

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05549

研究課題名(和文) 予備濃縮と電位差分析法によるマイクロ流路ペーパー分析デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of Microfluidic Paper Analytical Device by Preconcentration and Potentiometric Analysis

研究代表者

正留 隆 (Masadome, Takashi)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：30190341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、改質を行つた紙にイオン性界面活性剤を吸着させ予備濃縮後、オプトード膜で定量するマイクロ流路ペーパー分析デバイス(μ PAD)の開発を行つた。その結果、濃縮を行っていない場合には検出できなかった $10\mu\text{M}$ 程度の陽イオン性界面活性剤を検出することに成功した。また、作製した μ PADsにより $100\mu\text{M}$ - $1000\mu\text{M}$ の濃度範囲の陰イオン性界面活性剤(AS)の定量が可能であったが、現段階ではASの予備濃縮は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学的に改質された紙相に、試料を予備濃縮した後、紙デバイスに組み込まれたオプトードにより定量する紙ベースの新規 μ PADを開発することを具体的な目的とした。この μ PADの開発は、オプトードを含むすべての検出構成要素が単一の紙に集積された使い捨てが可能で、特別な機器を用いない濃縮システムを μ PADに集積したものである。本研究によって、実試料中の極微量でも有害性を示す環境汚染物質の定量の可能性を示すことができたので、計測部のコンパクト化および低価格化を検討することで、環境と医療分野での新しい産業創出につながる可能性を有する波及効果がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a microfluidic paper analytical device (μ PAD) in which ionic surfactants are adsorbed on a modified filter paper, preconcentrated, and determined using an optode membrane. As a result, we succeeded in determining about $10\mu\text{M}$ of cationic surfactant, which could not be detected in the absence of preconcentration. The developed μ PADs can also quantify anionic surfactants (AS) in the concentration range of $100\mu\text{M}$ to $1000\mu\text{M}$, but it was difficult to preconcentrate AS at the present stage.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロ流路ペーパー分析デバイス オプトード 予備濃縮 環境分析

1. 研究開始当初の背景

マイクロチップは、数センチ四方のプラスチックの基板に数 μm 程度の微細流路を作製し分析を行う装置であり、試料量および廃液量の微量化や分析の自動化及び装置全体の小型化などの利点を持っている。マイクロチップにおいては装置が大掛かりな熱レンズ法などの超高感度な検出法が必要であり、トータルな分析装置が大型になる欠点がある。一般に、電気化学検出法の中でも、特にイオン選択性電極 (ISE) を用いる電位差分析法は、センサを試料溶液に浸すだけで分析対象物質を簡便に高選択的に定量できる、微小化してもその検出感度が低下しないという利点及び簡便に作製できるなどの利点を持っているので、マイクロチップのようなマイクロフロー分析における検出法として有効である。一方、リトマス試験紙や pH 試験紙、尿検査試験紙など、紙を基材とする化学センサは、簡便、迅速な測定法として古くから利用されている。紙のセンサは軽量、安価、使い捨て可能であるなどの優れた特徴を持っているが、いずれも試料溶液に浸すだけの単純なものであった。しかし、2007 年 Whitesides らは、マイクロチップの基材としての紙に数 μm 程度の流路を作製し、フロー分析に利用する方法を考案し、これを microfluidic paper-based analytical device (μPAD) と命名した。 μPAD は紙上に疎水部と親水部を作製し、親水部に水溶液を滴下することで、化学計測を実現するものである。親水部に導入された水溶液は、毛管現象により紙上の流路に沿って流れ、あらかじめ導入された試薬と反応する。 μPAD は小型分析機器や迅速診断キットを用いて医療現場で行うリアルタイム検査において非常に重要である。一方、環境計測のための μPAD はオンサイトでの環境計測を実現できるツールであり、野外計測での応用が期待できる。 μPAD はありふれた低コストの紙材料を使用し、多様な化学物質の測定を実行することができ、リモートサイトおよび、またはリソースが制限された設定で大量に持ち運ぶことができるため、大きな注目を集めている。しかしながら、これまで報告されているほとんどの μPAD は比色検出法を用いているため、高選択性に目的物質を測定できない場合があり、また着色溶液や懸濁溶液に適用できないこと、検出感度が低いなどの欠点があるので生体試料や環境試料中の極微量成分を高感度、高精度に定量できないことである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高選択性かつバッチ法並みの検出感度を有する紙材料を使用する μPAD を開発することである。Philippe Buhlmann らは、ISE を検出部とする紙材料を使用する μPAD を 2014 年に報告した。しかし、ISE を検出部とする紙材料を使用する μPAD の検出限界濃度は、通常の ISE を用いるバッチ法に比べて 2~3 桁程度高く、ISE を検出部とする μPAD のさらなる高感度化が必要である。 μPAD の高感度化のためには、試料溶液の濃縮システムを組み込んだ μPAD を開発することが必要である。濃縮システムを組み込んだ μPAD は既に報告があるが、 μPAD に 0~50 V の外部電圧を掛けて電気浸透流 (EOF) を発生させている。この方法は、外部電圧を μPAD に掛けて EOF を発生しているため装置が複雑かつ高価であり、 μPAD の特長である簡便性やコストパフォーマンスを損ねている。

