

微小作用力と分析化学

渡 會 仁*

1. はじめに

分析化学は分離と検出の化学と言われるが、分離においても検出においても、様々な作用力を利用されている。分子の移動や、分子内の電子の変位は、いずれも外場の作用力に起因する。電子、分子、微粒子と大きさや性質が異なると、作用する力の受け方も多種多様となる。外場の種類と勾配の設計により、分子や粒子の移動すなわち分離法を設計することができる。

J. C. Giddings の著書“Unified Separation Science” (1991年)¹⁾ は、分子の化学ポテンシャル、力、分離法の間を述べた啓蒙的な教科書である。彼は、式(1)に示すように、通常の化学ポテンシャル項に外場のポテンシャル項 μ^{ext} を加え、その微分量が分子に作用する力であるとした (式(2))。

$$\mu = \mu^{\text{ext}} + \mu^0 + RT \ln c \quad (1)$$

$$F = - \left(\frac{d\mu^{\text{ext}}}{dx} + \frac{d\mu^0}{dx} \right) - \frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} \quad (2)$$

(2)式の x は分離座標を表し、右辺の第一項は、外場の力を、第二項は溶媒組成の勾配 (液液界面のような状態) を、第三項は拡散力を表わす。彼は、外場の形には、連続変化、不連続変化、両者の連続状態の3様式があり、また、流れのある場合 (流れが外場力と平行あるいは直角に作用する場合) と流れのない場合の3状態を考えることで、結果的に $3 \times 3 = 9$ のカテゴリーを考えて、様々な分離法を統一的に分類

することに成功した。

外場の勾配により、分子や微粒子はその力に応じた速度で移動する。たとえば、水中の半径 $1 \mu\text{m}$ の微粒子が $1 \mu\text{m/s}$ の速度で移動しているとき、この微粒子に作用している力はわずか 17fN と計算される。すなわち、微粒子の移動速度を測定することは、力を測定することと同じ意味をもつ。ここでいう外場とは、電場、磁場、光、壁、流れ等である。近年、タンパク質、細胞、細菌、環境浮遊微粒子等の分析が必要となっているが従来法では十分対応ができず、新たな方法の開発が望まれている。外場の勾配を μm スケールで設計することにより、微小領域に力を発生させて微粒子の移動速度を制御し、微粒子の分離法や分析法の新たな原理を開発することができる。遠心分離法、キャピラリー電気泳動法、原子間力顕微鏡等は、すでに微小作用力を利用した分析法と言えるが、さらに多くの可能性がある。ここでは、 $\text{fN} \sim \text{pN}$ の外場力を利用したマイクロ分析法の研究例を紹介する。特に指摘したいことは、表1に示すように、外場の力の中で、微粒子のサイズの3乗に比例する誘電力、磁気力、電磁力等は“volume force”と考えることができ、小さな分子・イオンにはほとんど作用しないが、分子集合体や微粒子に対しては有効に作用する。したがって、サイズ分離に適すると言える。また、特に生体分子は会合して微粒子となりやすいことを考えると、力の作用を生体はうまく利用しているの

*大阪大学名誉教授

表 1 外場，微小作用力，分析法の例

外場 (U)	微小作用力 (F = -(dU/dx)) の半径依存性	分析法への利用
重力場	沈降力 $\propto r$	遠心分離法，沈降分析
電場	静電力 $\propto r^0$	電気泳動
レーザー輻射場	散乱力 $\propto r^2$	光泳動
誘電場	誘電力 $\propto r^3$	誘電泳動
磁場	磁気力 $\propto r^3$	磁気泳動
電磁場	電磁力 $\propto r^3$	電磁泳動
壁，界面	分散力 $\propto z^{-4}$ ，反発力 $\propto z^{-10}$ (z: 壁面との距離)	ナノギャップ法，界面吸着
流れ	粘性力 $\propto r$	流れ分析，クロマトグラフィー

ではないかと想像できる。

2. 誘電力 (dielectric force) の利用

H. A. Pohl (1951年)²⁾ により提案された誘電力は，電解質溶液中の電荷をもたない微粒子を泳動させるのに有効である。電気泳動は，直流電圧下で微粒子表面のゼータポテンシャルに比例して泳動する現象であるが，誘電力は交流電場によっても発生する。交流電場により分極した微粒子（または微粒子表面）と電束密度勾配の相互作用により誘電力が発生する。誘電泳動力 F_{DEP} は次式に示すように，

