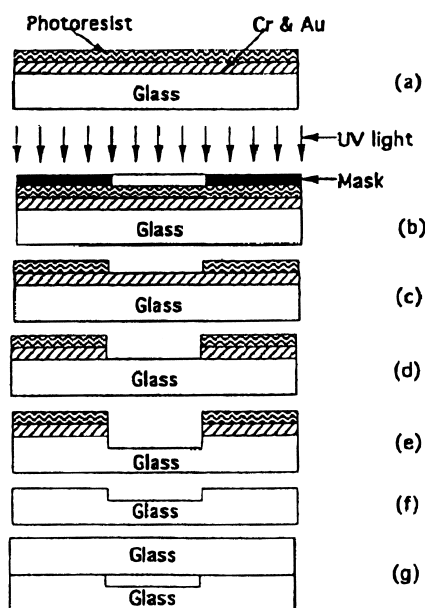


Figure 2. Sequence of photolithographic fabrication: (a) Cr and Au masked glass plate coated with photoresist; (b) sample exposed to light through a master mask; (c) photoresist developed; (d) exposed metal mask etched; (e) exposed glass etched; (f) resist and metal stripped; (g) glass cover plate bonded to form channel. Reproduced from Ref. 8 with permission of the publisher.

によりカバープレートを完全に接着させ均質で強固な構造のガラス製マイクロチップを作成することができる。

このようにして作成したガラス製マイクロチップを用いる電気泳動においては安定な電気浸透流が発生するため、カラム効率が高くなり良好な分離を得ることができる。しかしながら、ガラスは紫外外部吸収を起こすため、光の吸収による検出を行う場合には可視部の検出波長に限定される。高感度で検出を行うには試料を可視部領域に蛍光を有する誘導体に導くことが有効であるが、全ての試料を容易に誘導体化できるわけではないため試料は限定される。

2.3 石英製マイクロチップ

ガラス製マイクロチップのもつ問題を解決するためには紫外外部での検出が可能な石英製マイクロチップを作成する必要があると考えられる。ガラス基盤を用いる場合と同様に金・クロームマスクを用いる一般的なフォトリソグラフィー技術により石英基盤上に流路パターンを構築することは可能であるが、非常に融点の高い石英ガラス同士の接着が問題となる（通常、石英ガラスの加工には1800以上の加熱が必要である）。しかし、Jacobsonら[9]の報告では、基盤とカバープレート表面を水酸化アンモニウム/過酸化水素を用いて50で酸化処理し酸化した表面同士を重ねて加熱すれば融点

以下の温度（1100）でも接着することが可能であった。

2.4 使い捨てマイクロチップ

前述のようにフォトリソグラフィー技術を用いて種々の素材に精密にマイクロ流路を構築し、カバープレートを接着することにより電気泳動用マイクロチップを作成することができる。しかしながら、それら一連の操作を行うためには長時間を要し高額な費用を要する。これらの問題は新しい分析法の研究において大きな障害となり、この方法を広く普及させるためにも簡便なマイクロチップ作成法およびコストダウンの検討を行う必要がある。石英製のマイクロチップは分離および検出のいずれにおいても優れているが、実際の分析において、特に試料が限定されている場合には、それほど高い性能が必要でない場合もある。また、分析の再現性を高めるためにはチャンネル内の状態を一定に保つ必要があるが、複雑に交差したチャンネルを一樣に洗浄し内壁の電荷を定常状態に平衡化させることは容易ではない。1回の分析しか許されずしかも信頼性の高い情報が必要な臨床分析等においては、限度一杯の高いカラム効率や検出感度よりも安定な結果が望まれる。このような場合には安価で一定の品質のチップを供給する必要があり、熱により軟化するプラスチック素材を用いて鑄造する方法が有望であると考えられる。Martynovaら[10]はプラスチック製のマイクロチップの鑄造について検討を行った。

Figure 3に彼らの用いた方法を図示する。これは、ポリメチルメタクリレート（PMMA）基盤を用い、これを加熱・軟化させた状態で流路パターンをプレスしマイクロ流路を作成する方法であるが、彼らはこれについて2種類のインプリント方式を検討した。1つは、ガラス平板上にPMMAプレートを置き、その上にワイヤーでマイクロ流路をデザインしガラスプレートで挟み込んで加圧することにより鑄造する方法である（Figure 3A）。この方式は簡便であり単純なチャンネルデザインに対しては有効な方式であるが、交差チャンネル等を作成する場合には2回プレスする必要がある。もう1つは、シリコンウェハー上にフォトリソグラフィーにより流路パターンをエッチングして鑄型を作成し（Figure 3B下部）これにPMMAプレート（Figure 3B上部）を押し付けて鑄造する方法である。この方法においてはシリコンウェハー上に流路を作成する必要があるため操作が煩雑になるが、より複雑なデザインを鑄造することができるという利点があり、作成した鑄型は繰り返し使用できるため、再現性良く同等の品質のマイクロチップを量産することが可能である。これらの鑄造法によりマイクロ流路を構築したPMMA基盤上にPMMAブランク基盤を重ねて108で10 min加熱することにより容易に接着することができる。これら一連の操作によりプラスチック製のディスポーザブルマイクロチップを作成することができる。また、最近では検出面や送液のための電気浸透流の面からも考慮された素材が取り上げられ、それを用

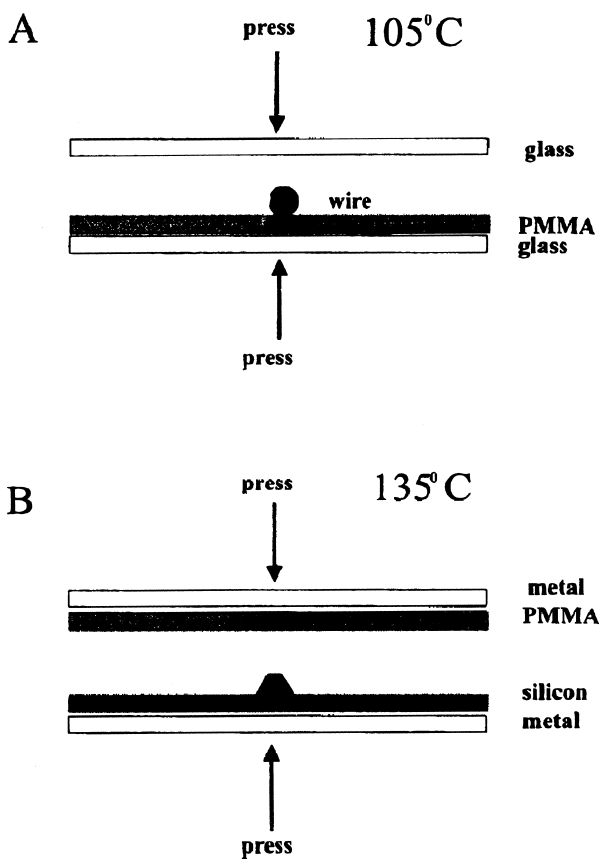


Figure 3. (A) Fabrication protocol for wire-imprinted devices. (B) Fabrication protocol for silicon-temple-imprint devices. Reproduced from Ref. 10 with permission of the publisher.