そこで、当初の本研究では、化学的に改質された紙相に、環境汚染物質であるイオン性界面活性剤 (IS) を予備濃縮した後、紙デバイスに組み込まれた ISE に溶出させ、生じた電位差により定量する紙ベースの新規 μPAD を開発することを具体的な目的としていた。IS を新規 μPAD の分析対象物質としたのは、研究代表者が開発した ISE ベースのマイクロチップによる環境水中の IS の定量結果と、新規 μPAD による IS の定量結果を比較するためである。この μPAD の開発が実現すれば、ISE を含むすべての検出構成要素がインクジェット印刷によって付着された単一の紙に集積された使い捨てが可能で、さらにキャリブレーションフリーセンシングが可能となる、特別な機器を用いることなく濃縮システムを μPAD に集積した最初の例となる。さらに、この μPAD の原理は、IS 以外の様々な環境汚染物質や、生体試料の定量に適用できる。濃縮プロセスにおける工夫や折りたたみ型のデバイスの導入によるコンパクト性、電位計測部を含めたコンパクト性、ISE 検出部の材料を検討することによって、本研究の独自性および創造性をさらに高めることができる。本研究によって、これまでの μPAD では実現できなかった着色および懸濁した実試料中の極微量でも有害性を示す環境汚染物質による汚染状態の把握、生体試料の定量が可能になるので、電位計測部のコンパクト化および低価格化を検討することで、環境と医療分野での新しい産業創出につながる可能性を有する波及効果がある。

しかしながら、上述のように、当初の計画では μPAD における検出部として ISE を用いる電位差分析法を用いる予定であったが、電位安定性に優れた ISE と参照電極を作製することができなかった。そこで、 μPAD における検出部としてオプトードを用いる方法に切り替えた。オプトードは試料溶液に感応膜を浸し、その感応膜の色を目視や吸光度および蛍光により簡便に測定が可能なセンサであり、電氣的ノイズを受けにくい、参照電極が不要、小型化が容易であるなどの利点を有している。

そこで、本研究では、測定に有毒な有機溶媒を用いず、低コストかつ迅速で簡便、さらに高感度である IS の定量法の開発を目的としている。すなわち、化学的に改質された紙相に IS を予備濃縮した後、 μPAD に組み込まれたオプトードに溶出させ、生じたオプトード感応膜の吸光度変化により定量する紙ベースの新規 IS 定量用 μPAD を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

3.1 陽イオン性界面活性剤(CS)オプトード膜の作製

IS としての CS に応答するオプトード膜の作製法は以下の通りである。

テトラプロモフェノールフタレインエチルエステルカリウム 0.0560 g, 2-ニトロフェニルオクチルエーテル(NPOE) 2.0 g, 6.0 M 塩酸水溶液 10 mL を順にビーカーに加え, 2 時間攪拌した。その後, 3500rpm で 10 分間遠心分離した。テトラヒドロフラン(THF) 7.5mL にポリ塩化ビニル粉末 (PVC) 0.3g を完全に溶解させて PVC/THF 溶液を作製した。遠心分離後の NPOE 層を 1.5 g 分取し, 先ほど作製した PVC/THF 溶液に加え十分に攪拌することによってオプトード膜を作製した。

3.2 CS オプトードによる検量線の作成

直径 10 mm の円形に 3 枚を切り出したろ紙(ADVANTEC 2)を CS であるゼフィラミン(Zph+)溶液(20 mL)に 60 分間浸した。浸透後のろ紙をシャーレ上に設置したオプトード膜の上に重ね, 接触時間を 60 分とした。その後, オプトード膜を取り出しラミネート化した。使用したラミネートフィルムの片面に予め 3.5 mm 孔を開けておき, ラミネートの際にオプトード膜の中心に孔が重なるようにした。ラミネート後は, 孔内に対してスキャナー(RICOH/SPC261SF)を用いて画像化し, 色情報である RGB 値と L*a*b*値をフリーソフトの Image J 及び Colorizer1)を用いて求めた。L*a*b*値を用いて E を算出し, E と Zph+濃度との間の検量線を作成した。E は以下の(1)式により求めた。

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

ここで, オプトード膜の色の L*, a*, および b*値と, Zph+に浸したオプトード膜の色の L*, a*, および b*値の差をそれぞれ L*, a*, b*とした。

