

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19205010

研究課題名 (和文) マイクロチップ内単一ピコリットル微粒子に基づく新規超高感度分析

研究課題名 (英文) Novel Trace Analysis Systems Based on Single Picoliter Microparticles Combined with Microflow Devices

研究代表者

喜多村 昇 (KITAMURA NOBORU)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：50134838

研究成果の概要 (和文)：

1-ブタノール(BuOH)水溶液系におけるレーザー誘起単一油滴形成・捕捉・顕微分光法とマイクロ流路を組み合わせた新規な計測法の開発を行った。特に、レーザー誘起形成させた単一油滴中に微量成分を連続的に抽出することを目指し、手法をキャピラリー電気泳動法と組み合わせた新規なシステムを構築した。BuOH-酢酸アンモニウム緩衝溶液系のキャピラリー電気泳動条件下においてレーザー誘起単一油滴形成に成功するとともに、電気浸透流の存在にも関わらず形成した油滴をレーザー捕捉・顕微計測することにも成功した。これに基づき、アルミニウムジヒドロキシアゾベンゼン錯体(Al^{3+} -DHAB)やローダミン B(RhB)の電気泳動分離とレーザー誘起形成油滴への抽出を確認することができた。RhB の場合、通常のキャピラリー電気泳動の蛍光検出の検出限界をはるかに超え、ピコリットル油滴に抽出することにより $10^{-20} \text{ mol/dm}^3$ 程度まで検出可能であることが示され、所期の目的を達成することができた。

一方、RhB をドープしたマイクロメートルサイズのカチオン交換樹脂微粒子の大気中におけるレーザー発振に成功するとともに、微粒子周囲のガス雰囲気を反映してレーザー発振挙動が変化することを明らかにした。さらに、エアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微計測に成功した。その結果、エアロゾル水滴を球形共振器とした光増幅が起こることや、これを利用して水滴サイズを正確に計測することが可能であることを明らかにした。また、温度制御下におけるエアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微計測法も開発し、低温下におけるエアロゾル水滴の過冷却状態の分光計測と相転移現象を世界に先駆けて *in situ* 観測することができた。

研究成果の概要 (英文)：

In the present study, we showed that a single 1-butanol (BuOH) droplet could be produced by infrared laser irradiation under an optical microscope and the droplet produced could be simultaneously trapped optically by the infrared laser beam. The technique was then combined with a capillary electrophoresis system. Single BuOH droplets were produced by laser irradiation and trapped stably even in the presence of an osmotic flow. An aluminum dihydroxyazobenzene chelate complex (Al^{3+} -DHAB) or rhodamine B (RhB) was then separated by capillary electrophoresis and the solute was then forced to distribute to single BuOH droplets produced by infrared laser irradiation. In the case of RhB, the lower detection limit of the dye distributed to the BuOH droplet was as low as $10^{-20} \text{ mol/dm}^3$, which was much lower than the ordinary detection limits in capillary electrophoresis.

Laser oscillation in single dye-doped cation-exchange resin microspheres was also applied to ultratrace analysis. Laser oscillation of single RhB-doped microparticles under air was confirmed by characteristic emission spikes superimposed to the spontaneous broad emission spectrum. In the presence of organic gas vapor in air, the characteristic laser oscillation spikes from the RhB-doped microparticle were modulated owing to the change in the particle/surrounding medium refractive index conditions. The present study was also extended to laser trapping - microspectroscopy of picoliter aerosol water droplets in air. We succeeded in conducting temperature-controlled laser trapping of aerosol water droplets as well as in observing formation of supercooled water droplets down to 223 K.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	38,700,000	11,610,000	50,310,000

