

Focussing Review

マイクロチャンネルを用いたキャピラリー電気クロマトグラフィー

内山一美*、除 偉、保母敏行

Capillary Electrochromatography Utilizing Microchannel

Katsumi Uchiyama*, Wei Xu and Toshiyuki Hobo

Department of Applied chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo metropolitan University

Received for review August 1, 2001. Accepted September 5, 2001.

1 はじめに

分析化学におけるダウンサイズ化の究極の姿として半導体の微細加工技術を利用したマイクロ化学分析^{1,2}が注目を集めている。即ち主にガラス或いはプラスチックなどの基板にフォトリソグラフィ、化学或いは物理的エッチングにより幅10~200 μm、深さ1~50 μm程度の微細な溝を作製し、この溝を分離場や反応場として用いるものである。このような微細な流路中では物質の拡散による反応、分子間の相互作用が顕著になるため、きわめて効率の高い反応が期待できると同時に、全体として使用する試薬量が非常に少ないという利点がある。この分野において分離分析で特に注目されているのはマイクロチップを用いた電気泳動法(CE)ないしは電気クロマトグラフィー(CEC)であり、これはマイクロ化学分析の大きな一分野となっている。これらの方法では流路に高電圧を印加することにより発生する電気浸透流(EOF)をその駆動力として用いている。

マイクロチャンネルをCEに応用した例は数多く知られているが、そのほとんどはガラス^{2,3}のチップである。これらの材料は光学的に透明、堅牢などの利点を有する。またポリジメチルシロキサン^{4,5}(PDMS)やポリメチルメタクリレート⁶(PMMA)、ポリスチレン⁷(PS)などの高分子をチップ材料として用いた例もいくつか報告されており、これらは取り扱いの容易さ、安価・ディスプレイ化が可能などの利点がある。いずれのマイクロチャンネルにおいても、装置の小型化、試料導入の再現性の向上と微小化、自由な流路設計の可能性などが利点としてあげられる。

微小液体流路をクロマトグラフィーの場として用いようとする試みは、ガスクロマトグラフィーの中空カラムと同様の着想により多くなされている。ガラス基板上に作成したマイクロ流路を用いたものでは、流路に機能性の固定相を充填し

たもの、充填剤として粒子状のものでなく一体化した充填剤を満たしたもの、マイクロ流路内表面を利用したオープンチューブタイプのものなどがある。送液には電気浸透流を用いるものをはじめとして、ポンプで圧送したHPLCモードを用いたものなどが報告されている。本稿ではそれぞれについて著者らの興味に従って取り上げ、それぞれの特徴と今後の可能性について述べる。

2 充填型固定相を用いたマイクロチャンネルCEC

マイクロチャンネルをCEC用に使用するには、何らかの方法で固定相をチャンネル中に作製し、フリットなどを用いて充填剤を固定しなければならない。マイクロチャンネルは、通例微細な溝をつけたガラスプレートと試料導入用孔をこのガラスプレートの対応する位置に空けたカバープレートを陽極接合或いは熱接合により接合して用いる。しかし接合後のマイクロチャンネルに再現性よくフリットを作製するのは難しい。そこでガラスの微細加工技術を利用して、流路に流路の深さよりも若干低い堰を作りこの堰の間の空間を充填剤溜めとして用いる方法が報告されている⁸。この流路の概観をFigure 1に示す。堰の高さは9 μmでチャンパー深さは10 μmであるので蓋と堰の間には1 μmの隙間ができる。Figure 1左の図の から固定相を電気浸透流によりこのチャンパーに導入する。固定相として1.5~4 μm径のODSを結合したシリカゲル粒子を導入した。粒子の直径は先の隙間よりも大きいのでシリカゲル粒子は流れ出すことなくこのチャンパーに固定される。すなわちこの隙間がフリットとなる。微細加工により作製したチャンパーの容積は330 pLであった。試料溶液と溶離液はこの隙間を通してチャンパー内に導入され、ODS固定相によって成分が分離される。またチャンパー中のODSシリカゲルを用いたオンチップマイクロ固相抽出