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \epsilon_m \text{Re}[Ke] \nabla |E_{\text{rms}}|^2 \quad (3)$$

媒体の誘電率 ϵ_m ，クラウジウス-モソットー因子の実数部 $\text{Re}[Ke]$ ，電場強度の二乗の勾配 $\nabla |E_{\text{rms}}|^2$ に比例する。誘電力は微粒子と媒体の複素誘電率の差に比例し，その差の符号により正の誘電泳動（電束密度の高い方向に泳動）と負の誘電泳動（電束密度の低い方向に泳動）に分けられる。低い周波数では伝導度が支配的となり，高い周波数では誘電率が支配的となる。平面四重極電極の対向する二対の電極（距離

100 μm ）に，10³~10⁶Hz，10V の交流電場を印加すると，40kbp の DNA は，1 kHz では電極方向に正の誘電泳動を示し，1 MHz では電極中心に向かう負の誘電泳動を示す。さらに，この電極を三次元的に伸ばしたようなキャピラリー型の四重極電極を作製して，流れを与えながら壁面の電極に交流電場を印加すると³⁾，周波数に応じた DNA のトラップ分離やポリスチレン微粒子のサイズ分離（図 1），酵母の生細胞と死細胞の分離等が可能である。

3. 光散乱力 (scattering force) の利用

光が微粒子に及ぼす力が A. Ashkin (1970年) により報告⁴⁾ されて以来，レーザーの進歩と普及という状況もあって，分析法としての利

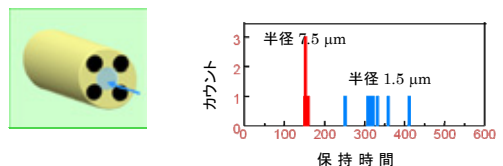


図 1 キャピラリー四重極電極（左）によるポリスチレン微粒子の誘電泳動分離例（右）：キャピラリーの長さ 2.3mm，内径 100 μm ，1 kHz，5 V

用研究も行われている⁵⁾。レーザーの進行方向に作用する散乱力 F_p は次式で表わされる。

$$F_p = \frac{2Pnr^2}{c\omega^2}Q \quad (4)$$

P はレーザー強度、 n は媒体の屈折率、 c は光速、 ω はレーザービームの半径、 Q は泳動効率である。泳動効率は Mie 散乱理論により予測でき、粒子の複素屈折率、半径およびレーザー波長に依存する⁶⁾。レーザー光泳動法により、水中の無色透明な有機液滴を、その屈折率の違いにより泳動分離することが可能であり、また、赤血球のような光を吸収する微粒子は泳動効率が大きいため、光を吸収しない白血球等との分離が可能である。光の吸収という、これまで検出法で利用されてきた現象が、そのまま波長に依存する分離法になるということは興味深い。光を吸収すると光熱変換により温度が上昇する。水中の直径10–20 μm の water-in-oil 型マイクロエマルション液滴は、光を吸収して10 $^\circ\text{C}$ 以上上昇すると相分離が起こり、熱浸透で内部の水が外部の水を取り込みながら膨張する。油層の厚さが100nm 程度になると破裂し、もとの w/o 型の液滴状態に戻る。この膨張収縮を数秒の周期で繰り返しながら泳動する (図2)。周期は含まれる光吸収化合物の濃度に比例する⁷⁾。

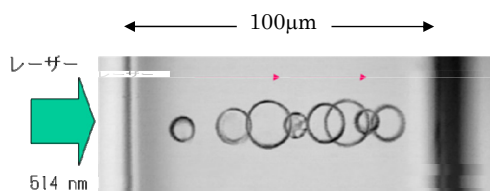


図2 4秒の周期で膨張収縮を繰り返すマイクロエマルション液滴 (514nm のレーザー光を吸収する Co 錯体を油相に含む) の光熱変換相分離光泳動 (レーザーパワー50mW)

