

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 年度～2009 年度

課題番号：19350040

研究課題名（和文）極微プローブを用いる液液界面の in situ 深さ方向分析法の開発

研究課題名（英文）Development of in situ analytical method for depth profile of liquid/liquid interface using ultrasmall probes

研究代表者

塚原 聡 (TSUKAHARA SATOSHI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：50207338

研究成果の概要（和文）：本研究では、液液界面の in situ（その場）深さ方向分析法を確立するために、薄層二相マイクロセル内に調製した液液界面について新規な方法を開発し、主に以下のような成果を得た。(1)上下振動が 1  $\mu\text{m}$  以下であり極めて小さかった、(2)両親媒性を有しない金コロイド(大きさ 5～40 nm)であっても液液界面に吸着し、またその場で会合した、(3)液液界面近傍に存在する蛍光物質サフランin O の拡散係数を求めた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study is the development of in situ analytical method for depth profile of liquid/liquid interface. We prepared liquid/liquid interfaces in a thin-layer two-phase microcell and applied some new methods to the interface. The results in the present study are as follows: (1) The vertical vibration of liquid/liquid interfaces was found to be less than 1  $\mu\text{m}$ . (2) Gold colloids (5 – 40 nm in size), which had no amphipathic property, were adsorbed to liquid/liquid interface and were aggregated there. (3) Diffusion coefficient of fluorescent safranin O existing at and near the liquid/liquid interfaces was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
平成 20 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成 21 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：状態分析, 表面・界面物性, 液液界面, 金コロイド, 顕微分光法, 並進拡散係数, 全内部反射法

## 1. 研究開始当初の背景

古くから現在に至るまで、有機相と水相からなる二相系は、分離や反応など、分析化学のみならず、多くの化学の分野で重要な役割を担ってきている。その有機相と水相の境界

である液液界面は、疎水性物質と親水性物質が自由に出会う良好な反応場であり、近年様々な in situ（その場）分析法を用いて、特徴的な吸着や反応が報告されてきている。一般に、固液界面や気固界面と比べると、液液

界面は空間的に固定することができないため、形態が不安定で、振動したり変形したりする。

ところで、分子動力学のシミュレーションによれば、液液界面の厚さは数 nm であるとされているが、直接的に液液界面の *in situ* 深さ方向分析を実践した例はない。その理由の一つは、前記のように液液界面が振動したり、形態が変化したりするからである。したがって、例えば、アルカン/水のように物性の全く異なる2つの溶媒間の界面と、高級アルコール/水のように物性の類似した溶媒間の界面では、その厚さや深さ方向の溶媒分子の分布に違いがあるかないかといった基本的なことから、全く判っていないのが現状である。厚さ以外の物性として、液液界面の誘電率を調べるために、例えばプローブ分子を液液界面に吸着させ、そのスペクトル情報を解析する研究がある。しかし、この手法では、そのプローブ分子が液液界面の深さ方向のどの位置に存在しているか、という情報を得ることができないため、液液界面の普遍的な物性を評価しているとは言いがたい。このように、液液界面の *in situ* 深さ方向分析を試みた研究例は、国内外ともにほとんどない。

## 2. 研究の目的

上記のような状況の下、研究代表者らは、世界に先駆けて薄層二相マイクロセルを開発した。これによって、液液界面を光学顕微鏡によって *in situ* 計測することが可能になり、液液界面分析法のブレークスルーになったものと自負している。これを用いて、液液界面の様々な吸着や反応について、界面の横方向の微視的な情報を測定してきた。しかし、液液界面の深さ方向に関しては、全く手付かずである。液液界面を顕微鏡で安定に測定することが可能になったことにより、大きな課題となっている液液界面の深さ方向分析が可能であると考え、本研究に至っている。

## 3. 研究の方法

本研究では、液液界面の *in situ* 深さ方向分析法を確立するために、以下のような実験を行った。なお、すべての実験は図1に示した薄層二相マイクロセルを用いた。これの中には、振動の小さい平面状の液液界面を形成できる。また、作動距離の極めて短い

