

マイクロ流路内速度, イオン濃度および
ゼータ電位の複合光学計測

2007 年度

一 柳 満 久

目次

目次	[i ~ iii]
記号表	[iv ~ vii]
図表一覧	[viii ~ xvi]
第1章 序論	[1 ~ 11]
1.1 研究の背景および着想点	2
1.2 関連する従来の研究	3
1.2.1 静圧駆動流動場における研究	3
1.2.2 電気浸透流動場における研究	5
1.3 本研究の目的および本論文の構成	7
第2章 基礎事項	[12 ~ 35]
2.1 微小空間の流れ場の特徴	13
2.2 静圧駆動流	13
2.3 界面動電現象	14
2.3.1 電気二重層およびゼータ電位	14
2.3.2 電気泳動	16
2.3.3 一様ゼータ電位分布内の電気浸透流	17
2.3.4 非一様ゼータ電位分布内の電気浸透流	18
2.4 微小流路の材質および作製法	20
2.4.1 流路材質の特性	20
2.4.2 微小流路作製法	21
2.5 静圧駆動流および電気浸透流への影響因子	22
2.5.1 流路材質および溶液の影響	22
2.5.2 リザーバ	23
第3章 本研究で用いた計測法	[36 ~ 71]
3.1 はじめに	37
3.2 既存の計測法	37
3.2.1 顕微鏡および深さ方向分解能	37
3.2.2 マイクロ粒子画像流速計	41
3.2.3 レーザ誘起蛍光法	43

3.3	本研究で開発した複合光学計測法	46
3.3.1	速度およびイオン濃度分布の同時計測法	46
3.3.2	電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法	47
3.3.3	不確かさ解析	52
第4章	速度およびイオン濃度分布の同時計測	[72 ~ 94]
4.1	はじめに	73
4.2	実験条件	73
4.2.1	作動流体	73
4.2.2	マイクロ流路	74
4.3	較正および不確かさ解析	74
4.3.1	速度計測手法	74
4.3.2	pHの二次元分布計測手法	75
4.4	速度およびpHの二次元分布	75
4.5	数値解析による水素イオン濃度勾配の評価	77
4.6	対流および拡散の空間分布	78
4.7	本章のまとめ	79
第5章	電気浸透流速度およびゼータ電位の評価	[95 ~ 123]
5.1	はじめに	96
5.2	実験装置	96
5.2.1	作動流体および蛍光粒子	96
5.2.2	計測装置概要	96
5.2.3	マイクロ流路	97
5.3	粒径による粒子沈降の影響	97
5.4	電気泳動速度および粒子表面ゼータ電位の評価	98
5.5	電気浸透流速度および壁面ゼータ電位の評価	100
5.6	複合型流路内の電気浸透流速度分布	101
5.7	本章のまとめ	102
第6章	表面改質による電気浸透流の流動特性	[124 ~ 145]
6.1	はじめに	125
6.2	実験装置および評価法	125
6.2.1	作動流体および蛍光粒子	125
6.2.2	計測装置概要	125
6.2.3	表面改質法	126
6.2.4	深さ方向流量の評価法	127

6.3	電気泳動速度の評価	127
6.4	表面改質の電気浸透流への影響.....	128
6.5	非一様ゼータ電位分布内の電気浸透流速度.....	129
6.5.1	ステップ型流路	129
6.5.2	平行型流路	129
6.5.3	タイル型流路	130
6.6	本章のまとめ	130
第7章 結論		[146 ~ 151]
7.1	本論文の結論	147
7.2	今後の課題	149
謝 辞		[152]
参考文献		[153 ~ 159]
付録 Appendix		[160 ~ 180]
A.1	顕微鏡の詳細.....	161
A.2	粒子追跡アルゴリズム.....	164
A.3	ブラウン運動による粒子の移動量.....	167
A.4	レーザー誘起蛍光法の特徴および注意点.....	169
A.5	数値解析手法.....	170

記号表

記号	意味	単位
B_i	要素正確度	—
B_m	総括正確度	—
b	密閉セルの半分の深さ	m
C	相関値	—
C_0	相関係数	—
C_n^*	補正された相関係数	—
c	イオン濃度	mol/l
c_f	蛍光色素のイオン濃度	mol/l
D	拡散係数	m ² /s
D_r	リザーバの径	m
d	流路径	m
d_m	分子の大きさ	m
d_p	粒子径	m
d_{pin}	ピンホール径	m
E	電界	V/m
e	CCD 素子の大きさ	m
F	ファラデー定数	C/mol
f_a	吸収スペクトルによる係数	—
g	重力加速度	m/s ²
$H(d_p/\lambda_d)$	Henry 係数	—
$h(t)$	水頭差	m
$h(X, Y)$	参照窓画像	—
$h_0(X, Y)$	探索画像	—
I	像の明るさ	—
I_0	標本面の明るさ	—
I_c	正規化した蛍光発光強度	W/m ²
I_e	励起光強度	W/m ²
I_f	蛍光発光強度	W/m ²
j_c	対流	kg/m ² s
j_d	拡散	kg/m ² s

