



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	紫外励起熱レンズ顕微鏡/液体クロマトグラフィーを用いるペプチドの無標識高感度検出
Author(s)	比企, 伸一郎; 渡慶次, 学; 角田, 正也 他
Citation	分析化学, 56(1), 1-7 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.56.1
Issue Date	2007-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71686
Type	journal article
File Information	bunseki.56.1.pdf



報 文

紫外励起熱レンズ顕微鏡/液体クロマトグラフィーを用いる ペプチドの無標識高感度検出

比企伸一郎¹, 渡慶次 学^{1,2,6}, 角田 正也^{1,2}, 馬渡 和真², 菊谷 善国²,
佐藤 記一^{2,3}, 火原 彰秀^{2,4}, 志村 清仁², 内田 直行⁵, 北森 武彦^{®2,4}

ペプチド等の生体由来成分の無標識高感度分離分析を目的として、励起光に波長 266 nm の紫外光を有する紫外励起熱レンズ顕微鏡 (UV-TLM) と液体クロマトグラフィー (LC) を組み合わせた測定システム (LC/UV-TLM) を構築した。構築したシステムの性能を評価するために、グラジエント溶出法を適応した際の熱レンズ信号に対する影響を検討した。熱レンズ信号は溶媒によって信号強度が大きく変化するため、グラジエント溶出法のような溶媒組成が時間とともに変化するような系では、その影響を検討する必要がある。水-アセトニトリル系グラジエントにおいては、アセトニトリルの体積分率が 40% 未満では、熱レンズ測定に大きな影響を及ぼさないということが分かった。標準試料を用いて LC/UV-TLM の検出性能を評価したところ、通常の分光光度計を検出器としたシステムに比較して 10 倍以上高感度であることが分かった。

1 緒 言

液体クロマトグラフィー (LC) は、有機化合物やタンパク質などの分離や定量の代表的な手法として、化学やライフサイエンスなどの分野で幅広く用いられている。近年、ポストゲノム解析の重要な研究領域であるタンパク質の網羅的解析、プロテオーム解析では、LC は重要な分析手法の 1 つとなっており、現在も装置やカラムの高性能化・高機能化 (高感度化、ハイスループット化、多次元化、小型化など) など様々な技術開発が行われている。タンパク質の分析では、LC の検出法として質量分析法 (MS) を組み合わせた LC/MS や質量分析計を多段で組み合わせた LC/MS/MS が用いられるようになってきたが、一般には LC の検出法としては D₂ ランプを用いた紫外吸収法が最も広く用いられている。これは、ほとんどの化学物質が紫外域に吸収を持つため、紫外吸収法ははん用性が高いから

である。しかし、吸光法は感度的にはそれほど高くない。最近では、タンパク質などの生体由来の微量試料を扱うのにマイクロカラムやキャピラリーカラムが用いられるようになってきたが、これらのカラムの場合は原理的に光路長を長くとることができないため、検出に吸光法を用いた場合は不利となる。吸光法以外にも LC の検出法としては、蛍光法、電気化学検出法、示差屈折法などがあるが、感度の点では蛍光法が最も高い。しかし、一般的な分子の蛍光はそれほど強くないため、蛍光法は測定対象が蛍光強度の強い試料の場合や蛍光標識された試料の場合以外には不適である。

著者らは、吸光法のようにはん用性の高く、かつ、蛍光法のように感度が高い検出法を開発する目的で、熱レンズ分光法¹⁾を顕微鏡下で実現した熱レンズ顕微鏡 (TLM) の開発に取り組んできた²⁾³⁾。これまでに TLM を用いて単一分子レベルの定量⁴⁾や単一微粒子 (直径: 10 nm) のカウンティング⁵⁾に成功し、TLM の感度の高さを実証してきた。更に TLM の小型化 (デスクトップサイズ化)⁶⁾やデバイス化⁷⁾にも成功し、これらは市販するに至っている⁸⁾。熱レンズ分光法の測定原理は、物質の光吸収に基づいているため、原理的には励起光の波長を選択することで吸光法と同じはん用性を持ち得る¹⁾。しかし、これまで開発してきた TLM の測定対象は、可視域に吸収を持つ物質に限定されていた。これは、紫外域に対応できる光源や光学系の有無及び性能 (出力安定性や光透過性など)、コストなどに起因する。また、従来の TLM は、微弱信号を高感度に

