

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21685009

研究課題名（和文）ナノチャンネル内での特異的物質輸送に基づくキラル分離チップの創製

研究課題名（英文）Chip chiral separation based on specific molecular transport inside nanofluidic channel

研究代表者

山口 央 (YAMAGUCHI Akira)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：10359531

研究成果の概要（和文）：ナノメートル（nm）レベルの微小な流路（ナノ流路）は、微小空間特有の化学現象を利用した新しい物質分離法への応用が期待されている。この点に着目して、シリカなど金属酸化物からなるナノ流路内部での物質輸送現象について検討を進めた。また、ナノ流路内での物質輸送をリアルタイムでモニタリングする新規手法、およびナノ流路内でのキラル分離について検討し、それぞれに対して成果を得た。

研究成果の概要（英文）：Nanofluidic channels have been paid much attention in the field of separation science due to their specific microenvironments. In the present study, molecular transport inside the nanofluidic channel composed of metal-oxide frameworks was examined. In addition, I also examined development of real-time monitoring technique to observe molecular transport inside the nanofluidic channel and chiral separation inside the nanofluidic channel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	21,000,000	6,300,000	27,300,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ナノチャンネル，キラル分離

1. 研究開始当初の背景

近年のナノ材料開発の進展によって、カーボンナノチューブや金属ナノチューブ、金属酸化物ナノチューブ、脂質ナノチューブなど様々な無機・有機ナノチューブの合成が可能となり、これらナノチューブ内の微小空間を利用した先駆的化学プロセスの創製が繰り返されている。ナノメートル（nm）レベ

ルの微小空間（ナノ空間）内では、包摂された分子の運動性と反応性がチューブ内壁との相互作用に強く依存し、フラスコ内バルク溶液中とは異なる特異な化学過程の発現が期待されている。ナノ空間の特異性の観点から、ナノチューブを微小反応フラスコとした「ナノテストチューブ」という概念が近年提唱されると共に、光機能性物質や生体酵素、

触媒活性物質を包摂させた機能性材料の開発が進んでいる。また、ナノチューブ内での物質輸送現象に着目した研究も行われている。その結果、通常のキャピラリーチューブ（内径が μm 以上）では通常発現し得ない物質輸送現象が報告され、ナノチューブ内での物質輸送の特異性を利用した新たな物質分離手法の開拓が期待されている。しかし、ナノチューブ内での物質輸送の本質は未だ分かっていないのが現状である。

これまでに、多孔性陽極酸化（PAA）膜やトラックエッチング膜に存在する円柱状細孔内に金ナノチューブ、カーボンナノチューブ、シリカナノチューブなどを形成させたナノチューブ集積膜を用いた膜透過実験から、ナノチューブ内での物質輸送現象の研究が報告されている。中でも、独自に開発してきたシリカナノチューブ（以降シリカナノチャンネル）を PAA 膜内に集積させたナノチャンネル集積（NCA）膜は、チャンネル径や形状を任意に制御出来るために、チャンネル構造と物質輸送現象の関係を議論するために適した素材と言える。

2. 研究の目的

本研究では、ナノチャンネル内部における特異な物質輸送現象を理解し、ナノチャンネル内物質輸送に立脚した分離分析システムを構築することも目的として、以下の研究課題を遂行した。(1)物質輸送現象に影響を及ぼすナノチャンネル内溶媒物性の評価、(2) ナノチャンネル内部での物質輸送のリアルタイムモニタリング手法の開発、(3) ナノチャンネル内部での特異性が有効と予測されるキララル分離。

3. 研究の方法

各研究課題において以下の研究を遂行した。

(1) 物質輸送現象の理解

ナノチャンネル内部における物質輸送現象を理解するためには、ナノチャンネル内部に閉じ込められた溶媒の粘性や pH といった物性を解明することが必要である。そこで、膜透過型 NCA 膜の内部に各種蛍光プローブ分子を導入した蛍光測定から、細孔内溶媒物性の評価を行った。