記号表

k	アスペクト比	—
k_B	ボルツマン定数	J/K
K_0, K_1, K_2	最小二乗近似二次曲線の係数	—
L	流路長さ	m
M	顕微鏡の総合倍率	—
M_0	対物レンズの倍率	—
m, n	窓画像サイズ(m×n)	pixel
n	対物レンズと標本間の媒質の屈折率	—
NA	対物レンズの開口数	—
p	圧力	N/m ²
Pe	ペクレ数	—
pK_a	酸解離定数	—
pH	水素イオン濃度指数	—
Q	流量	m ³ /s
q	電荷量	C
R	気体定数	—
Re	レイノルズ数	—
S_i	要素精密度	—
S_m	総括精密度	—
s_B	ブラウン運動による移動量	m
$S(\Delta X, \Delta Y)$	輝度差の総和の移動量に対する分布	—
T	絶対温度	K
t	時刻	s
t_s	スチューデント値	—
U	流れ方向速度	m/s
U_B	密閉セルの下面速度	m/s
U_{cell}	密閉セル内で計測した速度	m/s
U_{mag}	速度の絶対値	m/s
U_{RSS}	95 % 包括度不確かさ	—
U_T	密閉セルの上面速度	m/s
U^*	無次元化された速度	—
V	流路幅方向速度	m/s
W	深さ方向速度	m/s
X, Y	画像中の位置座標	pixel
X^*, Y^*	サブピクセル精度による粒子の位置	pixel
X_0, Y_0	整数値による粒子の位置	pixel
z^*	無次元化された深さ方向位置	—

記号表

z_v	イオンの価数	—
Δt	画像フレーム間隔	s
$\Delta X, \Delta Y$	粒子群移動量	pixel
$\Delta X_0, \Delta Y_0$	粒子位置修正量	pixel
$\Delta x, \Delta y, \Delta z$	コントロールボリュームの大きさ	m
Δx_C	共焦点顕微鏡の面方向分解能	m
Δx_E	蛍光顕微鏡の面方向分解能	m
Δz_D	離散情報による被写界深度	m
Δz_E	被写界深度	m
Δz_{MD}	計測深度	m
Δz_{OST}	共焦点顕微鏡の深さ方向分解能	m
α	開口角	rad
α_p	粒径パラメータ	—
β	角度 α で入射した光がガラスから大気中へ出射する角度	rad
$\delta x, \delta y, \delta z$	各格子点間の距離	m
ε	誘電率	F/m
ε_B	ブラウン運動による速度計測誤差率	—
ε_m	モル吸光係数	—
ϕ	量子収率	—
γ	補正係数	—
γ_s	壁面からすべり面までの距離	m
λ_{em}	蛍光発光波長	m
λ_{ex}	励起波長	m
λ_d	デバイ長	m
μ	粘性係数	Pa·s
ν	動粘性係数	m ² /s
θ	粒子が対物レンズに張る円錐の頂角の 1/2	rad
ρ	溶液の密度	kg/m ³
ρ_E	電荷密度	C/m ³
ρ_p	粒子の密度	kg/m ³
τ_{EOF}	電気浸透流が定常に達するまでの時間	s
τ_{Meas}	計測システムの時間分解能	s
τ_p	粒子周りの電解質溶液の緩和時間	s
τ_s	粒子の流体への追従性の時定数	s
ψ	電位	V
ζ	ゼータ電位	V
ζ_S	経験式によるゼータ電位	V

添え字	意味
<i>avg</i>	平均
<i>back</i>	バックグラウンド
<i>EOF</i>	電気浸透流
<i>EP</i>	電気泳動
<i>obs</i>	観測される速度
<i>p</i>	粒子
<i>pr</i>	静圧駆動流
<i>ref</i>	参照
<i>w</i>	壁面

図表一覧

List of Tables

Table 2.1	Relationship between pH value and zeta-potential, and relationship between pH value and electroosmotic flow velocity.....	26
Table 2.2	Relationship between ion concentration and zeta-potential, and relationship between ion concentration and electroosmotic flow velocity.....	26
Table 3.1	Axial resolution of epi-fluorescent microscope	54
Table 3.2	Depth of field and measurement depth when the emission wavelength is (a) 515 nm, (b) 560 nm and (c) 645 nm	54
Table 3.3	Optical parameters, axial resolution and optical slice thickness of confocal microscope	55
Table 3.4	Overview of dye behavior (Coppeta and Rogers 1998).....	56
Table 3.5	Properties of fluorescent particles	57
Table 3.6	Properties of fluorescent dye	57
Table 3.7	List of measurement systems and micro-PIV and LIF conditions in chapter 4	58
Table 3.8	Measurement uncertainty in 95 % confidence level of micro-PIV and bulk velocity in chapter 4	59
Table 3.9	Measurement uncertainty in 95 % confidence level of laser induced fluorescence using the single calibration in chapter 4.....	59
Table 3.10	List of measurement systems and micro-PIV conditions in chapters 5 and 6.....	60
Table 3.11	List of measurement uncertainties in 95 % confidence level of electrophoretic velocity and zeta-potential of particles in chapters 5 and 6.....	61
Table 3.12	List of measurement uncertainties in 95 % confidence level of electroosmotic flow velocity and zeta-potential at wall surface in chapters 5 and 6	61
Table 4.1	Measurement uncertainties in 95 % confidence level of micro-PIV using the confocal microscope.....	80
Table 4.2	Measurement uncertainties in 95 % confidence level of laser induced fluorescence using (a) the whole image calibration and (b) the single calibration.....	81

