

マイクロ流体デバイスを用いた現場型化学分析装置の開発

Development of Microfabricated in situ Chemical Analyzer

高 木 尚 哉*・福 場 辰 洋*・藤 井 輝 夫*

Naoya TAKAGI, Tatsuhiko FUKUBA and Teruo FUJII

1. は じ め に

海洋は地球表面の70%を占め、地質学的鉱物の巨大な貯蔵庫であり、地球上の物質循環において重要な役割を担っている。近年では、地底の熱水噴出活動による物質移動が特に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。これらの熱水活動を詳しく把握する手段として、熱水中に含まれる金属イオンに着目し、その濃度分布を計測する方法が考えられる。例えば、海洋中のマンガンイオンの濃度値は、熱水噴出口付近で特異的な数値を示すため、その計測を行うことは、熱水噴出場所の特定だけでなく、マンガン団塊等の新しい海洋資源の開発等に大きく寄与する。

熱水の挙動は複雑であり、時空間的に大きな変化を伴うので¹⁻³⁾、採水器を用いる従来の方法ではその連続的な変化を知る事が難しい。また、船上や研究室に運んだ後に分析することになるため、その過程でのコンタミネーションの可能性も否定できない。これらの問題を解決する目的で、これまでも現場型化学分析装置が開発されており^{4,5)}、例えば、ルミノールによる化学発光^{6,7)}を利用した現場型マンガンイオン濃度計測システム (GAMOS)⁵⁾がある。

連続的かつリアルタイムに時空間的な計測を行うためには、これらのシステムをAUVs (Autonomous Underwater Vehicles) やROVs (Remotely Operated Vehicles) 等の潜水艇に搭載する必要がある。しかし、既存の現場型化学分析装置は大型であるため、潜水艇のペイロードスペースを占有してしまうという問題があり、多系統の分析装置を搭載可能にするためには、分析装置全体を小型化する必要がある。装置の小型化を実現する一つの方法としてマイクロ流体デバイス技術がある。マイクロ流体デバイスを用いれば、装置の小型化のみならず、反応時間の短縮、試薬、廃液量の低減、低電力量で長時間の現場計測、等が可能となる。こうしたメリットがあるにもかかわらず、この技術を応用した現場型分析システムはこれまでにほとんど開発されていない。

本稿では、筆者らが開発を進めているマイクロ流体デバイスを用いたマンガンイオン濃度計測装置を紹介する。ここでは、本装置に用いる具体的なマイクロ流体デバイスの設計及び製作プロセスと、nMレベルのマンガンサンプルを用いた評価実験の結果について述べる。

2. フロースルー分析

開発中の装置では、前述のGAMOSとの互換性を確保するため、同じ計測原理であるルミノール反応による化学発光を用いる。ルミノール反応とはルミノールが過酸化水素の存在下で酸化される時に青白い光 ($\lambda = 460 \text{ nm}$) を放つ反応である。この発光は非常に微弱であるが、図1に示すように、反応の際に鉄やマンガン等の金属イオン及びキレート化合物がアルカリ条件下で触媒として働くと、発光強度が強くなるという特徴があり、さらに発光強度は金属イオン濃度に比例する事が知られている。

図2にルミノール反応を利用したマンガンイオンのフロースルー分析の概略図を示す。マンガンイオンのフロースルー分析操作において最も重要なことは、必要な試薬類について正確な量を完全に混合することである。また、ルミノール反応には触媒としての金属イオン種に対する選択性が無いため、あらかじめマンガンイオン以外の金属イオン

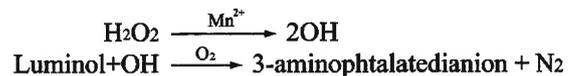


図1 金属触媒作用によるルミノール反応

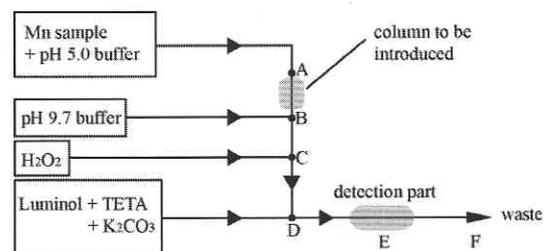


図2 ルミノール反応によるマンガンイオンのフロースルー分析の概略図

*東京大学生産技術研究所 海中工学研究センター

(主に鉄イオン、クロムイオン)を除去しておく必要がある。この操作にはキレート樹脂カラム⁸⁻¹⁰⁾を用いるが、その際には溶液のpHを5.0にしておかねばならない。そのため、フローする分析操作の最初のステップでは、マンガンイオンを含むサンプル溶液とpH 5.0の緩衝液を4:1で混合する(A)。ルミノール反応の発光強度はマンガンイオンの濃度だけでなく、反応液のpHの影響も受ける。金属イオンの触媒作用を利用し、なおかつ検出可能な発光強度を得るためには溶液条件をpH値9.0以上とすることが望ましい。さらにpH 9.75以上における海水中のマグネシウムイオン沈殿を避けるため本研究ではルミノール反応の溶液条件をpH 9.7に設定する(B)。続いて過酸化水素(C)、ルミノール溶液(D)を混合させ、光電子増倍管(photomultiplier: PMT)により発光を検出する(E)。

3. デバイス設計

図2に示したフロースルー分析を行うためのマイクロ流体デバイスのデザインを図3に示す。デバイス上には、分析操作を行うための流路構造(深さ200 μm)に加えて、4つの試薬導入ポート(内径1mm)と廃液ポート(内径1

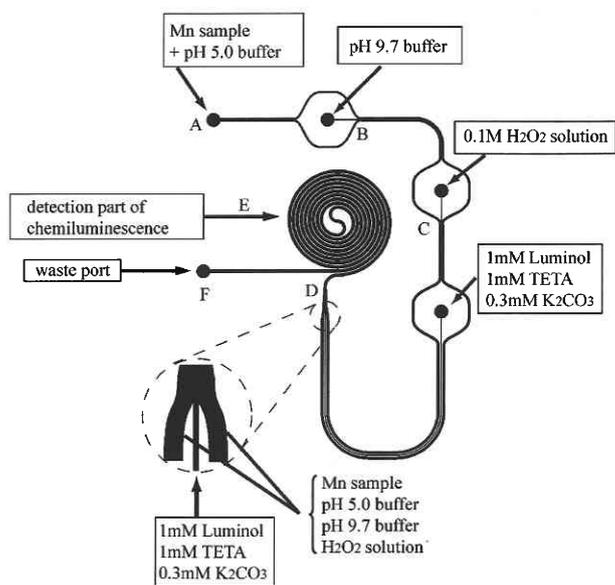


図3 マイクロ流体デバイスの流路デザイン

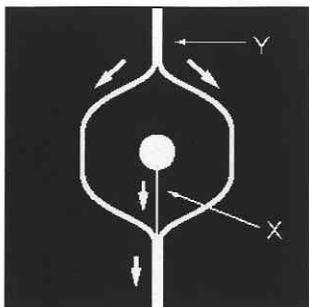


図4 試薬導入部分の流路構造

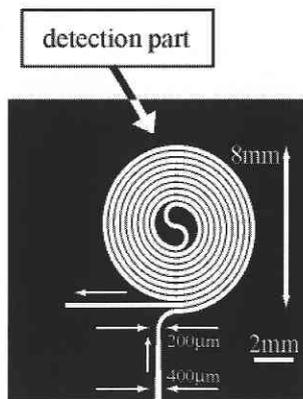


図5 化学発光検出部の流路構造

mm)を設け、流路内の溶液の速さが全ての箇所において同じになるように設計されている。図中のA~Fは図2における分析操作とそれぞれ対応しており、分析全体の流れとしては、まずポートAよりマンガンイオンを含むサンプル溶液とpH 5.0の緩衝溶液の混合液を導入し、B, C, Dの試薬合流部において順次ルミノール反応に必要な試薬を混合する。その後、発光検出部Eを通り、ポートFから全溶液は排出される。試薬の合流地点においては、溶液の混合効率を高めるために、図4に示すような流路形状としている。図中、試薬を導入する流路幅は全て50 μm (X)であり、左右に分岐した主流路(Y)と合流する。主流路の幅は(A)の地点で250 μm であり、試薬混合の際に50 μm ずつ増加する。したがって全ての試薬混合後に流路幅は400 μm になるが、拡散効率を高めるために検出部直前で200 μm に絞ってある(D)。検出部の流路については、感度を高めるために図5に示すような渦巻き状の流路形状を考え、光電子増倍管の受光面(8mm ϕ)を覆うようなデザインとした。

4. デバイス製作プロセス

マイクロ流体デバイスは、シリコンゴムの一種であるPDMS(polydimethylsiloxane)を材料として、ソフトリソグラフィと呼ばれる方法によって製作する。図6にその製作プロセスを示す。まず、超厚膜の感光性樹脂であるSU-8を、流路深さである200 μm の厚みで、シリコンウェハ上に均一にコーティングする(A)。この基板に対し、製作する流路デザインと同一のパターンを有するフォトマスクを通して、紫外線を照射し、現像を行えば、流路構造に対応する凸型の鋳型構造が得られる(B)。この鋳型に、未重合のPDMSを流し込み(C)、熱を加えて硬化させる。尚、PDMSを流し込む前に、鋳型からPDMSが容易に引き剥がせるように、 CHF_3 によるプラズマ処理を行っている。硬化したPDMSを鋳型からはがし(D)、試薬、廃液用のポートなどの穴あけを行った(E)後に、ガラス基板

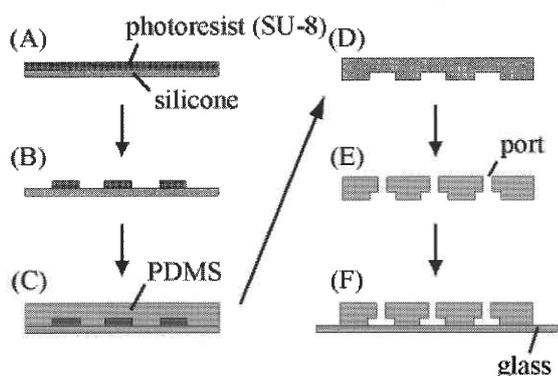


図6 マイクロ流体デバイス製作プロセス

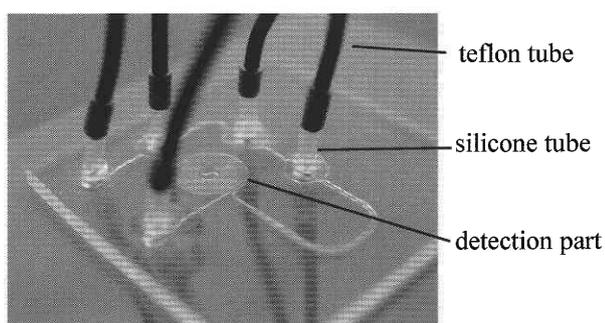


図7 マイクロ流体デバイスの写真

に貼り付ける (F). その際、半永久的な接合を行うために、PDMSの接着面をあらかじめO₂プラズマで処理しておく。製作したマイクロ流体デバイスの写真を図7に示す。

5. 実験セットアップ

図8に製作したマイクロ流体デバイスを評価するための実験セットアップを示す。ルミノール反応による発光は光電子増倍管により電流値から電圧値に変換後、デジタルマルチメータにより計測され、RS-232Cケーブルを介して

表1 単位時間あたりの各試薬の送液量

solutions	flow rate
Mn ²⁺ solution(containing pH 5.0 buffer)	10.75 μl/min
pH 9.7 buffer	2.150 μl/min
H ₂ O ₂	2.150 μl/min
luminol solution	2.150 μl/min

電圧値としてPCに取り込まれる。マイクロ流体デバイスにサンプル溶液、試薬を導入するためにプラスチック製シリンジ、および送液駆動用コントローラを用いる。送液駆動用コントローラにセットしたシリンジの先端とマイクロ流体デバイスの試薬用ポートをテフロン製チューブ（内径1 mm）でつなぎ、送液を行う。外部の光を完全に遮るため、デバイス及び検出のための光電子増倍管を暗箱の内部にセットし計測を行う。

表1に各試薬の送液量を示す。サンプル溶液はすでにマンガン溶液とpH 5.0の緩衝溶液とを4:1の割合で混合済みであり、最終的にルミノール反応時においてはマンガン溶液と試薬全体の単位時間あたりの体積比が1:1 (3.34 μl/min : 3.34 μl/min) になるように調整されている。ルミノール反応による発光強度は、反応開始後次第に増加し、15秒前後で最大値に達した後、急速に減少する。最大値付近の発光を検出するため、本実験では、反応後の溶液が検出部を約25秒で通過するような流速を用いる。

6. 実験結果及び考察

マイクロ流体デバイスの評価実験として、0, 5, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 400 nMのマンガン溶液を用意し、発光強度の測定を行った。サンプリングレートを0.59 sec、計測時間を3分間とした。図9に各マンガン濃度溶液に対応する発光強度の時間的変化を示す。全体として、安定した発光強度プロファイルが得られた。0 nMはマンガン溶

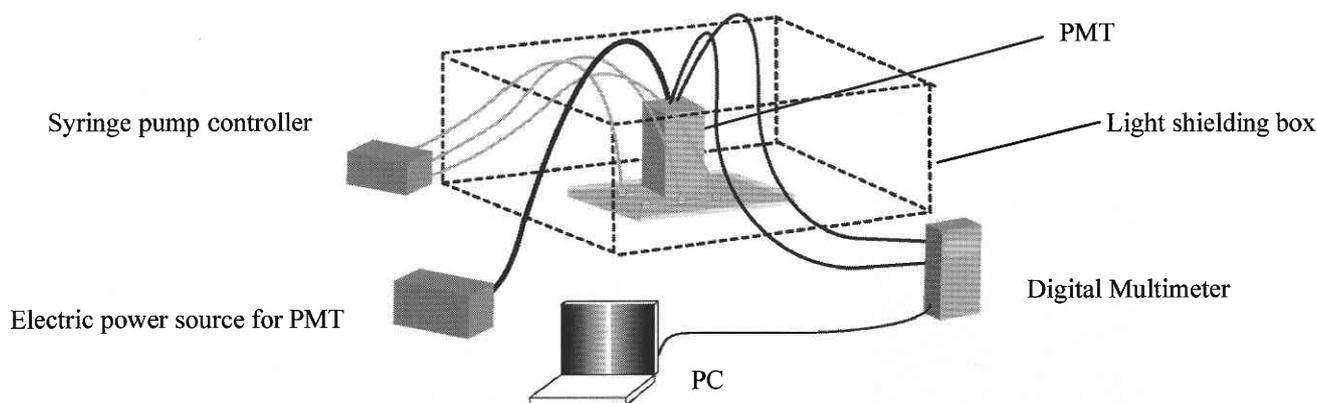


図8 実験セットアップ

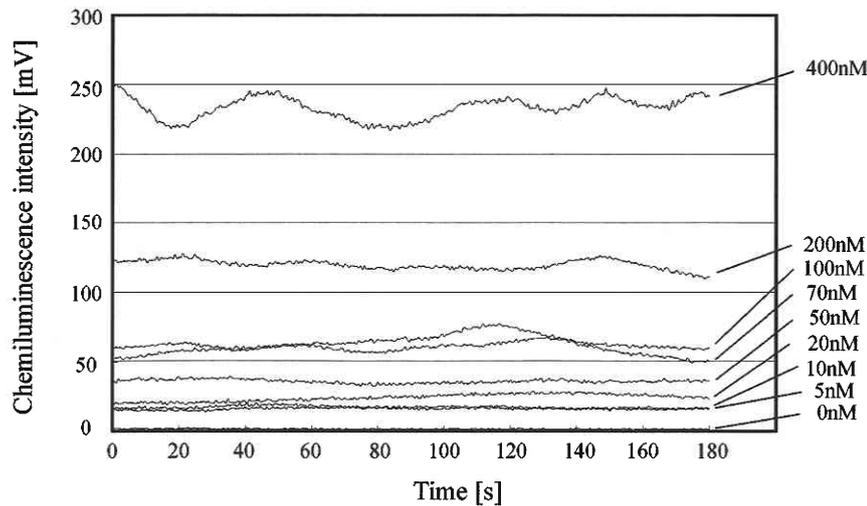


図9 各サンプル溶液の発光強度の時間的変化

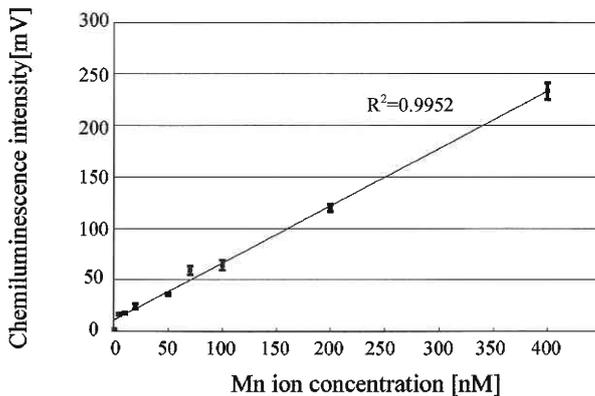


図10 マンガンイオン濃度と発光強度の関係

液として純水を用いており、その発光強度の電圧換算値は約5 mVであり、本実験においてはこれをベースラインとして扱う。70 nMと100 nMのマンガン溶液の発光強度プロファイルでは、互いの曲線が交差し、大きな違いは確認できなかった。この原因として、70 nMのマンガン溶液は200 nM マンガン溶液を希釈し調整されており、200 nM 溶液中の濃度の偏りにより、実際には70 nMより濃いマンガン溶液が作製され、発光強度に影響を与えたと考えられる。また他の要因としてシステムの性能限界が考えられる。本計測に用いるような低速領域では、流路内の流速を一定に保つことが困難であり、発光検出部を通過する溶液の流速分布変化に起因する影響も考えられる。図9における3分間にわたる発光強度の時系列データから平均値を求め、マンガン濃度に対してプロットすれば、図10に示すような線形関係が得られる ($R^2 = 0.9952$)。図9において、計測時間は3分間であるが、初期の段階でデータは安定していることから、短い時間でサンプリングした海水のマンガン濃度分析にも十分対応可能であり、現場計測ではマイク

ロ流体デバイスを用いて、高分解のデータが得られると期待できる。

7. ま と め

マイクロ流体デバイスを用いたマンガンイオン濃度計測装置を製作し、高性能および、再現性のある計測が実現できた。特に3分間という短い時間で得られたデータが安定していることから、現段階において、マイクロ流体デバイスを用いた現場計測は十分可能である。さらに試薬導入から発光検出までの時間を短縮することで、分析データを即座にオペレーションに反映出来る。例えばマンガンイオン濃度が異常に高い熱水噴出口付近を重点的に計測したい場合は、サンプル取得から計測までの時間を短縮させることで、異常値を感知後、即座にその地点に戻り分析を開始することができる。これにより探査機の電力を有効に利用することができ、より長期的な観測が可能となる。

今後、マイクロ流体デバイスを用いた既存のマンガン計測システムの小型化を実現させるためには、送液システムの安定化、集積化、自動化が必要となる。さらにはマンガンイオン以外の金属イオンを吸着するためのカラムをチップ内に組み込む事も考える必要がある。これらの集積化によりマイクロ流体デバイスを用いた現場計測の実現化に大きく近づくと考えられ、マンガンイオンのみならず、pHや他の金属イオン濃度等も同時に計測できる「多系統分析が可能な小型の現場型化学分析装置」の開発が期待できる。

(2004年10月25日受理)

参 考 文 献

- 1) T. Gamo, E. Nakayama, K. Shitashima, K. Isshiki, H. Obata, K. Okamura, S. Kanayama, T. Oomori, T. Koizumi, S. Matsumoto, and H. Hasumoto, "Hydrothermal plumes at the Rodriguez Triple Junction, Indian Ridge.", *Earth Planat. Sci. Lett.*, vol 142,

- 研 究 速 報
- pp. 261–270, 1996.
- 2) T. Gamo, H. Chiba, T. Yamanaka, T. Okudairai, J. Hashimoto, S. Tsuchida, J. Ishibashi, S. Kataoka, U. Tsunogai, K. Okamura, Y. Sano, and R. Shinjo, "Chemical characteristics of newly discovered black smoker fluids and associated hydrothermal plumes at the Rodriguez Triple Junction, Central Indian Ridge.", *Earth Planat. Sci. Lett.*, vol 193, pp. 371–379, 1996.
 - 3) J. Ishibashi, H. Wakita, K. Okamura, E. Nakayama, R. Feely, G. Leobon, E. Baker, and K. Marumo, "Hydrothermal methane and manganese variation in the plume over the superfast-spreading southern East Pacific Rise.", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 61, No. 3, pp. 485–500, 1997
 - 4) G. Klinkhammer, "Fiber optic spectrometers for in-situ measurements in the oceans: the ZAPS Probe.", *Mar. Chem.* Vol. 47, pp. 13–20
 - 5) K. Okamura, H. Kimoto, K. Saeki, J. Ishibashi, H. Obata, M. Maruo, T. Gamo, E. Nakayama, and Y. Nozaki, "Development of deep-sea in situ Mn analyzer and its application for hydrothermal plume observation.", *Mar. Chem.*, vol 76, pp. 17–26, 2001.
 - 6) K. Okamura, T. Gamo, H. Obata, E. Nakayama, H. Karatani, and Y. Nozaki, "Selective and sensitive determination of trace manganese in sea water by flow through technique using luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence detection.", *Anal. Chim. Acta*, vol. 377, pp. 125–131, 1998.
 - 7) W. Seitz, D. Hercules, M. Cormier, and D. Hercules (Eds.), "Chemiluminescence and Bioluminescence.", Plenum Press, New York, pp. 427, 1973
 - 8) S. Hirata, T. Kajiya, N. Takano, M. Aihara, K. Honda, O. Shikino, and E. Nakayama, "Determination of trace metals elements in seawater by on-line column preconcentration inductively coupled plasma mass spectrometry using metal alkoxide glass immobilized 8-quinolinol.", *Anal. Chimi. Acta*, vol. 499, pp. 157–165, 2003.
 - 9) Y. Sohrin, M. Kinugasa, K. Okamura, K. Norisuke, T. Ishita, Y. Fujishima, H. Hasegawa, and K. Ueda, "Determination of Trace Metals in the Ocean by MAF-8HQColumn Extraction-ICP-MS.", *Anal. Sci.*, vol. 17 Supplement
 - 10) Y. Sohrin, S. Iwamoto, S. Akiyama, T. Fujita, T. Kujii, H. Obata, E. Nakayama, S. Goda, Y. Fujishima, H. Hasegawa, K. Ueda, and M. Matsui, "Determination of Trace Metals in seawater by fluorinated metal alkoxide glass-immobilized 8-hydroxyquinoline concentration and high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry detection.", *Anal Chim Acta*, vol. 363, pp. 11–19, 1998.