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：単一微粒子、高感度分析、レーザー捕捉、レーザー発振、マイクロチップ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、従来から、溶液中の単一マイクロメートル微粒子のレーザー捕捉・顕微計測法（吸収・発光・ラマン・電気化学）に基づき、単一微粒子化学ならびに微小空間の化学の研究に成果を挙げてきた。例えば、イオン交換過程を単一樹脂レベルで観測することにより、樹脂中のイオン交換過程を世界で初めて直接測定することに成功している。また、マイクロ化学を進展させるために重要なツールとなるマイクロチャンネルチップの作製とその化学的利用についても精力的に研究を行ってきた。特に、極めて簡便なポリマーマイクロチャンネルチップの創製法を考案するとともに、マイクロ電極やマイクロヒーターを集積化したチップによる新規な計測法やマイクロリアクターへの応用なども試みてきた。しかしながら、このような手法により単一マイクロメートル微粒子の計測・分析や微小体積の計測・分析は可能であるが、分析化学が究極的な目的とする超微量分析を行うためには、更なる手法の改善・開発が望まれる。そこで、本研究においては単一ピコリットル微粒子のレーザー捕捉・顕微計測とマイクロ流路の特徴を組み合わせた新たな研究を展開することを目指した。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が報告している、1) 溶液系における『レーザー誘起単一油滴形成・レーザー捕捉・顕微計測法』(Anal. Chem., 77, 6055 (2005) ならびに 2) ユーザーフレンドリーな『マイクロチャンネルチップによる連続的な化学操作』を組み合わせ、新規な超微量計測法の開発の展開を目的とした。

具体的には、

研究項目 1:『レーザー誘起単一油滴形成に基

づく高感度抽出・濃縮・検出の自動化とそのマイクロ流路系への展開』

研究項目 2:『単一微粒子のレーザー発振現象を利用した新規な高感度計測法の開発と連続・自動化』

また、当初の研究計画には無かったが、研究途上で見出した関連研究である

研究項目 3:『単一ピコリットルエアロゾル水滴の分析化学的展開に関する研究』を推進した。

3. 研究の方法

研究項目 1

これまでトリエチルアミン(TEA)/H₂O 系や1-ブタノール(BuOH)/H₂O 系においてレーザー誘起油滴形成を確認している。これに基づき、レーザー誘起油滴形成法を溶質の液/液抽出・濃縮に展開した。溶液静止系における油滴形成・液/液抽出における分配は溶質の拡散に規定される。一方、マイクロ流路中においては、溶液フローにより溶質の供給が効率的に行われるため、溶液静止系では達成できない油滴への効率的な抽出・濃縮を行うことができるものと期待される。特に、希薄溶液試料であっても、連続的な溶液フローにより単一ピコリットル油滴に自動的な濃縮を行うことができるとともに、顕微分光法により濃縮成分を *in situ* 計測可能である。これらを組み合わせることにより新規な微量成分の計測法を開発することを目指した。

研究項目 2

微粒子のレーザー発振挙動は微粒子と周囲の媒体の屈折率差により決まる。実際に、レーザー発振微粒子を他の微粒子に接触あるいは接近させることにより、微粒子内の蛍光の全反射による共振条件が変化し、微粒子のレーザー発振挙動が変化する現象が既に報告されている。したがって、溶質の存否および溶質濃度によって微粒子周囲の溶液組

成・屈折率を変化させることにより、微粒子のレーザー発振挙動を制御可能であると考えられる。また、レーザー発振微粒子はレーザー捕捉・マニピュレーションすることが可能であり、各種の顕微分光を行うことができる。これに基づき、微粒子のレーザー発振挙動を指標とし、周囲の媒体に共存する溶質を微粒子/媒体間の屈折率差として読みだす新規な計測法を開発することを試みた。

研究項目 3

当初の研究計画には無かったが、本課題の研究を進めている段階において、新たに大気中の微粒子であるエアロゾルのレーザー捕捉に成功した。単一エアロゾル微粒子に基づく新規な計測法につながる研究であり、本研究課題にも密接につながるものであるため、本項目についても精力的な研究を行った。

4. 研究成果

研究項目 1 :