いたディスプレイマイクロチップ製法についても検討が行われている [11]

3 キャピラリー電気泳動との比較

微量溶液中で電気泳動を行う高分解能微量分離分析法として既にキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE) が開発され一般的に広く用いられているが、その原理や使用目的などからCEはMEに最も近い既存の分析法であると言える。言い換えればMEはCEの発展した形であるとも言える。そこで、MEを種々の面からCEと比較した。

3.1 分析用カラム

3.1.1 素材と作成法

CEにおいては、その開発段階においてテフロン [12]、ガラス [13]、石英 [11] など種々の素材のキャピラリーについて検討が行われた。その結果、紫外外部検出の感度が優れている石英製のキャピラリーが最もよく用いられるようになっ

た。現在では内径10~200 μm のフューズドシリカキャピラリーが工業的に生産され、高品質で口径が一定なものが安価で容易に入手できるようになった。CE用カラムとして利用できる市販のフューズドシリカキャピラリーはポリイミドにより表面コーティングが施されており、変形により破損することがないため取り扱いが容易である。また、長いキャピラリー分離長が必要な場合にはコンパクトに巻いて使用することもできる。一方、電気泳動用マイクロチップは今のところ自作する必要があり、その材質および作成法については目下検討が行われている段階であるが、用途に応じて適切な設計を行う必要がある。

3.1.2 内面の被覆

CEにおいてはほとんどの場合フューズドシリカキャピラリーが用いられるが、内面は負電荷を帯び電荷の大きさは正電荷を帯びた成分の吸着等により泳動中に変わり易く、したがって電気浸透流が変動し易いため、内面修飾のための種々の方法 [14-16] が開発されており、移動時間のばらつきによる分析の再現性の低下にもほぼ対応できるようになった。ガラスや石英製チップを使用するMEにおいても、CE用キャピラリーの内壁コーティング技術を応用することにより再現性を高めることができるが、マイクロチャンネル作成後にカバープレートを接着するため圧力に対する耐久性に問題があることや交差チャンネルをもつマイクロチップにおいてはチャンネル内面を一様に処理することが困難である。このため、電気泳動用マイクロチップのチャンネルの内壁コーティングには煩雑な操作を伴う化学的コーティングよりもイオン性ポリマーなどを用いた物理的コーティングが適していると思われる。

3.1.3 レプリカの量産

臨床応用等多くの共存物を含む多数試料の迅速分析を目的とする場合には、さまざまな試料が導入され迅速に結果を得ることが要求されるため、チャンネルのコンディショニングにより分析環境を回復したり内面被覆により再現性を向上させるよりはむしろチップのディスプレイ化を進めることに重点がおかれている。先述のようにフォトリソグラフィーにより作成したシリコンマスターを用いるチップ鋳造法がMcCormicら [17] のグループなどにより開発され、プラスチックで鋳造することにより短時間で品質の安定したチップを量産できるようになった。このためマイクロチップのディスプレイ化が進みはじめているが、素材などについては現在も検討が続けられている。

3.1.4 有効長

微小チップ上に直角に2つのチャンネルが交差する一般的なマイクロチップ (Figure 4a) [18] を用いる電気泳動においては、分離有効長が短いと十分な分離が得られないという問題点がある。しかし、1993年Seilerら [19] によりチャンネルを屈曲させても試料バンドはあまり拡散しないことが明らかにされた。この結果に基づき、1994年Jacobsonら [20] は

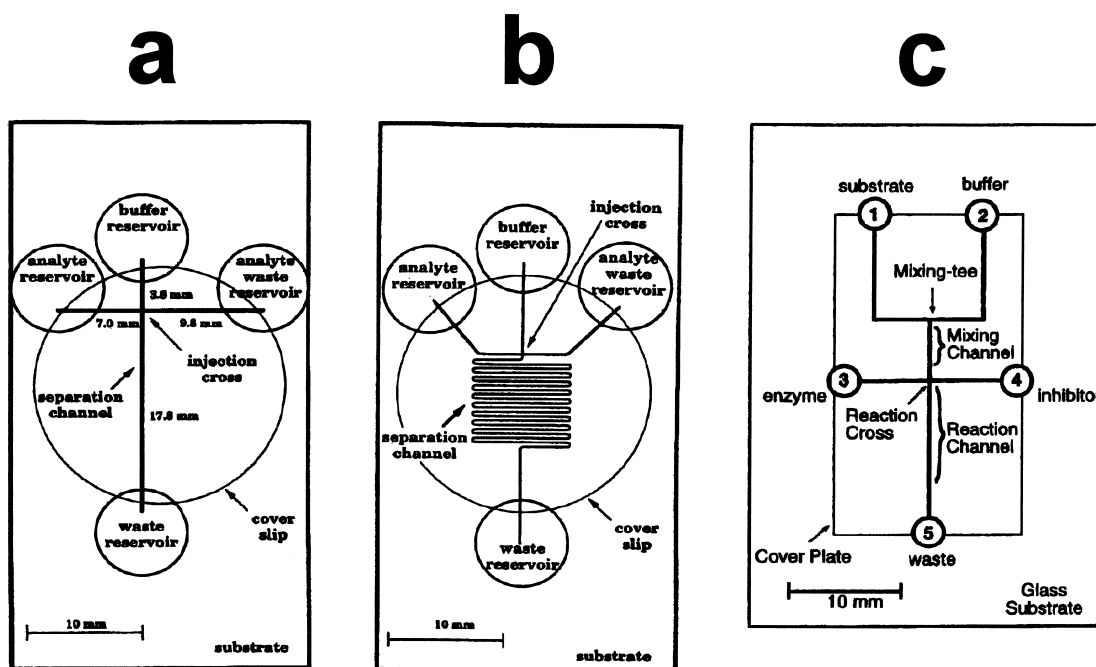


Figure 4. Schematic of the microchip with a cross-channel geometry (a), a serpentine channel geometry (b) and a mixing channel (c). Reproduced from Ref. 18, 20 and 21 with permission of the publisher.

1 × 1 cm角に16.5 cmの曲がりくねったチャンネル (Figure 4 b) をもつマイクロチップを作成し、流路長が分離に与える影響を調べた。その結果、試料導入部から検出部までの距離を長くすると理論段数が比例的に増加することがわかった。

3.1.5 インカラム希釈・混合

このように、精密なマイクロチャンネルを作成できる技術の発展に伴い、試料の前処理や誘導体化をチップ上で行う方法についても検討が行われた。一般に分離分析においてポストセパレーション誘導体化や試料の前処理をカラム内で行うためにはカラムを分岐させる必要があるが、CEにおけるキャピラリーは円筒形であり素材も硬質の石英であるためデッドボリュームが生じないように加工することは非常に困難である。これに対してMEにおいてはフォトマスク作成時の印刷技術の範囲内で自由なチャンネルデザインが可能であるため、デッドボリュームのない分岐カラムを作成することができる。Haddら [21] は多数のリザーバーおよび混合チャンネルをもったマイクロチップ (Figure 4 c) を作成し、このチップを用いればチップ上で基質、緩衝液、酵素および阻害剤を希釈、混合、反応および分析を行い、酵素活性測定を行うことが可能であることを示した。

3.2 試料導入

3.2.1 試料導入方式

CEにおいては状況に応じて種々の導入法が選択できる。吸引法および加圧法のような圧力を利用する方法、重力を利用する落差法および電圧を印加することにより試料を導入する電氣的導入法などにより時間的な制御を行い再現性良く試料導入を行うことができる。これに反してMEにおいては今のところもっぱらFigure 5に示すような交差チャンネルを用いて電圧制御により試料をスプリット導入する方法が用いられている [22, 23]

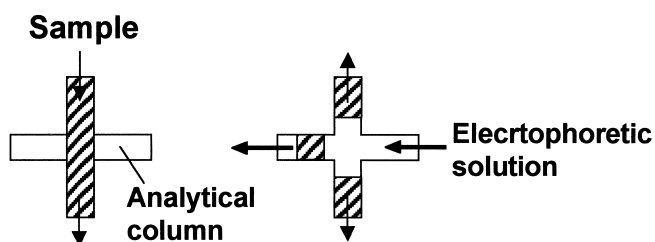


Figure 5. Schematic of sample introduction for microchip electrophoresis with a cross junction injector.

3.2.2 試料プラグ長

CEにおける試料導入では、その操作上若干多量の試料を用意する必要があるが、キャピラリーに導入される試料体積は数nl~十数nl程度であり、残部は回収することができる。しかしながら、キャピラリー先端を試料バイアルから泳動液リザーバーに移動させる必要があり、再現性良く導入するためには数mmの試料溶液プラグを形成させる必要がある。一方、MEにおいては交差チャンネルを用いて試料をスプリット導入する方法を採用できるため数十 μm オーダーでのプラグ長で試料導入を行うことができるが、再現性良く試料導入を行うためには送液コントロールやインジェクターの構造について工夫が必要である。例えばFigure 5に示すような

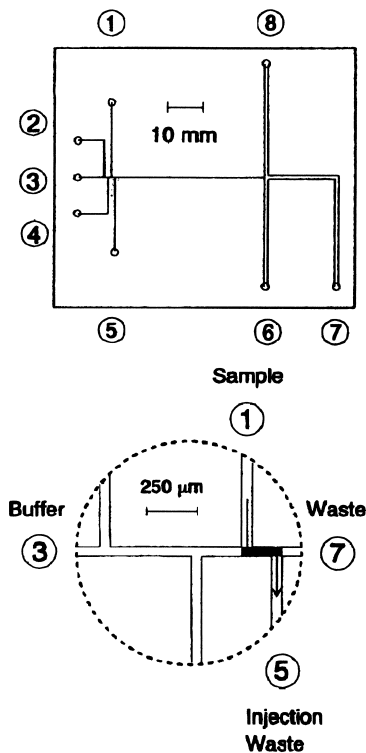


Figure 6. (a) Layout of the glass chip with an integrated sample injector. Channel cross sections: $50 \times 12 \mu\text{m}$ (thin channels) and $1000 \times 12 \mu\text{m}$ (broad channels). A detailed view of the shaded intersection area is shown in (b): After application of a high voltage between reservoirs 1 (sample) and 5 (injection waste), the geometrically defined injection volume (double-T injection, shaded area) is filled by electrophoretic migration of the sample ions in the direction indicated by the arrow. After loading is completed, application of a high potential between reservoirs 3 (buffer) and 7 (waste) causes electrophoretic separation of the sample components. Reproduced from Ref. 24 with permission of the publisher.