4. 磁気力 (magnetic force) の利用

4.1 磁気泳動速度の解析

近年、永久磁石の高性能化 (0.4T Nd-Fe-B 磁石の磁気回路化により3T発生) や高温超電導体を用いる10~15Tの無冷媒型超電導磁石の普及により、材料、情報、プロセス、エネルギー、分離・分析等において磁気科学の新たな発展が期待されている。微粒子に作用する磁気力 F_M は、次式により表わされるように、

$$F_M = \frac{(\chi_p - \chi_m)}{\mu_0} VB \frac{dB}{dx} \quad (5)$$

微粒子と媒体の磁化率の差 ($\chi_p - \chi_m$)、真空の透磁率 μ_0 、微粒子の体積 V 、磁束密度 B およびその勾配 (dB/dx) に依存する。そして、磁束勾配における微粒子は粘性力に釣り合いながら等速で泳動する。球形の微粒子の泳動速度 v_M は、

$$v_M = \frac{2}{9} \frac{(\chi_p - \chi_m)}{\mu_0 \eta} r^2 B \frac{dB}{dx} \quad (6)$$

で表わすことができ、速度と半径の測定から磁化率を決定することができる。一般の細胞や有機微粒子は反磁性であり、磁気的作用力は極めて小さいが、塩化マンガン (II) 等を加えて、媒体を常磁性にすると、反磁性微粒子の泳動速度は増大する。また、磁束密度とその勾配を大きくすると、水 (体積磁化率 -9.01×10^{-6}) 中の2-フルオロトルエン液滴 (体積磁化率 -8.19×10^{-6}) があたかも常磁性液滴のように磁石に向かって泳動する (図3)。

このとき、水相に 10^{-4}M の Dy^{3+} イオンを、有機液滴に 10^{-3}M のラウリン酸を溶解させ、液滴の磁気泳動速度から磁化率を測定すると、小さい液滴ほど磁化率は常磁性側に増大した (図4)⁸⁾。

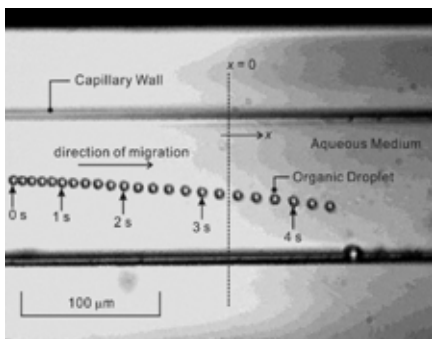


図3 水中の2-フルオロトルエン液滴の磁気泳動挙動。点線のポールピース端で B (dB/dx) が最大 ($47000\text{T}^2/\text{m}$) となるため、この領域で加速している。0.5s 間隔で重ねた画像

これは界面に Dy (III) 錯体が吸着し界面が常磁性となったためと考え、界面磁化率 χ_i を定義して以下の式で結果を解析した。(7)式において、右辺第一項は界面の寄与を表わす。

$$\chi_p = \frac{3}{r} \chi_i + \chi_{2FT}^V = \frac{3}{r} \chi_{Dy}^M C_{int} + \chi_{2FT}^V \quad (7)$$

図4に示すように、液滴全体の磁化率は半径に反比例したため、その勾配から界面磁化率が求められる。さらに Dy (III) のモル磁化率を用

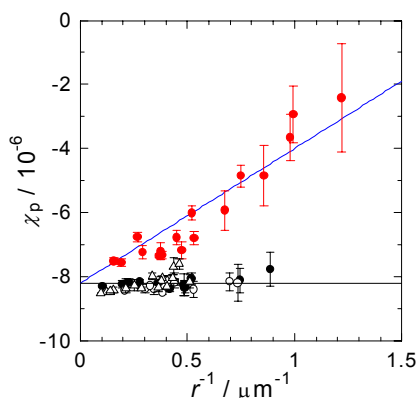
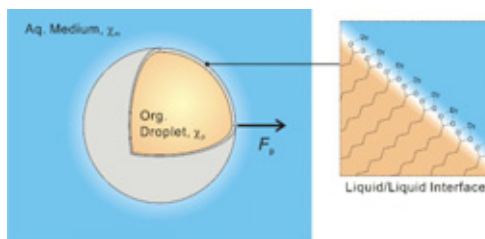


図4 (左) 液滴の磁化率が半径に反比例。赤は Dy (III) とラウリン酸の両者を含む場合、黒は両者を同時には含まない場合。(右) 界面磁化率を生じる Dy (III)–ラウリン酸錯体の界面吸着の概念図