¹ マイクロ化学技術株式会社: 213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 207

² 財団法人神奈川科学技術アカデミー光科学重点研究室マイクロ化学グループ: 213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 307

³ 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻: 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

⁴ 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻: 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

⁵ 日本大学大学院生物資源科学研究科応用生命科学専攻: 252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

⁶ 現在所属 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻: 464-8603 愛知県名古屋市中千種区不老町

計測できるように、励起光を変調して、その変調周期と同期した信号成分を増幅するという同期検出⁹⁾を行っているため、励起光源には連続発振 (CW) 光が用いられてきた。紫外域で連続発振するレーザー光源がそれほど多くないということも、これまで TLM の適応範囲を紫外域に広げることができなかった原因の 1 つであった。

一方、アルゴンイオンレーザーの第二高調波 (CW: 257 nm)¹⁰⁾ や KrF レーザー (パルス発振: 248 nm)¹¹⁾ を励起光源に用いた熱レンズ測定⁹⁾の報告がある。また、ごく最近、著者らもアルゴンイオンレーザーの第二高調波 (CW: 244 nm) を励起光源とした TLM 測定を報告した¹²⁾。しかし、第二高調波による紫外光発生は、高出力の大型レーザーが必要であり、非線形効果により得られる第二高調波 (紫外光) の出力も弱く、出力安定性も高くない。また、パルス発振するエキシマーレーザーは、YAG レーザーなどのレーザーダイオード (LD) 励起固体レーザーに比較するとパルス出力安定性が低く、繰り返し周波数もそれほど高くない¹³⁾。したがって、これらの報告では、紫外領域にのみ吸収を持つ物質の無標識検出は実現しているものの、感度的には不十分であった。更に、紫外光を励起光源に用いた場合は、溶媒や光学系の吸収によるバックグラウンド信号が、可視光を用いた従来の熱レンズ測定に比較して高くなり、これも感度を低くする要因であった。

そこで著者らは、上記の問題点を解決するために、高い繰り返し周波数を持つ小型 Nd:YVO₄ レーザー (波長 266 nm, パルス幅: 22 ns, 繰り返し周波数: 80 kHz) を擬似的な CW 光と見なして、従来の TLM と同様に励起光を 1 kHz で変調し、変調周波数と同期した信号成分を検出する、紫外励起 TLM (UV-TLM) を開発した¹⁴⁾。開発した UV-TLM の性能を評価したところ、最適化した条件では、分光光度計に比較すると 350 倍高感度であることが分かった。また、UV-TLM を検出器とした LC システム (LC/UV-TLM) を構築し、UV-TLM の LC 用検出器としての可能性についても予備的な検討を行った。グラジエント溶出法を適応しない系 (移動相: 80% アセトニトリル) では、UV-TLM は LC 用検出器として極めて高い性能を有していることを報告した。

本研究では、LC/UV-TLM システムの性能評価を目的として、グラジエント溶出法を適応してペプチドの無標識検出を行った。熱レンズ信号は、溶媒物性によって信号強度が変化するため、時間とともに溶媒組成が変化するグラジエント溶出法を適応した際の信号に対する影響について検討した。また、最適条件化での検出限界についても検討した。

2 実 験

2・1 試 薬

評価用試料として、H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-OH のアミノ酸配列から成る合成ペプチド (ペプチド研究所製) を用いた¹⁵⁾。試料は、超純水を用いて段階的に調製した。超純水は、超純水製造装置 (野村マイクロサイエンス製, TW-600RU) で作製したものをを用いた。LC の移動相にはアセトニトリル (和光純薬, HPLC 用) をを用いた。

ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) 血しょうフィブロンネクチン (TpFN) は、既報の方法に従い、ゼラチンセファロース 4B によるアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製した¹⁶⁾。精製した TpFN をトリプシン消化 (20 時間, 20℃) し、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) により反応停止したものを試料とした。