水中における BuOH 濃度の低下とともに均一相から水/BuOH 分離相に変化する温度は上昇し、約 7 wt % の BuOH 水溶液においては、室温付近に相転移温度を持つ。一方、H₂O は Nd:YAG レーザーの基本波長である 1064 nm に吸収を持つ。顕微鏡下において BuOH 水溶液に 1064 nm レーザー光を照射することにより、水の光熱変換現象を介して相転移を誘起し、レーザー光の焦点近傍に単一ピコリットル BuOH 油滴を生成させることができる。そこで、顕微鏡下に設置したマイクロ流路に蛍光性のアルミニウムジヒドロキシアゾベンゼン錯体(Al³⁺-DHAB)を含む BuOH 水溶液を導入し、溶液フロー条件下においてレーザー誘起単一油滴形成・顕微蛍光観測を行った。その結果を Figure 1 に示す。縦軸は BuOH 油滴形成に基づく油滴からの Al³⁺-DHAB 蛍光強度を示す。1064 nm レーザー光の照射により BuOH 油滴が生成し、それに伴い Al³⁺-DHAB が油滴中に抽出され、蛍光として観測される。レーザー光の照射を停止すると油滴は周囲の溶液に溶解するため消失し、蛍光も観測されなくなる。従って、マイクロ流路を用いた溶液フロー条件下においては、レーザー誘起単一油滴形成を連続的かつ再現性良く繰り返し起こすことが可能である。

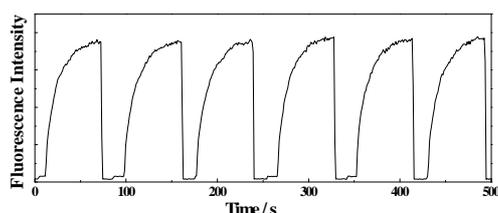


Figure 1 マイクロ流路中におけるレーザー誘起単一 BuOH 油滴形成と Al³⁺-DHAB の液/液抽出・顕微蛍光計測

本手法とキャピラリー電気泳動法を組み合わせることにより、分離された試料をレーザー誘起生成油滴に次々と、かつ連続的に抽出・濃縮する高感度分析へと展開した。種々の条件を探索した結果、BuOH 7.2 wt %, pH = 6.3 の酢酸アンモニウム/HCl 緩衝液(92.8 wt%)を用いることにより電気泳動分析が可能であるとともに、1064 nm 照射によるレーザー誘起単一油滴形成が可能であることを明らかにした。そこで、Al³⁺-DHAB を試料とし、電気泳動条件下におけるレーザー誘起液/液抽出分離を試みた。結果を Figure 2 に示す。Al³⁺-DHAB は電気泳動によりゾーン分離し、エレクトロフェログラムにおいて蛍光ピークとして現れている。また、1064 nm レーザー光を照射していない場合に比べ、照射条件下において蛍光ピーク強度ははるかに強くなっていることが確認できる。即ち、Al³⁺-DHAB を単一ピコリットル BuOH 油滴に抽出することにより計測手法を大きく高感度化できることを実験的に示すことができた。同様な実験を蛍光性色素であるローダミン B(RhB)を用いて行った。この場合、試料として 10⁻²⁰ mol/dm³ の RhB/BuOH 水溶液を用いても電気泳動・蛍光検出することが可能であった。一般的に、キャピラリー電気泳動法における蛍光検出においては試料の検出限界は 10⁻¹² mol/dm³ 程度であるとされているが、本手法はそれをはるかに凌ぐ検出下限を示した。一般的に、色素分子の蛍光量子収率は水中に比べ油相中で大きくなる。従って、水相から BuOH 油滴に抽出することにより高感度化することが可能になる。本研究課題の目的の一つを達成することができた。

研究項目 2 :

蛍光色素を含有させた微粒子に光照射を行うと、微粒子内部から発せられた色素蛍光は微粒子/媒体界面において全反射しながら内部に閉じ込められ、光の共振条件が成立するとレーザー発振が起こる。これは光の whispering gallery mode 共鳴として知られている現象で、

