

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550087

研究課題名(和文) 単一くし形微小電極を組み込んだ高感度マイクロ電気化学検出システムの構築とその応用

研究課題名(英文) Construction of a highly sensitive electrochemical detector on a microchip device with an integrated single comb-like array electrode and its application

研究代表者

石田 晃彦 (Ishida, Akihiko)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20312382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、複数の微細電極を適切な間隔で配列した単一くし形電極を考案し、電極の形状因子などを詳細に検討することで、より微量の物質を電気化学的に検出することが可能となった。本電極は、その形状の工夫によって1個の電極単独で高感度化を達成しているところに特色があり、多くの物質に適用でき、比較的安価な測定器を用いることができる点で有用である。今後、本電極は医療診断の分野で活用が見込まれているマイクロ流体分析デバイスの有力な検出器としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a single comb-like electrode was studied, which was formed by arranging a number of microelectrodes at a given spacing. A thorough examination of the shape factors of the electrode led to electrochemical detection of more trace amounts of substances. High sensitivity has been achieved by the electrode alone with a characteristic shape. The electrode has good utility because a wide variety of target substances can be detected and the detection can be performed with a relatively cheap measuring apparatus. This electrode is expected to be used as a powerful detector for microfluidic analysis devices possibly demanded in a field of clinical diagnosis in near future.

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：電気化学検出 くし形電極 チャンネルフローセル 液体クロマトグラフィー チップ分析

### 1. 研究開始当初の背景

近年、革新的な実験機器として、いくつかの化学分析プロセスを半導体微細加工技術により集積した超小型分析装置の開発が活発に進められている。これらは、Lab-on-a-chip system や Micro Total Analysis System ( $\mu$ TAS)と呼ばれるもので、場所を問わずに容易で短時間で分析を可能とする。このような分析装置での検出には、感度の観点からはレーザー誘起蛍光法(LIF)または蛍光顕微鏡法が有効とされている。しかし、測定対象物質のほとんどが非蛍光性であり、装置が大型かつ高価で取り扱いには熟練が必要であるため、応用範囲は限定的である。一方、電気化学検出法(電流測定法)の利用は早くから検討されてはいたが、最近特に注目されている。これは、測定装置が小型であること、操作が簡便であること、感度が比較的高いこと、適用可能物質が多いことが理由となっている。しかし、これまでの電気化学検出法の適用例を見る限り検出限界は数 $\mu$ M オーダー近辺にとどまっている。実際、我々が開発したマイクロ流体ベースのHPLCにおいても同様の検出限界しか得られていない。また、高感度化の試みは少なく、感度の向上には至っていない。この主な原因は、一般的には、電極面積の増加に伴うシグナルとシグナル/ノイズ比(S/N比)の挙動が相反していることにある。すなわち、より低い検出限界を得るのに都合がよい大きなS/N比を求めようとすると、電極が小さいため、検出困難なほどシグナル(電流値)が小さくなり、両者を同時に増大させることは困難だということである。そのため、新たな着想による電気化学検出のさらなる感度向上が課題となっていた。

そこで、この課題の解決への取り掛かりとして、電極反応の問題を可視化して理解するため、我々は電極反応の数値シミュレーションを行った。そのために、一般的なチャンネルフローセルで、その流路の底面に設置したバンド形の作用電極上に形成する目的成分の濃度分布を計算した。その結果、電極幅が微細な場合、薄い濃度の層(拡散層)が電極全体に形成するが、電極長さを100倍にした場合、拡散層が形成するのは電極上流のごく限られた部分だけであることが判明した。電流の大きさは拡散層の厚さに反比例するため、大きな電極では、下流の多くの部分が電流の発生にほとんど寄与していないといえる。また、ノイズは電極面積に比例するため、電極が大きいほどシグナル/ノイズ(S/N)比は逆に小さくなる。したがって、この検討結果から、電極面積の観点だけでは感度の向上は望めず、薄い拡散層を電極面全体に形成させる新たな原理の考案が必要であることが示唆された。そこで、我々は電極形状の観点から検討したところ、微小電極を櫛のように等間隔で配列した単独の電極によって、シグナルとS/N比を同時に増大させられること

を見出した。なお、既に2本のくし形電極をかみ合わせて酸化還元サイクルを行う電極が提案されているが、本電極の原理はそれとは異なり、デュアルチャンネル式の測定器が必要なほか、適用物質や条件が限られるという問題があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述のように多数の微小電極をくし形に配置させるという原理において電極の形状因子や流路構造などのさらなる詳細な検討を行うことにより電気化学検出の感度向上を図ることを目的とした。

本研究で検討する電極を従来のくし形対電極と区別するため単一くし形電極と呼ぶ。

### 3. 研究の方法

電極の形状因子と電極を配置する流路のサイズの検討のためにシンプルな構造のチャンネルフローセルデバイスを作製した。電極は、金を材料として真空蒸着法およびフォトリソグラフィーによりポリスチレン基板表面に作製した。流路は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を材料としてソフトリソグラフィーにより作製した。PDMSがもつ粘着性により電極の基板と流路を接合し、フローセルデバイスとした(図1)。