が可能であり、500倍程度の濃縮が可能であった。また、チャンバーを横方向に用いると長さ200 μm の微小クロマトカラムとなり、4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7, 8-pentamethyl-4-bora-3 a, 4-diaza-s-indacene (BODIPY[®]493/503) が20秒程度で分離できた。このときの理論段高さは2 μm で高性能分離が達成された。本法は固定相を自由に選択可能であり、適用範囲が広いという点では興味深い。総合的な分離性能の点では若干不満が残る。すなわちより長い流路の実現により分離が改善されると思われる。

このような微細加工技術により作製した堰をフリットとする方法は大変興味深い。長い分離カラムを作製するのは技術的にはそれほど容易でない。そこで固定相自身を連続体とし、フリットを用いないで固定相をマイクロチャンネル中に作製する方法も報告されている。Christerら⁹⁾は高分子固定相をマイクロチャンネル中で作製し、これを固定相充填剤として用いた。クロマトグラフィー的な分離を達成するため流路は長いほうが好ましいので、折り返し構造を持つ構成とした。しかしこのような形状ではたとえフリットがうまくできたとしても先の例のような微粒子を導入することはできない。折り返しの部分で微粒子が滞留したり不均一になったりするためである。そこで連続的な高分子固定相を、モノマー溶液をカラム中で重合することにより作製した。官能基としてスルホン酸、イソプロピル基(C3)を持ったもの、アンモニウム基を有するモノマーをカラム中で *in situ* で合成した。前者はスルホン酸基により電気浸透流を発生し、イソプロピル基により弱い逆相的保持を狙ったものである。後者はタンパク質のイオン交換分離を目的とし、電気泳動でなくHPLCモードで分離を行った。いずれもマイクロチャンネル内部で重合、固化させるため壁と固定相の間隙が問題となる。そこでマイクロチャンネル内壁を化学的に処理し、ポリマーと化学結合できる構造を付与した。すなわち、種々の溶液で内壁をコンディショニング後、メタクリロキシ基を有するシラン化剤でガラス内壁を処理した。これによりアクリルアミド系のポリマーが化学的に内壁と結合し、いわゆる

“Wall Effect”の問題を解決した。また、検出窓の作製はポリエチレングリコール及び重合触媒を高濃度に満たした高粘度溶液を、緩衝液溜めから導入することにより作製した。この溶液によりシャープな界面を持った高分子固定相を作製した。彼らはこのようにして作製したポリマー固定相を“Continuous bed”と称しているが、いわゆる有機系モノリスカラムといってよい。粒子径は0.1~0.4 μm と小さく、CECで低分子化合物が、イオン交換クロマトグラフィーモードでタンパク質の分離ができた。装置はHPLCモード、電気クロマトグラフィーモードの両方が使用可能なシステムとし、試料導入はHPLCのインジェクターを用いて行った。アルキルフェノール類を先のC3カラムを用い、CECモードで分離した例をFigure 2に示す。カラムの有効長は28.1 cm、検出は240 nmのUV検出で行った。アセトンで約300,000段/mの理論段が得られた。タンパク質はイオン交換クロマトグラフィーにより良好な分離が1分以内に達成された。また、この報告のマイクロチップの作成方法がユニークであるので紹介する(Figure 3)。まず石英基板上にポリシリコンを蒸着し、このシリコンをパターニング後ドライエッチングにより除去する。次に露出した石英層をフッ化水素酸によりエッチングする。これにより半円状の断面をもった石英チャンネルができる。半円状のチャンネル上面にあるポリシリコンを酸化すると透明なSiO₂となるが、この上にTEOSを低圧CVDにより蒸着しポリシリコンにパターニングしたはじめの孔を塞ぐ。このカバーの厚さは4 μm 、チャンネルの幅は40 μm で

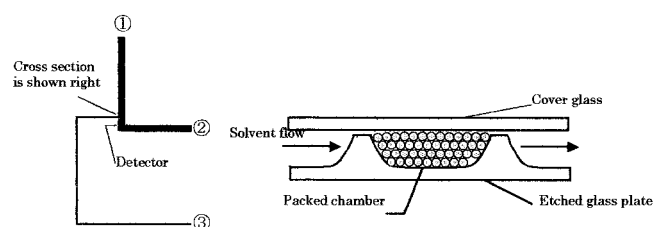


Figure 1. Drawing of microchip device used for packing and solid-phase extraction (left). 1, outlet buffer channel; 2, inlet sample/buffer channel; 3, bead-introduction channel, and cross-section of packed chamber, showing weir heights in relation to channel depth and particle size (right).

