

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19550094  
 研究課題名 (和文) オンチップ検出型マイクロチップを用いる界面活性剤の自動・分離分析法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of automatic and separation analysis methods for the determination of surfactants using a microchip detector.  
 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

研究成果の概要 (和文) : 界面活性剤は、合成洗剤などの身近な生活消耗品に多く含まれており、水環境に与える影響は非常に大きく環境汚染物質として注目されている。このような界面活性剤による環境汚染状況を広範囲にわたって正確に把握するためには、簡便で高感度な化学計測システムの開発が不可欠である。そこで、本研究では、試料及び廃液の微量化・分析時間の高速化・省スペースが可能な界面活性剤検出用イオンセンサを組み込んだマイクロチップの開発とそれを検出器とする界面活性剤の自動・分離分析法を開発した

研究成果の概要 (英文) : A cationic surfactant ion-sensitive field-effect transistor (cationic surfactant-FET) and an anionic surfactant-FET have been developed. The cationic surfactant-FET shows an almost Nernstian response to tetradecyldimethylbenzylammonium chloride over a concentration range between  $1.0 \times 10^{-6}$  M and  $1.0 \times 10^{-3}$  M, with a slope of  $58.5 \pm 1.7$  mV/decade. The anionic surfactant-FET shows an almost Nernstian response to sodium dodecylbenzenesulfonate in the concentration range from  $1.0 \times 10^{-6}$  M to  $1.0 \times 10^{-3}$  M with a slope of  $56.6 \pm 3.3$  mV/decade. Microfluidic polymer chips were integrated with the cationic surfactant-FET or anionic surfactant-FET. These were fabricated using polystyrene plates and stainless wires as a template for the channel. The microfluidic polymer chip with embedded the cationic surfactant-FET detector or the anionic surfactant-FET detector was applied to a sequential injection analysis and a capillary electrophoresis of cationic and anionic surfactants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3800,000	1140,000	4940,000

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：界面活性剤, 界面活性剤イオンセンサ, マイクロチップ分析, キャピラリー電気泳動, シーケンシャルインジェクション分析

## 1. 研究開始当初の背景

界面活性剤は、合成洗剤などの身近な生活消耗品に多く含まれており、水環境に与える

影響は非常に大きく環境汚染物質として注目されている。この界面活性剤による環境汚染は人類の将来を脅かすほど深刻な社会問

題となっている。また、最近内分泌かく乱物質として注目されているノニルフェノールは、非イオン性界面活性剤の合成の原料であるので、非イオン性界面活性剤も内分泌かく乱作用を持っている可能性もある。このような界面活性剤による環境汚染状況を広範囲にわたって正確に把握するためには、簡便で高感度な化学計測システムの開発が不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロチップとイオン感応性電界効果トランジスタ(ISFET)センサの利点に着目し、既に研究代表者らが確立した金属ワイヤーとプラスチックポリマーを用いるマイクロチップの作製法を用いて、界面活性剤を検出するための ISFET センサを組み込んだマイクロチップを開発することを目的としている。さらにこのマイクロチップをキャピラリー電気泳動法およびシーケンシャルインジェクション間欠連続計測法と結合させた界面活性剤の高感度な新規自動分離・分析システムを開発する。

## 3. 研究の方法

環境汚染物質である界面活性剤を簡便かつ高感度に検出するために、ISFET を用いるマイクロチップ検出法を開発する。また、このマイクロチップ検出法を用いてキャピラリー電気泳動分析法による界面活性剤の分離分析法およびシーケンシャルインジェクション法による界面活性剤の自動分析法を開発する。