電極については、くし形の単位となる電極の幅、電極間距離、電極数を様々変えたものを作製した。また、流路については、流路の高さおよび幅が様々異なるものを作製した。

フローセルデバイスで定常電流を求めるため、フローセルデバイスに電気活性物質の溶液(支持電解質、pH緩衝剤を含む)を微量HPLCポンプで所定の流量で連続的に流し、所定の電位で物質の酸化電流を測定した。この酸化電流とベースラインとの差を電流値として評価に用いた。

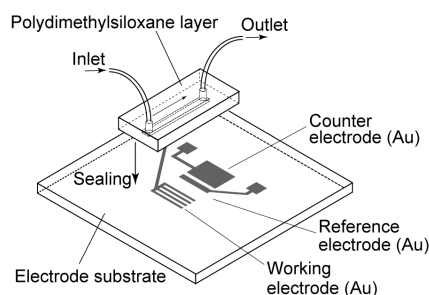


図1 単一くし形電極の性能評価に用いたデバイスの概要

### 4. 研究成果

#### 1) 電極形状パラメーター

単位電極を50 $\mu$ m幅とし電極間距離が異なる単一くし形電極を様々作製し、それぞれフローセルとして組み立てたのち、フェロシアン化カリウム溶液を送液し、電流値を測定した。その結果、電流値は電極間距離とともに増加したのち200 $\mu$ mで最大一定値に達した。この測定を様々な流量(5~15 $\mu$ m)で行ったところ、最大電流値を与える電極間距離は

200  $\mu\text{m}$  と、流量に依存しなかった。さらに、単位電極の幅を減少させて同様の測定を行ったところ、最大電流値を与える電極間隔は電極幅とともに減少した。

電極間距離を最大電流が得られる値 (200  $\mu\text{m}$ ) に固定し、単位電極数を変えた単一くし形電極で電流値を測定したところ、電流値は電極数に比例して増加した。一方で、電極数の増加に伴う電極面積の増加にもかかわらず S/N 比は電極数とともに減少することはなくほぼ一定であった。

以上から、電極間距離を適切に設定した単一くし形電極を用いれば単位電極数を増やすことで S/N 比を下げることなく感度 (電流値) を倍増できることが実証された。また、電極間距離は流量に依存しないことから流量ごとに電極間距離を変える必要がなく、同一の電極デザインを様々な流量 (測定条件) に適用できることも実証された。

## 2) 各電極の面積と設置位置

作用電極と参照電極の距離、参照電極および対電極の大きさを変えて、それらの電流値への影響を検討することにより、感度の観点から各電極の設置条件 (位置と面積) を決定した。

## 3) 流路サイズの感度への影響

本研究で用いた、直方体型の流路とその底面に配置した電極からなるチャンネルフローセルは、流体の線速度を増加することでも電流値を増加させることができる。流量が分析条件で固定されている場合でも流路の断面積を小さくすることで線速度を大きくすることができる。ただし、流路の断面を縮小するほど流路壁が流体から受ける圧力が大きくなり、それが過大になると流路と基板の剥離が発生する。そこで、幾通りかの高さと幅を変えた流路にキャリア液を流し、剥離の有無を調べ、剥離が起きない幅と高さの下限値を関係づける関数を得た。さらに、その範囲で流路の幅と高さそれぞれの電流値および S/N 比への効果を検討した。その結果、剥離を生じさせない限界で電流値と S/N 比を最大にできる流路の高さと幅について明らかにし、流路について、機械的強度と感度の両面について理論的な設計指針を得た。

以上の検討に基づいて電極形状および流路のデザインを決定し、フローセルを構築した。次に、フェロシアン化カリウムをモデル物質に用いて検量線を作成することでフローセル単独の性能 (検出限界) を評価した。その結果、サブ  $\mu\text{M}$  オーダーだった検出限界が  $\text{nM}$  オーダーまで向上し、実用的な感度が得られることを確認した。また、従来高感度な検出器とされるウォールジェット式フローセルと比較しても本フローセルがそれを超える感度を持ちうることを確認した。

以上から、電流値の電極形状および流量へ

の依存性を明らかにし、これまでの成果と合わせて電極デザインの設計指針を得た。

## 4) マイクロ HPLC への適用

検討してきた単一くし形電極をマイクロ HPLC の検出器として使用しその性能を評価した。そのために、単一くし形電極とマイクロ充填カラムを一つの小型基板に搭載したマイクロ HPLC デバイスを作製し (図 2)、このデバイスでカテコールアミン類などを分離・検出した。単一くし形電極を構成する単位電極数の増加は感度の向上につながる一方で、電極総長さの増大につながり、それがクロマトグラムピークをブロードにすることが予想された。しかし、実際には、単位電極数が異なるデバイスを用いた実験から、電極数 24 (電極総長さが約 6 mm) まではピーク幅に影響しないことを確認した。このことから、電極総長さをもともと大きくなる単一くし形電極は、その幾何学的性質が直ちに分離度や分離効率に影響することはなく、マイクロ HPLC の検出器として適用可能であることが実証された。

