

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790033
 研究課題名（和文） オンチップ液体クロマトグラフィーを用いたカテコールアミン高感度分析システムの開発
 研究課題名（英文） Development of a sensitive method for catecholamines using on-chip liquid chromatography
 研究代表者
 角田 誠 (Makoto TSUNODA)
 東京大学・大学院薬学系研究科・講師
 研究者番号：10323453

研究成果の概要（和文）：

オンチップ液体クロマトグラフィーによる高性能な分離媒体の作製に成功した。フォトリソグラフィとドライエッチングにより、シリコン基板にクロマトグラフィー用分離媒体として流路内にピラーアレイを作製し、分離用チップとした。低拡散曲線構造を有するカラム長の長いLCチップ(カラム長 110mm)を用いることで、直線流路だけでは得られない分離能を得ることができた。6種蛍光誘導体化アミノ酸を140秒以内に分離することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The separation efficiency of a pillar array column under pressure-driven liquid chromatography conditions can be improved using a separation channel with low-dispersion turns. The pillar array column was fabricated by reactive ion etching of a silicon substrate. Two coumarin dyes were well resolved under reversed-phase conditions with a maximum theoretical plate number of 8000. Successful separation of the fluorescent derivatives of six amino acids was achieved in 140 s.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学

1. 研究開始当初の背景

近年、半導体微細加工技術と生物工学技術の発展により、マイクロ化学分析システムの研究が行われている。分離分析においては、電気泳動を用いた定性・定量分析が報告されている。チップを用いた分析法は、微量のサ

ンプルで高感度検出が可能であると共に、高速分析も可能である。また、生体分子の分離分析をマイクロチップ上において行う場合、前処理や誘導体化反応技術などを含めた分析の全ての過程をマイクロチップ上で行うことができるという利点がある。このように、

生体分子の分離・定量の技術として、マイクロ化学分析システムの利用は有効であると考えられる。

液体クロマトグラフィーは、電気泳動と並ぶ分離手段の一つであり、広く用いられている。しかしながら、マイクロ化学チップにおける液体クロマトグラフィーの報告は少ない。このように、分析対象物質の範囲が広く汎用性の高いマイクロチップ液体クロマトグラフィーの開発が囑望されている。

一方、体液中カテコールアミン濃度は、交感神経系の活動状態の指標と考えられている。しかし、特に、血液中のカテコールアミン濃度は非常に低い。本研究によるカテコールアミン分析システムでは、より微量な試料での分析が可能となり、臨床における高血圧などの病態解析だけでなく、生体のストレス応答解析などの研究に広く用いられると考えられる。

2. 研究の目的

マイクロチップ上における分離技術については、高分離能を有する分離場を作製できる方が好ましい。そこで、理論的に優れた分離性能を有することが示されており、試料の拡散が少ないと考えられる μm オーダー以下の微小流路を修飾することにより、分離媒体を形成させ、マイクロ構造体を用いたオンチップクロマトグラフィー技術を開発することを目的とする。従来の HPLC カラムと同等の分離能をもつ分離媒体の作成を目指す。さらに、蛍光顕微鏡を用いた検出系と組み合わせることによりカテコールアミンの分析システムを構築する。

3. 研究の方法

フォトリソグラフィとドライエッチングにより、シリコン基板にクロマトグラフィー用分離媒体として流路内にピラーアレイを作製した。流路表面に酸化膜を成膜した後、シリコンとガラスの陽極接合を行った。作製したチップに ODS (octadecylsilyl) 基を表面修飾することで分離用チップとした。

検出には、蛍光顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

はじめに、長さ 6.7 mm の直線部において C525 と C545 の 2 つのクマリン色素の分離を試み、理論段数 800 を得た。チップ内において得られる直線流路の長さは限られる。そこで、流路の曲線構造について検討を行い、低拡散曲線構造をもちいること