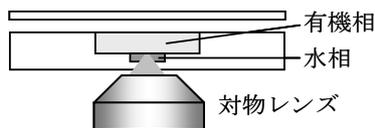


図1 研究代表者らが開発した薄層二相マイクロセルの概略

(1) 液液界面の上下振動の測定 薄層二相マイクロセル内に、ドデカンと水を加えて、直径 3 mm の液液界面を作成し、市販のレー

ザー変位計を用い、液液界面の上下振動を測定した。

(2) 液液界面における金(III)の直接還元 薄層二相マイクロセル内に、塩化金(III)酸を溶かした水相、還元剤を溶かした有機相を順次加えて液液界面を調製し、明視野もしくは暗視野顕微鏡を用いて液液界面近傍に生成することが予想される金(0)微粒子を観察した。また生成した金微粒子をガラス板上に取得し、AFM(原子間力顕微鏡)測定によって大きさを測定した。

(3) 金コロイドの液液界面への吸着と会合 有機相にドデカン、水相に大きさ 5~40 nm の金コロイドを用い、薄層二相マイクロセル内に液液界面を調製した。これらの金コロイドの大きさは、光学顕微鏡の回折限界を超えているため直接測定が難しい。そこで、暗視野顕微法もしくは全内部反射レーザー散乱顕微法を用いて金コロイドの動的挙動の測定を行った。

(4) 液液界面近傍におけるサフラニン O の並進拡散係数の評価 全内部反射励起蛍光法は、界面近傍に存在する物質を選択的に測定することができる有力な測定法である。また、光退色後蛍光回復法は、蛍光物質の並進拡散係数を求めることができる手法である。液液界面近傍に存在する蛍光物質サフラニン O について、全内部反射-光退色後蛍光回復法を適用できるような光学システムを新たに作製し、その並進拡散係数を求めた。

## 4. 研究成果

本研究で得た研究成果は、以下のようである。

(1) 液液界面の上下振動の測定 薄層二相マイクロセル内のドデカン/水界面の上下振動は 1  $\mu\text{m}$  以下と極めて小さいことが明らかになった。さらに、直径を小さくすることで、振動のほとんどない液液界面を作成することができる期待される。

(2) 液液界面における金(III)の直接還元 液液界面で金(III)の直接還元を行った結果、金(0)の微粒子とそれの鎖状の会合体が界面に生成した。それらは密度が水よりもかなり大きいにもかかわらず、界面に吸着したままであった。界面に生成した金微粒子の大きさは 200 nm 以上であり、期待した金コロイド(大きさ 5~40 nm)よりもかなり大きなものであった。

(3) 金コロイドの液液界面への吸着と会合 上記(1)の結果から、本来両親媒性を有しない金コロイドであっても、液液界面へ吸着することが示唆された。そこで大きさが 5~40 nm である金コロイドが、ドデカン/水界面に吸着するかどうかを確認した。その結果、金コロイドがドデカン/水界面に吸

着することを明らかとした。また、それらのドデカン/水界面における並進拡散係数の見積もりから、それらは時間とともに界面で会合し、大きくなっていることがわかった。このような結果から、金コロイドを液液界面近傍のプロープとして使うことは多くの困難を伴うことが示された。

- (4) 液液界面近傍におけるサフラニン O の並進拡散係数の評価 全内部反射-光退色後蛍光回復法によって得られた液液界面近傍のサフラニン O の並進拡散係数は、分子の大きさや溶媒の粘性率を用いた理論値とほぼ同じ値が得られた。また、その拡散係数は、有機相の溶媒の粘性率にはほとんど影響を受けなかったが、界面活性物質や水相の溶媒の粘性率には影響された。この結果から、液液界面およびその近傍における物質の拡散係数を測定する方法が確立したことを確認した。
- (5) 今後の展望 現在、液液界面とその近傍における蛍光物質を、極微開口プロープによって発生する近接場光によって励起し、高感度に検出する方法を検討中である。この手法によって、界面近傍のサフラニン O の拡散係数を求め、(4)の方法によって求められた拡散係数と比較し、本方法や解析法の確認を行う予定である。