## 4. 研究成果

### (1) 陰イオン性界面活性剤(AS)検出用 ISFET センサの開発

AS 検出用 ISFET センサは、溶媒抽出法により調製した臭化テトラヘキサデシルアンモニウム (THAB) とドデシルベンゼンスルホン酸イオン (DBS) とのイオン対の 2-ニトロフェニルオクチルエーテル (NPOE) 溶液及びポリ塩化ビニルを、テトラヒドロフラン (THF) に完全に溶解させ、その THF 溶液を ISFET 感応部にディップコートすることにより作製した。4 種の 4 級アンモニウム塩を用いる ISFET センサの DBS<sup>-</sup>イオンに対する電位応答を測定した。その結果を表 1 に示す。THAB 膜を用いた ISFET が、 $1.0 \times 10^{-6} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{M}$  の濃度範囲の DBS<sup>-</sup>イオンに対して  $-60.5 \text{ mV/decade}$  のネルンスト応答を示し、他の 3 つの 4 級アンモニウム塩を用いた場合と比較して、応答性及び再現性も優れていることが分かった。次に、THAB-ISFET の DBS<sup>-</sup>イオンに対する選択性を測定したところ、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$  及び  $\text{NO}_3^-$  などの通常の無機イオンは約 1000 倍程度過剰に共存しても、DBS<sup>-</sup>イオンの定量を妨害

しなかった。また、作製した ISFET センサは、 $\text{pH} 3 \sim 10$  の pH 範囲で使用可能であった。

表 1 陰イオン性界面活性剤 ISFET の電位応答

4 級アンモニウム塩	電位勾配 (mV/decade)	直線的応答範囲 /M
TDMA	$44.8 \pm 9.9$	$1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3}$
TDAB	$55.8 \pm 4.2$	$1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3}$
MTOA	$52.5 \pm 3.6$	$1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3}$
THAB	$56.6 \pm 3.3$	$1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3}$

TDMA: 塩化トリドデシルメチルアンモニウム, TDAB: 臭化テトラドデシルアンモニウム, MTOA: 臭化メチルトリオクタデシルアンモニウム, THAB: 臭化テトラヘキサデシルアンモニウム.

### (2) AS 検出用 ISFET センサを組み込んだマイクロチップの開発

作製したマイクロチップの模式図を図 1 に示す。マイクロチップの流路は、ポリスチレン板にワイヤーを置き、2 枚のスライドガラスとクリップで挟み、 $115^\circ\text{C}$ 、40 分加熱して作製した。流路を転写したポリスチレン板に、もう 1 枚のポリスチレン板を置き、 $100^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱し、2 枚のポリスチレン板を融着した。その後、そのポリスチレン板に ISFET センサと参照電極を組み込んだ後、それらをエポキシ樹脂で固定することによって、マイクロチップを作製した。試薬溶液として  $10^{-2} \text{M}$  LiCl 溶液を、試料溶液として DBS 溶液を用い、それらをそれぞれ  $50 \mu\text{l/min}$  でマイクロチップに送液し、DBS<sup>-</sup>イオンに対する電位応答測定を行い、バッチ系における THAB-ISFET の電位応答と比較した。マイクロチップ系における THAB-ISFET は、 $10^{-6} \text{M} \sim 10^{-4} \text{M}$  の濃度範囲の DBS<sup>-</sup>イオンに対して  $-56.0 \text{ mV/decade}$  の電位応答を示し、バッチ系の応答とほぼ同じ感度が得られた。また、マイクロチップ系及びバッチ系のいずれの測定においても、測定開始から 2 分程度で安定した電位が得られた。以上のことにより、試作したマイクロチップは、陰イオン界面活性剤の検出を行うのに十分な性能を有していることが分かった。