TpFN 精製に用いた試薬はすべて和光純薬製 (特級) をを用いた。

2・2 LC/UV-TLM システム

Fig. 1 に LC/UV-TLM システムの概略を示す。LC 用分離カラムは、ジーエルサイエンス製 Inertsil[®] WP300C18 (内径: 0.5 mm, 長さ: 150 mm) をを用いた。インジェクターは、Agilent 製 G1377A をを用いた。移動相のグラジエントは、Agilent 製の G1376A 及び G1379A をを用いて制御した。測定セルには、角型フューズドシリカキャピラリー (Polymicro Technologies 製, 内径: 50 µm) をを用いた。カラムと測定セルは、PEEK 製のフィッティング (Upchurch Scientific 製 F242 x) をを用いて接続した。

UV-TLM は既報のシステムを用いた¹⁴⁾。システムは、光学防振台上に配置された励起用 UV レーザー (サイバーレーザー製 SPICA266-HR, 波長: 266 nm, 繰り返し周波数: 80 kHz, パルス幅: 22 ns) と市販の顕微鏡 (ニコン製 EclipseE600) を熱レンズ測定用に改造した顕微鏡^{きょう}筐体、光チョッパー (エヌエフ回路設計ブロック製 5584A), 光学系から構成される。励起光は光チョッパーにより 1 kHz に変調され、筐体に設置されたビームエキスパンダーに導入される。ビームエキスパンダーを透過した励起光とプローブ光 (コヒレント製 VLM2-IRL, 波長: 670 nm) は、ダイクロイックミラーで同軸にして、ビームスプリッタ及び対物レンズ (ニコンエンジニアリング製, 紫外対物レンズ×50, N.A.0.4) を通して、試料セル中の試料に照射される。試料位置での励起光とプローブ光の光強度は、それぞれ 5.0 mW 及び 0.5 mW であった。試料セルを透過した励起光とプローブ光は、コンデンサレンズに導かれ、ダイクロイックミラーを通すことで、励起光とプローブ光を分離する。その後、プローブ光は干渉フィルターを通して