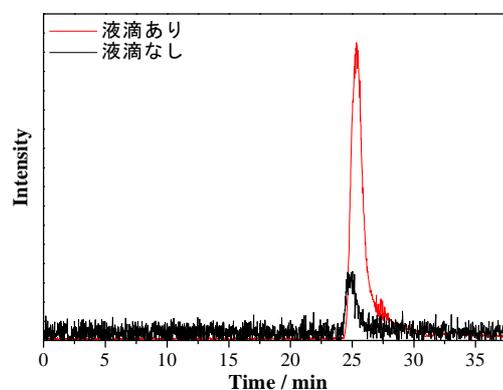


Figure 2 キャピラリー電気泳動条件下におけるレーザー誘起液/液抽出・顕微蛍光計測

高分子微粒子や液滴等の球形微粒子は微小共振器として働く。微粒子のレーザー発振は微粒子/媒体界面における光の全反射現象に基づくため、微粒子/媒体間の屈折率差が重要となる。これに着目すると、レーザー発振挙動を用いて微粒子/媒体間の屈折率差をモニターすることが可能である。媒体の屈折率は溶解している溶質の濃度や種類によって異なるはずであるため、これを利用した新規な計測法へと展開することを試みた。

試料としてカチオン性蛍光色素であるRhBを含有させたカチオン交換樹脂を用いた。大気下、顕微鏡下において単一RhB/カチオン交換樹脂に532 nmのパルスレーザーを照射した際の蛍光スペクトルをFigure 3に示す。溶液中のRhBは550~700 nmにブロードな蛍光スペクトルを示すが、RhB/カチオン交換樹脂においては600~700 nm近辺のブロードな発光スペクトルに加え、640~680 nm領域に鋭いピーク状の発光線が多数観測された。これらの発光の帰属を行うため、Figure 3に示したブロードな発光領域(赤)およびスパイク状発光ピーク(青)強度の励起光強度依存性を検討した。ブロードな発光は励起光強度の1次に比例するのに対し、スパイク状の発光はある境界値を境にして励起光強度の2次に比例することが明らかになった。従って、ブロードな発光は自然放光であり、スパイク状の発光はレーザー発振光であると結論される。

そこで、レーザー発振微粒子の周囲の雰囲気、即ち屈折率を変化させることによりレーザー発振挙動がどのように変わるかを検討した。その結果をFigure 4及び5に示す。Figure 4は大気中および水中におけるRhB/カチオン交換樹脂のレーザー発振スペクトルであるが、屈折率が1.33である水中においては、屈折率~1.0である大気中に比べ、レーザー発振が大きく抑制されていることが分かり、微粒子(屈折率 1.58)と周囲の媒体の屈折率差がレーザー発振に大きな影響を与えていることが分かる。また、Figure 5は大気中と大気中にn-ペンタンの蒸気を導入した際の単一