単純に試料チャンネルと分析用チャンネルが交差したcross junctionインジェクターを用いて試料を導入する場合には、それぞれのチャンネルの両端に電極を設け、電圧印加を精細にコントロールすればスプリットされた試料以外は試料チャンネルの両リザーバー方向に移動し試料の拡散や漏出を防ぐことができ、これによって鮮明な試料プラグを形成させることができる。また、試料導入量の再現性を高めるためのインジェクターデザインとしてdouble-T junctionインジェクター (Figure 6) がある。

このデザインにおいては導入量を印加電圧や導入時間によらず、試料体積により制御するため、導入量の再現性が極めて高い。Effenhauserら [24] の報告によると蛍光標識オリゴヌクレオチドの繰り返し測定における移動時間およびピーク高さの相対標準偏差はそれぞれ0.06%以下および1.7%以下と低値を示した。しかしながら、スプリット法により試料導入を行う場合には試料リザーバーおよび試料導入用チャンネル全体に試料溶液を満たす必要があるため数 μl の試料が必要であり、残部の回収は困難である。

3.3 検出

3.3.1 検出のテクノロジー

CEにおいては、キャピラリー外壁のポリイミドコーティングを細い炎で焼却して検出ウィンドウを作成し、この検出ウィンドウをスリットに合わせてキャピラリーを直接装着することにより使用できる検出器が市販されている。そのような装置では遮光やphotomultiplier (PM) の位置調整あるいは焦点調整などは装置の出荷時あるいは納入時に行われるため通常はこれらの煩雑な操作を必要としない。また、最近ではカセットに収めたキャピラリーも市販されるようになり、スリットの位置調整をする必要のない装置もある。キャピラリー素材は石英であるため紫外部での検出も可能であり、バックランドが低い。これに対してMEでは顕微鏡を用いてチップ上の検出部に光をピンポイントで照射し吸収を測定するか蛍光を集光して検出する必要がある。吸収測定による検出を行うためには紫外部吸収を起こさない石英ガラスを用いたMEが望ましいが、石英ガラスを用いた場合でも検出する光量が少なく十分な検出感度が得られない場合が多い。これに対してはパルス光源照射 / 積算方式などが考えられ今後の展開が期待される。

3.3.2 レーザー励起蛍光検出

CEにおいてもレーザー励起蛍光 (laser-induced fluorescence, LIF) 検出は超高感度検出が可能な卓越した方法であり、既に集光効率の良い2、3の機種が市販されている。MEではLIF検出がさらに適しているがLIF検出を行う場合には現在のところFigure 7に示すような大掛かりな検出装置を自作する必要がある [19-25]。

また、CEにおけるLIF検出よりもさらに高度な技術が要求される。チップ上の検出部にレーザーの焦点を合わせて入

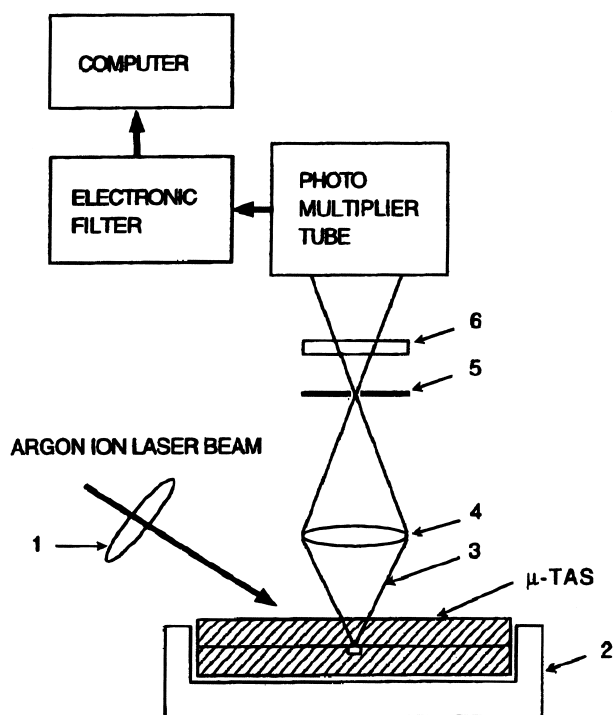


Figure 7. Schematic of an optical detection system. Ar ion laser was focused with a lens (1) onto the separation channel, which was held in place with a plexiglass holder (2). Fluorescence emission (3) was collected with a microscope objective (4), focused onto an air slit (5), filtered (6) and then detected with a photomultiplier tube. An objective, an air slit and a filter were mounted in a microscope body, which was fixed on X-Y translation stages. Reproduced from Ref. 19 with permission of the publisher.

射させ、発した蛍光は対物レンズにより集光しPMにより電気信号化させる。この場合、励起光および蛍光の集光やPMの位置調整を行う必要がある。また構造上検出部のみを部分的に遮光することが困難であるため、電気泳動中は分析装置全体を遮光せざるを得ないが、遮光が完全でない場合にはノイズが大きくなることもある。PMを用いてピンポイント照射に対する蛍光強度を測定する方式の他にCCDカメラを用いて試料が移動する全体像を捕らえる方式もあり、この方式では平行に掘ったチャンネル間での蛍光強度の比較を行ったりチャンネル交差部あるいは屈曲部の試料の希釈およびゾーンの拡散などを直接観察することもできる [26]

3.4 分析時間

MEやCEのような微小溶液中での電気泳動においてはその分析時間は当然泳動液や印加電圧により変化するが、有効分離長が最も大きく影響すると言える。CEにおいては通常キャピラリーに導入される試料プラグの長さが数mmといっ

たオーダーであるため10成分程度について良好な分離を得るためには数cm以上の有効長が望ましいと考えられる。したがって、通常利用できる高電圧電源における最高電圧（一般的には30 kV）を印加した場合においても、実現できる最短分析時間は数十secから数minといったオーダーである。これに対して、MEにおいてはそのチャンネルデザインが自由であることから1 cmに満たない有効分離長のチャンネルを作成でき、試料導入においても交差チャンネルを用いたスプリット法を用いれば数十 μm という試料プラグ長での導入が可能であることから、同じ成分数についてmsecオーダーでの高速分離が可能である。このことはMEの最大の利点と言ってもよい。

4 応用

前述のようにMEは高速分離とチャンネルデザインの自由度という大きな利点をもっている。CEにおいてはカラムスイッチングや複数リザーバーへの接続は極めて困難であるが、MEではチャンネルデザインを自由に行うことができるため最新の印刷技術やフォトリソグラフィーにより多数のリザーバーを使用する交差チャンネルをデザインすることができる。また、従来の流体系での分析法の大部分においてはインジェクター、分析用カラムおよび検出器などの接続やカラムスイッチングはチューピングにより行われるためデッドボリュームを生じたり拡散を起こす場合が多いのに対して、MEでは接続によるこのような問題はない。このような利点を活かした分析例をいくつか紹介する。

4.1 超高速分析

3.4で述べたようにMEにおいては数十 μm オーダーのプラグ長での試料導入が可能であるため、従来のCEにおける場合に比べて極端に短いチャンネル中での分析が可能である。また、チップを移動させて検出部を変えることにより容易に分離長を変更することができる。Jacobsonら [18] は全長21.6 mm（試料導入部から廃液リザーバーまでの距離17.8 mm）のマイクロチップ（Figure 4 a）を用いて種々の分離長でローダミンBとフルオレセインの超高速分離を試みた。得られた電気泳動図をFigure 8に示す。