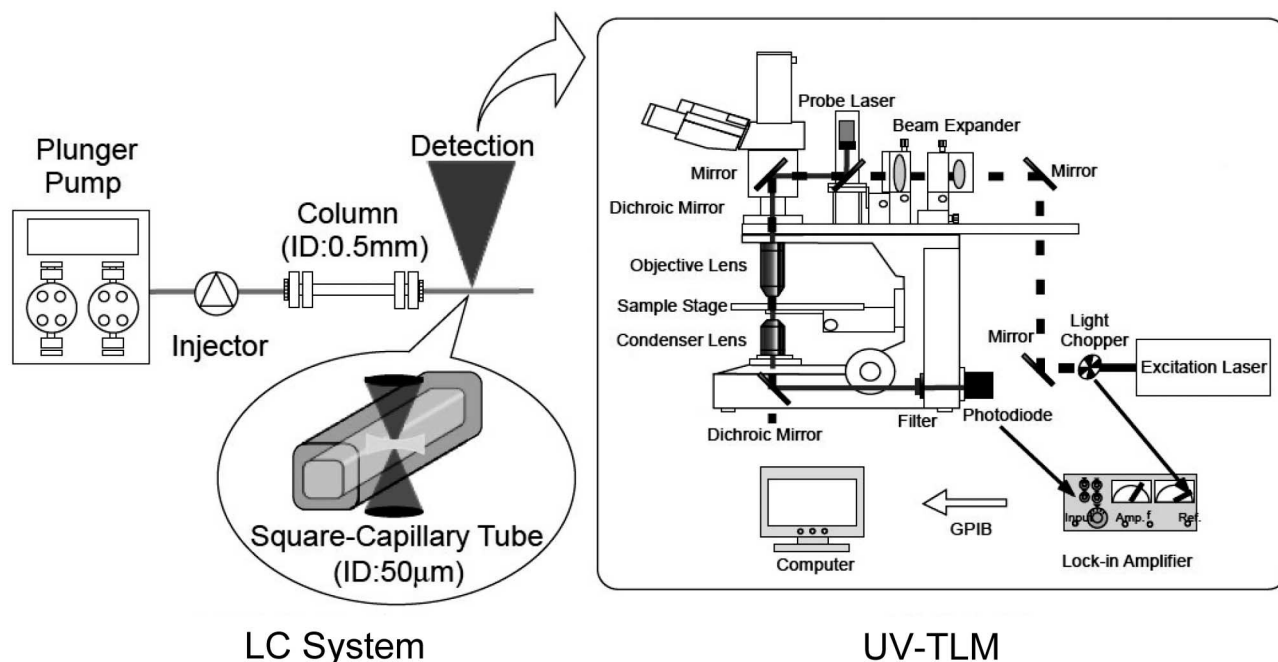


Fig. 1 Schematic diagram of experimental system

フォトダイオード (EOT 製 ET-2030) に導入される。顕微鏡筐体に配置した、対物レンズを除く光学部品 (ミラー及びレンズ類) は、すべて UV-TLM 用に新規設計・製作 (ニコンエンジニアリング製) した。フォトダイオードからの電気信号をロックインアンプ (Stanford Research 製 SR-830) により、変調周波数と同期した熱レンズ信号成分を増幅・検出した。検出したデータは、GPIB カード (ナショナルインスツルメンツ製 PCMCIA-GPIB) を介して、LabVIEW7.1 (ナショナルインスツルメンツ製) を用いて作成した自作プログラムにて処理した。

2・3 LC/分光光度計システム

LC/UV-TLM の性能を評価するために、前述の LC/UV-TLM システムの検出器のみを市販の分光光度計 (日本分光製 CE-971UV, スリットサイズ: 1 mm × 0.1 mm) に変えた、LC/分光光度計システム (LC/UV-Vis) を構築し、性能の比較評価を行った。検出したデータは、DAQ カード (ナショナルインスツルメンツ製 DAQCard-6036E) を介して、LabVIEW7.1 を用いて作成した自作プログラムにて処理した。

3 結果と考察

3・1 熱レンズ信号に及ぼすグラジエントの影響

熱レンズ (TL) 信号は、溶媒の熱伝導率 κ 及び屈折率の温度係数 dn/dT によって大きく影響されることが知られており¹⁾¹⁷⁾、時間とともに溶媒組成が変化するグラジエント溶出法を適応する場合には、TL 信号に対するグラジ

エントの影響を検討する必要がある。熱レンズ信号は、以下の式で表される¹⁷⁾。

$$S_{TL} \propto \frac{P_e (dn/dT) A}{\lambda_p \kappa} = EA \quad (1)$$

ここで P_e は励起光強度、 A は吸光度、 λ_p はプローブ光の波長、 E は信号増強因子である。式 (1) から分かるように、熱レンズ信号 S_{TL} は、信号増強因子 E と吸光度 A の積として表され、溶媒の熱伝導率 κ と屈折率の温度係数 dn/dT によって信号強度 S_{TL} が大きく変わる。したがって、熱レンズ分光法は、測定原理が物質の光吸収に基づいているが、信号強度は吸光度のみで決まるのではなく、信号増強因子が大きい溶媒を選択することで、信号強度を強くすることができる。一般には、有機溶媒の信号増強因子は水のそれに対して 10~20 倍程度大きい¹⁾。

溶媒組成が連続的に変化するグラジエント溶出法では、信号増強因子の大きさが連続的に変化するため、その影響がどれくらいあるか検討する必要がある。水に対する混合溶媒の相対的な信号増強因子は、励起光強度及び試料の吸光度、プローブ光の波長が一定なので、次のように表される。

$$E_{Re} = \frac{S_{mix}}{S_{water}} = \frac{E_{mix}}{E_{water}} = \frac{(dn/dT)_{mix}}{(dn/dT)_{water}} \times \frac{\kappa_{water}}{\kappa_{mix}} \quad (2)$$

ここで、 S_{mix} と S_{water} は混合溶媒と水溶液における熱レ

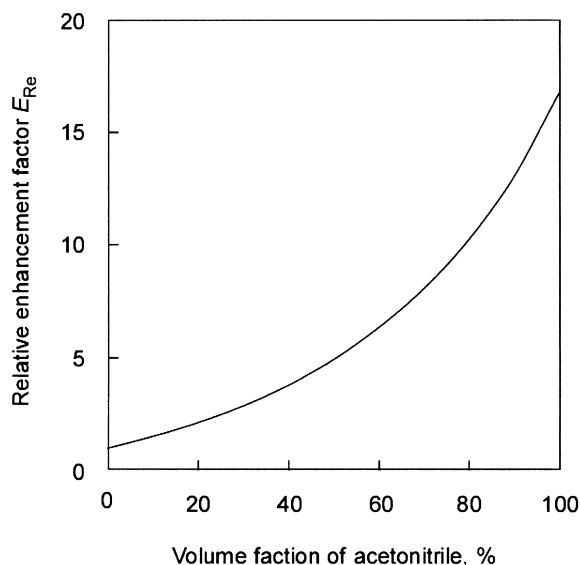


Fig. 2 Relative enhancement factor of the thermal lens method as a function of the solvent volume fraction for the water-acetonitrile system