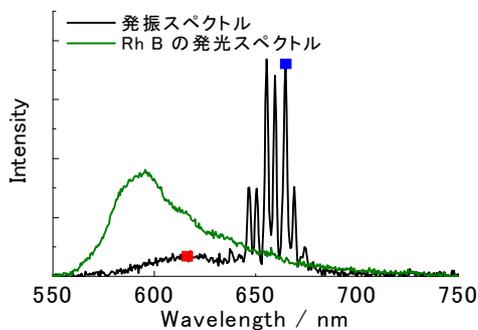


Figure 3 単一 RhB/カチオン交換樹脂の大気下におけるレーザー発振スペクトル

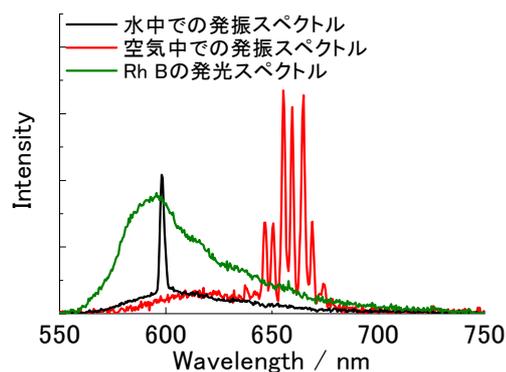


Figure 4 微粒子のレーザー発振に対する媒体効果

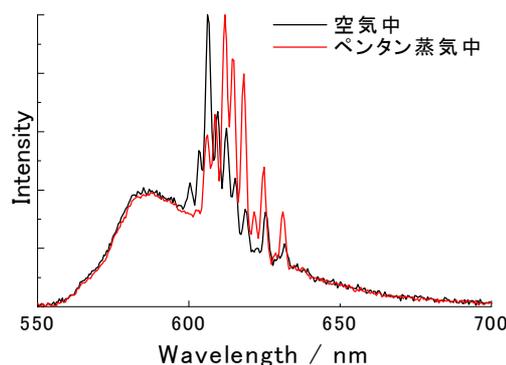


Figure 5 大気中における単一微粒子のレーザー発振に対する有機蒸気の影響

RhB/イオン交換樹脂のレーザー発振の様子を示す。レーザー発振ピークのモードがn-ペンタングスの導入により変化していることが確認された。従って、レーザー発振微粒子周囲の僅かな屈折率変化をレーザー発振ピークモードの変化として捉える事が可能であり、これを利用した新規な計測法へと展開できる可能性を示すことができた。

研究項目 3 :

本研究において、Figure 6 に示した単一エアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微計測(蛍光・ラマン分光)システムを開発・確立した。ネブライザーにより発生させたエアロゾル水滴を倒立型顕微鏡のステージ上に設置した試料チャンバーに導入し、約2マイクロメートル程度の単一微小水滴をレーザー捕捉した。単一水滴をレーザー捕捉し続けると、捕捉されていないエアロゾル水滴が衝突して捕捉水滴のサイズは大きくなる。ほぼ飽和水蒸気圧の実験条件下においては、水滴をレーザー捕捉し続けることにより約16マイクロメートル程度の水滴とすることができ、これを数時間にわたって安定に捕捉することが可能であった。さらに、コロイド微粒子と同様に、単一エアロゾル水滴の顕微分光にも成功した。