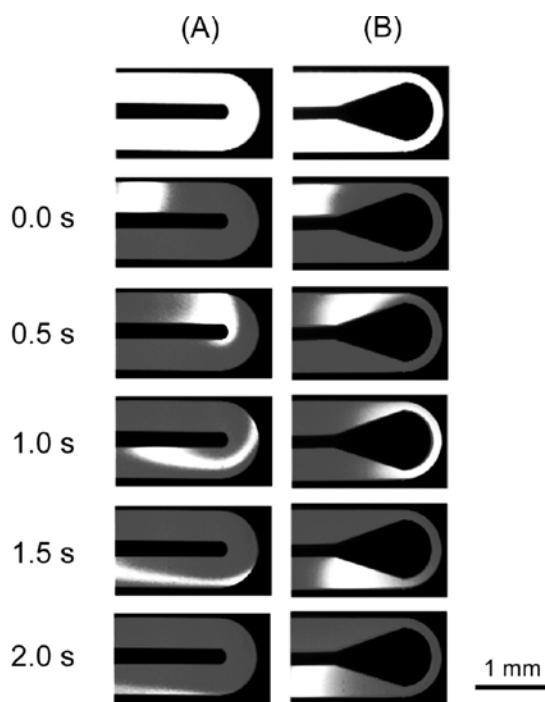


図 1 (A)円弧型曲線構造と(B)低拡散曲線構造における蛍光バンドの様子

で、ピークの形状がほとんど変化しないことを見出した。一方、円弧型曲線構造を用いた流路においては、明確なピークの広がり観察された (図 1)。

続いて、低拡散曲線構造を有するカラム長の長い LC チップ (カラム長 110 mm) を用いて、C525 と C545 の 2 つのクマリン色素の分離を検討した。図 2 に示すように、インジェクション流路からの距離 (=カラム長) が長くなるほど、良い分離が得られた。カラム長 7.0 mm において、C525 の理論段数は、760 であった。カラム長が長くなるにつれ理論段数の増加がみられ、カラム長 107 mm においては、8000 を超える理論段数が得られた。また、理論段高さについては、カラム長 7.0 mm において $9.3 \mu\text{m}$ であったのが、カラム長 107 mm においては $13.1 \mu\text{m}$ であったことから、低拡散曲線構造におけるサンプルの拡散が最小限に抑えられていることが示された。

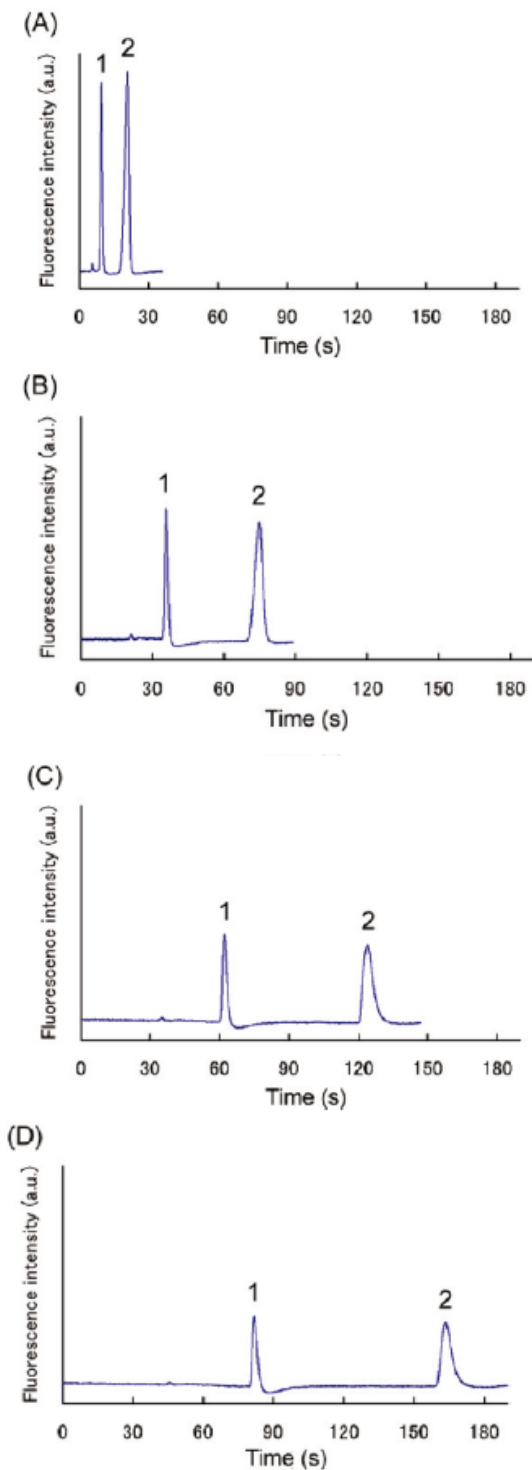


図 2 低拡散曲線構造を有するカラム長の長いカラム (カラム長 110 mm) を用いて C525 と C545 を分離したときのクロマトグラム。それぞれのインジェクション流路からの距離、(A) 7.0 mm, (B) 41.2 mm, (C) 75.4 mm, (D) 107 mm。1, C525; 2, C545。