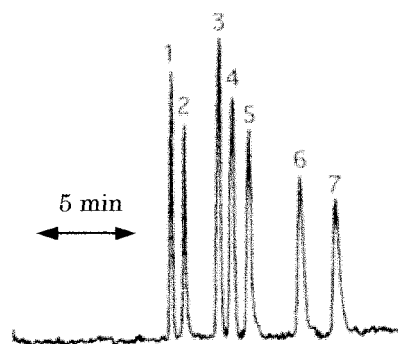


Figure 2. Electrochromatography of alkyl phenones in a chip column filled with a continuous bed derivatized with isopropyl and SO₃ ligands. Serpentine column geometry, 28.1-cm effective length; mobile phase, 5 mM sodium phosphate, pH 2.5, containing 30% acetonitrile (v/v); flow rate of the mobile phase through the inlet reservoir, 50 $\mu\text{L}/\text{min}$; applied voltage, 16 kV (500 V/cm); UV detection at 240 nm; electrokinetic injection, 1 kV, 1 s; sample concentration 0.30-0.60 mg/mL. Sample 1, acetone; 2, aniline; 3, acetophenone; 4, propiophenone; 5, butyrophenone; 6, 2, 6-dihydroxyacetophenone; 7, 2, 5-dihydroxypropiophenone, Plate/m 300,000 (acetone).

あった。

3 オープンチャンネルCEC

上記の例は充填型HPLCをスケールダウンしたものである。しかし容易に想像できるようにマイクロチャンネルのサイズ効果を生かした分離方法として中空カラムを用いた分離

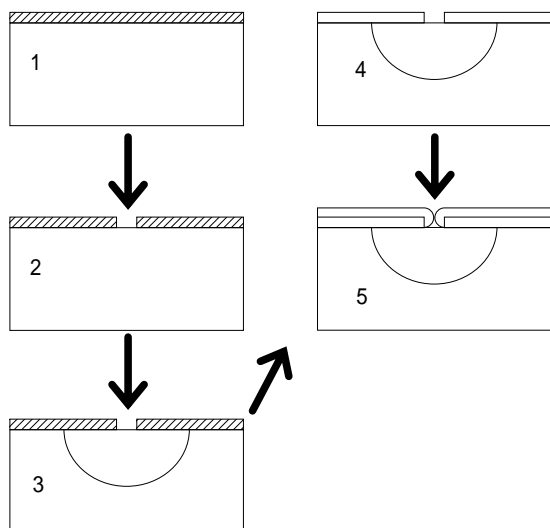


Figure 3. Process for the fabrication of channels in the quartz substrate. Poly-Si, polycrystalline silicon. The TEOS-oxide (tetraethylorthosilicate) is deposited by LPCVD. 1, Deposition of poly-Si on the quartz substrate, 2, Patterning and dry etching of the poly-Si, 3, Wet etching of the quartz, 4, Oxidation of the poly-Si, 5. Deposition of TEOS-oxide.

については多くの報告¹⁰⁻¹²⁾がある。その中でRamseyらのグループは折り返し構造をもった石英製チップによりオープンチャンネルクロマトグラフィーによる分離を報告している。オープンチャンネルはガスクロマトグラフィーにおけるGolayカラムから容易に類推される。ガスに比べて溶液の拡散係数は1,000倍以上小さいので迅速な分配が期待できないというデメリットが考えられるが、CECでは流れのプロファイルがプラグフローになること、微細な溝が作製可能であることを考慮すると十分な性能が期待できる。しかし、問題は固定相が再現性よく内壁へ構築できるかどうかである。彼らはガラス内壁を常温でオクタデシルシリル化して逆相固定相を作製¹³⁾した。また、分子拡散によって固定相と相互作用する際に最も大きな影響を及ぼすマイクロチャンネルのサイズは幅66 μm 、高さ5.6 μm とし、長さは折り返し構造により171 mmとした。チャンネルのアスペクト比(チャンネル幅に対するチャンネル深さの比率)は1/12である。チャンネルの形状をFigure 4に示す。中性蛍光色素(クマリン)の逆相分離をisocraticな系で行い良好な結果を得ている。また、溶離液の線速度と理論段高さの関係をvan Deemterの式にフィッティングしそれぞれの要素を求めたところ以下の式が得られた。