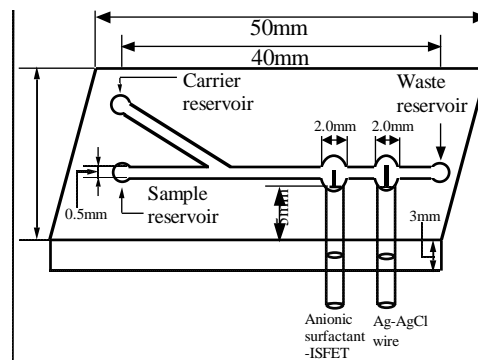


図 1 作製したマイクロチップの模式図

### (3) 陽イオン性界面活性剤(CS)検出用 ISFET センサの開発

CS 検出用 ISFET センサは、溶媒抽出法により調製したテトラキス[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ホウ酸ナトリウムとゼフィラミンイオン(Zephi<sup>+</sup>)とのイオン対の NPOE 溶液及びポリ塩化ビニルを THF に完全に溶解させ、その THF 溶液を ISFET の感応部にディップコートすることにより作製した。この ISFET センサの Zephi<sup>+</sup>イオンに対する電位応答を測定したところ、 $1 \times 10^{-6} \text{M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$  の Zephi<sup>+</sup>イオンに対して 56.0mV/decade のネルンスト応答を示した。次に、この ISFET センサの Zephi<sup>+</sup>イオンに対する選択性を測定したところ、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 及び $\text{Na}^+$ などの通常の無機イオンは、2000 倍程度以上過剰に共存しても Zephi<sup>+</sup>の定量を妨害しないが、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムイオンなどの疎水性の高い陽イオン性界面活性剤に対しては、Zephi<sup>+</sup>イオンと同程度に反応することが分かった。また、作製した ISFET センサの応答速度について検討した。Zephiramine の濃度を急速に 1/3 倍にした場合及び、Zephiramine の濃度を急速に 3.4 倍にした場合の ISFET センサの応答時間は 15~30 秒程度であった。また、作製した ISFET センサは、pH 3~10 の広い pH 範囲で使用可能であった。

### (4) CS 検出用 ISFET センサを組み込んだマイクロチップの開発

作製した 1 流路マイクロチップは、4(2)で述べた方法により作製した。 $1 \times 10^{-2} \text{M}$  LiCl 溶液と種々の濃度の Zephi<sup>+</sup>溶液の混合溶液を流速  $50 \mu\text{L}/\text{min}$  でマイクロチップに送液し、マイクロチップの Zephi<sup>+</sup>イオンに対する電位応答性を評価した。マイクロチップ系における ISFET センサは、 $1 \times 10^{-6} \text{M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$  の濃度範囲の Zephi<sup>+</sup>イオンに対して 56.0mV/decade の電位応答を示し、バッチ系の応答とほぼ同じ感度が得られた。また、マイクロチップ系の測定においても、バッチ系での測定とほぼ同程度の検出下限濃度が得られ、測定開始から 2 分程度で安定した電位が得られた。以上のことにより、試作したマイクロチップは、CS の検出を行うのに十分な性能を有しているこ