Table 4.3	Experimental conditions.....	82
Table 4.4	Diffusion coefficient of proton (Choi et al. 2001).....	82
Table 5.1	Fluid properties	104
Table 5.2	Property of fluorescent particles.....	104
Table 5.3	Maximum standard deviation of particle velocity in the closed electrokinetic cell	104
Table 5.4	Measurement uncertainty of electrophoretic velocity and zeta-potential of particles at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3.....	105
Table 5.5	Electroosmotic flow velocity with maximum standard deviation classified by pH value of buffer solutions.....	106
Table 5.6	Measurement uncertainty of electroosmotic flow velocity and zeta-potential at wall surface in the silica glass microchannel at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3.....	107
Table 6.1	Property of fluorescent particle	132
Table 6.2	Measurement uncertainty of electrophoretic velocity and zeta-potential of particles	132
Table 6.3	Zeta-potentials of glass, octadecyltrichlorosilane (OTS) and poly(dimethylsiloxane) (PDMS) surfaces.....	133
Table 6.4	Measurement uncertainty of electroosmotic flow velocity and zeta-potential at wall surface.....	133
Table A.1	List of filter block.....	175

List of Figures

Figure 1.1	Originality of the present study for transport and mixing phenomena in microchannel.	9
Figure 1.2	Originality of the present study for electroosmotic flow field in microchannel.	9
Figure 1.3	Contribution of the study of flow characteristics in microchannel to engineering and industry.	10
Figure 1.4	Objectives of the present study.	10
Figure 1.5	Outline of the present study.	11
Figure 2.1	Flow patterns of (a) pressure-driven flow and (b) electrokinetically driven flow obtained by using caged fluorescent dye (Paul et al. 1998).	27
Figure 2.2	(a) Structure of the electric double layer at a wall surface. (b) A plot of the electric potential versus the distance from a wall surface.	28
Figure 2.3	(a) Structure of the electric double layer around a particle. (b) A plot of the electric potential in the electric double layer versus the distance from the wall surface of a particle.	28
Figure 2.4	Electrophoretic motion of an ion in comparison with that of a particle.	29
Figure 2.5	Electroosmotic flow velocity profile in the straight microchannel.	29
Figure 2.6	Electroosmotic flow velocity profiles in the straight microchannel with the surface charge varying perpendicular to the electric field.	30
Figure 2.7	(a) Schematic of a glass microchannel. (b) Top and (c) cross-sectional views of a glass microchannel.	31
Figure 2.8	(a) Top view and (b) cross-sectional view along the A-A' of an I-shaped microchannel.	31
Figure 2.9	Fabrication process using photolithography technique.	32
Figure 2.10	Fabrication process using softlithography technique.	32
Figure 2.11	Schematic of the deprotonation on the surfaces of (a) Glass and (b) poly(dimethylsiloxane) (PDMS).	33
Figure 2.12	Schematic of the straight microchannel with reservoirs. The diameters of the microchannel and reservoirs were d and D_r , respectively. The pressure-driven flow was generated by the difference of $2h(t)$ height of the water surface in both reservoirs.	34
Figure 2.13	Time evolution of the pressure-driven flow velocity affected by varying the diameter size of reservoirs, which was estimated from equation 2.26. The assumptions of the estimation were that the diameter and length of the microchannel was 100 μm and 30 mm, respectively, and the initial	

	difference of the height of the water surface was 20 mm.	34
Figure 2.14	(a) Schematic of the straight microchannel with reservoirs at $t = 0$ sec, in which the height of the water surface was equal. The diameters of the microchannel and reservoirs were d and D_r , respectively. (b) At t sec after applying the electric field, the pressure-driven flow was generated by increasing $2h(t)$ height of the water surface at the cathode due to the electroosmotic flow.	35
Figure 2.15	Time evolution of the pressure-driven flow velocity affected by varying the diameter size of reservoirs, which was estimated from equation 2.29. The pressure-driven flow was generated by increasing the height of the water surface due to the electroosmotic flow. The assumptions of the estimation were that the diameter and length of the microchannel was 100 μm and 30 mm, respectively, and the electroosmotic flow velocity was 100 $\mu\text{m/s}$	35
Figure 3.1	Schematic of the measurement system using (a) epi-fluorescent microscope and (b) inverted epi-fluorescent microscope.	62
Figure 3.2	Schematic concept of (a) epi-fluorescent microscope and (b) confocal microscope.	63
Figure 3.3	Schematic of (a) Galvano mirror scan and (b) Nipkow-disc scan.	63
Figure 3.4	Schematic of Nipkow-disc with micro-lens-array disc.	64
Figure 3.5	(a) Particle tracking velocimetry and (b) particle image velocimetry.	64
Figure 3.6	Sample particle images at (a) $t = t_0$, (b) $t = t_0 + \Delta t$	65
Figure 3.7	(a) Instantaneous velocity-vector field in a microchannel and (b) time-averaged velocity-vector field in a microchannel.	65
Figure 3.8	Ratio between standard deviation and bulk velocity affected by average number of velocity-vectors.	66
Figure 3.9	Process from absorption to fluorescence and phosphorescence.	66
Figure 3.10	Relationship between the chemical structure and fluorescence. (a) Phenolphthalein and (b) malachite green have no fluorescence. (c) Fluorescein and (d) rhodamine B have fluorescence because the chemical structures of fluorescein and rhodamine B have the conjugate double bond.	67
Figure 3.11	Concept of combined optical measurement of velocity and ion concentration in microchannel.	68
Figure 3.12	Schematic of the measurement system using the confocal microscope which is comprised of the epi-fluorescent microscope and the confocal scanner.	68