$$H_{tot} = 2 D_m/u + C_m u + 0.67 (\mu\text{m})$$

また、同様の手法を用い、2種類の緩衝液を混合しグラジエント溶離を用いたCECも行なっている。これには2つの緩衝液溜めに独立に電圧を印加し、その印加電圧をプログラムすることにより直線状のグラジエントを作製し、溶出を行っている。グラジエント溶出と高圧の電場の印加により20秒以

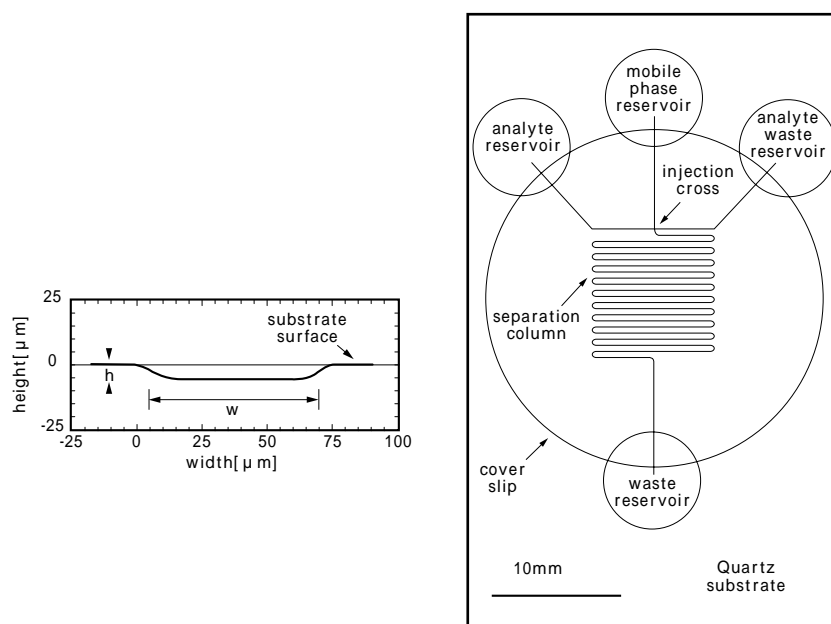


Figure 4. Schematic of the microchip with a serpentine column geometry (right) and measured profile of channel cross section with $h = 5.6 \mu\text{m}$ and $w_{0.5} = 66 \mu\text{m}$.

内に色素の分離が達成された。(Figure 5)

また、Uchiyamaらは高分子を用いたオープンチャンネルCECを報告している¹⁴⁻¹⁶⁾。ガラス製マイクロチャンネルにおける以下のような問題点を解決し、容易に中空カラムを作製する方法を考案した。1) マイクロチャンネルチップとカバーチップの接合プロセスの歩留まりが低い。2) 内壁の化学修飾の評価が困難。3) 内壁の分子機能の再現性が小さい。などである。そこでマイクロチャンネル流路のテンプレート(凸型鋳型)を作成し、これに*in situ*で機能性モノマーを重合し、高分子マイクロチップを作製した。Figure 6に高分子マイクロチップの作成方法の概要を示す。テンプレート上に適当な濃度の触媒を加えた高分子のモノマーを展開し、その場で重合させた。高分子として不飽和ポリエステル(PE)を用いた。カバーチップは平面ガラス基板の上に試料溜め及び緩衝液溜め作成用シリコンゴムを、検出窓用のガラス板を底面から約1 mmの位置におき、同様のポリエステル樹脂を重合させて作成した。二つの樹脂が約80%程度重合した後重ね合わせ、24時間放置しマイクロチャンネルを作製した。マイクロチャンネルのパターンは折り返しを持つパターンとし、分離部の長さは約35 cmとした。マイクロチャンネルは幅約70~100 μm、深さ約15 μmである。作製したポリエステルマイクロチャンネルは疎水性で水溶液の導入が困難である。しかし界面活性剤のミセル水溶液の導入は容易であった。そこでまず本マイクロチップをミセル動電クロマトグラ