ンズ信号強度, E_{mix} と E_{water} は混合溶媒と水溶液の信号増強因子, $(dn/dT)_{\text{mix}}$ と $(dn/dT)_{\text{water}}$ は混合溶媒と水の屈折率の温度係数, κ_{mix} と κ_{water} は混合溶媒と水の熱伝導率である. 混合溶媒の熱伝導率は, 以下の Filippov の経験式によって表される¹⁸⁾¹⁹⁾.

$$\kappa_{\text{mix}} = \omega_{\text{water}}\kappa_{\text{water}} + \omega_{\text{org}}\kappa_{\text{org}} - 0.72|\kappa_{\text{org}} - \kappa_{\text{water}}|\omega_{\text{water}}\omega_{\text{org}} \quad (3)$$

ここで, ω_{water} と ω_{org} は水と有機溶媒の質量分率, κ_{org} は有機溶媒の熱伝導率である. また, 混合溶媒の屈折率の温度係数は, 次に示すように体積分率の線形関数として表される²⁰⁾.

$$(dn/dT)_{\text{mix}} = v_{\text{water}}(dn/dT)_{\text{water}} + v_{\text{org}}(dn/dT)_{\text{org}} \quad (4)$$

ここで, v_{water} と v_{org} は水と有機溶媒の体積分率である.

本研究では, 後述するように, 水-アセトニトリル系グラジエントを用いたので, 水とアセトニトリルの混合溶媒系について, 式(2)~(4)を用いて E_{Re} を計算した. Fig. 2 にその結果を示す. 計算に用いた物理パラメータを Table 1 に示す¹⁹⁾. アセトニトリルの体積分率が40%未満の領域では, 体積分率に対する E_{Re} の増加率はほぼ線形で近似できるのに対して, アセトニトリルの体積分率が40%以上では増加率が高くなり, 線形から大きくずれてくる. 本研究では, グラジエント溶出に水-アセトニトリル (5~35%, v/v) の直線勾配法 (0~5分: 5%, 5~35分: 5~35%) を用いたので, アセトニトリルの体積分率

Table 1 Physical constants for water and acetonitrile at 20 °C

	Water	Acetonitrile
κ ($\text{Wm}^{-1} \text{K}^{-1}$)	0.595	0.179
$(dn/dT) \times 10^4 / \text{K}^{-1}$	-0.9	-4.55

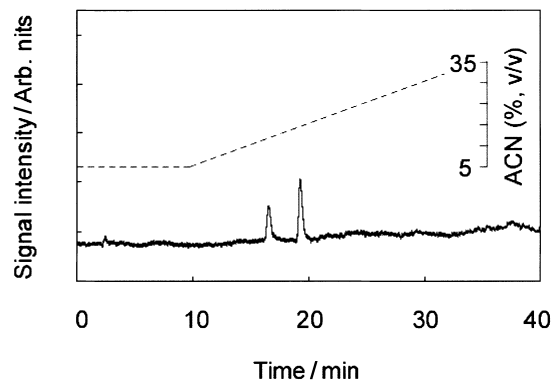


Fig. 3 Chromatogram of peptides detected by UV-TLM

は時間とともに緩やかに増加していく. この体積分率の領域では, Fig. 2 に示した E_{Re} の変化も 1.2~3.3 と緩やかに変化しており, この領域の連続的な測定では熱レンズ信号に大きな影響を及ぼさないと考えられる. 実際に, 評価用試料 (合成ペプチド) を用いて得られたクロマトグラムのピーク形状が, 熱レンズ顕微鏡と吸光光度計を用いた場合とでほとんど変わらないことから, 本研究の実験条件ではグラジエントの影響を考慮する必要はないと考えられる. しかし, E_{Re} の変化率が大きい領域や勾配が急である場合には, クロマトグラム上のピーク形状に影響を及ぼすと考えられるので注意する必要がある. また, ピーク高さやピーク面積の比較により, 溶出時間が同じ単一ピーク (E_{Re} が一定) の検量線を作成する場合は, E_{Re} を考慮する必要はないが, 溶出時間の異なるピーク間 (E_{Re} が変化している) の定量的な比較には E_{Re} を考慮する必要がある.