Figure 3.13	(a) Spectral response of the 3CCD color camera and (b) spectrum of fluorescent particles and dye.	69
Figure 3.14	Concept of combined optical measurement of electroosmotic flow velocity and zeta-potential in microchannel.	70
Figure 3.15	Schematic of electroosmotic flow and electrophoresis in a closed electrokinetic cell.	70
Figure 3.16	Ratio between standard deviation and bulk velocity affected by average number of particle velocities.	71
Figure 4.1	(a) Top view and (b) cross-sectional view along the A-A' of the I-shaped microchannel.	83
Figure 4.2	(a) Top view and (b) cross-sectional view along the line A-A' of the T-shaped microchannel.	83
Figure 4.3	Comparison between the streamwise velocity profile with standard deviation measured by the confocal microscope at (a) $z = 5 \mu\text{m}$ and (b) $25 \mu\text{m}$. The trapezoidal curve shows the velocity profile by the prediction of Hagen-Poiseuille flow in a rectangular channel.	84
Figure 4.4	Schematic of the sample calibration location for the pH calibration.	85
Figure 4.5	Calibration curves depicting the relationship between fluorescent intensity and pH value at five locations shown in Figure 4.4.	86
Figure 4.6	Calibration curves obtained by the correction using a reference value at pH 6.9.	86
Figure 4.7	Calibration curve obtained from normalized fluorescent intensity averaged over measurement area.	87
Figure 4.8	Velocity-vector and pH distribution (a) in the junction area ($x = 0 \mu\text{m}$) and (b) in downstream ($x = 400 \mu\text{m}$) at $z = 15 \mu\text{m}$ for the mixing flow. The arrows show the velocity-vectors and the pH distribution is shown with shading.	88
Figure 4.9	pH profiles at $z = 15 \mu\text{m}$ for the mixing flow comparison between at $x = 200$ and $400 \mu\text{m}$	89
Figure 4.10	Velocity-vector and pH distribution (a) in the junction area ($x = 0 \mu\text{m}$) and (b) in downstream ($x = 400 \mu\text{m}$) at $z = 15 \mu\text{m}$ for the chemical reacting flow. The arrows show the velocity-vectors and the pH distribution is shown with shading.	90
Figure 4.11	pH profiles at $z = 15 \mu\text{m}$ for the chemical reacting flow comparison between at $x = 200$ and $400 \mu\text{m}$	91
Figure 4.12	Effect of the diffusion coefficient on proton concentration profiles obtained from the numerical simulation. The plot and lines indicate the	

	proton concentration profiles at (a) $x = 100 \mu\text{m}$ and $z = 5 \mu\text{m}$ and (b) $x = 100 \mu\text{m}$ and $z = 15 \mu\text{m}$ for the mixing flow whose Reynolds number is 2.95×10^{-2}	92
Figure 4.13	Proton concentration profiles at $x = 100 \mu\text{m}$ obtained from the experiments and the numerical simulation for (a) the mixing flow whose Reynolds number is 2.95×10^{-2} and (b) the chemical reacting flow whose Reynolds number is 2.41×10^{-2}	93
Figure 4.14	Comparison between the magnitude of the diffusion and that of convection at $x = 100 \mu\text{m}$ and $z = 15 \mu\text{m}$ for (a) the mixing flow whose Reynolds number is 2.95×10^{-2} and (b) the chemical reacting flow whose Reynolds number is 2.41×10^{-2}	94
Figure 5.1	Chemical structures of (a) Acetate buffer solution (pH 4.6), (b) Phosphate buffer solution (pH 6.0), (c) HEPES buffer solution (pH 7.1) and (d) Borate/HCl or Borate buffer solution (pH 8.1 or 9.3).	109
Figure 5.2	(a) Top and (b) cross-sectional views of the closed electrokinetic cell.	110
Figure 5.3	(a) Schematic of the silica glass microchannel. (b) Top and (c) cross-sectional views of a silica glass microchannel.	111
Figure 5.4	(a) Top view and (b) cross-sectional view along the A-A' of the I-shaped microchannel.	111
Figure 5.5	Instantaneous images of $0.5 \mu\text{m}$ diameter particles at (a) $z = 1 \mu\text{m}$ (upper side) and (b) $25 \mu\text{m}$ (bottom side) of the closed electrokinetic cell. pH of buffer solution was 9.3. The number densities of particles per unit area were (a) 68.7 and (b) $68.0 [10^{-3}/\mu\text{m}^2]$	112
Figure 5.6	Instantaneous images of $1.0 \mu\text{m}$ diameter particles at (a) $z = 1 \mu\text{m}$ (upper side) and (b) $25 \mu\text{m}$ (bottom side) of the closed electrokinetic cell. pH of buffer solution was 9.3. The number densities of particles per unit area were (a) 8.6 and (b) $25.4 [10^{-3}/\mu\text{m}^2]$	112
Figure 5.7	The number density of $0.5 \mu\text{m}$ and $1.0 \mu\text{m}$ diameter particles per unit area in terms of the depth-wise direction in the closed electrokinetic cell. pH of buffer solution was 9.3.	113
Figure 5.8	Ensemble-averaged velocity-vector field at pH 9.3 in the closed electrokinetic cell on application of 20 V/cm	114
Figure 5.9	Velocity profiles with the standard deviation at each plane in Z direction for pH 9.3 in the closed electrokinetic cell on application of 20 V/cm : near the glass wall ($z = 7 \mu\text{m}$, ●), at the depth-midpoint ($z = 13 \mu\text{m}$, ▲) and near the poly(dimethylsiloxane) (PDMS) wall ($z = 19 \mu\text{m}$, ■).	114
Figure 5.10	Particle velocity profiles with the standard deviation for $0.5 \mu\text{m}$ diameter	