いて $10^{-10}\text{mol}/\text{cm}^2$ レベルの界面濃度が決定できる。磁化率に加成性があることは、分析法を考案する上で有用である。キャピラリー内の液中微粒子を磁気力でトラップし、媒体の流速を連続的に増大させると、サイズと磁化率に応じた分離が可能である。磁気力は熱の発生を伴わないので、細胞の分離等に有用である。

4.2 磁気質量分析法

液体中では、微粒子に働く作用力による泳動速度が定常状態となるまでの時間（緩和時間）は極めて短い（加速度はほぼゼロ）が、大気は粘性率が水の約1/80と低いため、大気中の緩和時間はマイクロ秒以上に長くなる。したがって、磁気泳動速度の時間変化の測定より加速度を決定することができる。緩和時間は質量/半径に比例するため、質量の決定に利用できる。これが磁気質量分析法の原理である。磁場勾配を落下する微粒子の運動は次式で表わされる。

$$(a-g) \frac{m}{r} - \frac{1}{\mu_0} B \frac{dB}{dx} \frac{\chi}{r} V = -6\pi\eta v \quad (8)$$

ここで、 a は加速度、 m は質量、 r は半径、 η

は大気の粘度である。磁気勾配と速度の関係から、 m と χ が評価できる。たとえば、直径 $5\mu\text{m}$ のシリカ微粒子の質量 0.24ng と質量磁化率 $7.6 \times 10^{-9} \text{m}^3 \text{kg}^{-1}$ が同時に決定でき、さらに Dy (III) が付着した微粒子についてはその表面濃度が決定できた。この磁気質量分析法は、イオン化も高真空も不要であり、現在、 10nm レベルのタンパク質の分析が目標とされている (図5)⁹⁾。

4.3 磁気張力による異性化平衡のシフト

分子の幾何異性平衡は、異性体のギブス自由エネルギー差に支配されるが、この分子を引っ張ると異性化平衡はどうなるだろうか？ システアミン分子のチオール端を銀ナノ粒子基板に固定し、アミノ基を磁気微粒子に結合させ、磁気微粒子を磁気力で引っ張りながらシステアミン

の表面増強ラマンスペクトルを測定した。 100pN の磁気張力を作用させると、Trans 型の割合が37%から52%に増大した。これは、Gauche 型よりも Trans 型の分子長が約 1Å 長いので、張力の作用下では Trans 型がより安定となったことを示す。張力の作用により、(張力×距離)の仕事が、相対的に Trans 型の自由エネルギーを低下させたと解釈できる¹⁰⁾。

5. 電磁力 (electromagnetic force) の利用

5.1 電磁気力による化学結合評価

均一な磁場中で、シリカキャピラリー内の微粒子を含む電解質溶液に電流を流すと、媒体へのローレンツ力が微粒子には浮力となって作用するので、壁面に結合した微粒子に対しては張力として作用させることができる。この電磁力 F_{EMP} は次式で表わされ、