3.3 ろ紙への CS への予備濃縮

ろ紙へ CS を予備濃縮するために, エピクロロヒドリン(ECH), 水酸化ナトリウム含有アルギン酸ナトリウム(SA/NaOH), 塩化カルシウム(CaCl₂)およびリン酸緩衝液(pH 7.4) (PBS)を用いてろ紙(ADVANTEC2)を改質した。3 mL の Zph+溶液を 3 枚の直径 10 mm の改質したろ紙に浸して Zph+の予備濃縮を行った。シャーレ上にてオプトード膜と予備濃縮を行ったろ紙を重ね, その上から酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)を 30 μ L 滴下してろ紙上に予備濃縮された Zph+をろ紙からオプトード膜に溶出させた。溶出時間を 60 分間とした。その後, 2-2 と同様の方法でラミネート及び色情報, E 値を求めた。

3.4 陰イオン性界面活性剤(AS)オプトード膜の作製

IS としての AS に応答するオプトード膜の作製法は以下の通りである。

まず, 7.5×10^{-4} M ローダミン B (1.0 M NaOH 含有) 6 mL, NPOE 2.0 g をアルミホイルで包んだコニカルチューブに入れ, 35 の恒温槽で 24 時間振とうさせることにより, NPOE 層にラクトン型ローダミンを抽出させた。次に, コニカルチューブを 4000 rpm で 10 分間遠心分離させ, その後 NPOE 層 2.0 g をバイアルに分取した。さらに, バイアルに THF 10 mL, PVC 粉末 0.4g を加え, オプトード膜溶液を作製した。このオプトード膜溶液を 10cm 径シャーレに移し, ろ紙で蓋をして室温で 24 時間放置することで膜溶液が乾燥し形成されたものをオプトード感応膜とした。

3.5 AS オプトードによる検量線の作成

1cm 径に切り抜いたろ紙 (ADVANTEC2) に濃度の異なる AS である直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)溶液をそれぞれ 15 μ L ずつ滴下し 2 時間浸透させた。その後, ラミネートフィルムの内側に LAS を浸透したろ紙を並べ, その上に 6.0 mm 径に切り抜いたオプトード感応膜をそれぞれ置き, ラミネーターを使用してろ紙とオプトード感応膜をラミネート加工した。その後, 10 分毎にスキャナーを用いてオプトード感応膜の色情報をスキャンして求めた。得られた色情報から L*, a*, b*値を求め, E を算出し, E と LAS 濃度の関係(検量線)を作製した。

3.6 ろ紙への AS への予備濃縮

1cm 径に切り抜いたろ紙 (ADVANTEC2) 15 枚に 0.3 M エピクロロヒドリンを 20 μ L 滴下し, 10 分間放置し, 純水でろ紙を洗浄した。その後, 0.5 wt% ポリエチレンイミン (pH 11) を 20 μ L 滴下し, 10 分間放置し, 純水でろ紙を洗浄した。その後, 乾燥器に移し, 60 で 2 時間乾燥した。図 1 に AS の予備濃縮のために用いた μ PAD の模式図を示す。改質したろ紙の内 5 枚(これをろ紙 とする)に 0.1M HCl 20 μ L を滴下した。残りの改質したろ紙(こ

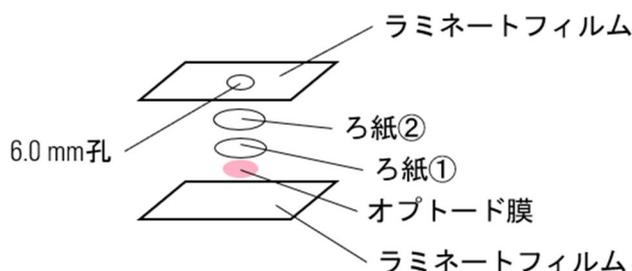


図 1 μ PAD の模式図

れをろ紙 とする) 2 枚に濃度の異なる AS をそれぞれ 60 μL 滴下して 2 時間放置することで AS の予備濃縮を行った後、純水で洗浄した。次に、図 1 に示したようにラミネートフィルムでろ紙とオプトード感応膜をラミネート加工し、ラミネートフィルムの孔から予備濃縮させた AS を溶出させるために 0.1 M NaOH 15 μL を滴下し 0.1M HCl で改質したろ紙 を通じてオプトード膜と 20 分反応させた。その後、スキャナーを用いてオプトード感応膜の色情報をスキャンして求めた。

4 . 研究成果

図 2 に CS オプトードを検出器とする μPAD を用いて得られた予備濃縮後の Zph+ に対する検量線を示す。この場合、Zph+ を予備濃縮したろ紙に酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液を滴下してからの Zph+ の溶出時間を 120 分と 60 分の 2 通りで行なった。図 2 の 2 つの検量線から、溶出時間が長くなるにつれて得られた E の値が増加することが分かった。これは、溶出時間が長くなるろ紙から溶出された Zph+ の濃度が増加するためだと考えられる。また、溶出時間が 60 分の場合には、10 μM Zph+ の E 値は 0 に近似しており、これはオプトード膜の変色が起きていないことを意味している。