(2) 物質輸送のリアルタイムモニタリング

ナノチャンネル内部における物質の拡散

挙動をリアルタイムで観測することができれば、物質輸送現象の特異性を系統的に研究することができる。ここでは、ナノチャンネル集積（NCA）膜を金属薄膜上に形成させることで発現する光導波路現象を利用した、新規なモニタリング手法の開発を目指した。

(3) キララル分離

キララル分離においては、キララルセクター分子をナノチャンネル内部に固定化し、ナノチャンネルを通過する溶質分子の拡散挙動の差を観測する必要がある。そこで、膜透過型 NCA 膜を2つの溶液間に挟み込み、キララルなアミノ酸の膜透過挙動を観測し、キララル選択的な物質輸送の可能性を検討した。

4. 研究成果

各研究課題において以下の成果を得た。

(1) 物質輸送現象の理解

直径が 3.1 nm および 13 nm の一次元シリカナノチャンネルが集積された膜透過型 NCA 膜を作製し、チャンネル内部にアミノプロピル（AP）、およびトリメチルアミノプロピル（TMAP）単分子膜を形成させた。以下、それぞれ AP-NCA 膜、TMAP-NCA 膜と呼ぶ。

TMAP-NCA を用いた系では、ナノチャンネル内部の pH 環境評価を行った。アニオン性の pH プローブ分子を静電的にチャンネル内部に吸着させ、外部溶液の pH (pH_{bulk}) に対する pH プローブ分子の酸解離挙動を蛍光励起スペクトルから解析したところ、バルク溶液系と比べてナノチャンネル内部で酸解離挙動に大きな差が観測された（図 1）。このようなナノチャンネル内部での特異的な酸解離挙動はピラニン以外の 3 種類の pH プローブ分子においても観測されたことから、ナノチャンネル内部の pH 環境が外部溶液の pH 環境と著しく異なるためである。図 1 で示したような酸解離挙動を基にして、ナノチャンネル内部の pH (pH_{pore}) を解析したところ、 pH_{bulk} が 2~9 の時に、ナノチャンネル内部は弱酸性~中性条件であることが示唆された。また、図 1 に示すようにナノチャンネル内部に閉じ込められた分子の酸解離挙動がチャンネル径（ここでは 3.1 nm と 13 nm の比較）に依存することが分かった。この結果については、細孔内部の誘電率がチャンネル径依存性に起因することが示唆されている。

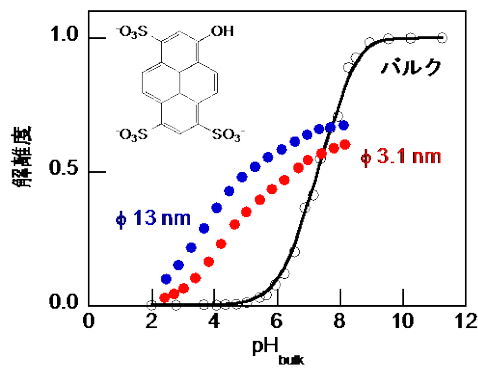


図1 ピラニンの酸解離挙動の比較

また、AP-NCA膜を用いた系では、粘性プローブであるローダミン B (RhB) を固定化させ、RhB の時間分解蛍光測定からチャンネル内の粘性の温度依存性を評価した (図2)。

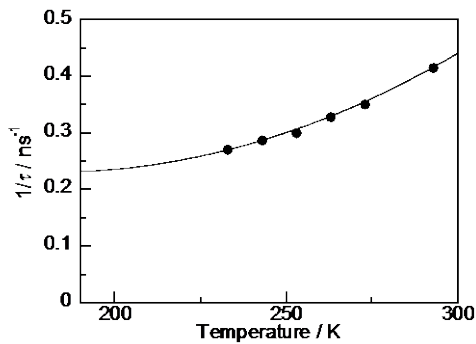


図2 AP 修飾シリカナノチャンネルに固定化した RhB 蛍光寿命の温度依存性

その結果、AP 修飾した直径 3.1 nm のシリカナノチャンネル内部に閉じ込められた溶媒水が、およそ 223 K まで凍らず、安定な過冷却状態となることを見いだした。溶媒粘性の温度依存性は非アレニウス型であることから、過冷却水が Fragile 溶媒と示唆された。さらに、223 K におけるチャンネル内過冷却水の溶媒粘性については、およそ 5 mPa s と見積もられ、過冷却状態バルク水の粘性に比べて比較的小さいことが分かった。