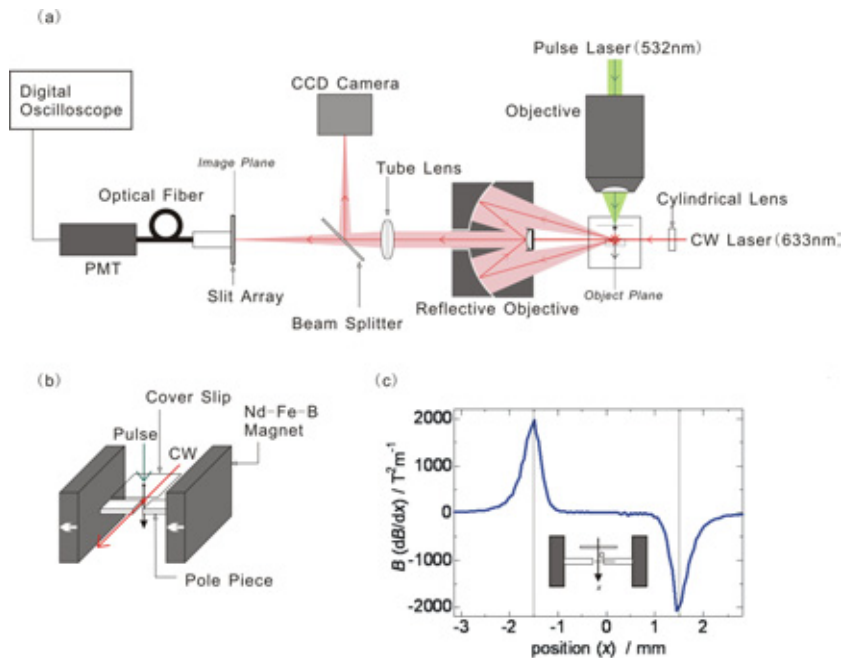


図5 (a) 磁気質量分析装置の概略, (b) カバーガラスに付着した微粒子をパルスレーザーで脱離・落下, (c) 測定領域の B (dB/dx) の分布

$$F_{EMP} = 2BV \frac{i}{S} \left(\frac{\sigma_p - \sigma_t}{2\sigma_t + \sigma_p} \right) \quad (9)$$

電流 i とキャピラリー断面積 S 、および微粒子と媒体の伝導度 σ_p 、 σ_m により制御できる。シリカ壁面にコンカナバリン A (ConA) を化学的に結合させると、これに酵母細胞表面の糖鎖が選択的に結合する。そして、酵母細胞を電磁浮力により引っ張ると、結合の解離頻度と張力との関係が得られる。毎秒 3 pN の割合で増大する力で 20 秒間引っ張ったときの解離頻度の解析から、ConA-酵母間の自発的解離速度定数 $4.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ と、解離に至る臨界伸長距離 0.25 nm が得られた (図 6)¹¹⁾。このときの力は、解離の活性化自由エネルギーを低下させる働きをしており、加熱と同様の効果を示していることは極めて興味深い。熱は方向性を持たないが、力はある方向に作用させることができるので、溶液中で方向選択的解離反応を促進させること

が可能と思われる。

電磁力により、キャピラリー内壁に微粒子を押し付ける力や引き離す力を制御できるので、電解質溶液を流しながら電磁力をのこぎり刃状に反転して作用させると、微粒子の吸脱着クロマト分離ができる。長さ 1 mm のキャピラリーで $10 \mu\text{m}$ と $20 \mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を分離することができる。

5.2 ファラデー効果の利用

ファラデー効果は、磁場と同方向に直線偏光を物質に透過させたとき、直線偏光が回転する現象である。これは、電子へのローレンツ力の作用が原因である。回転角は、光の透過距離と磁束密度に比例する。比例係数であるヴェルデ定数は物質に固有の値であり、混合物においてはその成分のモルヴェルデ定数とモル濃度に比例することから、定量に利用できる。回転方向は、反磁性物質では右回転、常磁性物質では左