3.2 UV-TLM/LC システムの性能評価

グラジエント溶出法を適応した LC/UV-TLM システムの性能評価を行うために, 合成ペプチド H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-OH を評価用試料として分離検出を行った. Fig. 3 に結果を示す. 測定条件は, 移動相: 水-アセトニトリル (5~35%, v/v), 流量 6.6 mm/min, 試料注入量: 1 μL , 試料濃度: 5 $\mu\text{g/mL}$ である. 溶出時間約 16 分と 19 分にそれぞれ H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-OH のピークを検出した. 同条件において濃度の異なる試料の分離検出を行い, 得られたクロマトグラ

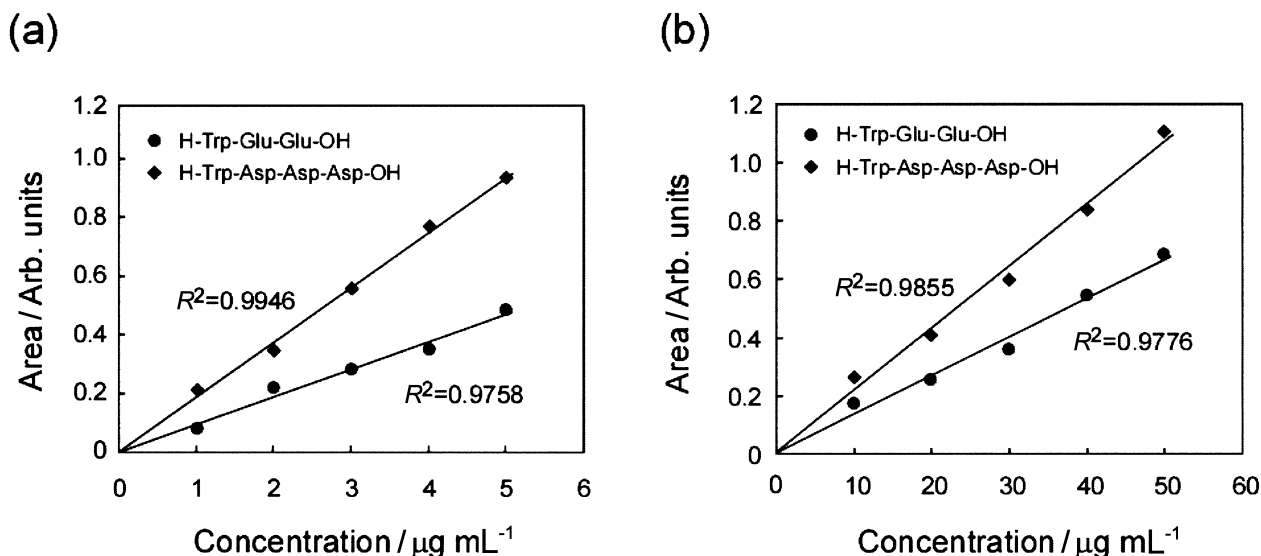


Fig. 4 Calibration curve: of peptides
(a) UV-TLM, (b) Spectrophotometer

Table 2 The limit of quantitative determination (LQD)

	Spectrophotometer	UV-TLM
LQD for H-Trp-Glu-Glu-OH / $\mu\text{g mL}^{-1}$	14.0	1.29
LQD for H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH / $\mu\text{g mL}^{-1}$	12.1	0.93

ムから, それぞれのピーク面積を算出し, H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH の検量線を作成した. Fig. 4 (a) にその結果を示す. 試料濃度が 1~5 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線関係を示した. 得られた検量線から算出した定量下限値 (2σ) は, H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH に対して, それぞれ 1.29 $\mu\text{g/mL}$ と 0.93 $\mu\text{g/mL}$ となった (Table 2).