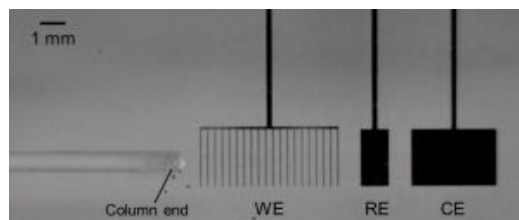


図 2 マイクロ HPLC の検出器として組み込んだ単一くし形電極

## 5) 単一くし形電極の応答モデル

単一くし形電極の電流応答をモデル化する目的で電極の形状因子 (電極間距離、電極数) と電流値の関係について理論的に検討した。一般に、電気化学検出器の電流値は電極表面での濃度勾配を面積分することで得られるため、各種デザインの電極で濃度勾配を数値シミュレーションすることにより電流値を算出した。その結果、電極間距離を変えたときの電流値の変化は実験結果と一致した。また、最大電流値を与える最小電極間距離と拡散係数の関係については、実験的に明らかにすることは困難であったが、数値シミュレーションにより最小電極間距離は拡散係数に依存しないことを明らかにすることができた。なお、この結果はどのような物質にも同じデザインの単一くし形電極を適用できることを示唆している。単位電極の数と電流値の関係については、実験結果とシミュレーションの一致は部分的であり、実験系をさらに正確に再現したシミュレーションが必要となったが、高性能なシミュレーション環境が必要となるため今後の課題とした。

以上、本研究では、電極形状に着目することで単一の電極で高感度化を達成した。単一

くし形電極は、多くの物質に容易に適用でき、比較的安価な測定器を用いることができる点で有用である。また、本研究は、これまで比較的広い適用範囲にもかかわらず、感度がならず、実用性が不十分だった電気化学検出方式のマイクロ分析システムの性能を格段に向上させたという点で大いに意義がある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Jun Sekiya, Tatsuya Tanaka, Satoshi Yokogawa, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, A Single Comb-like Electrode Array for Highly Sensitive Electrochemical Detection of Catecholamine in Microfluidic Device, Proceedings of 2013 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, 査読有, 2013, 50-51

Akihiko Ishida, Takehiro Fujimoto, Satoshi Yokogawa, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, Ichiro Yanagisawa, Portable Liquid Chromatography System Based on Battery-powered Electroosmotic Pump and Microchip with Packed Column and Electrochemical Detector, Proceedings of MicroTAS 2012 conference, 査読有, 2012, 1183-1185

横川理史, 田中達也, 谷 博文, 石田晃彦, ポリスチレン基板に作製した単一くし形微小電極の応答特性の評価とマイクロチップ分析への応用, Chemical Sensors Supplement B, 査読無, 27, 2011, 125-127

### 〔学会発表〕(計20件)

Akihiko Ishida, Satoshi Yokogawa, Tatsuya Tanaka, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, Highly Sensitive Electrochemical Detector for a Miniaturized Liquid Chromatography System with a Microfluidic Chip, 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2013), 2013年6月17日, Amsterdam RAI (オランダ)

Jun Sekiya, Tatsuya Tanaka, Satoshi Yokogawa, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, A SINGLE COMB-LIKE ELECTRODE ARRAY FOR HIGHLY SENSITIVE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF CATECHOLAMINE IN MICROFLUIDIC DEVICE, 2013 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, 2013年4月10日, Marina del Rey Marriott (USA)

Akihiko Ishida, Takehiro Fujimoto, Satoshi Yokogawa, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, Ichiro Yanagisawa, PORTABLE LIQUID CHROMATOGRAPHY SYSTEM BASED ON BATTERY-POWERED ELECTROOSMOTIC PUMP AND MICROCHIP WITH PACKED COLUMN AND ELECTROCHEMICAL DETECTOR, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2012), 2012年10月28日~2012年11月01日, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)  
石田 晃彦, 横川 理史, 谷 博文, 単一くし形電極に基づくマイクロ流体電気化学検出システムの構築, 日本化学会第92春季年会, 2012年3月26日, 慶應義塾大学日吉キャンパス(横浜市)  
横川 理史, 田中 達也, 谷 博文, 石田 晃彦, ポリスチレン基板に作製した単一くし形電極の応答特性の評価とマイクロチップ分析への応用, 第52回化学センサ研究発表会・2011年電気化学秋季年会, 2011年9月11日, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター(新潟市)

### 〔その他〕

ホームページ等

[http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/tokeshi\\_lab/?post\\_type=research](http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/tokeshi_lab/?post_type=research)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 晃彦 (ISHIDA, Akihiko)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 20312382