

マイクロチャンネル中での微小電極の電気化学的挙動

バイオセンサ・光電気化学

田部井 久男、栗田 僚二 (NTT-AT)、丹羽 修、堀内 勉 (NTT) *このドキュメントは、ピー・イー・エス (株) 主催による抄録です。

1、はじめに

近年、細胞レベルや遺伝子の情報を得るため、ナノリットルオーダーの微小容量サンプル分析が重要な手法として注目されている。具体的手法として、マイクロカラム液体クロマトグラフィ、キャピラリー電気泳動法などが検討されている。(1-4) これらに用いられる通常の検出手段として、光学的検出器が多用されているが、試料の微量化に伴ない検出器の光路長が不足して感度不足といった問題が生じネックとなっている。高感度化のためレーザー誘起蛍光を用いる手法もあるが多くの場合、目的物質の蛍光発生のための修飾(誘導化)を行う必要があるなど一長一短がある。一方電気化学検出は、カテコールアミン、セロトニン類など神経伝達物質の直接測定が可能で従来から高感度で簡便な検出器として知られているが、必ずしも万能ではない。このような状況の中で、マルチ検出可能な検出器の出現が望まれている。

ここでは、NTT研究グループが最近検討している技術情報を紹介、動向を述べるとともに、今後のあり方の一指針を提言できれば幸甚である。

2、マイクロチャンネル中での微小電極の電気化学的挙動

1) フローセルの構造と作製法

図1にラジアル型フローセンサの構造と作

製法を示す。パイレックス基板の上にフォトリソグラフィ技術により、レジスト樹脂の微小なくし型パターンを形成し、リフトオフ法で金薄膜を形成し、電極を作製した。

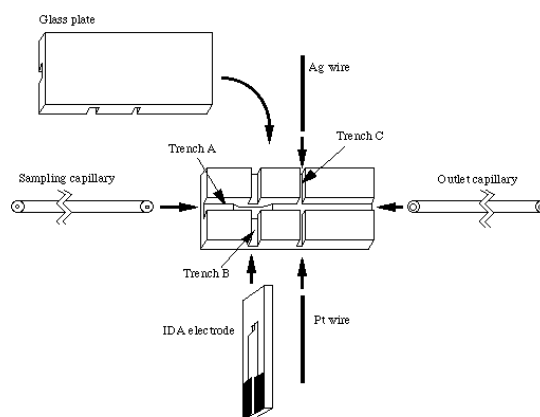


図1 微小チャンネル電気化学検出素子

2) 電気化学発光セルの構造と作製法

図2に電気化学発光セルの構造と作製法を示す。石英基板上にフォトリソグラフィにより、くし型パターンを形成し、4 μm電極幅&ギャップの白金のくし型電極を形成した。送液用のキャピラリーを取り付け、フィルムスペーサを挟み込み別の石英基板を張り合わせてセルとした。また白金平板電極を2枚、対向型に張り合わせたセルも作製した。この場合、分光測定のため一方はハーフミラー構造となっている。

3) 混合色素の電気化学発光計測

電気化学発光用の色素として、DPA (9,10-Diphenylanthracene)を用いている。波長変換用の蛍光色素としては、DCM(4-Dicyanmethylen-2-methyl-6-(p-

dimethylaminostyryl)-4H-pyran) Coumarine515(3-(2'-N-Methylbenzimidazolyl)-7-N,N' diethylaminocoumarin が用いられている。

DCMは、吸収の最大が472nmで644nmに蛍光の最大を持ち赤色に発光する。Coumarine 515は吸収の最大が412nmで488nmに蛍光の最大をもち青緑色に発光する。溶媒にはDMF(N,N'-dimethyl formamide)を用い、DPA、DCM溶液を別々のシリンジポンプから送液し、フローセルの直前で混合している。電極での発光はマルチモード光ファイバで集光、分光器を通してCCDで計測している。