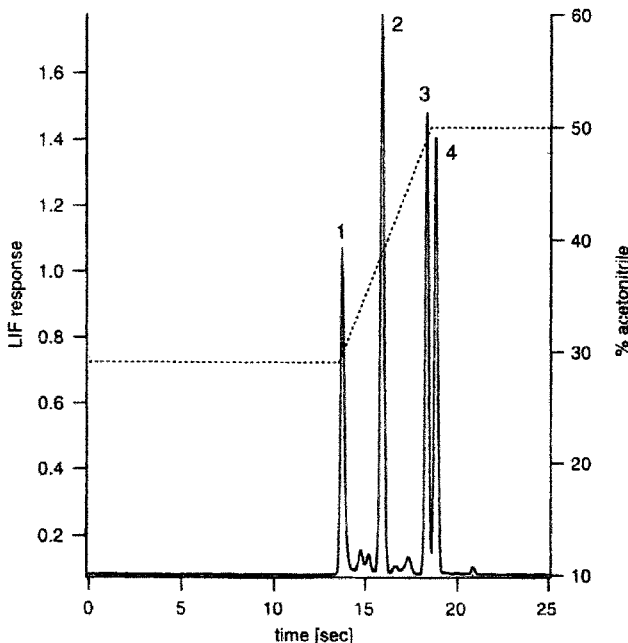


Figure 5. Fast open-channel electrochromatography on microchips. Mobile phase, 10 mM borate buffer (pH 8.4) with a linear gradient of acetonitrile from 29% to 50% within 5 s, starting 1 s after injection; analytes, 1. C 440, 2. C 450, 3. C 460 and 4. C 480.

フィー(MEKC)に応用した。検出はLIFにより行っている。モデル試料としては蛍光色素を用いた。分離能を石英製キャピラリーと比較し結果をFigure 7に示す。ガラスあるいは溶融シリカを用いたキャピラリーチューブ及びマイクロチャンネルではpHにより電気浸透流¹⁷⁾の大きさが変化する。これは主にガラス表面のシラノール基の解離によるもので、pHの低下とともにキャピラリー内表面の負電荷が減少するため電気浸透流速も小さくなる。一方本マイクロチップでこ

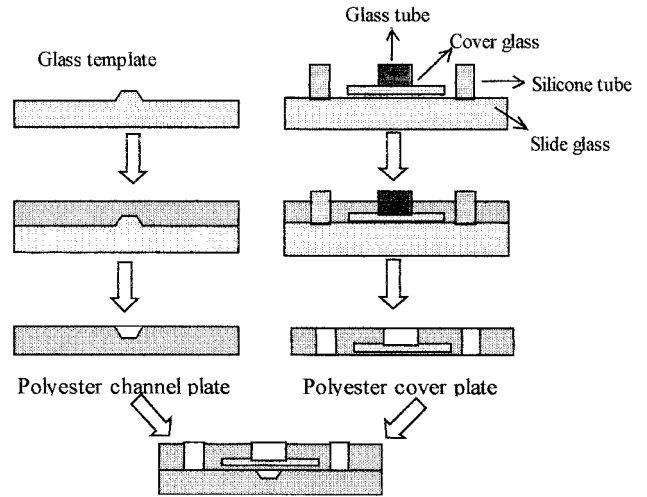


Figure 6. Fabrication procedure for polyester microchannels.