いずれの分離長においても印加電圧1.5 kV/cmで電気泳動を行ったところ、分離長0.9 mm（Figure 8 a）では基線分離には至らなかったものの150 msec以内に良好な分離が得られ、分離長1.6 mm（Figure 8 b）では260 msec以内にこれら2成分の基線分離が達成された。分離長11.1 mm（Figure 8 c）では1.6 sec以内に分析が終了し良好なピーク形状を与えた。このようにMEでは有効分離長を自由にデザインできるが、このことを利用すれば驚異的な超高速分析が可能であることが示された。理論段数（ N ）は、移動時間（ t ）およびピーク半値幅（ $W_{1/2}$ ）を用い(1)式

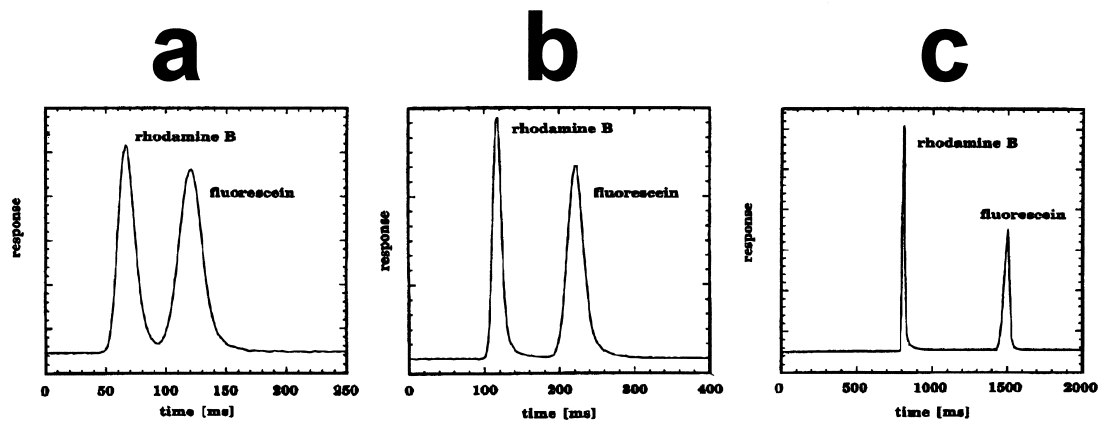


Figure 8. Electropherograms of rhodamine B and fluorescein with a separation field strength of 1.5 kV/cm and a separation length of (a) 0.9, (b) 1.6, and (c) 11.1 mm. Reproduced from Ref. 18 with permission of the publisher.

$$N = 5.54 \times t^2 W_{1/2}^{-2} \quad (1)$$

により算出することができるが、先の結果を基に算出した理論段数を比較すると、分離長0.9 mmにおいてローダミンおよびフルオレセインの理論段数はそれぞれ120および130段、1.6 mmではいずれも450段であった。また、分離長11.1 mmではそれぞれ15,100および11,900段となり、分離長が与える理論段数への影響は非常に大きいことがわかる。しかしながら、ここで使用された試料中の2成分を分離するためには10,000段以上のカラム効率は要求されておらず、120段程度のカラム効率においても十分な分離が得られていることに注意を払う必要がある。そしてMEにおいては分離をある程度犠牲にしても分析時間を短縮することが要求され、そのために分離長の最小値を知ることが重要になると思われる。

4.2 オンチップポストセパレーション誘導体化

MEにおいては超微量分析が可能であるが、このためには高感度で検出を行わなければならない。CEにおける同様に高感度検出が可能な高性能装置や誘導体化が模索されている。特に蛍光検出は最も有望な検出法であるため種々の検討が行われている。蛍光検出においては分析の簡便化を図るために蛍光標識をオンラインで行うことが望まれる。そこで、Jacobsonら(27)は*o*-phthalaldehyde (OPA)によりアミノ酸を誘導体化する高速反応をモデルとしてMEにおけるオンチップポストセパレーション誘導体化について検討を行った。マイクロチップ上にはフォトリソグラフィ技術を伴ったエッチングによりFigure 9に示すような5つのリザーバー、クロスインジェクター、セパレーションチャンネル、試薬混合用分岐チャンネルおよび反応チャンネルをもったオンチップポストセパレーションリアクターを構築した。

廃液リザーバー (waste reservoir) および試料廃液リザー

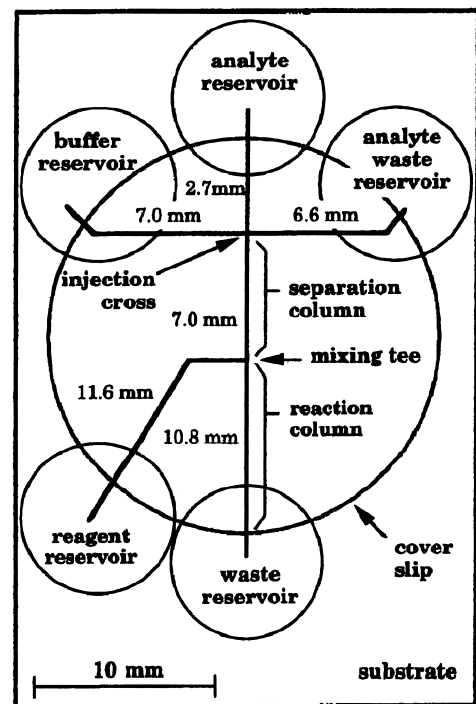


Figure 9. Schematic of the microchip with a post-separation reactor. Reproduced from Ref. 27 with permission of the publisher.

バー (analyte waste reservoir) を接地 (0 kV) し、試料導入は泳動用緩衝液リザーバー (buffer reservoir) および試料リザーバー (analyte reservoir) の電圧印加を切り替えることにより行い、印加時間により導入量を制御した。また、分離後の試薬導入および混合も試薬リザーバー (reagent

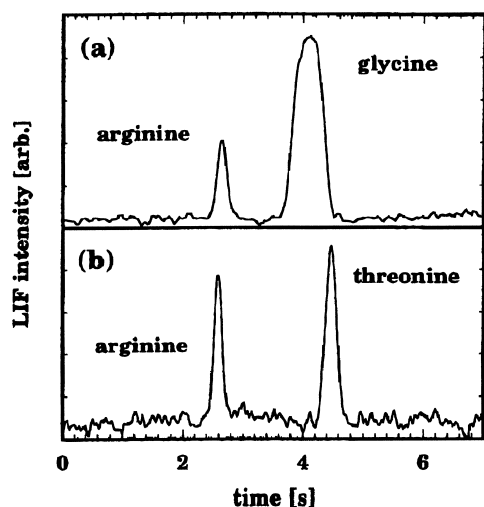


Figure 10. Electropherograms of (a) an arginine-glycine mixture and (b) an arginine-threonine mixture using post-separation derivatization with OPA. Reproduced from Ref. 27 with permission of the publisher.

reservoir) に電圧を印加することにより電氣的に行った。アルギニン (Arg) とグリシン (Gly) の混合物およびアルギニンとスレオニン (Thr) の混合物を試料として分析した結果、Figure 10に示すようにガラスマイクロチップ上でのOPAポストセパレーション誘導体化を行うことができた。

しかしながら、印加電圧およびOPA試薬混合部から検出部までの距離を変化させた場合に蛍光強度が変化したことから、検出されるまでに反応が完結しなかったことがわかる。また、Figure 10 aにおいてGlyが著しく幅広いピークを与えていることがわかる。Figure 10 bにおいてGlyよりも移動時間の遅いThrが鋭いピークを与えていることからGlyピークのブロードニングは自然拡散によるものではないことがわかる。電場において誘導体化を行う場合、著者らにも経験があるが [28] 誘導体化により原料と誘導体の移動速度が異なる場合にはこのような特徴的なピークのブロードニングがみられる場合がある。Figure 10の結果から考えるとArgおよびThrに比べてGlyは誘導体化されて移動速度が大きく変化したために著しいピークブロードニングを起こしたものと思われる。また、反応速度はピークの広がりに対して大きな影響をもつ。Figure 10の例では誘導体化の反応速度に対して分析時間が短いためこのような結果を与えたものと考えられ、このように考えるとMEにおけるオンチップポストセパレーション誘導体化においては、反応速度の速い誘導体化反応を選ぶことが予想以上に重要である。また、分析時間が長くなることは避けられないが、チャンネルの長さあるいは印加電圧を変更して誘導体化効率を高くすれば良好な結果が得ら

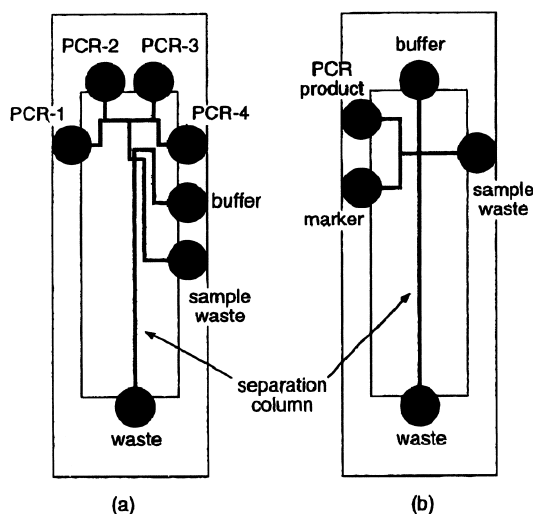


Figure 11. (a) Schematic of a microchip used for PCR amplification and electrophoretic analysis of multiple DNA samples. (b) Schematic of a microchip used for sizing PCR products with DNA markers. Reproduced from Ref. 29 with permission of the publisher.