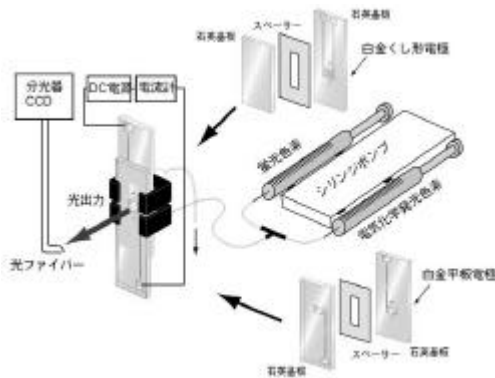


図2 電気化学発光セルの構造と製造法

3、結果

1) 電気化学的挙動

図3aに100 μM水溶性フェロセンの20 nL/ml流速での応答を示す。電流立ち上がりから1.4秒で定常状態になり、速い応答を示している。この原因は、サンプリングキャピラリー外でのデッドボリュームが5 nLと小さく、キャリア溶液での希釈が小さいためと思われる。すなわちマイクロチャンネル中での特徴として、オンラインセンサやCE法と組み合わせて測定出来ることが確認され、高感度で高速の応答が期待できることになる。⁵⁾

図3bに上と同様の試料での10mV/secで

のCVを示す。(a)はデュアルモードで、(b)はシングルモードである。デュアルモードではレドックスサイクル効果により約3倍大きなシグナルが得られている。この値は通常もう少ししの本数の多い電極ではもっと大きな値が出現するがこの場合は、本数が少なく小さ目の値を示している。

$$R_c = 1 / (1 - ce^2) \quad \text{--- (1)} \quad ce: \text{補足率}$$

レドックスサイクル数は(1)式で近似的に示されるが⁶⁾、流速が小さな領域では補足率ならびにレドックスサイクル数は急激に増加する。20nL/minでは、レドックスサイクルが4とエスティメートされる。

以上示したように可逆性の種に対してのこの手法(特にマイクロチャンネル中)の有用性が期待される場所であるが、実際にカテコールアミンの1つドーパミンでの検出限界を試した結果、4nMが可能という結果を得ている。

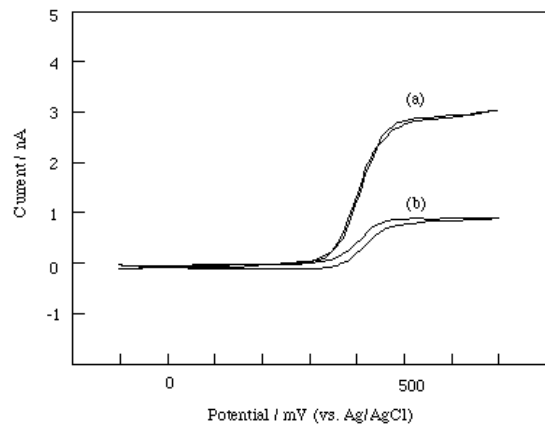
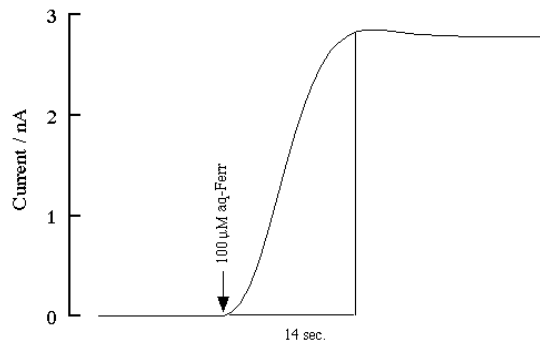


図3 水溶性フェロセンの応答とC V

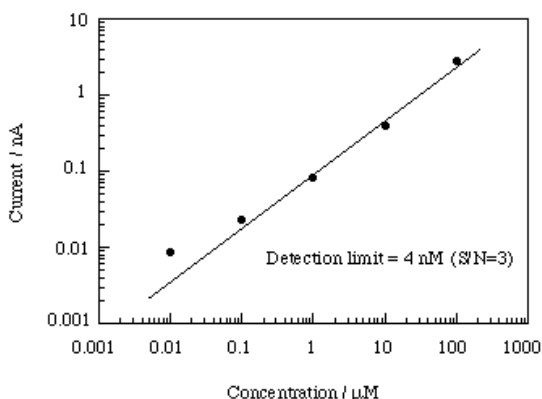


図4 ドーパミンの検出限界

4、電気化学発光の測定結果

図5は、くし形電極に12Vの電位差を印加した場合の、DPA溶液とそれにDCM溶液を混合した場合の発光スペクトルの比較を示している。それぞれの電極上でDPAは酸化、還元されDPA⁺、DPA⁻を発生、くし形電極の間隙へ拡散、電子移動反応の結果、励起状態のDPA*が生成する。この励起状態から基底状態へ落ちる際に発光を生じる。DPAは可逆なため、くし形電極では原理的に発光が継続するはずであるが、実際はDPAの分解や消光作用を有する副反応物の生成により連続的発光はしない。特に容積が小さいセルではこの現象が顕著である。しかしそういった系でも溶液を流すことにより、常に新たな電気化学種が供給されるため、連続的な発光を行うことが可能になる。