	particles in the closed electrokinetic cell on application of 20 V/cm at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3. The electrophoretic velocity of particles, U_{EP} , is indicated by a dotted line.	115
Figure 5.11	Electrophoretic velocity and zeta-potential at 0.5 μm diameter particle surface with 95% confidence interval versus pH.	116
Figure 5.12	Ensemble-averaged velocity-vector field of electroosmotic flow at pH 9.3 in the silica glass microchannel on application of 20 V/cm.	117
Figure 5.13	Electroosmotic flow velocity profiles with standard deviation at pH 9.3 in the silica glass microchannel on application of 20 V/cm at (a) $z = 1 \mu\text{m}$, (b) $z = 25 \mu\text{m}$ and (c) $z = 49 \mu\text{m}$	117
Figure 5.14	Electroosmotic flow velocity and zeta-potential of the silica glass microchannel with 95% confidence intervals in comparison to the equation proposed by Scales et al. (1992) versus pH.	118
Figure 5.15	Electroosmotic flow velocity profiles in the complex microchannel on application of 20 V/cm at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3.	121
Figure 5.16	Comparison between electroosmotic velocity profile for pH 9.3 at the center in the spanwise direction and that near the side wall in (a) silica glass microchannel and (b) complex microchannel.	122
Figure 5.17	Electroosmotic flow velocity and zeta-potential with 95% confidence intervals of the silica glass in comparison to those of PDMS.	123
Figure 6.1	(a) Top and (b) cross-sectional views along the line A-A' of the I-shaped microchannel. Three surface modification patterns on cover glasses by octadecyltrichlorosilane (OTS). (c) Step, (d) parallel and (e) tile pattern microchannel.	134
Figure 6.2	(a) Chemical structure of glass surface and (b) that of glass surface modified by OTS.	134
Figure 6.3	(a) Top and (b) cross-sectional views of the glass rectangular microchannel. (c) Schematic of the closed electrokinetic cell.	135
Figure 6.4	Particle velocity profile with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the closed electrokinetic cell on an application of 40 V/cm. The electrophoretic velocity of particles, U_{EP} , is indicated by a dotted line.	135
Figure 6.5	Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the glass and the OTS microchannels on an application of 40 V/cm.	136
Figure 6.6	Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms	

	of the depth-wise direction in the step pattern microchannel on an application of 40 V/cm. OTS and glass were captured at $x = -200 \mu\text{m}$ and $x = 200 \mu\text{m}$, respectively.	137
Figure 6.7	Electroosmotic flow velocity profiles at $y = 0 \mu\text{m}$ in terms of stream-wise direction in the step pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $x < 0 \mu\text{m}$ and $x > 0 \mu\text{m}$ indicate OTS and glass surfaces, respectively.	137
Figure 6.8	Depth-wise volumetric flow rate profiles at $y = 0 \mu\text{m}$ in terms of the stream-wise position in the step pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $x < 0 \mu\text{m}$ and $x > 0 \mu\text{m}$ indicate OTS and glass surfaces, respectively.	138
Figure 6.9	Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the span-wise direction in the parallel pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $y < 0 \mu\text{m}$ and $y > 0 \mu\text{m}$ indicate glass and OTS surfaces, respectively.	139
Figure 6.10	Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the parallel pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $y < 0 \mu\text{m}$ and $y > 0 \mu\text{m}$ indicate glass and OTS surfaces, respectively.	139
Figure 6.11	Depth-wise volumetric flow rate profiles in terms of the span-wise position in the parallel pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $y < 0 \mu\text{m}$ and $y > 0 \mu\text{m}$ indicate glass and OTS surfaces, respectively.	140
Figure 6.12	(a) Schematic of surface modification patterning in the measurement area. Electroosmotic flow velocity-vectors and the magnitude of the velocity at (b) $z = 4.4 \mu\text{m}$, (c) $22.0 \mu\text{m}$ and (d) $35.2 \mu\text{m}$ in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The arrows and the contour map show the velocity-vectors and the velocity magnitude, respectively.	142
Figure 6.13	(a) Streamwise and (b) spanwise electroosmotic flow velocity profiles at $y = -50 \mu\text{m}$ and $50 \mu\text{m}$ in terms of the stream-wise direction in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm.	143
Figure 6.14	Depth-wise volumetric flow rate distribution at $z = 4.4 \mu\text{m}$ in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm.	144
Figure 6.15	Depth-wise volumetric flow rate profiles in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm, located at (a) $y = -50 \mu\text{m}$ and (b) $50 \mu\text{m}$	145
Figure 7.1	Summary of the present study for (a) transport and mixing phenomena in microchannel and (b) electroosmotic flow field.	150