れるものと思われる。

4.3 細胞内DNAのオンチップPCR生成物分析

マイクロチップ上での流体分析装置の開発初期段階においてその目的の一つとして試料の前処理、希釈、混合、分析および検出の全行程をチップ上で行うこと、すなわちLab on chipと呼ばれるコンセプトを実現しようとする努力がなされた。Watersら [29] は、試験的に3種類のDNA試料についてpolymerase chain reaction (PCR) による増幅を1つのマイクロチップ上で行い、それぞれの試料からのPCR生成物を同一チップ上で混合して電気泳動を行った。また、PCR生成物を塩基対マーカと混合し電気泳動を行うことによりサイズの決定を行った。PCR反応槽、混合チャンネルおよび分離チャンネルを備えたガラス製マイクロチップのチャンネルデザインをFigure 11に示す。

複数のDNA試料の同時増幅およびPCR生成物の電気泳動にはFigure 11 aに示したデザインのマイクロチップを使用し、DNA試料の塩基対サイズの決定にはFigure 11 bに示したマイクロチップを使用した。チャンネル内面をリニアージメチルアクリルアミド (PDMA) により被覆したのち4% PDMAを含む泳動用緩衝液をチャンネル内に満たして電気泳動を行った。試料には199、346、410 および346/410塩基対 (bp) のDNA断片を用い、PCR反応には市販 (Perkin-Elmer) のPCRキットを使用した。同時増幅を行ったPCR生成物の泳動図をFigure 12に示す。

その結果、199 bpのものは150 sec (Figure 12 a)、410 bp

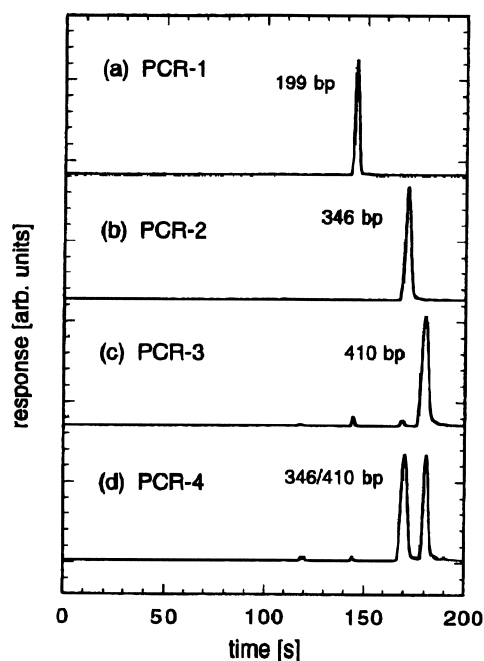


Figure 12. Electropherograms of the PCR products made from four DNA samples and analyzed on the same microchip. Targets: (a) 199 bp; (b) 346 bp; (c) 410 bp; (d) multiplexed 346 and 410 bp. The microchip (Figure 11 a) was filled with 4% (v/v) PDMA, the separation length was 3.0 cm., and the separation field strength was 130 V/cm. The microchip channels were approximately 50 μm wide and 10 μm deep. The numbers denote fragment size in base pairs. Reproduced from Ref. 29 with permission of the publisher.

のものは190 sec (Figure 12 c) にピークを与えピーク形状も良好であった。一方、346 bpおよび410 bpが共存する場合のPCR生成物は互いにほぼ同等のピーク高さを与え (Figure 12 d) どの試料についてもPCR反応が同等に行われたことがわかる。また、346 bpおよび410 bpの移動時間と346/410 bp混合物の移動時間もよく一致しており分析の精度は良好であった。

しかしながら、移動時間をそのままピークの同定に使用できるほどの精度ではなく、ピークの同定には標品との共泳動が適しているものと思われた。そこで、同一試料をPCR反応後bpマーカーと混合し分析した。得られた泳動図をFigure 13に示す。

いずれについても180 sec以内に分析が終了し良好な分離が得られている。これらのデータを基に電気泳動移動度を算出しDNA断片サイズ (bp) に対してプロットしたところ良好な相関性が示された。この実験においては試料とPCR反応

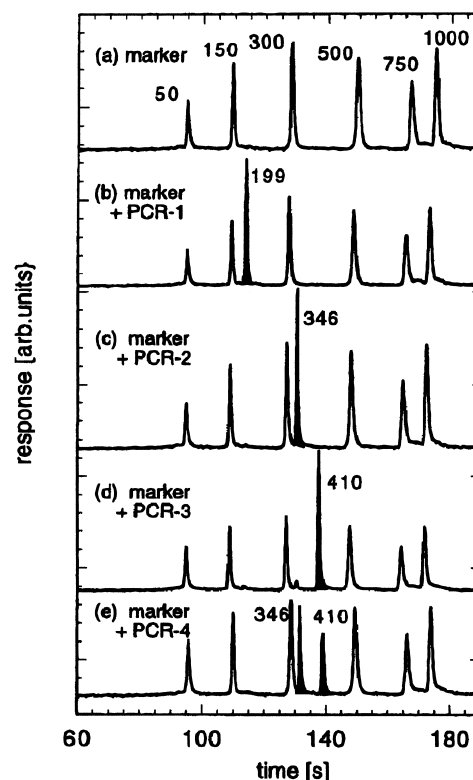


Figure 13. Electropherograms of the PCR products (filled peaks), amplified as analyzed on the single microchip and shown in Figure 12, mixed with 50-1000 bp DNA ladder (unfilled peaks). The microchip (Figure 11b) was filled with 4% (v/v) PDMA, the separation length was 2.5 cm., and the separation field strength was 120 V/cm. The microchip channels were approximately 74 μm wide and 10 μm deep. The numbers denote fragment size in base pairs. Reproduced from Ref. 29 with permission of the publisher.

用試薬との混合はチップ上で行われなかったが、これらの結果を基に今後さらに検討を続けるならば、MEにより煩雑な分析の全行程を1つのチップ上で短時間に自動的に行うことができるようになるものと思われる。

4.4 環状チャネルによる分離長可変マイクロチップ

MEにおいては、CEにおけると同様に分離チャンネル内に充填する泳動液を変更することにより種々の分離モードを実現することができる。CEにおける代表的な分離モードとして電荷/サイズ比により分離を行うゾーン電気泳動 (zone electrophoresis, ZE) 泳動液中に臨界ミセル濃度以上の界面活性剤を添加しミセルへの試料の可溶化の違いにより分離を行うミセル動電クロマトグラフィー (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)、ゲルを充填しサイズ分離を行うゲル電気泳動 (gel electrophoresis, GE) などがあげられるが、von Heerenら [30] はMEKCおよびGEによる分離をME

に適用して蛍光標識アミノ酸の分離を行った。

また、MEにおいてチャンネルを自由に設計できるため、Figure 14に示すような環状にレイアウトしたマイクロチャンネルを構築し、分離長可変マイクロチップを作成した。

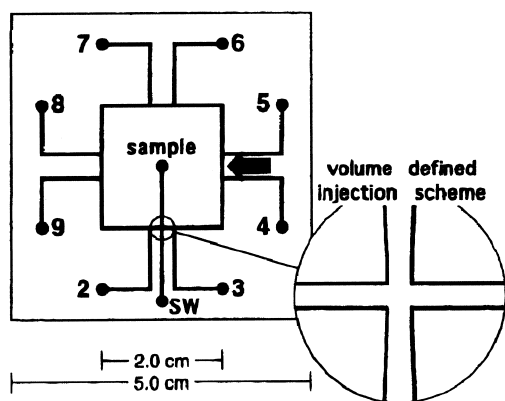


Figure 14. Layout of the cyclic channel on a chip and the volume-defined injection scheme. Numbers 3, 5, 6 and 8 and SW constitute reservoirs into which the channel effluent is electrokinetically pumped, whereas 2, 4, 7 and 9 and "sample" are reservoirs from which electrolytes are introduced into the channel system. Reproduced from Ref. 30 with permission of the publisher.