#### 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 12 件)

1. Satoshi TSUKAHARA, Mami Yamasaki, Terufumi Fujiwara, "Microscopic Imaging of Fluorescence Anisotropy of Rhodamine B at the Free and Surfactant-Modified Toluene/Water Interfaces Excited under Total Internal Reflection Conditions," *Solv. Extr. Res. Dev. Jpn.*, **17**, 163-174 (2010). 査読有
2. Yasuaki Okamoto, Keisuke Yamamoto, Hiroko Kataoka, Satoshi Tsukahara, Terufumi Fujiwara, 他 4 名, "Direct determination of bismuth in steel samples by magnetic drop-in electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry," *Appl. Spectrosc.*, **63**, 1403-1406 (2009). 査読有
3. Satoshi Tsukahara, Yukio Kamiya, Terufumi Fujiwara, "In situ measurements of emission transition dipole moment of individual ordered microdomain of diprotonated tetraphenylporphine aggregate formed at dodecane/aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> interface," *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 1047-1053 (2009). 査読有
4. 高橋秀行, 占部泰章, 岡本泰明, 塚原 聡, 藤原照文, "逆ミセルを用いるフローインジエクション化学発光検出による有機溶媒中のコバルトとマンガンの微量定量法," *分析化学*, **58**, 523-529 (2009). 査読有
5. Satoshi TSUKAHARA, Rintaro KOBAYASHI, Terufumi FUJIWARA, "Formation of Gold Microparticles by Reduction with dl- $\alpha$ -Tocopherol at Liquid/Liquid Interfaces," *Solv. Extr. Res. Dev. Jpn.*, **16**, 37-45 (2009). 査読有
6. Shohei INOSHITA, Satoshi TSUKAHARA, Terufumi FUJIWARA, "In Situ Fluorescence Microscopic Investigation into Dependence of Conformation and Electrophoretic Velocity of Single DNA Molecules on Acid or Spermidine Concentration," *Anal. Sci.*, **25**, 293-299 (2009). 査読有
7. Kouta Nakada, Imdad U. Mohammadzai, Satoshi Tsukahara, Terufumi Fujiwara, "Adsorption Behavior of the Cetyltrimethylammonium Chloride Reverse Micelles on Porous Silica Gels," *Anal. Sci.*, **25**, 201-206 (2009). 査読有
8. 塚原 聡, "液液界面における特異反応・現象の in situ 顕微分光計測," *ぶんせき*, 215-221 (2008). 査読無
9. H. Kataoka, Y. Okamoto, T. Matsushita, S. Tsukahara, T. Fujiwara, K. Wagatsuma, "Magnetic Drop-in Tungsten Boat Furnace Vaporization Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (MDI-TBF-ICP-AES) for the Direct Solid Sampling of Iron and Steel," *J. Anal. At. Spectrom.*, **23**, 1108-1111 (2008). 査読有
10. Hiroko Kataoka, Yasuaki Okamoto, Satoshi Tsukahara, Terufumi Fujiwara, Kazuaki Ito, "Separate vaporisation of boric acid and inorganic boron from tungsten sample cuvette-tungsten boat furnace followed by the detection of boron species by inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic emission spectrometry (ICP-MS and ICP-AES)," *Anal. Chim. Acta*, **610**, 179-185 (2008). 査読有
11. Satoshi Tsukahara, Michinori Suehara, Terufumi Fujiwara, "In Situ Measurements of Dynamics of Single Giant DNA Molecules at Toluene-Trioctylamine/Water Interface by Total-Internal Reflection Fluorescence Microscopy," *Langmuir*, **24**, 1673-1677 (2008). 査読有
12. Tsuyoshi Tsuruta, Satoshi Tsukahara, Terufumi Fujiwara, "Microscopic Measurements for Deformation of Liquid Surfaces Induced by Localized Direct Current Electric Field," *Anal. Sci.*, **24**, 121-126 (2008). 査読有