Figure 7.2	Contribution of the present study to industrial applications.	151
Figure A.1	Schematic of the objective lens with (a) dry lens and (b) immersion oil lens.	176
Figure A.2	Schematic of the cross-correlation PIV method.	177
Figure A.3	Schematic of hierarchical PIV method.	177
Figure A.4	Schematic of unit of staggered mesh.	178
Figure A.5	Schematic of calculation area in (a) XY plane and (b) YZ plane.	179
Figure A.6	Flow chart of numerical simulation of proton concentration using velocity-vector maps obtained by micro-PIV measurements.	180

第 1 章
序 論

1.1 研究の背景および着想点

流体の輸送や混合現象は、大気や海洋等の自然界に見られるキロメートルオーダーの流れから、化学反応器のような工業装置に見られるメートルオーダーの流れ、さらには本研究にて対象とするマイクロ流体デバイス (Auroux et al. 2002; Reyes et al. 2002, Sinton 2004) のようなマイクロメートルオーダーまでの非常に多岐に渡る。流体が連続体と見なせる場合、こういった様々なスケールの流動現象の基礎方程式は、全て同じ運動量やエネルギーの保存則により記述される。ただし、流れのスケールの違いは輸送や混合の支配的要因に差をもたらし、巨視的な観点では対流と拡散の比で表されるペクレ数 ($Pe = UL/D$: U は代表速度, L は代表長さ, D は拡散係数) で評価される。例えば、メートルオーダー以上の流れではペクレ数が大となるため対流が支配的となるのに対し、マイクロ流路内では拡散が支配的となる (Figure 1.1 参照)。一方、微視的な観点に立ち、空間的な混合輸送の評価 (物質輸送方程式の評価) が可能となれば、混合物質の局所拡散制御や反応の促進や抑制につながる (本研究の着想点)。特に、拡散が支配的なマイクロ流路内では、上述の機能付加がデバイスの性能向上に大きく寄与する。これを実現するには、物質輸送方程式に記述される流体の速度およびイオン濃度を、マイクロ流路内において同時に計測する技術の開発が必要不可欠となる。

また、マイクロ流路内の流れの大きな特徴は、Figure 1.2 に示すように表面積 / 体積比が大となることである (北森ら, 2004)。これにより、メートルオーダー以上の流体では埋もれがちな流路壁面の電気的力 (ゼータ電位に起因する力) が顕在化し、流れの様相を異に呈する。この流れは一般的に電気浸透流と呼ばれており、壁面からわずか数 - 数十 nm に形成される電気二重層に電界を印加するとバルク流体も駆動される流れである。その速度はゼータ電位の大きさに依存し (Probstein 1994)、さらにゼータ電位は流路材質や溶液の性質といった因子に支配されている (Kirby and Hasselbrink 2004a, 2004b)。これら複数の因子は、ナビエ・ストークス方程式においては境界条件または外力項として与えられる。そのため、数値解析によりデバイスの最適設計の足掛かりにしようとはするものの、上述の影響因子に対する情報量の不足により、単純な系での解析に留まり、マイクロ流体デバイスの更なる性能向上に足踏みをさせている。このような現状を招いている主たる要因は、流れ場の特徴的な物理量を把握し、流動特性を評価するための計測法の開発が発展途上にあるため、影響因子の定式化が困難なことが挙げられる。そのため、マイクロ流路内における流れ場の計測法を新たに開発し、影響因子に対する流動特性を詳細に評価することで情報を蓄積していくことが必要不可欠となる。

さらに近年では、流路の複雑化に伴い流路材質が複数に渡ること、ゼータ電位が非一様となる場が形成されている。逆に、流路壁面を物理的に改質することで、ゼータ電位を非一様に分布させる技術も進展してきた (Kutter et al. 1998; Jun et al. 2002; Zhao et al. 2001; Pallandre et al. 2006)。この技術は混合促進や流れの制御に寄与すると期待されているものの、上述のような非一様なゼータ電位場の流れを計測または数値解析した研

究例は少なく発展途上にある。そこで、流れ場の特徴的な物理量（電気浸透流速度、ゼータ電位）の面的な計測が可能となれば、非一様なゼータ電位場の流動特性が実験的に解明され、将来的には物理モデルの再構築やデバイスの最適設計の足掛かりにつながると期待される（本研究の着想点）。

以上に示すように、微小空間に適用可能な速度およびイオン濃度の同時計測法を新たに開発することで、混合場や化学反応場の解明や空間的な物質輸送の評価が実現される。また、電気浸透流速度およびゼータ電位の計測法を開発し、流路材質や溶液の性質といったゼータ電位や流れに影響する因子を系統的に調査研究したり、非一様なゼータ電位場の流動特性を把握したりすることで、流れ場の物理的解明や統一的な関係式の構築の足掛かりとなると期待される。これらにより、デバイスの性能向上、迅速な最適設計、また革新的な機能の発現および統合といった工業的進展につながる（Figure 1.3 参照）。従って、マイクロ流路内の流れ場の計測法の開発および流動特性の知見を得ることは、学術的にも工業的にも意義のあるものである。

1.2 関連する従来の研究

1.2.1 静圧駆動流動場における研究

本節では、微小空間での静圧駆動流動場における研究事例として、現在までに開発された速度計測法、イオン濃度分布計測法、およびそれら計測法を用いて混合流動場を実験的に評価した研究を紹介する。