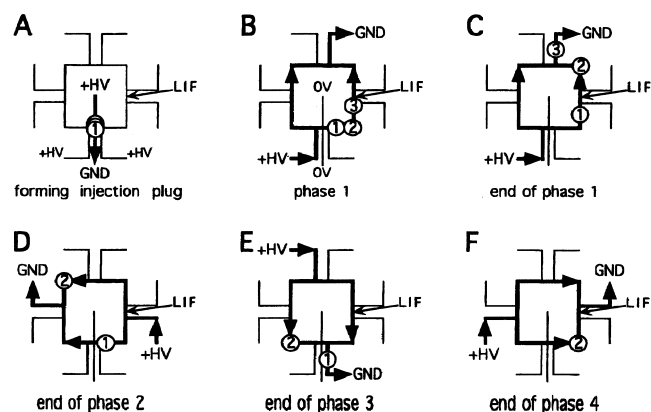


Figure 15. The principle of synchronized cyclic electrophoresis. The separation of three sample components 1-3 over 1 cycle is illustrated. The direction of fluid and sample transport are indicated by the arrows. LIF refer to the location where samples are detected. The voltage switching protocol is synchronized to cycle component 2: (A) injection phase, (B) time point during phase 1, (C) end of phase 1, (D) end of phase 2, (E) end of phase 3, and (F) end of phase 4 and end of first cycle. Reproduced from Ref. 30 with permission of the publisher.

環状チャンネル内で複数の成分を電気泳動した場合の電源のスイッチングおよび各成分が移動の様子を模式的にFigure 15に示す。この原理により多成分の試料を必要最低限の時間で全て分離することができた。

移動速度の異なる3成分 ~ が電気的に導入された (A) のち、インジェクターチャンネルの電源は遮断され、環状チャンネル内で電気泳動が行われ、1回目の検出が行われる (B, phase 1)。各試料の移動速度が著しく異なる場合には移動速度の速い成分 () は1回目の電源切換が行われるまでにリザーバーチャンネルに達し環状チャンネル外へ移動する (C) ためこれ以降には検出されない。成分 が検出器を通過後電源が切り換えられ (phase 2) 成分 および が逆方向に移動し完全に分離される。これは極端な例であるが、移動速度の違いが小さい成分間においても同様の切換により、環状チャンネル内で循環を繰り返すことにより全ての成分が分離されることになる。

ガラス製のマイクロチップを用いた場合にはLIFによる検出が最も効果的であるため、von Heerenら [30] はアミノ酸の誘導体化にはアルゴンレーザーを用いて誘導体をLIF検出できるfluorescein-isothiocyanate (FITC) を用いた。アルギニン (Arg)、グルタミン (Gln)、フェニルアラニン (Phe)、アスパラギン (Asn)、セリン (Ser) およびグリシン (Gly) のFITC誘導体を試料として環状チャンネルマイクロチップを用いMEKCモードおよびGEモードにより分析した結果をFigure 16に示す。

MEKCモードによる分離 (Figure 16 A) を行った場合、1/4 cycleでArgは他のアミノ酸から完全に分離し、2回目の1/4 cycleでは他の5種類のアミノ酸誘導体も良好に分離された。Argは移動速度が速いため環状チャンネル外に移動し検出されなかった。次に3回目の1/4 cycleにおいてはArgの次に移動速度の速いGlnおよび最も移動速度の遅いGlyが検出されなかったが、Asn、PheおよびSerは基線まで分離された。また、4回目の1/4 cycleにおいてはAsnおよびSerのみが検出された。一方、GEモードによる分離においては分子量の小さい成分から順に移動して検出され、この場合もMEKCモードの場合と同様に、1/4 cycleでArgが他のアミノ酸から完全に分離され、以後の循環において他のアミノ酸についても良好な分離が得られた。また、MEKCおよびGEモードのいずれにおいても6種類のアミノ酸全てが分離するまでに要した時間は200 sec以内であった。比較のためCE装置を用いて同一試料をMEKCにより電気泳動した場合の泳動図をFigure 17に示す。この場合は石英製のキャピラリーを使用し、220 nmにおける紫外外部検出を同時に行った。LIF検出を行った場合には高感度での検出が可能であり、UV検出を行った場合にも中性マーカーであるメタノールおよびSDSミセルの移動指標となるメサドンを含む8成分が検出され分離も良好であった。LIF検出した場合についてMEをCEと比較すると、CEでは試料のFITC 標識アミノ酸の濃度は各10 μ M

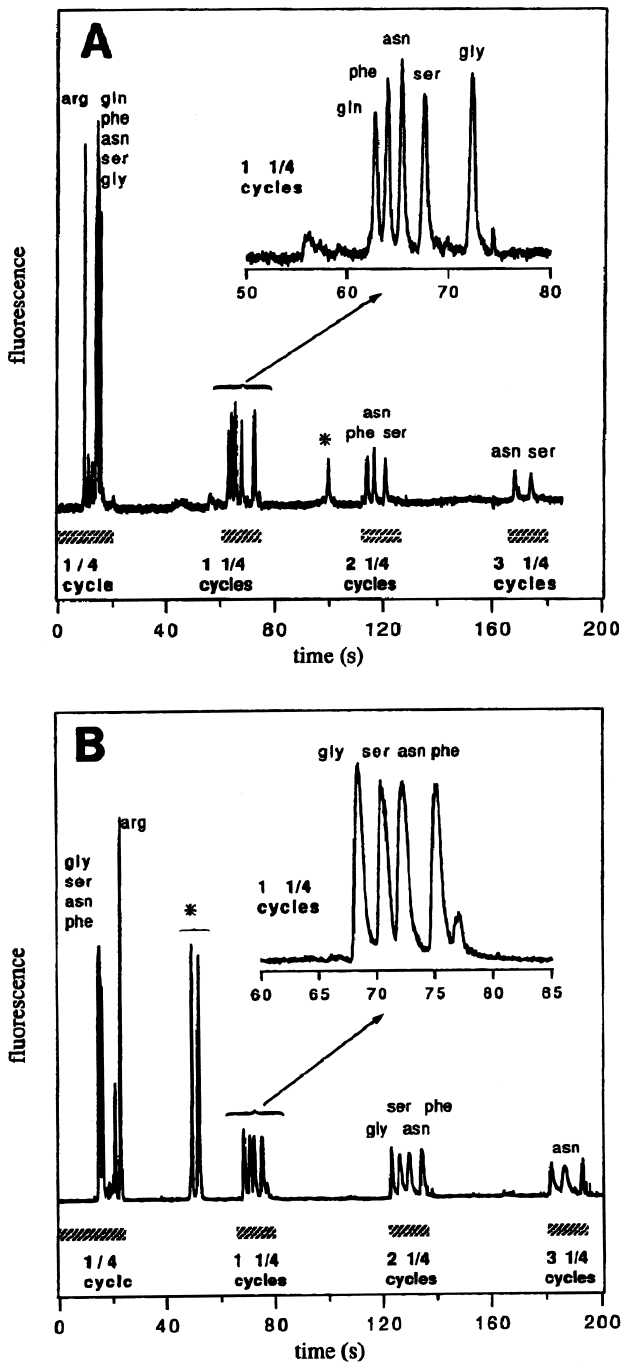


Figure 16. Synchronized cyclic electrophoretic separation of FITC-labeled amino acids using (A) MEKC and (B) GE modes. Synchronization time intervals were 13.5 and 14.4 sec, respectively. Reproduced from Ref. 30 with permission of the publisher.