以上の通り、物質輸送現象に関連するシリカナノチャンネル内部の pH 環境や溶媒粘性を定量的に評価した。

(2) 物質輸送のリアルタイムモニタリング

ナノチャンネル内部への物質吸着と脱着ダイナミクスを測定すれば、拡散係数を見積もることが出来る。本研究では、界面活性剤ミセルを鋳型として形成するシリカ NCA 膜

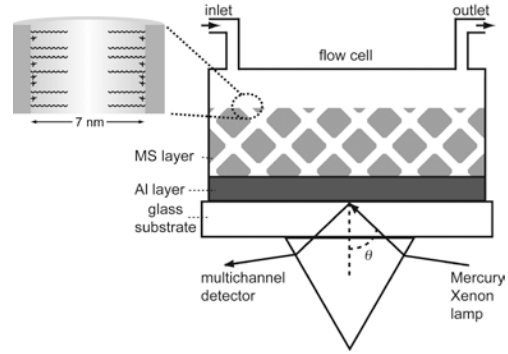


図3 OWG モニタリングの概略

(チャンネル径: ca. 7 nm), 陽極酸化により形成するアルミナ NCA 膜 (チャンネル径: 20~60 nm) を Al 薄膜上に形成させ、NCA 膜での光導波路現象を利用したモニタリング手法を開発した。図3にその概略を示す。NCA 膜を形成した試料基板をプリズムに接着したクレッチマン配置で、白色光の反射スペクトルを計測すると、反射光の減少ディップが観察される。このディップの波長位置は NCA 膜への物質吸着量にほぼ比例するために、吸脱着量のモニタリングが可能となる。

光導波路現象を利用したモニタリング (以下 OWG モニタリング) では、物質吸脱着に伴う NCA 膜の屈折率変化を計測するために、モル吸光係数の小さな物質に適応できる利点がある。しかし、検出感度の低さが問題であり、検出感度の改善が求められた。そこで、フレネル計算に基づき検出感度改善策を検討したところ、NCA 膜の平均屈折率を溶媒の屈折率に近づけると劇的に感度が改善できることを見いだした。この知見に基づき、NCA 膜の平均屈折率調整を図った。具体的には、ガラス基板上に Al 膜を真空蒸着した後に、Al 膜上部のみを陽極酸化することで、一

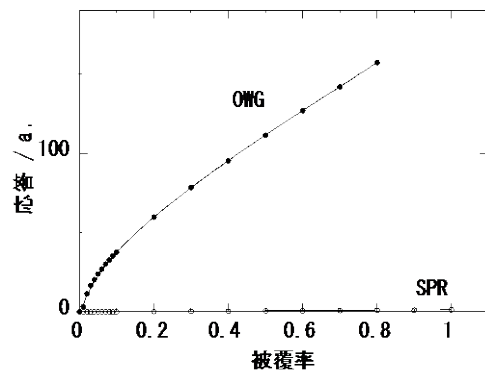


図4 OWG と SPR の応答比較

次元ナノチャンネルが集積したアルミナ NCA 膜を Al 薄膜上に形成させた。ナノチャンネルの直径や周期などを陽極酸化条件とポストエッチング条件によって制御することで、アルミナ NCA 膜の平均屈折率調整を図った。その結果、一般的な表面屈折率モニタリング法である表面プラズモン共鳴 (SPR) 法に比べて検出感度が 100 倍以上高くなることを見いだした。図 4 には、フレネル計算に基づく OWG 法と SPR 法の応答比較であり、この計算結果に対応した実験結果も得ている。