比較対象として, LC/UV-Vis システムを用いて同様の測定を行った. 測定条件は, 試料濃度を除いて, 上述の測定と同じである. 分光光度計の測定波長は 266 nm とした. 得られたクロマトグラムは, Fig. 3 と同様に溶出時間約 16 分と 19 分にそれぞれ H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH のピークを示した. LC/UV-Vis システムを用いて得られたクロマトグラムから, H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH の検量線を作成した (Fig. 4 (b)). 得られた検量線は良好な直線関係を示し, 検量線から算出した検出下限値 (2σ) は H-Trp-Glu-Glu-OH と H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH に対して, それぞれ 14.0 $\mu\text{g/mL}$ と 12.1 $\mu\text{g/mL}$ となった (Table 2).

これらの結果より, グラジエント溶出法を適応した LC/UV-TLM は, LC/UV-Vis に比較して約 10 倍高感度で

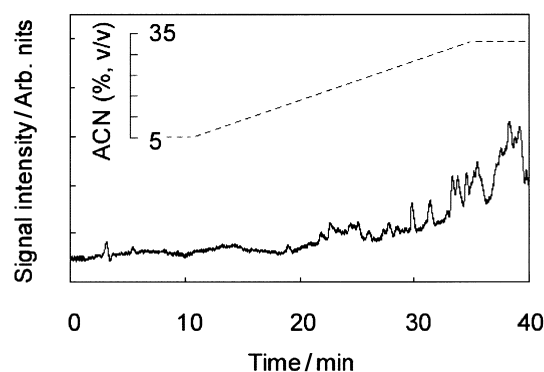


Fig. 5 Peptide mapping of TpFN digested with trypsin

あることが分かった. 以前の評価では, アデニンを試料とした場合, UV-TLM は UV-Vis に比較して約 300 倍高感度であった¹⁴⁾. 今回, 以前の結果に比較して検出性能が悪くなった原因としては, 以前の測定に対して, バックグラウンド (溶媒の熱レンズ信号) が増加したこと, モル吸光係数が低下 (今回の試料: $\epsilon_{266} = 4375 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, アデニン: $\epsilon_{266} = 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) したこと, 測定セル (キャピラリー) を含む測定系の頑健性の問題等があると考えられる. これらは励起光出力の最適化と測定系の頑健性を向上させることで改善することが可能である.

構築した LC/UV-TLM システムを実サンプルに適応する目的で, トリプシン消化後の TpFN の分離検出を行った. その結果を Fig. 5 に示す. 測定条件は, 移動相: 水-アセトニトリル (5~35%, v/v), 流量 6.6 mm/min, 試料注入量: 1 μL , 試料濃度: 1 mg/mL である. 溶出時間が 20 分以降に多くのピークが確認された. 得られたクロマ

トグラムの詳細な解析は行っていないが、同上の測定条件では LC/UV-Vis システムではピークは全く観測されず、バックグラウンド信号と一致することから、生体由来の微量試料の分析では本システムが極めて有効であるということが分かる。今後は細胞溶出液などの生体由来の微量試料の分離分析に本システムを適応していく予定である。

4 結 言

LC/UV-TLM システムの性能評価を目的として、グラジエント溶出法を適応してペプチドの無標識検出を行った。熱レンズ信号は、溶媒物性によって信号強度が変化するため、時間とともに溶媒組成が変化するグラジエント溶出法を適応した際の信号に対する影響について検討した。水-アセトニトリル系グラジエントの場合、アセトニトリルの体積分率が 40% 未満では熱レンズ信号に大きな影響を及ぼさないということが分かった。合成ペプチドを用いて検出限界を求めたところ、LC/UV-TLM システムは、吸光光度計を用いた LC/UV-Vis システムに比較して 10 倍以上高感度であることが分かった。励起光強度の最適化と測定システムの頑健性を上げることで更なる検出感度の向上が期待できる。

本研究の一部は、財団法人新技術開発財団「第 71 回新技術開発助成」の援助を受けて行われた。

文 献

- 1) S. E. Bialkowski: "Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis", (1996), (John Wiley & Sons, Inc., New York).
- 2) T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, K. Sato: *Anal.*

Chem., **76**, 52A (2004).