であったのに対してMEにおいては、MEKC分離の場合 (Figure 16 A)、各166 μ Mであり高濃度を要した。分離カラムの形状や素材による集光効率の違いによりこのような濃度感度の差が生じたものと考えられる。一方、導用量で比較すると

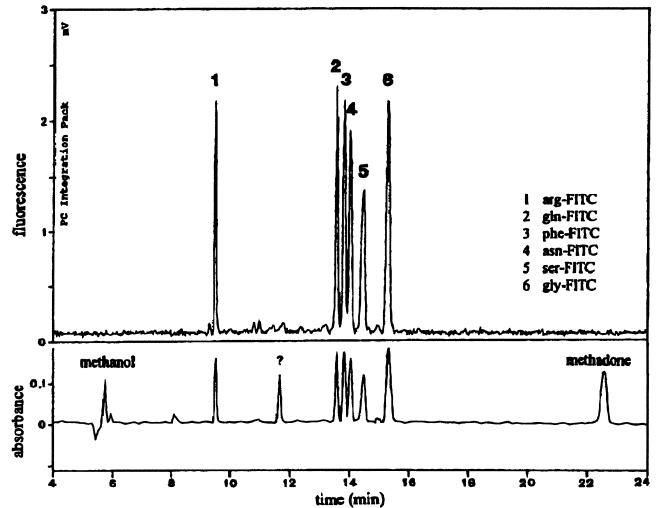


Figure 17. MEKC separation of FITC-amino acids in conventional instrumentation using a fused silica capillary of 75 μ m i. d., and 50 cm effective length. An instrument featuring simultaneous absorbance (lower graph) and fluorescence (upper graph) detection was employed, and the sample also contained methanol and methadone as markers for electroosmotic flow and micelle transport, respectively. Reproduced from Ref. 30 with permission of the publisher.

CEではnLレベルであったのに対し、MEにおいては \sim 12 pLであった。したがってMEは濃度感度においては十数倍劣っていたが、分析に必要な試料体積を考慮し、試料絶対量として比較すればマイクロチップを用いることにより十数倍程度の微量化が達成されたことになる。

このようにMEをCEと比較すると一長一短であると言える。MEではCEに比べて濃度感度が低い反面試料導用量が少ないということは薬物・生体成分分析や環境分析にとっては有利である。また、分析時間が短いということはルーティン分析等には適しているが、分離能はCEに比べ低い。このため多数成分の分離は望めない。このようにMEにおいてもCEの開発段階と同様な問題点が生じており両者には共通の問題が多い。

4.5 マイクロチップ電気泳動による細胞分析

細胞を膜を破壊せずにそのままの状態で行う方法についてはこれまでに種々検討が行われており、動物細胞モデルとしての赤血球をCEにより分離した例が報告されている。LiとHarrison [31] はMEによりイヌ赤血球の分析を行った。彼らは、MEにおいては流路の分岐をデッドボリュームなしで作成できるため、double-T junctionをもったガラス製マイクロチップ (Figure 18) を作成し、電気泳動中に添加剤を流入させこれによる影響を調べた。

本来このレイアウトのマイクロチップは試料導入量を電圧や時間ではなく体積により制御して再現性を高める目的でデザインされたものであるが、試料をBuffer (B)リザーバーから導入し、Sample (S)リザーバーから添加剤を流入させ、添加剤の混入による試料の泳動挙動の変化をCCDカメラを用いて観察することにより物質間相互作用を直接的に映像として調べることができる。この装置を用いてイヌ赤血球を電気泳動し、流路の分岐点から界面活性剤であるsodium dodecyl-sulfate (SDS)を含んだ泳動液を流入させ、赤血球に対する影響を調べた。

赤血球をBから導入し、3 mM SDSをSから流入させこれらのリザーバーに150 Vの電圧を印加しsample waste reservoir (SW)を接地(電位0 V)した。その結果、Figure 19の白の矢印で示すような溶液の流れが生じた。Figure 19 aは赤血球が写真左方から移動し上方からSDSが流入しチャンネル交差部で混合されている様子が示されている。番号をつけた4個の赤血球のうち写真上部にある2個(1および4)の赤血球がFigure 19 bにおいて溶血し始めていることがわかる(図中では見難いが、細胞の番号はいずれの図においても右から順に1、2、3、4となっている。) Figure 19 cにおいては1はフレームアウトしているため確認できないが、4は完全に溶血し2および3も溶血し始めていることがわかる。このようにマイクロチップ電気泳動を利用することにより、これまで観察することが困難であった秒単位での高速で起こる細胞と界面活性剤など外的物質との相互作用を観察することが可能であることが示された。しかしながら、重力が存在する条件下で実験を行う場合には、細胞が沈降しチャンネル内面との間の摩擦あるいは内壁との相互作用による異常挙動が加わる可能性があるため、このまま速度論的な解析を行うことは困難であると考えられる。しかし、CEにおける細胞分析のような無重力下での測定あるいは細胞の比重を考慮した泳動液の選択やチャンネルの垂直配置など、内壁との接触を最小限に抑える工夫によりさらに詳細な情報が得られるものと思われる。

最近ではMEに関する研究が盛んに行われるようになりさまざまな研究結果が報告されているが、ここでは特にMEの特徴を活かした応用例を選び、そのいくつかについて最近の報文を基に紹介した。これらはいずれも他法においては実現することが困難なものであり、MEの優れた性能を立証しているが、これらの研究を通してMEは超微量超高速分析であるがゆえに独自の問題点をもつことも同時に明らかになった。例えば、装置がコンパクトであるがゆえに分離あるいはオンチップで反応を行うための十分な流路長を確保することが困難であることがあげられる。また、可動装置を用いずに電圧印加を制御することにより送液をコントロールできることは利点であるが、一方ではこのことが原因になってチャンネルの分岐点において歪んだゾーンが形成されやすいことなど

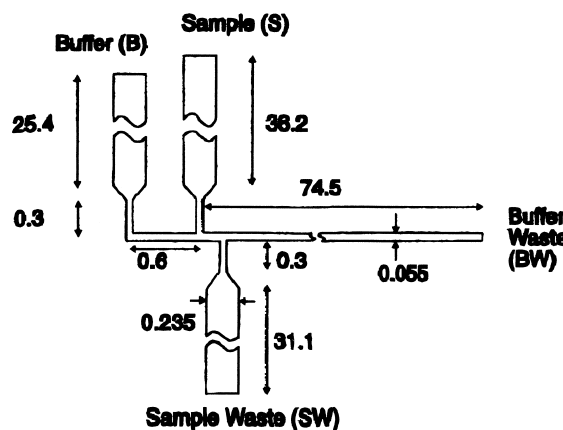


Figure 18. Layout of the microchip device having a double-T injector. Reproduced from Ref. 31 with permission of the publisher.

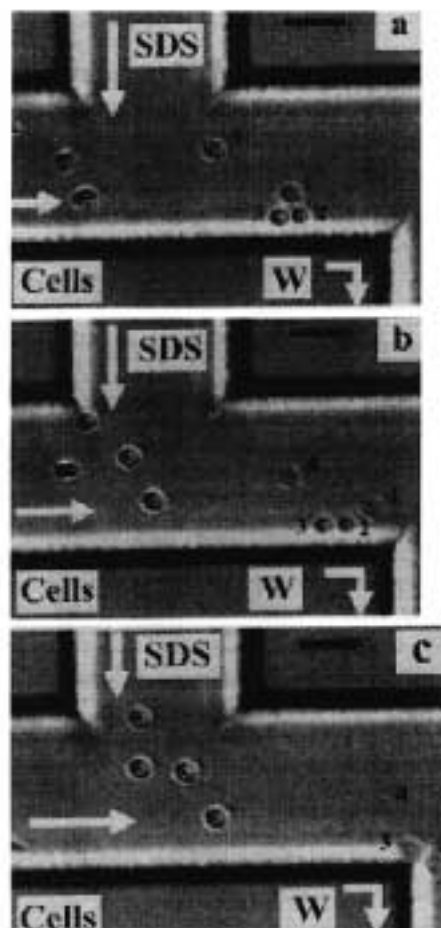


Figure 19. Photomicrographs of erythrocyte cell lysis in a microchip devices. The white arrows show direction of flow and black bars shows the scale (20 μ m). Cells enter from the left and SDS from above. A time progression over 0.3 sec is illustrated in the three frames. Reproduced from Ref. 31 with permission of the publisher.