微小空間における速度およびイオン濃度分布計測に対する条件は、空間分解能が高いこと、そして非挿入かつ非侵襲であるという二点である。これは、通常の計測器（例えば、熱線流速計の極小プローブは数 100 μm である）を微小空間における速度計測に適用しただけでは、十分な空間分解能と計測精度を得るのは難しいためである。また、計測する物理量が非常に小さいため、流れ場を乱す接触型の計測法では正確な計測は困難であり、光学的な非接触型の計測法が求められる。これらの要求を満たす計測法を以下に列挙する。Tieu et al. (1995) および Chen et al. (1997) は、それぞれレーザ・ドップラ流速計 (Laser Doppler Velocimetry: LDV) およびオプティカル・ドップラ・トモグラフィ (Optical Doppler Tomography: ODT) を微小空間の速度計測に適用したが、点計測であるため現象の詳細な観測には残念ながら適していない。Lanzillotto et al. (1996, 1997) は、X線を用いて 500 – 1000 μm の径を有する円管内の速度計測を行った。この手法は、不透明流路内部の流体計測に適するという利点はあるものの、装置が大掛かりとなり扱いにくいという問題を併せ持つ。Brody et al. (1996) は、粒子の軌跡画像から速度を算出する手法により 11 \times 72 μm の流路内の静圧駆動流を計測し、矩形チャンネル内の理論速度分布と比較した。一般的に、この手法は、粒子濃度を高くできないため詳細な速度情報は得られない。しかも、2 時刻間の粒子像を撮像し粒子追跡アルゴリズムを用いて速度を

算出する粒子画像流速計 (Particle Image Velocimetry: PIV) と比して, 約 1/10 の計測精度ということが知られている (Adrian 1991). このように, 微小空間の速度計測手法は複数開発されてはいるものの, 現象解明には不向きであったり, 汎用性や計測精度が低かったりと様々な問題を含んでいた.

Santiago et al. (1998) は, 蛍光顕微鏡を用いて PIV を微小空間に適用させたマイクロ PIV (Micron-resolution Particle Image Velocimetry: Micro-PIV) という手法を開発した. これは, 煩雑さがなく二次元的に流れ場を捉えることができ, 計測精度も高いという特徴を有している. そのため, 現在でも多くの研究者により使用されている. ただし, トレーサ粒子が数百ナノメートルと非常に小さく対象とする流れ場の速度が遅いため, 粒子のブラウン運動が顕著となり速度検出に影響を与えるという問題がある. PIV は, 粒子が流れに追従し画像フレーム間で粒子の相対位置が変化しないという前提で使用されるが, ブラウン運動によりこの前提が満たされず速度検出の際に影響を受ける. ブラウン運動が偏りのないランダムな運動であることから, Santiago et al. (1998) は速度ベクトルの時間平均を行い, Meinhart et al. (1999, 2000b) は PIV の相関演算の際に算出される相関値マップを時間平均することで, 上記の問題点は既に解決されている.

また, Park et al. (2004) は, 蛍光顕微鏡の代わりに, 共焦点顕微鏡を用いてマイクロ PIV を行い, 内径 99 μm および 516 μm の円管内の静圧駆動流の速度分布を計測して理論速度分布と良好な一致を得た. 共焦点顕微鏡とは, CCD カメラ等の検出器の前にピンホールを配置することで, 焦点外の散乱光や蛍光が取り除かれ焦点面のみの画像の取得が可能となる顕微鏡である. Sandison and Webb (1994) の研究によると, 蛍光顕微鏡と比して 10 倍程度の信号対雑音比 (Signal to noise ratio: SN 比) が向上することが明らかとなっており, 深さ方向の分解能の向上につながる. これにより, 深さ方向位置の異なる複数枚の二次元速度分布結果を描画することで, 三次元の速度分布結果が得られる. この特徴を活かし, Park and Kihm (2006) および Lima et al. (2006) は, それぞれ回転するクエット流れ, および血液細胞を含む流れを計測し, 三次元二方向の速度の結果を示した.

一方, イオン濃度分布計測法として代表的なものは, レーザ誘起蛍光法 (Laser induced fluorescence: LIF) である. この手法は, 溶液中に混入した色素の蛍光強度がイオン濃度や温度に依存し変化するという原理によるものであり, 微小空間への適用が容易である. ただし, 全ての色素が様々なイオン濃度を検知可能なわけではなく, 対象となるイオンに応じてその都度色素を選定することが必要となる. Coppeta and Rogers (1998) は, 9 種の蛍光色素の水素イオン濃度および温度依存性に関してまとめており, 本研究でも参考にしているところが多い. LIF を微小空間の混合流動場に適用した研究例を以下に示す. Shinohara et al. (2004, 2005) は, 蛍光顕微鏡を用いて Quinine または Fluorescein により, 幅 100 μm の Y 字型流路内の pH 分布計測を行い, 数値解析と比較した. これより, 塩化水素 (強酸性) および水酸化ナトリウム (強アルカリ性) を混合した中和反応場では, 水素イオンの拡散が促進される可能性を示唆した. Chen et al. (2006) は, T 字型流路内

に注入した pH の異なる二流体の混合過程を、Phenolphthalein の pH 依存性により計測し、数値解析結果と比較した結果、両者は概ね一致した。しかしながら、それと同時に、Chen et al. (2006) は、蛍光顕微鏡は深さ方向に蛍光強度を積算してしまうため、深さ方向に濃度勾配を有する現象の観察には不向きであると述べている。