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 向井 一晃, 「液液界面に形成したリン脂質単分子膜のダイナミクスの顕微蛍光測定」, 日本分析化学会中国四国支部 広島地区分析技術講演会, 2010 年 3 月 16 日, 広島大学学士会館レセプションホール
2. 塚原 聡, 「液液界面通過に伴う単一 DNA 分子の形態変化の in situ 顕微蛍光測定」, 第 28 回溶媒抽出討論会, 2009 年 11 月 20~21 日, 大阪大学基礎工学部国際棟シグマホール
3. 塚原 聡, 「局所交流電場による気液および液液界面の微小振動の顕微測定と強制振動モデルを用いた解析」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24~26 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
4. 向井 一晃, 「液液界面におけるリン脂質単分子膜の相分離挙動の in situ 顕微蛍光測定」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24~26 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
5. 川原 那津子, 「有機相/ヒドロゲル相界面で生成する金コロイドの in situ 顕微測定」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24~26 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
6. 八坂 栄次, 「液液界面に吸着したマンガニン(III)ポルフィリン錯体のマイクロドメインの in situ 顕微分光測定」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24~26 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
7. 渡辺 翔太, 「液液界面に生成したリン脂質単分子膜近傍における膜結合性タンパク質の動的挙動の顕微蛍光測定」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24~26 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
8. 塚原 聡, 「液液界面で生成する金コロイドの動的挙動の in situ 顕微測定」, 第 70 回分析化学討論会, 2009 年 5 月 16~17 日, 和歌山大学栄谷キャンパス
9. Shohei Inoshita, “In situ fluorescence microscopic investigation into pH dependence of conformation and electrophoretic velocity of single DNA molecules,” The 5th Nano Bio Info Chemistry Symposium and The 3rd Japanese-Russian Seminar, 2008 年 12 月 13~14 日, 広島大学学士会館
10. 鶴田 剛士, 「局所交流電場による液体表面の微小振動の顕微計測と強制振動モデルを用いた解析」, 第 31 回溶液化学シンポジウム, 2008 年 11 月 12~14 日, 近畿大学 11 月ホール
11. 松本 裕史, 「液液界面に存在する微粒子の局所電場内における泳動挙動」, 第 27 回溶媒抽出討論会, 2008 年 10 月 10~11 日, 上智大学四谷キャンパス
12. 向井 一晃, 「水中に形成した平面脂質二分子膜のダイナミクスの顕微蛍光測定」, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10~12 日, 福岡大学
13. 井下 翔平, 「液液界面における単一 DNA 分子の動的挙動の in situ 顕微蛍光測定」, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10~12 日, 福岡大学
14. 小林 龍太郎, 「液液界面で生成する金コロイドの in situ 顕微分光測定」, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10~12 日, 福岡大学
15. 鶴田 剛士, 「局所交流電場による液体表面の微小振動の顕微測定と解析」, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 15~16 日, 名古屋国際会議場
16. 松本 裕史, 「液液界面のポリスチレン微粒子の局所電場内における泳動挙動」, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 15~16 日, 名古屋国際会議場
17. 松本 裕史, 「液液界面に生成するテトラフェニルポルフィン会合体の局所電場内における泳動挙動」, 第 4 回ナノ・バイオ・インフォ化学シンポジウム, 2007 年 12 月 1~2 日, 広島大学東広島キャンパス
18. Satoshi TSUKAHARA, “In Situ Measurements for Single Giant DNA Molecules at Toluene-Trioctylamine/Water Interface by Total-Internal Reflection Fluorescence Microscopy,” Joint Conference of JMLG/EMLG Meeting 2007 and 30th Symposium on Solution Chemistry of Japan, 2007 年 11 月 21~25 日, 福岡大学
19. Satoshi TSUKAHARA, “Emission Characteristics of Ordered Microdomain of Diprotonated Tetraphenylporphine Aggregate Formed at Dodecane/Aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Interface,” Joint Conference of JMLG/EMLG Meeting 2007 and 30th Symposium on Solution Chemistry of Japan, 2007 年 11 月 21~25 日, 福岡大学
20. 塚原 聡, 「全内部反射蛍光顕微法を用いた液液界面近傍における単一 DNA 分子の動的挙動の計測と解析」, 第 26 回溶媒抽出討論会, 2007 年 11 月 8~9 日, 北九州国際会議場
21. 松本 裕史, 「液液界面に生成するテトラフェニルポルフィン会合体の電場内における泳動挙動の顕微測定」, 日本分析化学会第 56 年会 2007 年 9 月 19~21 日, 徳島大学
22. 塚原 聡, 「液液界面に生成するテトラフェニルポルフィン会合体のマイクロドメインの in situ 顕微分光測定と解析」, 第 68 回分析化学討論会, 2007 年 5 月 19~20 日, 宇都宮大学

〔図書〕(計 1 件)

1. 加藤正直, 塚原 聡 共著, “物質工学入門

シリーズ “基礎からわかる分析化学,” 森北出版, (2009).

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚原 聡 (TSUKAHARA SATOSHI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：50207338

### (2) 研究分担者

藤原 照文 (FUJIWARA TERUFUMI)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：80127703

岡本 泰明 (OKAMOTO YASUAKI)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：40213988

### (3) 連携研究者

なし