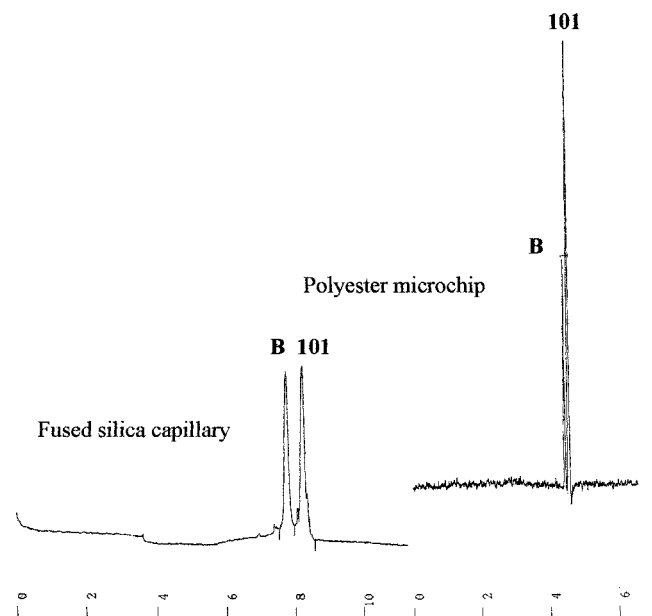


Figure 7. Comparison of the separation characteristics of Rhodamine dyes between Polyester microchip and fused silica capillary by MEKC mode, Running buffer: 10 mM borate buffer (pH 8.1) with 12 mM SDS, Sample: Sulforhodamine B+Sulforhodamine 101 (1×10^{-4} M), Electric field: 200 V/cm.

の点について検討したところ独特の性質を持つことがわかった。Figure 8に種々のpHにおける電気浸透流速の大きさを示す。溶融シリカキャピラリーの場合、シラノール基の解離に基づく電気浸透流の変化が観測され、pH 2以下では電気浸透流はほぼ0となった。一方ポリエステルマイクロチップでは測定したpH範囲ではほぼ一定の電気浸透流となった。ポリエステルの内表面で解離の可能性があるのはポリエステル主鎖末端のカルボキシル基が考えられ、そのpKaは4から6の範囲にあると思われるが、この解離に基づく電気浸透流の変化は認められない。これはSDS分子がポリエステル表面に強く吸着し、あたかも固定相のような挙動をするためと考えられる。又ポリエステル末端のカルボキシル基はSDS分子の下に隠れるためその解離が観測されなかったと思われる。同様の実験をBrij 35などの非イオン性界面活性剤を用いて行ったところ広い範囲にわたり電気浸透流が0になることを発見した。即ち長鎖アルキル鎖はポリエステルに強く吸着し擬似的固定相となることが間接的に示された。非イオン性界面活性剤の添加は等電点電気泳動などへの応用が期待される。

高分子マイクロチャンネルは再現性良く微小空間が作製可能で、そのサイズ効果を利用したクロマトグラフィーが期待される。ポリエステル重合時に適当な機能性分子を添加し、ポリエステル内表面に機能性分子を発現させこの機能性分子と試料との相互作用を利用したCECが可能である。クロスリンカーとして10-undecen-1-olを6%添加したポリエステルチップを作成した(マイクロチャンネルは半値幅72 μm 、深さ約8 μm)。高分子マイクロチャンネルチップに添加したアルケノールが内壁に発現しこれを固定相としたキャピラリー電気クロマトグラフィーを試みた。溶融シリカキャピラリー

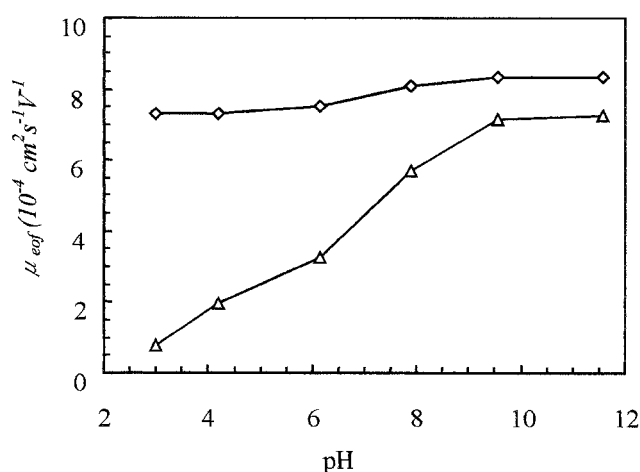


Figure 8. Effect of buffer pH on electroosmotic mobilities, Running buffer, boric acid - citric acid - sodium phosphate at the constant ion strength of 30 mM in the presence of 12 mM SDS, ○; polyester microchip, △; fused silica capillary tube (50 μm i.d.)