が問題として提起された。これらの問題点は、屈曲したチャンネルを構築したり流路内径を細くするなどの微小加工技術や正確に電源のスイッチングを行えるリレイの開発など電気部品の改良により徐々にではあるが解決されつつある。また、微小な構造のマイクロチップ内を分析毎にコンディショニングすることは容易ではなく、チップのディスポーザブル化が望まれるが、最近ではマイクロチップの鑄造法および安価で高性能なチップ素材の検討が行われている。このようにMEにおける技術が次第に進歩している。

5 おわりに

本総説においては種々の素材を用いたME装置の作成法、MEの特徴および応用について代表的な報文を選び紹介した。この新しい分析法の利点は最新の技術により流路を自由にデザインでき、しかも分岐点におけるデッドボリュームを無くすることができるということに集約されるが、チャンネルの短小化という考え方が根底にある。この利点をどのように利用して展開していくかが今後の課題であると言える。

まず導入する試料を少なくする必要があり、また少なくすることができるという特徴を活かせば、他の分離分析法ではみられない程狭いプラグ幅、したがって小さい理論段高のピークから成る超微細泳動図を得ることができる。この特徴は短時間で多数の成分を同時分析できることを意味し、高速～超高速分離へと繋がっていく。現在達成されている分離は6本/sec程度であるが、より精巧なチャンネル作成技術を開発し、レスポンスの速いデータ収集や解析などに関する周辺装置を高機能化すればさらに高速化が可能になるものと思われる。そのような高速化が実現できれば、多数検体を短時間で分析できることになり臨床分析には威力を発揮するであろう。また、高速分析はリアルタイム分析に近づくことを意味し、ベッドサイド分析等には有力な方法として迎えられるものと考えられる。勿論それらの生体試料分析においては高濃度のタンパク質等複雑なマトリックスによるチャンネルの汚染を、有効な洗浄法により取り除かなければならない。そのようなチャンネルの復元は決して容易ではなく、他方ではディスポーザブルマイクロチップの開発を促すことになる。ディスポーザブルマイクロチップに適した素材はそれなりの制限を受け、高感度検出に対して有利とは言えないため、パルス照射と吸光度の積算を組み合わせた検出法などが主流となり、超高感度ではないが実用性からは十分評価できるようなMEが実現し、臨床応用が盛んになることも期待できる。

一方、短いチャンネルで分離を行うMEにおいては、CCDカメラを用いてインジェクター内の様子を同時にモニターすることもできるため、単一細胞を導入し電圧印加中の細胞の挙動を調べることが可能である。従来単一細胞を分析系に導入する場合にはマイクロマニピレーターなど大掛かりな装置が必要であったが、MEにおいては電圧印加を精細にコント

ロールすればそのような特別な装置を用いることなく細胞分析を行うことが可能であると考えられ、個々の細胞について詳細な情報が得られるものと思われる。また、細胞分析とともに単一細胞内成分の分析にとってもMEは有力な方法である。これには十分にキャラクタライズされた細胞を対象として内液をチャンネル内に導入するデバイスが必須である。細胞内成分の分析は細胞取り扱い技術の進歩と相まって発展するであろうが、その先には細胞内部位ごとの成分分析という新天地が見えている。

一方、著者らはCEが物質間相互作用の観察をする上で有効な方法であることを示してきたが、試料が複合体を形成することにより起こる移動速度の変化(遅延)があまりにも著しい場合には分析時間が長くなるという問題点があった。しかし、MEにおいては試料導入点から検出部までのチャンネルの長さを短くすることができ、これにより泳動液や印加電圧を変えずに同一の分析条件において短時間で結合解析を行うことができる。したがって、MEは結合解析においてもその迅速性を高く評価することができる。

4 2および4 3で述べたようにMEにおいてはチップ上に多くの溶液リザーバーおよび複雑に分岐したマイクロ流路を構築し、これに充填した泳動液中で試料、誘導体化試薬、酵素、マーカーなどを電圧コントロールにより移動させ、希釈、混合、反応および分析を1つのチップ上で行うことができる。特にDNAのPCRをオンチップで行い生成物をそのまま分析できることは、これまでにない画期的な手法であるといえる。オンチップPCR-MEを利用することや超高感度で検出できる検出法の適用により、高速でのヒト遺伝子の読解も可能になると考えられ、個人レベルでの詳細な遺伝子解析が可能になれば従来行われているよりも高度な遺伝子診断が可能になると思われる。遺伝子レベルでの異常に基づく疾病が数多く存在しこれらは現在原因が解明されていないために症状を抑える治療に止まっている。より詳細な個人レベルの遺伝子に関する情報を得ることができればそれらの疾病を根治できる可能性にまでつながるものと思われる。このようなMEのもつオンチップ多行程連続処理能という特性はゲノム解析ばかりでなく、他の生体成分や環境物質の分析にもいづれ適用されていくであろう。

以上MEの利用面を中心として将来の展望を述べたが、それぞれの応用について多くの問題が残されており、これらを解決する必要があるが、今後分析装置のチップ化というコンセプトを前面に出して多くの研究者たちがさらに検討を行い改良を加えていくなれば、種々の分析において微量化、高速化、簡便化、および高精度化が可能になると考えられる。

参考文献

- [1] Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. *Science* **1991**, 251, 767-773.

- [2] Service, R. F. *Science* **1998**, 282, 396-399.
- [3] Colyer, C. L.; Tang, T.; Chiem, N.; Harrison, D. J. *Electrophoresis* **1997**, 18, 1733-1741.
- [4] Mitchelson, K. R.; Cheng, J.; Kricka, L. J. *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 448-458.
- [5] Altria, K. D. *J. Chromatogr. A* **1999**, 856, 443-463.
- [6] Manz, A.; Fettingner, J. C.; Verpoete, E.; Lüdi, H.; Widmer, H. M.; Harrison, D. J. *Trends Anal. Chem.* **1991**, 10, 144-149.
- [7] Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoete, E. M. J.; Fettingner, J. C.; Paulus, A.; Lüdi, H.; Widmer, M. *J. Chromatogr.* **1992**, 593, 253-258.
- [8] Fan, Z. H.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 177-184.
- [9] Jacobson, S. C.; Moore, A. W.; Ramsey, M. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2059-2063.
- [10] Martynova, L.; Locascio, L. E.; Gaitan, M.; Kramer, G. W.; Christensen, R. G.; MacCrehan, W. A. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4783-4789.
- [11] Duffy, D. C.; MacDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4974-4984.
- [12] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verhaghen, T. P. E. M. *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 11-20.
- [13] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298-1302.
- [14] Hjertén, S.; Elenbring, K.; Kilar, F.; Liao, J.; Chen, A. J.; Sibert, C. J.; Zhu, M. D. *J. Chromatogr.* **1987**, 403, 47-61.
- [15] Hjertén, S. *J. Chromatogr.* **1985**, 347, 191-198.
- [16] Towns, J. K.; Regnier, F. E. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1126-1132.
- [17] McCormick, R. M.; Melson, R. J.; Alonso-Amigo, M. G.; Benvegnu, D. J.; Hooper, H. H. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2626-2630.
- [18] Jacobson, S. C.; Hergenröder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1114-1118.
- [19] Seiler, K.; Harrison, D. J.; Manz, A. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1481-1488.
- [20] Jacobson, S. C.; Hergenröder, R.; Koutny, L. B.; Warmack, R. J.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1107-1113.
- [21] Hadd, A. G.; Raymond, D. E.; Halliwell, J. W.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3407-3412.
- [22] Seiler, K.; Fan, Z. H.; Fluri, K.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3485-3491.
- [23] Shultz-Lockyear, L. L.; Colyer, C. L.; Fan, Z. H.; Roy, K. I.; Harrison, D. J. *Electrophoresis* **1999**, 20, 529-538.
- [24] Effenhauser, C. S.; Paulus, A.; Manz, A.; Widmer, H. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2949-2953.
- [25] Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 720-723.
- [26] Jacobson, S. C.; McKnight, T. E.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4455-4459.
- [27] Jacobson, S. C.; Koutny, L. B.; Hergenröder, R.; Moore, Jr. A. W.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3472-3476.
- [28] Taga, A.; Nishino, A.; Honda, S. *J. Chromatogr. A* **1998**, 822, 271-279.
- [29] Waters, L. C.; Jacobson, S. C.; Kroutchinina, N.; Khandurina, J.; Foote, R. S.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5172-5176.
- [30] Heeren, F. von; Verpoete, E.; Manz, A.; Thormann, W. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2044-2053.
- [31] Li, P. C. H.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1564-1568.