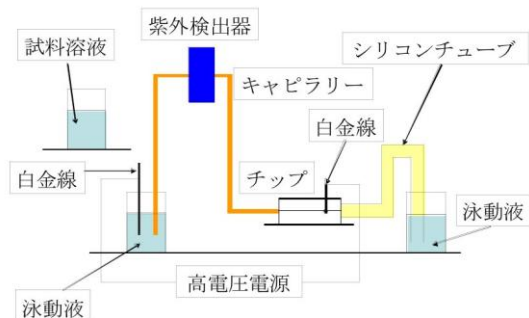


図2 CE法によるCSの分離に用いた測定装置

とが分かった。

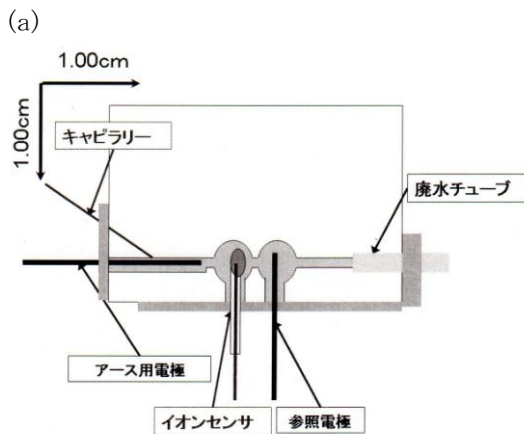
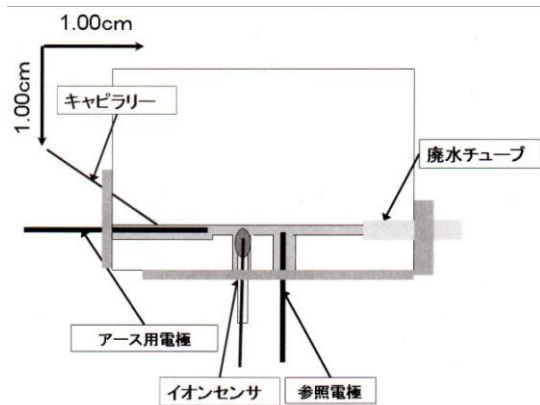
### (5) イオンセンサおよび参照電極を組み込んだマイクロチップでの CS のキャピラリー電気泳動(CE)/電位差測定

用いた CE の装置を図 2 に示す。泳動液は  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  HCl +  $5.0 \times 10^{-3} \text{M}$  KCl に、20~50 容量%のメタノールを加えたものを使用した。試料溶液には、それぞれ  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$  の 3 種類の CS と  $5.0 \times 10^{-5} \text{v}/\text{v}\%$  ベンジルアルコール、及び、泳動液と同容量%のメタノールを含む混合溶液を用いた。試料の CS は、塩化テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化セチルジメチルベンジルアンモニウムおよび塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムを用いた。CS イオンセンサを組み込んだマイクロチップの構造の一例を図 3 に示す。図 3 (a) に示すように泳動用電極として白金黒電極を用い、イオンセンサと参照電極が一直線の配列のチップを用いた場合には、電圧を印加しない場合の電位と印加した場合の電位がほぼ同じとなり、印加電圧の影響をほぼ抑えることが可能であった。しかし、泳動用電極から発生する気泡により、吸光度と電位差が不安定でエレクトロフェログラムを得ることができなかった。一方、図 3 (b) に示すようにイオンセンサと参照電極に液だめを作ったチップを用いた場合には、気泡がチップに留まらず溶液の通りも良いために、吸光度測定によるエレクトロフェログラムを得ることができた。しかしながら、電位差測定法によるエレクトロフェログラムを得ることができなかった。これは、試料溶液がイオンセンサに達するまでに希釈され、本来の濃度より著しく低下したためだと推定される。

### (6) マイクロチップ検出器を用いる界面活性剤のシーケンシャルインジェクション(SIA)分析法の開発

マイクロチップ検出器を用いる AS 測定のための SIA システムの模式図を図 4 に示す。SIA システムは、シリンジポンプ、六方バルブ、ホールディングコイル、マイクロチップ、イオンメーターおよびパーソナルコンピュータ(PC)および記録計より構成した。キャリア液の送液および試料溶液の導入は、シリンジポンプと六方バルブを PC により制御して行った。試料溶液として、 $1 \times 10^{-3} \text{M}$  ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (NaDBS) を、キャリア液として  $1 \times 10^{-2} \text{M}$  LiCl + pH4.0 緩衝溶液を用いた。まず、キャリア液をコイル内とマイクロチップ内に満たした。次に、試料溶液である NaDBS 溶液を六方バルブからコイル内へと吸引し、キャリア液と拡散混合させた後、マイクロチップへと送液した。NaDBS 溶液導入後のイオンセンサと Ag