との分離の比較をFigure 9に示す。通常の電気泳動法では分離が不十分であることがわかるが、内壁を利用したCECでは電気泳動とクロマトグラフィーの両方のモードが混在するため完全分離が達成された。また、高分子の利点を生かしたユニークな方法として、TimothyらはPMMA製マイクロチャンネルの折り返しパターンの部分にUVエキシマレーザーを照射することにより表面電荷を上昇させ、折り返し部分でのバンドの広がりを抑えることができたと報告¹⁸⁾している。

さらに中空カラム理論的裏づけとして、Zhangら¹⁹⁾はオープンチャンネルによる電気クロマトグラフィーについて3次元のランダムウォークモデルを用い、電気浸透流で駆動されたクロマトグラフィーシステムにおける分離効率のカラムのジオメトリーについての評価をした。これは、分子拡散について3次元空間で数値解析法によりシミュレーションしたもので、時間ステップは1 msとして行った。これによって試料プラグの長さ、チャンネルの断面、矩形のチャンネルのアスペクト比についてシミュレーションを行った。分子拡散の分布をガウス型分布と仮定し、van Deemter式を直接シミュレートした。試料プラグの長さはチャンネル長さの0.4%以内であれば分離効率に対してほとんど影響がないことがわかった。保持k'の値が0.25から0.35になると理論段高さは倍になった。カラム効率に最も大きな影響を及ぼすのはチャンネルのジオメトリーである。矩形状のカラムの場合、アスペクト比が4~8に達するまで理論段高さが上昇する。また、分子拡散に最も大きな寄与をされると考えられるチャンネル深

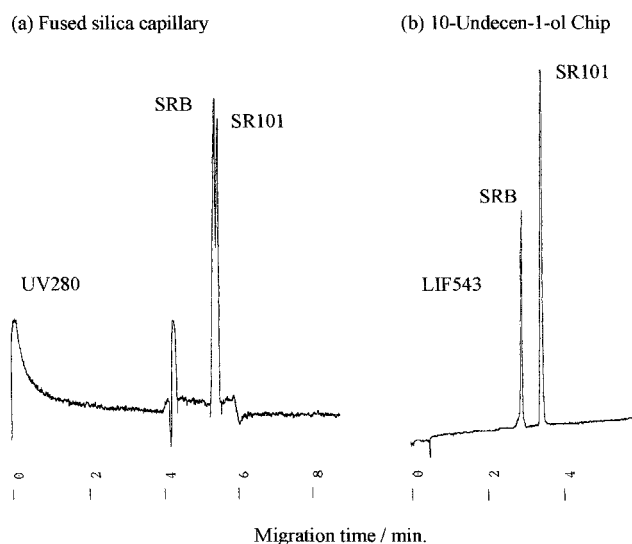


Figure 9. Comparison of 10-undecen-1-ol modified polyester micro channel chip with conventional fused silica capillary, Running buffer, 25 mM Borate buffer pH 9.6, Electric field strength, 200 V/cm, (a) fused silica capillary, (b) 10-undecen-1-ol modified polyester micro channel chip, enol : styrene ratio, 0.143.

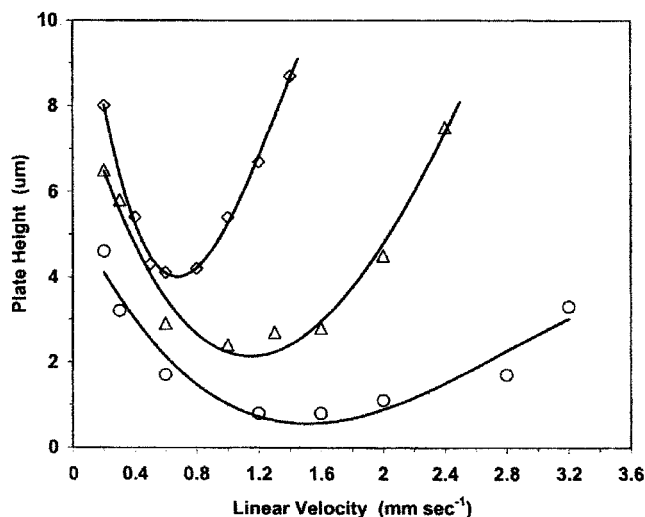


Figure 10. The impact of channel depth on plate height at a fixed aspect ratio. \circ for data derived from a $10 \times 2 \mu\text{m}$ channel; \triangle , $22.5 \times 4.3 \mu\text{m}$; and \diamond , $45 \times 8.7 \mu\text{m}$. Values set for other parameters were $N = 10^3$, $\delta t = 10^{-3}\text{s}$, $D_m = 1.6 \times 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$, $D_s = 8 \times 10^{-7}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$, $L = 2.7 \text{cm}$, $\text{ank}' = 0.25$.