- 3) 渡慶次 学, 馬渡和真, 火原彰秀, 北森武彦: 応用物理学会誌, **73**, 741 (2004).
- 4) M. Tokeshi, M. Uchida, A. Hibara, T. Sawada, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 2112 (2001).
- 5) K. Mawatari, T. Kitamori, T. Sawada: *Anal. Chem.*, **70**, 5037 (1998).
- 6) 比企伸一郎, 渡慶次 学, 火原彰秀, 北森武彦: 分析化学, **52**, 569 (2003).
- 7) M. Tokeshi, J. Yamaguchi, A. Hattori, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **77**, 626 (2005).
- 8) < <http://www.i-mt.co.jp/> >.
- 9) 菅 滋正, 櫛田孝司編: 実験物理学講座 8 "分光測定", 3-8 変調分光法 (1999), (丸善).
- 10) N. Ragozina, S. Heissler, W. Faubel, U. Pyell: *Anal. Chem.*, **74**, 4480 (2002).
- 11) M. Qi, X.-F. Li, C. Stathakis, N. J. Dovichi: *J. Chromatogr. A*, **853**, 131 (1999).
- 12) K. Sato, A. Egami, T. Odake, M. Tokeshi, M. Aihara, T. Kitamori: *J. Chromatogr. A*, **1111**, 228 (2006).
- 13) 大竹祐吉: 増補改訂版 "レーザーの使い方と留意点", 第 5 章 (1998), (オプトロニクス).
- 14) S. Hiki, K. Mawatari, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **78**, 2859 (2006).
- 15) K. Shimura, Z. Wang, H. Matsumoto, K. Kasai: *Electrophoresis*, **21**, 603 (2000).
- 16) N. Uchida, M. Watanabe, M. Kakiuchi, H. Anzai, E. Nishide: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1107 (1992).
- 17) R. D. Snook, R. D. Lowe: *Analyst*, **120**, 2051 (1995).
- 18) W. A. Wakeman, A. Nagashima, J. V. Sengers: "Measurement of the Transport Properties of Fluids", Experimental Thermodynamics Vol. 3, (1991), (Blackwell Science Inc., Oxford).
- 19) N. Arnaud, J. Georges: *Spectrochim. Acta A*, **60**, 1817 (2004).
- 20) S. N. Bendrysheva, M. A. Proskurnin, U. Pyell, W. Faubel: *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 1492 (2006).

Highly Sensitive Detection of Non-Labeled Peptides Using UV Excitation Thermal Lens Microscope/Liquid Chromatography

Shinichiro HIKI¹, Manabu TOKESHI^{1,2}, Masaya KAKUTA^{1,2}, Kazuma MAWATARI²,
Yoshikuni KIKUTANI², Kiichi SATO^{2,3}, Akihide HIBARA^{2,4}, Kiyohito SHIMURA²,
Naoyuki UCHIDA⁵ and Takehiko KITAMORI^{2,4}

¹ Institute of Microchemical Technology, E-207, KSP, 3-2-1, Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012

² Micro Chemistry Group, Special Research Laboratory for Optical Science, Kanagawa Academy of Science and Technology, E-307, KSP, 3-2-1, Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012

³ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657

⁴ Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656

⁵ Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252-8510

(Received 24 June 2006, Accepted 2 October 2006)

A UV excitation thermal-lens microscope (UV-TLM) with an excitation beam wavelength of 266 nm and liquid chromatograph (LC) were connected to build a new system (LC/UV-TLM) for the separation and highly sensitive label-free determination of biomolecules, such as peptides. A variation in the composition of the mobile phase with time, as in gradient elution, is very commonly utilized in LC for improved separations. Thermal-lens signals are generally highly dependent on the properties of the media surrounding the photo-absorber. This effect must be carefully considered in such situations where the composition of a solution drastically changes in time. Therefore, we tested the developed LC/UV-TLM system operated in a gradient elution mode, by observing the effects of the variation in the solution composition upon TLM signal intensities. In water/acetonitrile gradient elution, no serious effects were observed as long as the acetonitrile content was less than 40% v/v. We then tested the developed system in the separation of a standard sample solution of mixed synthetic peptides; we found that the developed system was 10-times more sensitive than a conventional system with the spectrophotometer used as a detector.

Keywords : thermal lens microscope; liquid chromatography; non-labeled proteins; gradient elution method.