最後に、低拡散曲線構造を有するカラム長の長いカラムの有用性を示すために、蛍光誘導体化アミノ酸の分離を試みた。蛍光誘導体化試薬として、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)を用いた。6種蛍光誘導体化アミノ酸を分離したときのクロマトグラムを図3に示す。直線流路だけでは困難であった分離が、低拡散曲線構造を有するカラム長の長いカラムを用いることで140秒以内で良好に分離することが出来た。

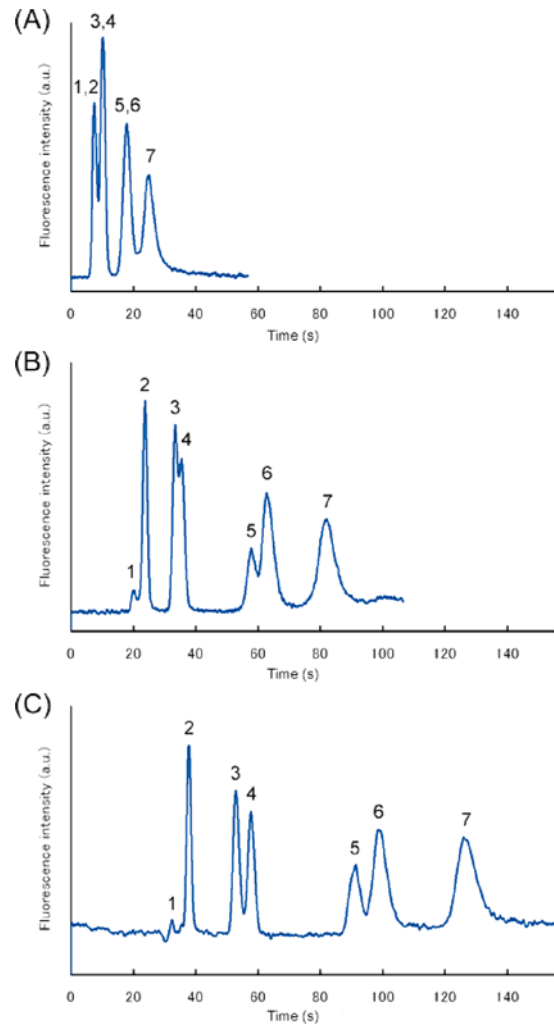


図3 低拡散曲線構造を有するカラム長の長いカラム (カラム長110 mm) を用いて蛍光誘導体化アミノ酸を分離したときのクロマトグラム。(A) 第1ターン、(B) 第2ターン、(C) 第3ターンの直前で検出。ピーク: 1, NBD-OH; 2, NBD-Pro; 3, NBD-Val; 4, NBD- ϵ -amino-*n*-caproic acid; 5, NBD-Ile; 6, NBD-Leu; 7, NBD-Phe。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

C. Aoyama, A. Saeki, M. Noguchi, Y. Shirasaki, S. Shoji, T. Funatsu, J. Mizuno, M. Tsunoda, Use of folded micromachined pillar array column with low-dispersion turns for pressure-driven liquid chromatography. *Anal. Chem.* 82 (2010) 1420-1426

M. Tsunoda, C. Aoyama, H. Nomura, T. Toyoda, N. Matsuki, T. Funatsu, Simultaneous determination of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in mouse striatum using mixed-mode reversed-phase and cation-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 712-715.

[学会発表] (計 2 件)

Masao Noguchi, Makoto Tsunoda, Jun Mizuno, Takashi Funatsu, Shuichi Shoji
“MEMS FABRICATED LIQUID CHROMATOGRAPHY MICROCHIP FOR PRACTICAL USES” The 23rd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2010) (2010.1.27)

角田 誠

「オンチップ分離技術の開発」

岡山大 & 理研ジョイントシンポジウム
(2010. 6. 28)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 誠 (Makoto TSUNODA)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：10323453