線から作製した Ag/AgCl 電極間の電位差を、ピーク状信号として測定した。まず、SIA 法におけるキャリア液と試料溶液の最適な体積量を検討した。その結果、キャリア液が 1208.3 $\mu$ L、試料溶液が 41.7 $\mu$ L の時、センサのスロープ感度が一番良いことが分かった。この条件で測定した AS センサを組み込んだマイクロチップは、 $3 \times 10^{-6}$ M $\sim 1 \times 10^{-3}$ M の NaDBS 溶液に対して約 50.0 mV/decade のネルンスト的応答が得られ、再現性も良好であった。 $1 \times 10^{-3}$ M NaDBS に対する分析速度は 1 試料あたり約 5 分であった。



(b)  
図 3 イオンセンサを組み込んだ CE 用マイクロチップの構造

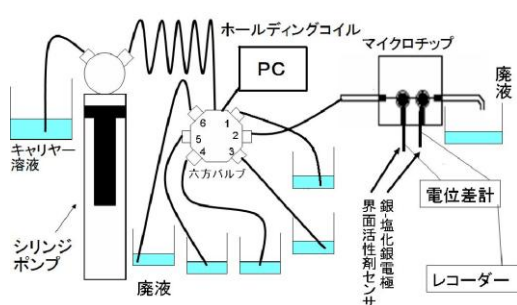


図 4 AS 測定のための SIA システム

#### (7) 成果のまとめと今後の展望

作製したマイクロチップにより、 $\mu$ M レベルの CS および AS の検出が可能であることが分かった。このマイクロチップを検出器として用いる CS および AS の SIA 法によっても、 $\mu$ M レベルの CS および AS の自動定量が可能であることが分かった。次に、このマイクロチップを検出器とする CS の CE 検出法を試みた。泳動用電極として、白金黒電極を用いることによって、電位差検出に及ぼす印加電圧の影響をほぼ除去できた。しかしながら、界面活性剤に対するエレクトロフェログラムを得ることができなかった。今後、以下のような特性をもつマイクロチップを作製することによって、CE/電位差検出法による界面活性剤の検出が可能になるものと考えられる。

1) 電気泳動用電極に従来の白金線に代わり、白金黒電極を用いる。2) キャピラリー末端とイオンセンサを接近させることによって、試料の希釈を最小限とする。3) 白金黒電極は気泡の逃げやすいような位置、環境に配置する。(溶液スポットとデカップラーなどの利用)

#### 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 8 件)

1) T. Masadome, K. Nakamura, D. Iijima, O. Horiuchi, B. Tossanaitada, S. Wakida, T. Imato, "Microfluidic polymer chip with an embedded ion-selective electrode detector for nitrate-ion assay in environmental samples", *Analytical Sciences*, 査読有, **26**, - (2010).

2) M. Tanaka, K. Sakamoto, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Masadome, T. Imato, "Flow immunoassay for nonionic surfactants based on surface plasmon resonance sensors", *Analytical Sciences*, 査読有, **25**, 999-1005 (2009).

3) T. Masadome, M. Akatsu, "Optical sensor of anionic surfactants using solid-phase extraction with a lactone-form Rhodamine B membrane", *Analytical Sciences*, 査読有, **24**, 809-812 (2008).

4) T. Masadome, Y. Yano, T. Imato, "Surface plasmon resonance immunosensor for anionic surfactants based on an indirect competitive immunoreaction", *Analytical Letters*, 査読有, **41**, 640-648 (2008).

5) T. Masadome, Y. Yamagishi, M. Takano, T. Hattori, "Potentiometric titration of polyhexamethylene biguanide hydrochloride with potassium poly (vinyl sulfate) solution using a cationic surfactant-selective electrode", *Analytical Sciences*, 査読有, **24**, 415-418 (2008).

6) 正留 隆, 今任稔彦, 『特集 化学センサの新展開 第2章 第1節 8. イオンセンサの流れ系への応用』, *マテリアル インテグレーション*, 査読無, **21(5, 6)**, 217-224 (2008).

7) R. Zhang, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Masadome, K. Nagata, K. Sakamoto, T. Imato, "Sequential injection chemiluminescence immunoassay for nonionic surfactants by using magnetic microbeads", *Analytica Chimica Acta*, 査読有, **600**, 105-113 (2007).

