

## 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 10 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22550080

研究課題名（和文）

マイクロチップ検出器を用いる界面活性剤のクロマトグラフ法の自動化

研究課題名（英文）

Development of an automated chromatographic determination method of surfactants using microfluidic chip 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(AS)は洗剤などに含まれており、その消費量の増大に伴い環境水汚染源の一つとなっている。従来の AS に対する分析法としては溶媒抽出/吸光光度法などがあるが、有害な有機溶媒を多量に用いることや、操作が煩雑で分析に時間を要することなどの欠点があるため、これらの欠点を改善する新たな分析法の確立が求められている。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 AS イオンセンサを組み込んだマイクロチップ検出器と、試料が  $\mu\text{L}$  単位で測定可能で、PC 制御により全自動分析が可能なシーケンシャルインジェクション分析法およびクロマトグラフ法と組み合わせた AS の自動・分離分析法の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：A sequential injection analysis (SIA) system for the determination of anionic surfactant (AS) using a microfluidic polymer chip with an embedded AS ion-selective electrode (AS<sup>-</sup>-ISE) as a detector was developed. Under the optimal flow conditions of the SIA system, the AS<sup>-</sup>-ISE showed a good linear relationship between peak heights and logarithmic concentrations of AS<sup>-</sup> ion with a Nernstian slope of 60.0 mV decade<sup>-1</sup> in a concentration range from  $3 \times 10^{-6} \text{M} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M mol dm}^{-3}$ . Sample throughput of the present system for the determination of AS<sup>-</sup> ion was ca. 20 samples h<sup>-1</sup>. The proposed SIA system was applied to the determination of the level of AS<sup>-</sup> ion in environmental water samples, such as river water.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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，モノリスカラム，シーケンシャルインジェクション分析，ワイヤーインプリント法，濃縮カラム

## 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。界面活性剤の従来からの定量法である溶媒抽出・吸光度法などに代わる簡便で、有毒な有機溶媒を用いない高感度で迅速計測法の開発はかなり行われているが、これらの方法の簡便性、分析速度および検出感度にはまだ問題がある。したがって、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、簡便で高速かつ高感度な化学計測システムの開発が不可欠である。

マイクロチップは、数センチ四方のガラスやプラスチックの基板に数十～数百 $\mu\text{m}$ 程度の微細流路を作製し分析を行う装置であり、試料量および廃液量の微量化や分析の自動化及び装置全体の小型化などの利点を持っているので、分析化学をはじめとする種々の分野で注目を集めている。マイクロチップにおいては種々の検出法が既に報告されているが、熱レンズ法などの超高感度な検出法が必要とされる場合が多い。しかしながら、このような検出法では装置が大掛かりとなり、マイクロチップ自体は小さいにもかかわらず、トータルな分析装置の大きさが大型になるという欠点がある。一般に、電気化学検出法は微小化が容易であり、微小化してもその検出感度が低下しないという利点を持っている。電気化学検出法の中でも、特にイオン選択性電極 (ISE) およびイオン感応性電界効果トランジスタ (ISFET) は微小化が容易であり、簡便に作製できるという利点を持っているのでマイクロチップのようなマイクロフロー分析における検出法として有効である。

従来のマイクロチップの作製法では、高価で特別な装置や設備が必要であり、通常の化学の実験室においてマイクロチップをローコストかつ簡便および取り扱いに注意しなければならないフッ

酸などの試薬を用いずに作製することは困難な場合が多い。そこで、研究代表者らは、金属ワイヤーとプラスチックポリマーを用いることによって、界面活性剤検出用 ISFET センサを組み込んだマイクロチップの作製法を既に確立している。この作製法は、非常に簡便でローコストな方法であるので、高価で特別な装置や設備は必要ではない。このマイクロチップの陰イオン性および陽イオン性界面活性剤に対する応答特性は、電位勾配、検出下限濃度、電位の再現性において、従来の溶液分析系とほぼ同等であり、この開発したマイクロチップが十分な性能を持っていることを明らかにしている。しかしながら、ISFET は、ISE に比べて高価であり、よりローコストである界面活性剤検出用 ISE の開発が望まれている。

計測手段としての湿式化学分析は安定な双方向性シリンジポンプを用いて、静止したホールディングコイルの中で化学反応を行わせ化学反応ゾーンを検出器に導入するシーケンシャルインジェクション (SI) 間欠連続計測に変わりつつある。

この方法は間欠連続式なので省試薬、排水への負荷の少ない安定クリーンな方法で、ゼロエミッションの要請にもかなった次世代の湿式化学分析の主流になると期待されている。シリンジポンプの操作や分析試料のホールディングコイルへの導入および配管の洗浄などはコンピュータにより制御され自動的に行われる。

SI 法はこのような優れた特徴をもっているため、近年研究例も多くなっている。しかしながら、この SI 法による界面活性剤の定量法の研究例はほとんどない。また、一般に、フローインジェクション分析法と同様に、SI 法では単一試料を分析対象としている。界面活性剤は、環境水など実試料中にはアルキル鎖長およびポリオキシエチレン鎖の異なった混合物として存在することが多いので、アルキル鎖長やポリオキシエチレン鎖の数による界面活性剤の分離・定量法の開発が望まれている。

新しい分析用媒体としてのモノリスは、分析化学の分野、とくに液体クロマトグラフィーの担体として近年活発に研究が行われている。モノリス型シリカカラムは、従来のシリカ粒子充填型カラムと異なり三次元ネットワーク状の骨格とその空隙 (流路) が一体となった構

造を持つ。このモノリス型シリカカラムは、骨格サイズと流路サイズは独立して制御可能で、粒子充填型カラムと比較して、その分離特性を低下させることなしに、大きな流路により高速かつ低圧での送液が可能であるという優れた特長を有している。このため、モノリス型シリカカラムはシリンジポンプ送液の低圧フロー分析である SI 法と結合させて用いることが可能であり、このことは、SI 法の応用範囲を著しく広げるものと考えられる。しかしながら、SI 法と、マイクロチップに組み込んだモノリスカラムとを結合させたシステムによる界面活性剤の分離・定量の全自動化の研究例はまだ報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、界面活性剤を検出するための ISE を組み込んだマイクロチップを検出器とし、これを、モノリスカラムを組み込んだマイクロチップを用いる液体クロマトグラフ法及び SI 法と結合させた界面活性剤の高感度な新規自動・分離分析法を開発する。

## 3. 研究の方法

本研究では、マイクロチップ検出器を用いて、モノリスを組み込んだマイクロチップを用いる液体クロマトグラフ法による界面活性剤の分離分析法と、シーケンシャルインジェクション法による自動化を組み合わせた界面活性剤の自動・分離分析法を開発することを目的としている。まず、高性能微小界面活性剤 ISE センサを組み込んだマイクロチップの開発を行う。

次に、この開発したマイクロチップを検出器として用いる界面活性剤のシーケンシャルインジェクション法を検討する。その後、界面活性剤分離用モノリス型キャピラリーカラムおよびモノリスを組み込んだマイクロチップの開発を行う。最終的にこれらの結果を組み合わせ、界面活性剤の自動・分離分析法の開発を行う。

## 4. 研究成果

陰イオン性界面活性剤センサを組み込んだマイクロチップ型検出器による陰イオン性界面活性剤の自動分析法の開発

### (1)概要

陰イオン性界面活性剤(AS)は洗剤などに含まれており、その消費量の増大に伴い環境水汚染源の一つとなっている。従来の AS に対する分析法としては溶媒抽出/吸光度法などがある

が、有害な有機溶媒を多量に用いることや、操作が煩雑で分析に時間を要することなどの欠点があるため、これらの欠点を改善する新たな分析法の確立が求められている。

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 AS イオンセンサを組み込んだマイクロチップ検出器 (MD) と、試料が  $\mu\text{L}$  単位で測定可能で、PC 制御により全自動分析が可能なシーケンシャルインジェクション分析(SIA)法の利点を組み合わせ、AS の自動分析法の検討を行った。

### (2)実験

AS イオンセンサ、Ag/AgBr 線および、それらを組み込んだ MD は既報<sup>1)</sup>に基づいて作製した。Fig. 1 に作製した MD の構造を示す。

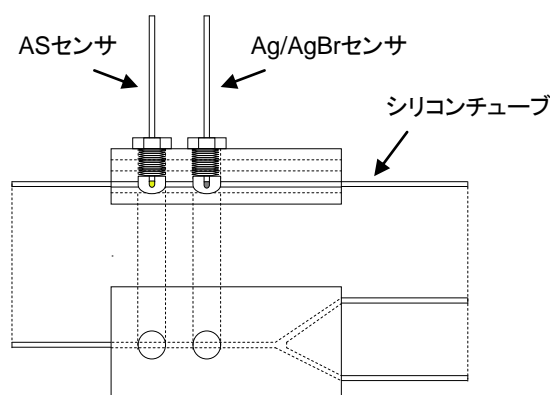


Fig. 1 MDの構造

SIA システムは、2 台のシリンジポンプ(SP)、ホールディングコイル(HC)、6 ポートセレクションバルブ(SV)、MD、イオンメータ(IM)、記録計およびパーソナルコンピュータ(PC)からなる。Fig. 2 にマイクロチップと SIA 法による AS 測定システムを示す。キャリアー溶液及び試料溶液の送液は、SP と SV を PC 制御して行った。試料溶液には、 $1 \times 10^{-x} \text{M}$  ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(NaDBS) ( $x=3 \sim 7$ ) 溶液を、キャリアー溶液には  $1 \times 10^{-2} \text{M}$  LiBr を含む pH4.0 緩衝溶液を用いた。

SP からキャリアー溶液を HC と MD に送液後、試料溶液を SV から HC へと送液した。その後、HC 内でキャリアー溶液と試料溶液を拡散混合させ、MD に送液した。試料溶液導入後の AS センサと Ag/AgCl 電極間の電位差を、IM によりピーク状信号として測定した。この操作を SIA I と SIA II の他のポートにおいて同様に行った。

検出限界以下である低濃度の溶液に対しては濃縮カラム (CC) を用いた濃縮操作を行い、検出感度の向上を図った。まず SIA II の HC にキャリアー溶液を満たした後、空気、試料溶液の順に吸引を行った。この試料溶液を CC に一定量送

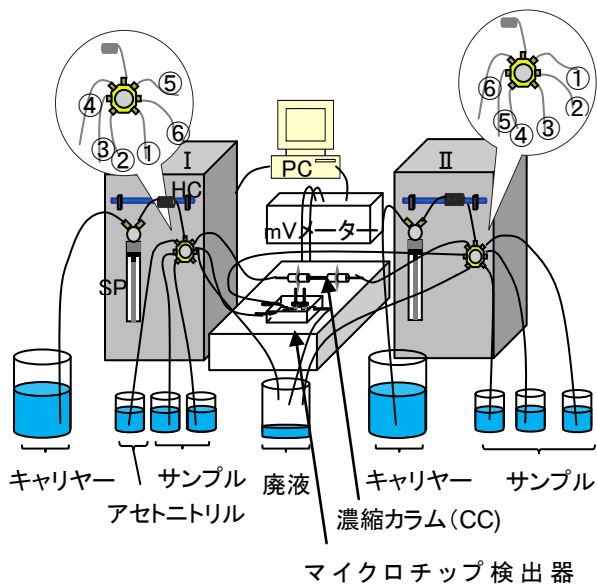


Fig. 2 マイクロチップとSIA法を用いるAS測定システム

液し、CC内に試料溶液を吸着させた。吸着後の溶液を廃棄した後、SIA IのHC内をキャリヤー溶液で満たし、続いて空気と溶離剤であるアセトニトリルを吸引した。その後アセトニトリルをCCに送液し、吸着させた試料溶液を溶離させた。この溶離溶液をSIA IIのHC内でキャリヤー溶液と拡散混合させMDに送液し、CCを用いない場合と同様にピーク信号として測定した。

### (3) 結果及び考察

MD内の溶液の滞留によりベースライン電位への戻りが遅くなるのを防ぐため、センサを組み込む液溜部を極力小さくする最適構造の検討を行った。その結果、滞留による影響を少なくすることができた。

次に、ASイオンセンサを組み込んだMDの応答感度（ピーク高さ及びスロープ感度）に影響を及ぼすキャリヤー溶液と試料溶液の体積比を検討した。また、各体積比においてMDへの送液速度を変化させ応答感度及び1試料あたりの分析時間の検討を行った。

その結果、キャリヤー溶液1187.6  $\mu\text{L}$ 、試料溶液62.4  $\mu\text{L}$ において、NaDBSに対して最も良好なネルンスト的応答が得られた。また、MDへの送液速度を検討した結果、20.8  $\mu\text{L/s}$ においてNaDBSに対して最も良好なネルンスト的応答を示した。これらの最適条件下において得られたNaDBSに対する検量ピークをFig. 3に示す。MDは $3 \times 10^{-6} \text{M} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$  NaDBS溶液に対して約60.0 mV/decadeのネルンスト的応答を示し、NaDBSに対するピーク高さの再現性も良好であった。分析速度は1試料あたり3分であった。

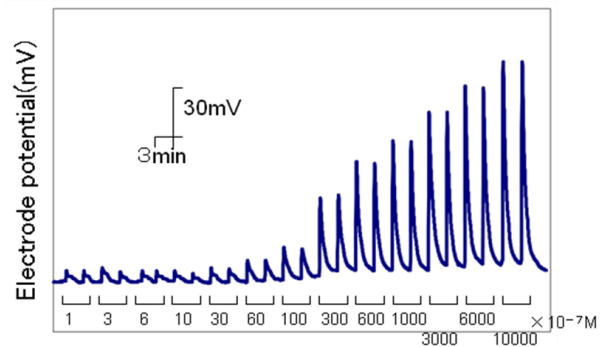


Fig. 3 MDを用いた最適条件下におけるNaDBSに対する検量ピーク

次にASの濃縮率に及ぼすCCへの送液速度の影響を検討した。 $10^{-6} \text{M}$  NaDBS溶液 1250  $\mu\text{L}$ をCCに濃縮させ、75wt%アセトニトリル62.5  $\mu\text{L}$ で溶離させた。種々の送液速度でCCへの濃縮率を検討した結果、4.16  $\mu\text{L/s} \sim 20.8 \mu\text{L/s}$ の送液速度で約90%の濃縮率が得られた。分析時間を考慮してMDへの送液速度として20.8  $\mu\text{L/s}$ を用いた。

次にASの濃縮率に及ぼすCCへ導入する試料溶液の体積の影響を検討した。種々の体積の $10^{-6} \text{M}$  NaDBS溶液をCCに濃縮させ、75wt%アセトニトリル62.5  $\mu\text{L}$ で溶離させた。種々の体積の $10^{-6} \text{M}$  NaDBS溶液においてCCへの濃縮率を検討した結果、CCへ導入する試料溶液の体積が1250および2500  $\mu\text{L}$ の時、約90%の濃縮率が得られた。NaDBSの濃縮倍率を理論的濃縮率と比較してMDの試料溶液導入体積は2500  $\mu\text{L}$ とした。

CCを用いた最適条件下におけるNaDBSに対する検量ピークより、濃縮、溶離の時間も含めて1試料当たり15分の分析速度でASの定量が可能であった。

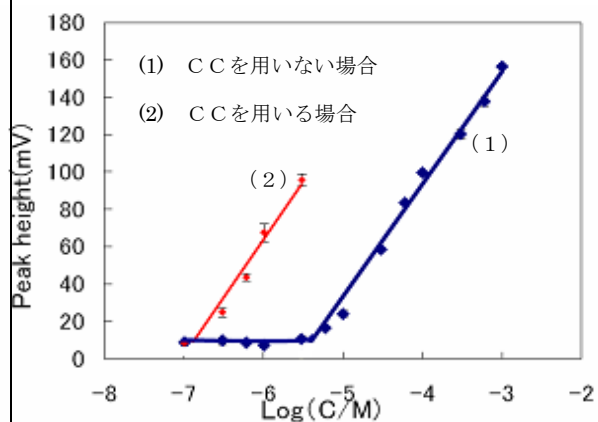


Fig. 4 CCとMDを用いた最適条件下におけるNaDBSに対する検量線

Fig. 4に、Fig. 3のNaDBSに対する検量ピークおよびCCを用いて得られた検量ピークより得られたNaDBSに対する検量線を示す。CCを用いることによって、試料溶液を約40倍の濃度に濃縮できることが分かった。このCCを用いることによって $1 \times 10^{-7} \text{M} \sim 3 \times 10^{-6} \text{M}$ のNaDBS溶液の定量が可能となった。

#### (4) 結言

ASイオンセンサを組み込んだMDを検出器とするASのSIA法を検討した。開発したSIA法により、CCを用いることで、 $1 \times 10^{-7} \text{M} \sim 3 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度範囲のASが1試料当たり15分の分析速度で自動分析できた。

#### 文献

1) Masadome et al., *Sensors and Actuators B*, **2005**, *108*, 888.

#### 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 4 件)

1) B. Tossanaitada, T. Masadome, T. Imato, "Simultaneous Determination of Inorganic Anions by Sequential Injection Chromatography System Constructed from a Monolithic Column and a Microfluidic Polymer Chip with an Embedded Ion-Selective Electrode", *Journal of Flow Injection Analysis*, 査読有, **29**, 89-94 (2012).

2) B. Tossanaitada, T. Masadome, T. Imato, "Sequential injection analysis of nitrate ions using a microfluidic polymer chip with an embedded ion-selective electrode", *Analytical Methods*, 査読有, **4**, 4384-4388 (2012).

3) T. Masadome, T. Miyanishi, K. Watanabe, H. Ueda, T. Hattori, "Determination of polyhexamethylene biguanide hydrochloride using photometric colloidal titration with crystal violet as a color indicator", *Analytical Sciences*, 査読有, **27**, 817-821 (2011).

4) 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**, 417-423 (2010).

[学会発表] (計 17 件)

1) B. Tossanaitada, T. Masadome, "Sequential injection chromatography of inorganic anions using a microfluidic chip with an embedded chloride ion-selective electrode," *Proceedings of the 6<sup>th</sup> South East Asian Technical University Consortium Symposium*, p.7-10, March 6-7, 2012, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand.

2) B. Tossanaitada, T. Masadome, "Separating and Monitoring Inorganic Anions by Sequential injection chromatography using a microchip with an embedded chloride ion-selective electrode detector," *The 1<sup>st</sup> Asian plus graduate research congress (AGRC2012)*, p.140, March 1-2, 2012, Chiang Mai, Thailand.

3) T. Masadome, K. Ishikawa, T. Takahashi, "Optode for Cationic Surfactants based on Tetrabromophenolphthalein Ethyl Ester Membrane", *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011*, May 22-26, 2011, Kyoto, Japan.

4) T. Masadome, Y. Nakamura, K. Maruyama, M. Akatsu, "Optode for Anionic Surfactants based on a Lactone-Form Rhodamine B Membrane," *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011*, May 22-26, 2011, Kyoto, Japan.

5) T. Masadome, K. Watanabe, T. Miyanishi, H. Ueda, T. Hattori, "Determination of Polyhexamethylene Biguanide Hydrochloride Using a Photometric Titration with Crystal Violet as a Color Indicator", *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011*, May 22-26, 2011, Kyoto, Japan.

6) B. Tossanaitada, T. Masadome, N. Ueno, H. Arai, T. Imato, "Sequential injection analysis of nitrate ion using a microchip with an embedded nitrate ion-selective electrode as a detector", *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011*, May 22-26, 2011, Kyoto, Japan.

7) B. Tossanaitada, T. Masadome, N. Ueno, H. Arai, "Determination of nitrate ion using a microchip with and embedded nitrate ion-selective electrode as a detector", *Proceedings of the 5<sup>th</sup> South East Asian Technical University Consortium (SEATUC) Symposium*, OS08-01, p.497-498, February 24-25, 2011, Hanoi

University of Science and Technology, Hanoi, Vietnam.

8) 正留 隆, 新井博明, 古野貴大, 今任稔彦, "マイクロチップ型陰イオン性界面活性剤センサ検出器による陰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", *日本分析化学会第61年会*, 平成24年(2012年)9月19日~21日, 金沢大学

9) 正留 隆, "イオンセンサを組み込んだマイクロチップを検出器とする流れ分析", *Separation Sciences 2012*, 平成24年(2012年)7月19日~20日, 北とぴあ

10) 正留 隆, 堀越悠太, "ポリヘキサメチレンビグアニド塩酸塩検出用蛍光センサの試作", *第72回分析化学討論会*, 平成24年(2012年)5月19日~20日, 鹿児島大学

11) 正留 隆, 今任稔彦, "イオンセンサを組み込んだマイクロチップを検出器とするフロー分析", *第49回フローインジェクション分析講演会*, 平成23年(2011年)12月2日, 愛知工業大学

12) 新井博明, 正留 隆, 今任稔彦, "陰イオン性界面活性剤センサを組み込んだマイクロチップ型検出器による陰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", *日本分析化学会第60年会*, 平成23年(2011年)9月14日, 名古屋大学

13) Benjaporn Tossanaitada, 正留 隆, 今任稔彦, "Sequential Injection Chromatography of Inorganic Anions Using a Microfluidic Polymer Chip with an Embedded Chloride Ion-Selective Electrode", *日本分析化学会第60年会*, 平成23年(2011年)9月14日, 名古屋大学

14) 正留 隆, 中村和貴, Benjaporn Tossanaitada, 今任稔彦, 脇田 慎一, "マイクロチップ型微小硝酸イオン電極検出器による硝酸イオンの検出", *日本分析化学会第59年会*, 平成22年(2010年)9月17日, 東北大学

15) 正留 隆, 中村裕一郎, 丸山慶子, "ラクトン型ローダミン B 含有感応膜を用いる陰イオン性界面活性剤の蛍光センサの試作", *日本分析化学会第59年会*, 平成22年(2010年)9月17日, 東北大学

16) 堀越悠太, 中村裕一郎, 正留 隆, "ラクトン型ローダミン B 含有感応膜を用いる陰イ

オン性界面活性剤検出用蛍光センサの試作", *日本化学会第4回関東支部大会*, 平成22年(2010年)8月30日, 筑波大学

17) 新井博明, 正留 隆, 今任稔彦, "マイクロチップ型陰イオン性界面活性剤イオンセンサを検出器とする陰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4回関東支部大会*, 平成22年(2010年)8月30日, 筑波大学

[図書] (計1件)

1) 正留 隆, "電気化学便覧第6版", 第18章センサ, 18.3.1. イオン選択性電極, p. 693-696, 電気化学会編, 丸善(2013).

## 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