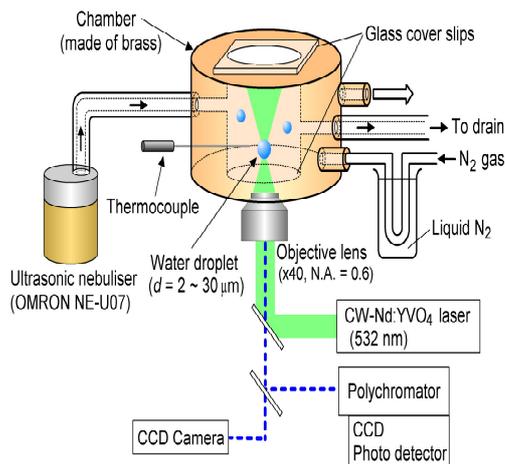


Figure 6 単一エアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微計測システム

さらに、本研究では、金属ブロック製の試料チャンバーを用いるとともに、液体窒素中を通過させた窒素ガスを試料チャンバー周囲に流速制御しながら導入することにより、エアロゾル系を室温から 220 K 程度まで温度コントロールすることが可能である。これを用いて、単一エアロゾル水滴をレーザー捕捉により保持しながら、試料チャンバーの温度を室温から 223 K まで冷却する実験を試みた。その結果、エアロゾル水滴は大気中において何に触れることも無く浮遊しているため、0 °C 以下でも凍結すること無く、過冷却液体として存在することが顕微画像観測ならびに水滴の顕微ラマン計測から明らかにすることが出来た。Figure 7 に単一エアロゾル水滴の顕微ラマンスペクトルの温度依存性を示す。293 K においては水に特徴的なブロードなラマンスペクトルが観測されている。しかしながら、図から分かるように、水滴を 273 K から 223 K まで冷却してもラマンスペクトルの形状はほぼ変わらず一定であり、氷に特徴的なラマンスペクトルは観測されなかった。また、同時に観測した顕微画像における水滴の表面はスムーズであり、氷が形成された特徴は確認されなかった。従って、大気中において浮遊している水滴は 223 K 程度まで過冷却水として存在していることが明らかになった。浮遊しているために核発生が起こること無く過冷却水として存在することが分かる。また、223 K 付近において過冷却水滴をレーザー捕捉し続けると、相転移が起こり、氷形成するプロセスを世界で初めて実時間で観測することに成功した。

以上のように研究項目 1 および 2 とともに当初の目的を達成することができたとともに、研究計画にはなかった研究項目 3 についても大きな研究の進展があった。特に、研究項目 3 において開発した温度制御型のレーザー捕

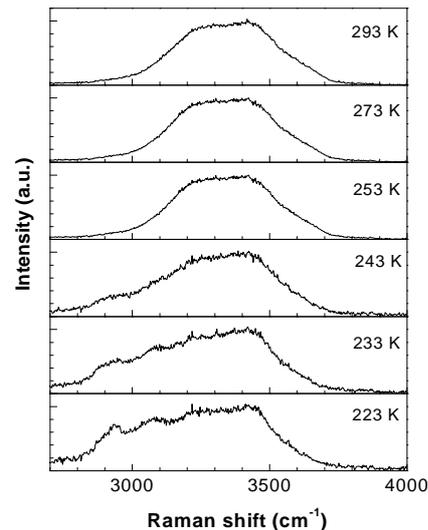


Figure 7 単一エアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微ラマン測定

捉用チャンバーは今後の研究の更なる進展を促すことが期待される大きな成果である。

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 10 件)

- 1) Optical Trapping of Amino Acids in Aqueous Solutions.
Y. Tsuboi, T. Shoji, and N. Kitamura. *J. Phys. Chem. C*, 査読有, 114(12), 5589 - 5593 (2010).
- 2) Optical Manipulation of Proteins in Aqueous Solution.
Y. Tsuboi, T. Shoji, M. Nishino, S. Masuda, K. Ishimori, and N. Kitamura. *Appl. Surf. Sci.*, 査読有, 255, 9906 - 9908 (2009).
- 3) Femtosecond Transient Absorption Study on Relaxation Intermediates in Oxymyoglobin.
S. Ishizaka, T. Wada, and N. Kitamura. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 査読有, 8(4), 562 - 566 (2009).
- 4) Phase Transition Dynamics of Fluorescent-Labeled Poly(N-isopropylacrylamide) in Aqueous Solution as Revealed by Time-Resolved Spectroscopy Combined with a Laser T-Jump Technique.
Y. Tsuboi, Y. Yoshida, N. Kitamura, and K. Iwai. *Chem. Phys. Lett.*, 査読有, 468, 42 - 45 (2009).
- 5) Polymer Channel Chips As Versatile Tools in Microchemistry
N. Kitamura, K. Ueno, and H.-B. Kim. *Anal. Sci.*, 査読有, 24(6), 701 - 710 (2008).
- 6) Laser-Induced Reversible Volume Phase Transition of a Poly(N-isopropyl acrylamide) Gel Explored by Raman Microspectroscopy.