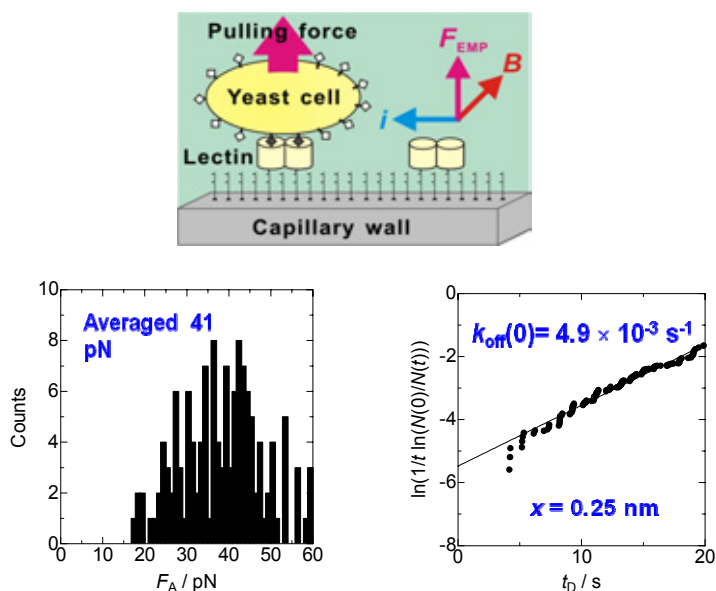


図 6 上図は電磁浮力による酵母細胞に掛かる力の概念図。下左図は 3 pN/s で引っ張ったときの解離数のヒストグラム。下右は解析結果。

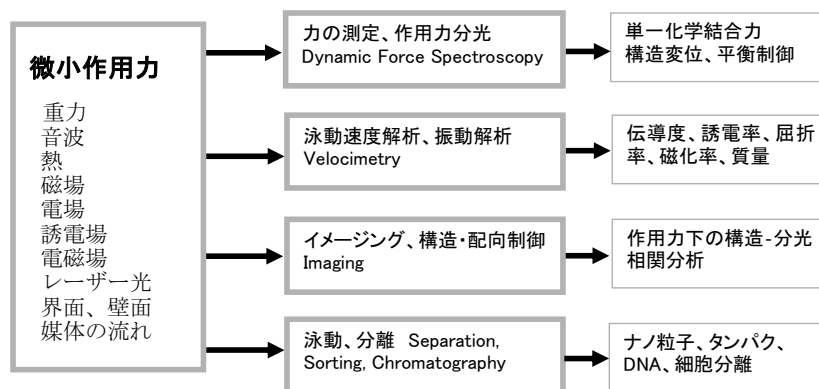


図7 微小作用力を利用する分離・分析化学の展開

回転を示すことから、磁性の判定ができる。常磁性の希土類イオンのモルヴェルデ定数は、 $4f$ 電子数と磁気モーメントに比例することが実験的に明らかにされた¹²⁾。反磁性物質のモルヴェルデ定数もモル磁化率に比例するが、 π 電子を有する物質では特に大きな値を示すことから、 π 電子性の尺度となる。また、光学活性物質の自然旋光性は磁場に無関係でありファラデー効果とは区別できるため、ファラデーイメージングから、磁性、 π 電子性、キラリティーの同時イメージングも可能と期待される¹³⁾。

6. 液液界面の作用

(2)式の第二項は、液液界面の作用力と考えることができ、これは界面吸着力として現れる。両親媒性分子は、水相および有機相に親和性を有する部分を含むことで液液界面に吸着しやすいと考えられているが、単に空孔生成自由エネルギーを考えただけでも、界面でのそれは水相や有機相中よりも小さいと考えられる。分子集合体やタンパク質などの微粒子は、水相および有機相における空孔生成自由エネルギーが正に大きい（仕事が必要）ので、界面に押し出されやすく、したがって吸着しやすいと考えられる。

最近、液液界面においてインスリンのアミロイド線維化が促進されるという実験結果を得たが、この界面アミロイド生成反応においても界面吸着力が作用していると考えられる。

7. まとめ

以上のように、微小作用力は、新たな分離法や検出法を考える上で有用な指針となるだけでなく、化学反応を力の側面から考えるヒントとなるであろう。特に、化学結合への力の作用は触媒のような反応促進効果をもたらすことがわかったので、動物はなぜ動くのかというようなことの化学的意味が今後明らかにされるものと期待される。

謝 辞

ここで紹介した研究は、大阪大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室においてなされたものである。共同研究者にお礼申し上げる。

参考文献

- 1) J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, John Wiley, New York, 1991.
- 2) H. A. Pohl, *J. Appl. Phys.* 1951, 22, 869.

- 3) S. Tsukahara, K. Yamanaka, H. Watarai, *Anal. Chem.*, 2001, *73*, 5661.
- 4) A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* 1970, *24*, 156.
- 5) T. Imasaka, Y. Kawabata, T. Kaneta, Y. Ishizu, *Anal. Chem.* 1995, *67*, 1763.
- 6) A. Hirai, H. Monjushiro, H. Watarai, *Langmuir*, 1996, *12*, 5570.
- 7) M. Tanaka, H. Monjushiro, H. Watarai, *Langmuir*, 2004, *20*, 10791.
- 8) M. Suwa, H. Watarai, H. Watarai, *J. Ion Exchange*, 2009, *21*, 41.
- 9) M. Arase, M. Suwa, H. Watarai, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, *391*, 701.
- 10) T. Goto, H. Watarai, *Langmuir*, 2010, *26*, 4848.
- 11) Y. Iiguni, H. Watarai, *Analyst*, 2010, *135*, 1426.
- 12) K. Miyamoto, K. Isai, M. Suwa, H. Watarai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, *131*, 6328.
- 13) K. Isai, M. Suwa, H. Watarai, *Anal. Sci.* 2009, *25*, 1.