したがって、10 μM Zph+ の検出を行うためには、60 分の溶出時間では不十分であると考えられる。一方、溶出時間が 120 分の場合には、10 μM Zph+ に対する E の値が 18 でありオプトード膜が Zph+ に対して応答しているので、10 μM 以下の濃度範囲の Zph+ の検出も行える可能性があるものと考えられる。このことから、10 μM 以下の低濃度の Zph+ を検出するためには、溶出時間を増加させることが有効であることが分かった。

図 3 に濃縮前および濃縮後の LAS に対する検量線をそれぞれ示す。図 3 から、100~1000 μM の濃度範囲の LAS に対して E と LAS 濃度の対数値との間には良好な直線関係が成立した。このことから、作製した μPADs により 100~1000 μM の濃度範囲の LAS の定量が可能であると考えられる。一方、濃縮後において、100~1000 μM の濃度範囲の LAS に対して E と LAS 濃度の対数値との間には直線関係は観察されず、濃縮前の LAS に対する検量線と比較して E は同等かあるいは小さい値となった。このことから、現段階では検討した方法による LAS の予備濃縮は困難であると考えられる。

以上、本研究では、ECH や SA/NaOH, CaCl_2 や PBS で改質を行ったろ紙に Zph+ を吸着させ予備濃縮後、CS オプトード膜に対して濃縮した Zph+ を抽出することで生じた CS オプトードの吸光変化量により定量する μPAD の開発を行った。その結果、濃縮を行っていない場合には検出できなかった 10 μM 程度の Zph+ を検出することに成功した。今後、ろ紙に対してより多量の予備濃縮が可能となるような新しいろ紙の改質方法、経時変化によるオプトード膜の変色の影響について研究を行い、より短時間でより低濃度のゼフィラミンを検出できる方法の開発を行う予定である。また作製した AS μPADs により 100 μM ~1000 μM の濃度範囲の LAS の定量が可能であったが、現段階では検討した方法では LAS の予備濃縮が困難であった。

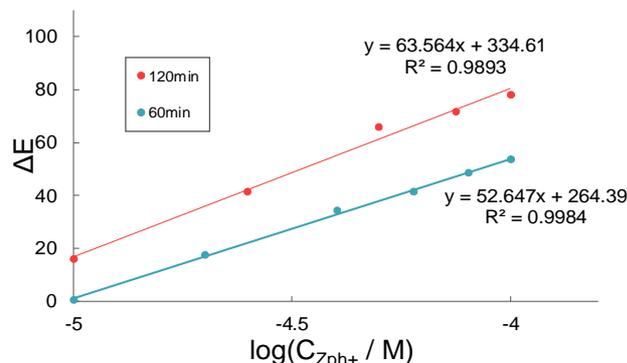


図 2 CS オプトードを検出器とする μPAD を用いて得られた予備濃縮後の Zph+ に対する検量線

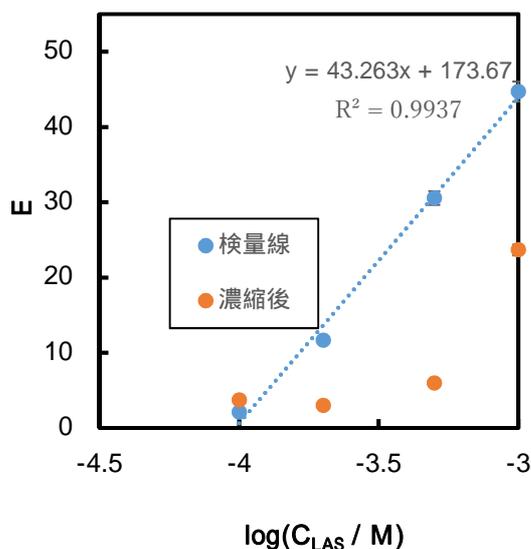


図 3 AS オプトードを検出器とする μPAD を用いて得られた予備濃縮前後の LAS に対する検量線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Takahashi, T. Masadome	4. 巻 88(6)
2. 論文標題 Determination of lactate by sequential injection analysis using a fluoride ion-selective electrode detector	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 522-524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5796/electrochemistry.20-00097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 曼一, 上原宏斗, 正留 隆
2. 発表標題 フッ化物イオン電極検出器を用いる乳酸のシーケンシャルインジェクション分析
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山竜誠, 小泉 成正, 正留 隆
2. 発表標題 塩化ブチリルコリンイオン選択性電極検出器を用いるブチリルコリンエステラーゼのシーケンシャルインジェクション分析
3. 学会等名 日本分析化学会 第69年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------