8) T. Masadome, T. Takahashi, "Optical sensing membrane based on tetrabromophenolphthalein ethyl ester for the determination of cationic surfactants", *Analytical Letters*, 査読有, **40**, 441-448 (2007).

〔学会発表〕(計 11 件)

1) 正留 隆, 佐藤貴俊, 『陽イオン性色素を指示薬とする陽イオン性界面活性剤の光度滴定』, 日本化学会第3回関東支部大会, 平成21年(2009年)9月

2) 上野直哉, 正留 隆, 今任稔彦, 『マイクロチップ型陽イオン性界面活性剤イオンセンサを検出器とする陽イオン性界面活性剤のシーケンシャルインジェクション分析』, 日本化学会第3回関東支部大会, 平成21年(2009年)9月

3) 正留 隆, 飯島大介, 堀内 修, 脇田 慎一, 『オンチップ検出型マイクロチップによる硝酸イオンの検出』, 日本化学会第89春季年会, 平成21年(2009年)3月

4) 上野直哉, 正留 隆, 今任稔彦, 『陽イオン性界面活性剤イオンセンサを検出器とする陽イオン性界面活性剤のシーケンシャルインジェクション分析』, 日本化学会第89春季年会, 平成21年(2009年)3月

5) 正留 隆, 渡邊圭太, 『陽イオン性色素を指示薬とするポリヘキサメチレンピグアニド塩酸塩の光度滴定』, 日本分析化学会第57年会, 平成20年(2008年)9月

6) 正留 隆, 赤津元男, 『ラクトン型ローダミンB色素含有感応膜を用いる陰イオン性界面活性剤の光センシング』, 日本分析化学会第57年会, 平成20年(2008年)9月

7) 脇田慎一, 正留 隆, 『ChemFET 集積型ラボチップ(3): 界面活性剤検出 FIA チップ』, 電気化学会第75回大会, 平成20年(2008年)3月

8) 矢野禎典, 正留 隆, 今任稔彦, 『陰イオン性界面活性剤の計測のための表面プラズモン共鳴イムノセンサの開発』, 日本分析化学会第56年会, 平成19年(2007年)9月

9) 正留 隆, 山岸優一, 高野正樹, 服部敏明, 『指示薬イオンに反応するイオンセンサを用いるポリヘキサメチレンピグアニド塩酸塩の電位差滴定』, 日本分析化学会第56

年会, 平成19年(2007年)9月

10) 正留 隆, 石川恭平, 『陽イオン性界面活性剤の光センシングのための陰イオン性色素含有感応膜』, 日本化学会第1回関東支部大会, 平成19年(2007年)9月

11) 脇田慎一, 正留 隆, 『ISFET 集積型マイクロ流体デバイスの開発と応用』, 第1回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ, 平成19年(2007年)7月

〔図書〕(計 3 件)

1) 正留 隆, 今任稔彦, 『役に立つフローインジェクション分析』8 FIA 関連分析法, p. 68-86, (社)日本分析化学会・フローインジェクション分析研究懇談会編, みみずく社(2009).

2) 正留 隆, 今任稔彦, 『先進化学センサガス・バイオ・イオンセンシングの最新技術』第II部バイオセンサ・イオンセンサ, 第1章酵素センサ・免疫センサ・イオンセンサ, 第8節イオンセンサの流れ系への応用, p. 225-232, 電気化学会化学センサ研究会編, ティー・アイ・シー(2008).

3) 正留 隆, 今任稔彦, 『バイオセンサ・ケミカルセンサ事典』第2編ケミカルセンサ, 第1章ケミカルセンサの原理および分類, 第2節イオンセンサ, 2. イオンセンサの測定法・応用, p. 540-558, テクノシステム(2007).

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 連携研究者

今任 稔彦 (IMATO TOSHIHIKO)  
九州大学・工学研究院・教授  
研究者番号: 50117066