- Y. Tsuboi, M. Nishino, and N. Kitamura. *Polymer J.*, 査読有, 40(4), 367 - 374 (2008).
- 7) Phase Separation Dynamics of Aqueous Solutions of Thermoresponsive Polymers Studied by a Laser T-Jump Technique. Y. Tsuboi, Y. Yoshida, K. Okada, and N. Kitamura. *J. Phys. Chem. B*, 査読有, 112 (9), 2562 - 2565 (2008).
- 8) Crystallization of Lysozyme Based on Molecular Assembling by Photon Pressure. Y. Tsuboi, T. Shoji, and N. Kitamura. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, 46(49), L1234 - L1236 (2007).
- 9) Phase Separation of Aqueous Poly(vinyl methylether) Solutions Induced by the Photon Pressure of a Focused Near Infrared Laser Beam. T. Tsuboi, M. Nishino, Y. Matsuo, K. Ijro, and N. Kitamura. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 査読有, 80(10), 1926-1931 (2007).
- 10) A Sensor for Adenosine Triphosphate Fabricated by Laser-Induced Forward Transfer of Luciferase onto a Poly-(dimethylsiloxane) Microchip. Y. Tsuboi, Y. Furuhashi, and N. Kitamura. *Appl. Surf. Sci.*, 査読有, 253, 8422 - 8427 (2007).

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 気相中における過冷却微小水滴のレーザー捕捉・顕微分光
石坂昌司, 和田照秀, 喜多村昇, 2009 年光化学討論会, 2009.9.16-18, 桐生市市民文化会館
- 2) レーザー捕捉顕微分光法を用いた気相中における光誘起微小水滴発生機構に関する研究
鈴木雄也, 石坂昌司, 喜多村昇, 第 26 回エアロゾル科学・技術研究討論会, 2009.8.19-21, 岡山大学
- 3) A Laser Trapping and Spectroscopy Study on Photoinduced Water Droplets Formation in Air
Y. Suzuki, S. Ishizaka, and N. Kitamura, 18th International Conference Nucleation and Atmospheric Aerosols, 10-14 August 2009, Prague, Czech Republic
- 4) A Study on Phase Transition of Single Supercooled Water Droplets in Air by Means of Laser Trapping and Spectroscopy S. Ishizaka, T. Wada, and N. Kitamura, 18th International Conference Nucleation and Atmospheric Aerosols, 10-14 August 2009, Prague, Czech Republic
- 5) 気相中における過冷却微小水滴の相転移に関する検討

- 石坂昌司, 和田照秀, 喜多村昇, 第 70 回分析化学討論会, 2009.5.16-17, 和歌山大学栄谷キャンパス
- 10) レーザー捕捉・顕微ラマン分光を用いた過冷却微小水滴の相転移温度の決定
和田照秀, 石坂昌司, 喜多村昇, 日本分析化学会第 57 年会, 2008.9.10-12, 福岡大学七隈キャンパス
- 7) レーザー捕捉・顕微分光法を用いた単一エアロゾル水滴への SO₃ ガス分配過程の検討
鈴木雄也, 石坂昌司, 喜多村昇, 第 69 回分析化学討論会, 2008.5.15-16, 名古屋国際会議場.
- 11) 極限分析
喜多村昇, 日本化学会春季年会, 2008.3.27 - 30, 立教大学.
- 9) Laser-Induced Single Droplet Formation and Its Application to Liquid/Liquid Extraction.
N. Kitamura, 2007 Korea-Japan Bilateral Symposium on Frontier Photoscience, 2007. 11.22 - 26, Gyengiu, Korea
- 10) 単一微小液滴のレーザー誘起形成・捕捉・分光計測(4)
金野久美子, 山田桃子, 石坂昌司, 喜多村昇, 日本分析化学会第 56 年会, 2007.9.19-21, 大阪

[図書] (計 1 件)

- 1) 単一微粒子の光操作と顕微計測
喜多村昇, 化学フロンティア, 切り拓き, サイエンスを牽引する 分析最前線, 化学同人 (2008).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://barato.sci.hokudai.ac.jp/~bunseki/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
喜多村 昇 (KITAMURA NOBORU)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 50134838
- (2) 研究分担者
石坂昌司 (ISHIZAKA SHOJI)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 80311520
- (3) 連携研究者
なし