OWG モニタリング法は、高分子量のタンパク質から比較的分子量の界面活性剤まで幅広い物質の吸脱着速度測定が可能である。例えば、タンパク質であるミオグロビン、界面活性剤である SDS について吸脱着速度を測定できた。得られた吸脱着速度を Fick の拡散方程式に基づき解析したところ、いずれも $10^{-12} \sim 10^{-13} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 程度とバルク溶液中 ($\sim 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) に比べて極めて小さな値であることが分かった。この遅い拡散定数は、ナノチャンネル内部での立体的制約やチャンネル内壁との相互作用頻度の高さによるもの

表 1 PEG-Mb の ODS 修飾シリカナノチャンネルへの吸着定数と拡散定数

system	$K_{\text{ads}} / \text{M}^{-1}$	$D / \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$
ODS-MS1	3.2 ± 0.4	1.2×10^{-12}
ODS-MS24	3.1 ± 0.3	0.33×10^{-12}

と考えられる。

そこで、ナノチャンネルの実効チャンネル径が異なる系での分子拡散について検討した。ここでは、疎水的な PEG を修飾したミオグロビン (PEG-Mb) を調整し、ODS 修飾したシリカナノチャンネル (直径: ca. 7 nm) 内部での PEG-Mb の拡散挙動について、OWG モニタリングにより検討した。その結果、ODS の被覆率がおよそ 1 と 0.6 について、PEG-Mb の拡散定数が $1.2 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $0.33 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ と見積もられた。いずれの ODS 被覆率についても、PEG-Mb の吸着定数が同じ (表 1) だったことから、PEG-Mb の ODS 修飾ナノチャンネル内壁への親和性については、被覆率に依存しないと考えられる。拡散定数の違いについては、シリカナノチャンネル内壁に固定化された ODS のアルキル鎖が、被覆率によってほぼ直鎖状から折れ曲がり状に変化することで、実効チャンネル径に差が生じたためと考えられる。

以上の通り、高感度な OWG モニタリング法を開発すると共に、ナノチャンネル内部における物質拡散挙動の観測に適用できることを実証した。

(3) キラル分離

直径 3.1 nm の一次元シリカナノチャンネル

ルが集積された膜透過型 NCA 膜を作製し、ナノチャンネル内壁にキラルセクターとして β -シクロデキストリン (CD) を修飾した。この CD 修飾 NCA 膜を 2 つの溶液間に設置し、D,L-トリプトファン (D, L-Trp) の膜透過流速を測定した。その結果、D 体の膜透過流速が L 体に比べておよそ 7 倍程度大きくなることが分かった。同様な実験を直径 200 nm の一次元アルミナ細孔を有する PAA 膜で行ったところ、D, L 体の膜透過流速に差が無かった。以上の結果から、微小な一次元ナノチャンネルが効率的なキラル分離に適用できることが示された。

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 12 件)

- ① H. Arafune, A. Yamaguchi, K. Hotta, N. Teramae, "Encapsulation of PEG-modified Myoglobin in Hydrophobic Mesoporous Silica as Studied by Optical Waveguide Spectroscopy", *Anal. Sci.*, **29** 187-192 (2013). 査読有 [DOI: 10.2116/analsci.29.187]
- ② K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, "Deposition of Polyelectrolyte Multilayer Film on a Nanoporous Alumina Membrane for Stable Label-Free Optical Biosensing", *J. Phys. Chem. C*, **116** 23533-23539 (2012). 査読有 [DOI: 10.1021/jp308724m]
- ③ A. Yamaguchi, M. Namekawa, T. Itoh, N. Teramae, "Microviscosity of supercooled water confined within aminopropyl-modified mesoporous silica as studied by time-resolved fluorescence spectroscopy", *Anal. Sci.*, **28** 1065-1070 (2012). 査読有 [DOI: 10.2116/analsci.28.1065]
- ④ Y. Fan, K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, "Enhanced fluorescence in a nanoporous waveguide and its quantitative analysis", *Opt. Exp.*, **20**, 12850-12859 (2012). 査読有 [DOI: 10.1364/OE.20.012850]
- ⑤ K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, "Nanoporous Waveguide Sensor with Optimized Nanoarchitectures for Highly Sensitive Label-Free Biosensing", *ACS Nano*, **6**, 1541-1547 (2012). 査読有 [DOI: 10.1021/nn204494z]
- ⑥ A. Yamaguchi, H. Arafune, K. Hotta, T. Itoh, N. Teramae, "Adsorption and Desorption Dynamics of Sodium Dodecyl Sulfate at the Octadecylsilane Layer on the Pore Surface of a Mesoporous Silica Film Observed In-situ by Optical Waveguide Spectroscopy", *Anal. Sci.*, **27**, 597-603 (2011). 査読有 [DOI:

- 10.2116/analsci.27.597]
- ⑦ X. Chen, N. Teramae, A. Yamaguchi, M. Namekawa, T. Kamijo, A. Tonge, "Functionalization of mesoporous silica membrane with a Schiff-base fluorophore for Cu(II) ion sensing", *Anal. Chim. Acta*, **696**, 94-100, (2011). 査読有
[DOI: 10.1016/j.aca.2011.04.002]
- ⑧ A. Yamaguchi, M. Namekawa, T. Kamijo, T. Itoh, N. Teramae, "Acid-Base Equilibria inside Amine-Functionalized Mesoporous Silica", *Anal. Chem.*, **83**, 2939-2946 (2011). 査読有 [DOI: 10.1021/ac102935q]
- ⑨ A. Yamaguchi, T. Iimura, K. Hotta, N. Teramae, "Transparent Nanoporous Tin-Oxide Film Electrode Fabricated by Anodization", *Thin Solid Films*, **519**, 2415-2420 (2011). 査読有
[DOI: 10.1016/j.tsf.2010.11.049]
- ⑩ K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, "Properties of A Metal Clad Waveguide Sensor Based on A Nanoporous/Metal Multilayer Film", *Anal. Chem.*, **82**, 6066-6073 (2010). 査読有
[DOI: 10.1021/ac100654b]

[学会発表] (計 67 件)

国内外での学会・学術講演会における招待・特別講演

- ① 山口 央, 「多孔質ナノ材料の分析化学などへの応用について」, 富山県衛生研究所合同セミナー, 富山県衛生研究所, 2012年9月18日
- ② 山口 央, 「物質透過型ナノ多孔膜の開発とバイオ分析への応用」, 茨城県産学官連携成果発表会, 茨城県工業技術センター, 2012年2月16日
- ③ 山口 央, 「均一メソ多孔体内部の特異環境を利用したバイオセンシング系の構築」, 第12回機能構造と分析化学シンポジウム, 東北大学, 2011年11月19日
- ④ A. Yamaguchi, "Optical Waveguide Sensor Based on Nanoporous/Metal Multilayer Films", PACIFICHEM2010, Honolulu, Hawaii, USA, 18 Dec 2010.
- ⑤ 山口 央, 「多孔性陽極酸化膜を利用した分離分析手法の開発」, 第27回ARS鎌倉コンファレンス, KKR 江ノ島ニュー向洋, 2010年11月18日
- ⑥ 山口 央, 「メソ空間を分子認識場とするセンサー開発」, 第7回茨城地区分析技術交流会, テクノ交流館リコッティ, 2010年10月29日
- ⑦ 山口 央, 「円筒状アルミナ細孔内で形成する規則性メソ多孔材料」, 表面技術協会第121回講演大会, 成蹊大学, 2010年3月16日

- ⑧ 山口 央, 「鋳型電析および陽極酸化によるメソ構造電極の作製」, 第41回セミコンファレンス&第3回みちのく電気化学セミナー, 東京第一ホテル モンタナリゾート岩沼, 2009年12月7日
- ⑨ 山口 央, 寺前紀夫, 「複合ナノポーラス膜の開発」, 第26回無機・分析化学コロキウム, 東北大学川渡共同セミナーハウス, 2009年6月5日

[その他]

ホームページ

<http://anal.sci.ibaraki.ac.jp/yama/yamalab.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 央 (YAMAGUCHI AKIRA)

研究者番号：10359531

茨城大学・理学部・准教授

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし