研究論文

食品産業支援の化学チップ開発

永井　直人*　笠原　勝次*　佐藤　健**

On-plate chromatographic spectroscopy using Marangoni and/or Poiseuille flow

NAGAI Naoto*, KASAHARA Katsuji* and SATO Takeshi**

抄　　録

数 cm 程度の大きさのプレート上にカバーグラスを傾斜をつけて配置し，その隙間に溶媒や溶液を導入して流れを形成して試料の組成物をプレート上に分離・展開する方法を開発した。流れはプレートの異なった場所に異なった表面張力の物質を吸着させる。その吸着物質を赤外分光やラマン分光などのマイクロプローブを利用して組成や化学構造の変化を議論できる。

1. 緒　　言

近年，「食の安全・安心」の観点から食品中に混入する異物や残留農薬，産地や表示偽装などが問題となっている。新潟県は米や清酒などの特産品が多数存在し，食品製造業も多くあることから本問題で大きな影響を受ける可能性が高い。しかし，一般に加工食品は多種類の組成物で構成されており，その問題の原因を明らかにするための分析は容易ではない。

材料の構成物を分離分析する手法としてはクロマトグラフィーの手法を使ったものが多く [1]，分離のための前処理で時間がかかる場合が多いうえ，同一の物質に関して主構成物質から不純物まで分析するには多大な時間を要する。最近はμ-TAS(Total Analysis System)，や Lab-on Chip と呼ばれる手法によって小さいチップ上で血液やタンパク質や DNA 解析を行うシステムが考案されている [2]。これらは一般に集積化技術を利用して多くの種類の分子をチップ上に植えつけたり，微細な流路を作ってチップ上で反応を起こさせたりするものである。検出は蛍光色素を使い目的物質を効率良く検出するのが主流であり，これらの方法は微細加工技術や集積化技術を要するためコストがかかる問題があった。

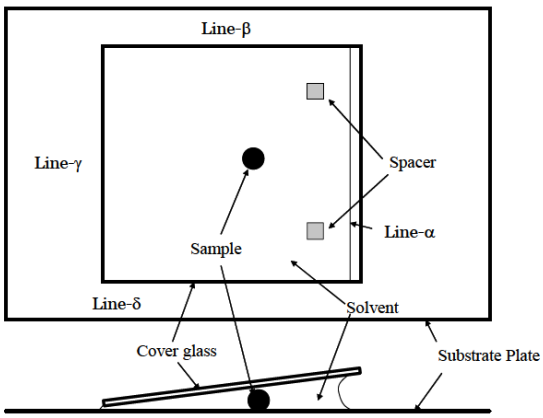

図 1　新しい化学チップ分離法の配置図

本研究では食品分析のために低コストで主構成物から微量不純物まで多様な分析に適用可能な革新的チップ開発を目指している。

今年度は基礎的な原理の確立を行ったので，それに関して報告する。

2. 実験および考察

2.1　実験的背景

シリコンウェハに金をスパッタリングし，3cm×10cm ほどの長方形に切断したものを基板とし，基板上に 1mmφ 程度の大きさで試料を固定する。そこに図 1 に示したようにカバー

*　下越技術支援センター
**　研究開発センター

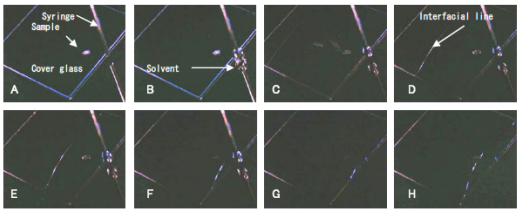

図 2　液の挿入と気化の様子

グラスを傾斜をつけてのせるシステムを考案した。カバーグラスの厚さは約 0.15mm である。その傾斜のあるカバーグラスと基板の間の隙間に溶媒が導入されると液は毛管現象によって固定されギャップから漏れない。液を挿入するためには接触角測定装置を改造してシリンジ先端から液を最大ギャップの位置に滴下するシステムを構築した。こうすると表面張力の異方性によって液がカバーグラス下に連続的に導入され，試料が溶媒に浸されるようにカバーグラス直下を満たすことができる。この様子を図 2 に示した。液が満たされた後，放置しておくと液はゆっくりと最大ギャップから最小ギャップの方向に向かって移動する。これは表面張力の異方性によってその方向に力が働くとともに[3]，最小ギャップのラインからの溶媒の気化が大きいことによると考えられる[4]。以下これを液を水平方向に駆動させる系であることから「薄膜ポンプ」と呼ぶことにする。この操作の後，溶媒の気化を待ってからカバーグラスをはずすと図 3 に示したような最大ギャップ以外のカバーグラスの周囲に沿ったしみが形成される。このしみを分析すると試料の構成物が分離されていることが見出された。例えば，図 4 は水 100cc に「イソジン」と「モンダミン」をそれぞれ 2 滴加え，よく攪拌した液をこの薄膜ポンプで駆動させ現れたしみを顕微赤外分光で分析した結果である。図 3 で表記した Line-β と Line-δの位置にはイソジンの成分のポリビニルピロリドンが現れているが，Line-γに近づくにつれてモンダミンの主成分であるグリセリンも混ざって現れていることがわかる。分離が不十分のところもあるが分光分析は差スペクトルを計算できるメリットがあり，混合領域が現れても計算で分離を進めることが可能であることから，本手法を我々の目指す食品分析に利用することを考えた[5]。

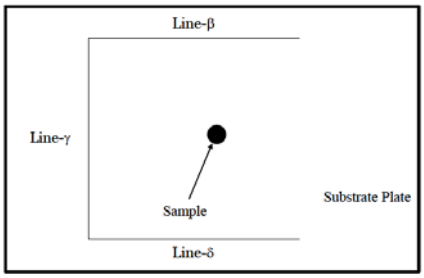

図 3　液の気化後に形成されるしみ

しかしながら，本現象に関してはこれまで報告がなく，現象の解明が今後の分離向上を目指すうえで重要である。

2.2　実験

現象を理解するために用いた溶液はエタノール 100ml，ステアリン酸 4.2mg，ドデシル硫酸ナトリウム 3.7mg，グリセリン 4.5mg である。以下この溶液を「溶液 A」と呼ぶことにする。これを薄膜ポンプで導入して基板上に残る成分を分析した。なお，本現象で溶質成分が現れることは吸着であると予想されることから，それぞれの物質の表面張力を調べるとグリセリンで 0.063N/m[3]，ドデシル硫酸ナトリウムで 0.050N/m[6]，ステアリン酸で 0.033N/m[7] であっ

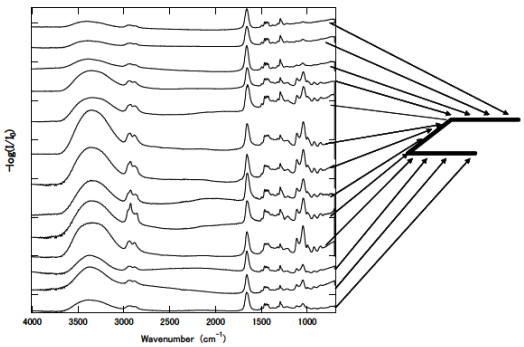

図 4　「イソジン」と「モンダミン」で形成されるしみの赤外分析の分布

た。溶解度の違いによる析出である可能性も考えられるのであるが，水への溶解度が極めて高いグルコースをわずかに水に溶かし薄膜ポンプで本実験を行うと，Line-β，Line-γ，Line-δのそれぞれにしみが現れた。本現象が析出だとしたら，溶解度の高い物質の場合はLine-γのみにしか現れないと予想されるが，このような実験事実からしみが現れる主な効果は吸着によるものであると考えられる。なお，応用としては市販のサプリメントである「ブルーベリーエキス」の組成物を調べた。これは色素が入っているため，流体の流れを観察するためにも利用することができる。

2.3　結果と考察

図5には溶液Aを18mm角のシリコーンコートカバーグラス（シリコーンコートの場合は液の流動速度が遅くなる）で薄膜ポンプを駆動した場合にできるしみの顕微鏡画像と赤外スペクトルを示した。aの部位ではステアリン酸のみが検出されている。bの部位ではステアリン酸とドデシル硫酸ナトリウムとグリセリンが認められる。cではグリセリン比率が高くなっている。一方，Line-γ上ではdの位置でほとんどグリセリンであるのに対してeの位置ではステアリン酸も混ざってくる傾向が認められる。なお，Line-βと等価な Line-δの結果は省略した。

図6は22mm×54mmの長さの長いシリコーンコートでないカバーグラスを用いた場合の結

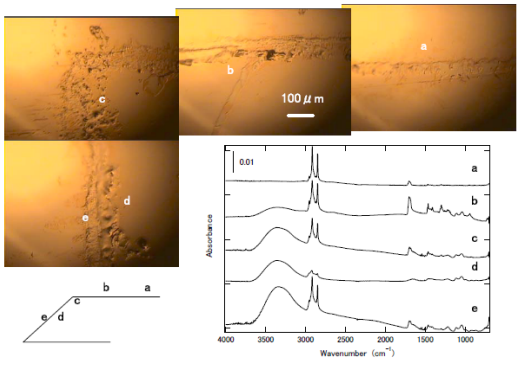

図5　「溶液A」の分離実験結果1

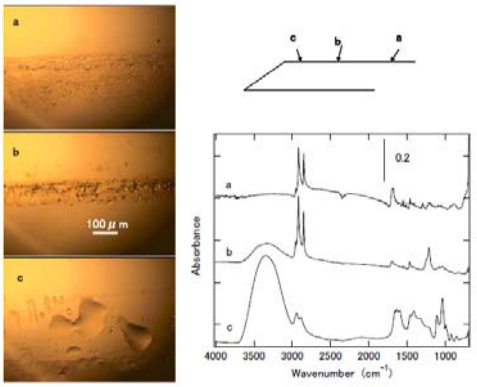

図6　「溶液A」の分離実験結果2

果を示した。この場合は長さが長かったためかLine-γ上にはあまりしみが残らなかったが，Line-β上に残ったしみは顕微鏡で観察しても明らかに異なるものであることが分かる。aの部位ではステアリン酸が，bの部位ではドデシル硫酸ナトリウムが，cの部位ではグリセリンが認められた。図5の実験では分離は不十分ではあったが，Line-β上での並び方が（ギャップ厚さの大きい方向から）表面張力の小さい物質から大きい物質になっているという図6の結果とほぼ合致している。一方，Line-γではギャップ厚さの大きい方向から小さい方向へむしろ逆で表面張力の大きい物質から小さい物質へと並んでいるように思われる。

物質の物理吸着はDefayによって示されるように図7の吸着核を考えると、臨界核形成の表面エネルギーをΔFgとして以下の式によって与えられる[8]。

$$J=c_{11}wv_1\sqrt{(s\sigma^{\alpha\gamma}/\pi kT)}\cdot\exp[-(\Delta Fg/kT)]$$

$$\Delta Fg=2/3\sigma^{\alpha\gamma}\pi r_{\alpha\gamma}{}^2(1-\cos\phi-1/2\cos\phi\sin2\phi)$$

なお，ここでJは吸着核形成割合で，c_{11}は単位体積あたりの核種の分子密度、wは単位時間，単位面積当たりのエンブリオ（核になる前の初期段階）との衝突分子数，v_1は核形成する種類の分子当たりの体積，sは形状因子，kはボルツマン定数で、Tは温度である。なお，図中の$\sigma^{\alpha\gamma}$は相αとγの界面張力であり，$r_{\alpha\gamma}$は相αと

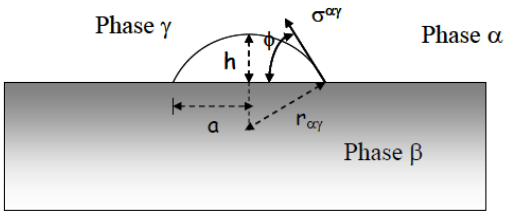

図 7　吸着核の模式図

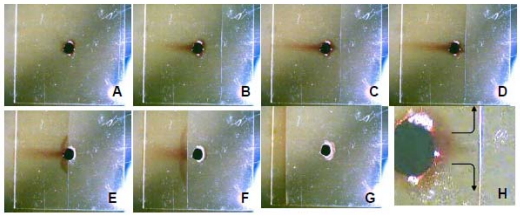

図 8　ブルーベリーエキスの流動

γの間の核によって作られる局面の曲率半径である。また，ϕは接触角である。今の系ではαは溶液で，βは基板，γは核である。以上のように物質の吸着はそれぞれの吸着核の界面張力と接触角に依存することがわかる。

しかし，カバーグラスのエッジに沿って吸着が起こる理由が理解できない。そこで，色素の入ったブルーベリーエキスを用いて流動過程を追跡した。結果を図 8 に示した。A は中央にサンプルを置いてカバーグラスをかけ溶媒のエタノールを導入した直後の画像である。右側がギャップ厚さの最も大きい領域で，左側が最も小さい領域である。液は右から左にかけて押されていく。B→C→D となるにつれて溶媒中に拡散した色素が押されていく様子が観察される。しかし，液面が E のサンプルを通りすぎる位置くらいから横方向への拡散も大きくなり最終的には平均化されて Line-γの方へ押されていくことが分かる。ここで，特徴的なのは C の位置での現象で，液面が試料から 1-2mm 程度まで近づいてくると，右から左ではなくて左から右への逆流現象が観察されることである。この様子を拡大した画像を H に示してある。赤い色素が先端を細くして液面に接触するのが観察される。液面に接触するとかなり速い動きで色素成分が液と大気の境界領域をカバーガラスの周囲に沿いながら流動していく。これは「界面かく乱」という現象で，液／大気の界面を不純物成分がマランゴニ流によって移動することを示している [9,10]。マランゴニ流は物質の界面張力勾配や温度勾配が界面で存在すると，界面張力の低い方（溶質濃度の高い方）から高い方（溶質濃度の低い方）へ，温度の高い方から低い方へ界面流動が発生する現象である。したがって，拡散した物質が Line-α（図 1 参照）に接するとその点で界面張力が低くなり，その周辺での界面張力が高いため，物質は Line-α→Line-β（Line-δ）→Line-γと流動していくことになる。したがって，拡散物質はどんどん界面領域に流れ込んで移動していってしまうことになる。さらに，Line-γでは溶媒の気化が激しいので，潜熱を奪われて Line-γ上で最も温度が下がり，結局マランゴニ効果を増幅させることになる。これがカバーグラス周辺にしみを作るための駆動力であると考えられる。なお，界面かく乱が発生するまでの試料からの拡散成分が逆流していく初期の駆動力は Line-α上で少し発生している溶媒の気化による温度勾配ゆらぎであろうと思われる。バルク流体中での温度勾配は物質勾配を誘起し，物質勾配がさらに温度勾配を誘起することが知られている [11]。

以上の事実と吸着種の部位の違いをル・シャトリエの原理から考察してみる [12]。マランゴニ流は表面張力勾配および温度勾配によって発生している非平衡流であると考えられる。したがって，系は表面張力勾配や温度勾配をなくすことで非平衡流を緩和する方向に変化していくはずである。すなわち，Line-αに近い Line-β領域では表面張力の小さい物質を基板に吸着させることによって溶液の表面張力を大きくし，Line-γに近い Line-β領域では表面張力の大きい物質を基板に吸着させることで溶液の表面張力を小さくしてマランゴニ流を緩和させると考えられる。ル・シャトリエの原理によって表面張