さは、分離効率により大きな影響があることがわかった。Figure 10にチャンネル深さの分離効率に対する影響を示す。理論段高さの最小値の理想的な値はチャンネル深さの半分である。したがってチャンネル深さに反比例して分離効率が上昇することになる。また、オープンチューブシステムにおける分離効率は現在のバックドカラムを用いたシステムと同等である。また、矩形のオープンチャンネルはシリンダー状のオープンチャンネルよりも分離効率は低い、現在のバックドカラムよりも優れている。シミュレーションではサブミクロンの深さのマイクロチャンネルが可能であればより大きな分離効率が期待できる。現実的には並列カラムを持ったマイクロシステムが試作²⁰⁾されている(アスペクト比は5~7)のでこれが現実的であると結論している。しかし、現在の加工技術ではサブミクロンレベルもさほど困難ではないと思われ、今後の展開が期待される。

4 おわりに

以上マイクロチップを用いたCECについての最近の動向を筆者らの独断で選り紹介した。CE及びCECはマイクロ化学分析における高性能分離手段として益々重要になると思われ、今後とも日進月歩の進歩が期待される分野である。またオープンチャンネルクロマトグラフィーにおける内壁の化学構造と物質の相互作用に関する知見は化学のマイクロ化に伴い益々重要となると思われ今後の発展が注目される。

引用文献

- [1] Mantz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fetting, J. C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H. M. *J. Chromatogr.* **1992**, *593*, 253.
- [2] Harrison, D. J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.; Effenhauser, C. S.; Mantz, A. *Science* **1993**, *261*, 895.
- [3] Jacobson, S. C.; Moore, A. W.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2059.
- [4] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J.; Whitesides, A. G. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974.
- [5] Anderson, J. R.; Chiu, D. T.; Jackman, R. J.; Cherniavskaya, O.; McDonald, J. C.; Wu, H.; Whitesides, S. H.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3158.
- [6] Ford, S. M.; Kar, B.; McWhorter, S.; Davies, J. Soper, S. A.; Klopff, M.; Calderon, G.; Saile, V. *J. Microcol. Sep.* **1998**, *10*, 413.
- [7] Roberts, M. A.; Rossier, J. S.; Bercier, P.; Girault, H. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3451.
- [8] Oleschuk, R. D.; Shultz-Lockyear, L. L.; Ning, Y.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 585.
- [9] Christer Ericson, Johan Holm, Thomas Ericson, Stellan Hjerten, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 81.
- [10] Manz, A.; Miyahara, Y.; Miura, J.; Watanabe, Y.; Miyagi, H.; Sato, K.; *Sens. Actuators, B* **1990**, *B 1*, 249.
- [11] Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2369.
- [12] Kutter, J. P.; Jacobson, S. C.; Matsubara, N.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3291.
- [13] Kohr, J.; Engelhardt, H. *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 309.
- [14] Uchiyama, K.; Xu, W.; Yamamoto, M.; Shimosaka, T.; Hobo, T. *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 825.
- [15] Xu, W.; Uchiyama, K.; Shimosaka, T.; Hobo, T. *Chem. Lett.* **2000**, 762-763.
- [16] Xu, W.; Uchiyama, K.; Shimosaka, T.; Hobo, T. *J. Chromatogr. A* **2000**, *907*, 279.
- [17] Huang, X.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1998**, *60*, 1837.
- [18] Timothy, J. Johnson; David Ross; Michael Gaitan; Laurie, E. Locascio, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3656.
- [19] Xiang Zheng; Fred, E.; Regnier, J. *Chromatogr. A* **2000**, *869*, 31.
- [20] He, B.; Tait, N.; Regnier, F. E. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3790.