もしこのような系で、種々の波長を発光させることが可能になり、マイクロマシン技術を用いた電気化学的な検出手段と光学的な検出手段をコンパクトに、安価に実現できれば、極めて興味深いと思われる。

DPA20mM、流速10μl/minでの結果を(a)に更に10mM,DCM溶液を合流させた場合の

スペクトルを(b),(c)に示す。DPA自体の発光が420nm付近に出現する現象と共に、DCMに吸収、DCMの蛍光が長波長の630nm付近にみられる。このようにDPA発光の光を励起光として、波長変換の可能性が示されている。DCMの代わりにCoumarine515を使用した場合には、480nm付近に蛍光発光を観測できた。

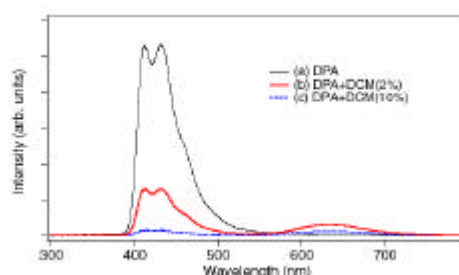


図5 DPA、DPA-DCM 混合液からの発光

一方平行平板型の電極を使用した場合には、さらに興味深い現象が観測された。電極の材質は、白金であり一方はミラーとして、一方はハーフミラーとして機能する構造のため、ファブリーペロー型共振器としても機能し、共振器長と溶液の屈折率で決まる数本の細いスペクトル波長の定在波が出現する。またCoumarine515混合系では、変調されたスペクトルの最大強度のピークはやはり長波長側にシフトしており、波長変換が可能であることが確認されている。

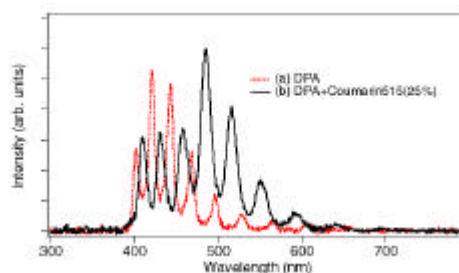


図6 ファブリーペロー型セルでのDPA電気

化学発光スペクトル

このようにマイクロチャネル中での電気化学発光によるレーザ発振現象が見出されており、興味深いデバイスとなることが期待される。

5、まとめ

マイクロファブリケーション技術を用いて作製したマイクロチャネル中での電気化学的挙動・光電気化学挙動についての最近のNTT 研究所の技術動向を述べた。特に電気化学デバイスにおいては、低流速領域での高感度測定が可能であり、例えば脳情報機構解明やバイオセンシングでのサンプリング時に大きな摂動を与えない測定が必要な系や、それ自体微量しか存在しない対象への適用可能性を示した。また光電気化学挙動においては、電気化学デバイスの構造を流用しながら、新たな現象の発現を紹介し、そのデバイス適用可能性を示した。こういった新たな試みが μ TAS の分野に取り入れられ発展していく可能性を示せたとすれば幸いである。

6、参考文献

- 1) R. A. Wallingford, A. G. Ewing
Anal. Chem., 60, 1972 (1988)
- 2) M. Zhong, J. Zhou, S. M. Lunte, G. Zhao, D. M. Giolando, J. R. Kirchhoff, Anal. Chem., 68, 203 (1996)
- 3) L. A. Holland, S. M. Lunte, Anal. Chem., 71, 407 (1999)
- 4) M. Takahashi, M. Morita, O. Niwa, H. Tabei
J. Electroanal. Chem., 335, 253 (1992)
- 5) O. Niwa, R. Kurita, Z. Liu, T. Horiuchi, K. Torimitsu
Ana. Chem. 72, 949 (2000)
- 6) O. Niwa, M. Morita, H. Tabei, Anal. Chem. 62, 447,

(1900)

7) T. Horiuchi, O. Niwa, N. Hatakenaka, Nature
394, 659 (1998)

8) 堀内勉、劉志明、栗田僚二、鳥光慶一、丹羽修
信学技報 CPM99-30, OME99-35 (1999)

9) 堀内勉、丹羽修、栗田僚二、鳥光慶一

電気学会 化学センサシステム研究会資料 CS-99-8