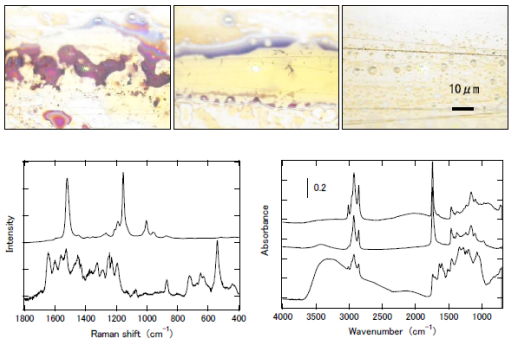

図 9　ブルーベリーエキスの分離分析結果

力の異なる物質が異なる位置に吸着して分離することができていると考えられる。

Line-γ上ではカバーグラスと基板の間の液が毛管現象の中で押されていく最終段階で形成されるしみである。すなわちカバーグラスおよび基板の抵抗を受けながら流動していくポワズイユ流である。しかし，ギャップ厚が次第に狭くなっていくため表面張力の大きい物質ではそこを通過していくための抵抗が大きくなり通過しにくくなる。一方，表面張力の小さい物質はギャップ厚さが小さくても通り抜けることが可能である。したがって，Line-γ上ではギャップ厚の大きい方からグリセリンのような表面張力の大きい物質が現れ、ギャップ厚が小さい領域でステアリン酸のような小さい物質が現れるのだと考えられる。以上より，Line-β（Line-δ）で並ぶ物質と Line-γ上での物質の並び方は本質的に異なる流動現象が起源であり，マランゴニ流とポワズイユ流が連続して起こる Line-γ上では分離成分のミキシングも再び起こる可能性があると考えられる。しかしながら，これらの流動現象を利用することで，チップ上で簡便に分離を起こさせることができる。

2.4　応用

以上のメカニズムを用いて今後多くの試料の分析に適用してみる予定であるが，ここでは先に述べた「ブルーベリーエキス」を分析した例を紹介する。

図 9 には本手法にてブルーベルーエキスの分離を行った結果を示した。Line-β上に現れる組成物を顕微鏡で観察した結果が上の画像である。明らかに，部位によって異なった成分が現れているのが見えている。それぞれの成分をラマン分光および赤外分光によって分析した結果を図下に示している。下の左がラマン分析の結果で，右が赤外分析の結果である。赤外分析の結果から油脂成分のトリグリセリドが認められる。そのトリグリセリドも不飽和結合の多い植物性油脂と不飽和結合の少ない動物性油脂の 2 種類存在していることが分かる。また，紫色の部分からはグリセリンとアントシアニンが検出された。一方，ラマン分光分析からは黄色部分からカロテノイドが検出され紫色の部分からはアントシアニンが検出された。以上より，本手法によってブルーベリーエキスの主要構成物はほとんど検出することができていることがわかる。

3. 結　　言

食品分析に応用するための全く新しい分離分析法を開発した。それはマランゴニ流とポワズイユ流による自己組織化現象を利用するものである。これによって，数 cm 角のチップ上で分離を行い，多様な分析が可能になると考えられる。

参考文献

1) J. C. Giddings, Dynamic of Chromatography Part1 Principles and Theory, Marcel Dekker, New York, 1965.
2) M. A. Northrup, K. F. Jensen and D. J. Harrison eds., Micro Total Analysis System 2003, Transducers Research Foundation (2003).
3) P. G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, D. Quere, Capillarity and Wetting Phenomena Drops, Bubbles, Pearls, Waves, Springer, New York, 2004.
4) D. Khrustalev and A. Faghi, “Fluid Flow Effects in Evaporation From Liquid Vapor Meniscus”,J.Heat Transfer, 118 ,1996, 725.

5) 特願 2008-40595「試料成分の分離方法及び分析方法」
6) K. J. Mysels, Langmuir, 2 ,1986, 423.
7) Catalogue from Mitsubishi-kagaku Foods corporation, http://mfc.co.jp/english/s1570.htm
8) R. Defay, I. Prigogine, with the collaboration of A. Bellemans, Surface Tension and Adsorption, Longmans, London, 1966.
9) C.V.Sternling and L.E.Scriven, "Interfacial Turbulence:Hydrodynamic Instability and the Marangoni Effect", AlChE J. 5 ,1959, 514.
10) Y. Nakaike, Y. Tadeumi, T. Sato, and K. Fujinawa, "An optical study of interfacial turbulence in a liquid-liquid system", Int. J. Heat Mass Transfer, 14 ,1971, 1951.
11) L.Landau and E.Lifshitz, Fluid Michanics 2nd edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1987.
12) I. Prigogine and R. Defay, Chemical Thermodynamics,Longmans,London,1954.