共焦点顕微鏡を用いて LIF を行った研究としては、Knight et al. (1998) や Ismagilov et al. (2000) が挙げられる。Knight et al. (1998) は、代表幅 $10\ \mu\text{m}$ の十字型流路内において、ナノリットルオーダーの極微量液体の混合過程を計測し、深さ方向に焦点面を変えることで、5-carboxyfluorescein という蛍光色素の三次元分布を示した。Ismagilov et al. (2000) は、幅 $100\ \mu\text{m}$ 深さ $90\ \mu\text{m}$ の Y 字型流路の左端より塩化カルシウム (CaCl_2) を、右端にカルシウムイオンと結合して蛍光発光する Fluo-3 (pentaammonium salt) を注入して実験を行った。静圧駆動流動場は、流路壁面では滑りなし条件となるため、深さ方向の速度分布は放物線形状となる。そのため、速度が小となる流路壁面でのカルシウムイオンの滞在時間は流路中央と比して長くなる。イオンの分子拡散は全領域において均一であるが、滞在時間が深さ方向で異なるため、壁面でのイオンは中央よりも広がり不均一な濃度場が形成される。Ismagilov et al. (2000) は、このような深さ方向に濃度勾配を有する流動場の可視化に成功した。

上記のように、微小空間に適用可能な速度およびイオン濃度計測法は数多く開発されており、その計測法を用いた混合流動場の可視化も行われている。しかしながら、全ての研究は個々の状態量の計測に留まっており、拡散や対流を定量的に評価するために必要な両者の同時計測には至っていない。また、数値解析でも混合の評価は行っていないものの (Kamholz et al. 1999; Kamholz and Yager 2001), 流れ方向の分子拡散の影響を考慮して計算することは困難を極めるため、無視されているのが現状である (Lam et al. 2005)。以上を踏まえて、速度およびイオン濃度の空間分布同時計測法を新たに開発し混合流動場の解明や評価を行うことが必要不可欠である。

1.2.2 電気浸透流動場における研究

本節では、電気浸透流動場における研究事例として、電気浸透流速度計測法、ゼータ電位計測法および表面改質を施した流路内の流れの研究を紹介する。

電気浸透流の速度計測に関する研究は、流体力学分野の計測技術の進展と共に発展してきており、その手法は蛍光色素および蛍光粒子を用いた二手法に大別される。一般的に、蛍光色素を用いた計測は、分子タギング法 (Molecular tagging velocimetry: MTV) として知られており、線状にマーキングした流体の移動距離から速度算出を行う方法である。Tsuda et al. (1993) は、蛍光色素を用いて電気浸透流を可視化し速度計測を行った。しかし、蛍光色素が帯電しているため、計測された速度は、色素の電気泳動による速度と電気浸透流速度の合成となり、電気浸透流速度のみの計測には至らなかった。Paul et al. (1998) は、かご化蛍光色素を用いて電気浸透流速度を計測した。この色素は、紫外光照射により蛍光物質に変化する性質を有している。そのため、任意の位置にマーキン

グすることが可能となり、時系列計測が可能となる点が特徴として挙げられる。Ross et al. (2001b) は、この手法を用いて、アクリル樹脂、PDMS、複合型 (アクリルに PDMS を貼り合わせて作製)、石英ガラスにより作製された 4 種の材質の流路内の電気浸透流速の計測を行った。Sinton and Li (2003) は、同様の手法を発展させ、壁面からわずか 2.5 μm 程度の領域における速度分布の詳細な計測に成功している。蛍光色素やかご化蛍光色素を用いた計測は、流動場の定性的な把握には非常に適しているが、その速度情報は 1 次元 1 方向であり、流れが合流するような混合流動場には適用できない。また、かご化蛍光色素を含む溶液を流路に注入すると、壁面に色素が吸着し、ゼータ電位を大きく変化させてしまうという報告もされており (Ross and Locascio 2003)、電気浸透流速の計測に不向きである。

蛍光粒子を用いた研究としては、Taylor and Yeung (1993) による粒子の軌跡画像から速度算出を試みた例があるが、計測された結果は粒子の電気泳動速度を含んでおり、残念ながら電気浸透流速の定量的計測には至らず、しかも電気浸透流の特徴である栓流とは程遠い結果であった。それに対し、マイクロ PIV 計測を電気浸透流動場に適用した研究 (Devasenathipathy et al. 2002; Kim et al. 2002; MacInnes et al. 2003) では、蛍光色素による結果 (Paul et al. 1998) と定性的な一致が確認された。これらの研究では、粒子の電気泳動速度を求めてマイクロ PIV による粒子速度から差し引くため、計測精度を向上させるためには電気泳動速度の計測精度の向上が重要となる。MacInnes et al. (2003) は、密閉セル内の深さ方向の速度分布を解析することで、電気泳動速度を評価した。この計測法の精度は速度分布の取得方法に依存しており、レーザドップラ流速計により速度計測が行われた。しかしながら、この手法の計測領域は流路全域であるため、得られた速度の分散から速度分布を推定しており計測精度は極めて低い。そのため、深さ方向の速度分布をより精緻に計測する手法の開発が必要不可欠である。

また、マイクロ流体デバイスの最適な設計を目指すべく、流路壁面のゼータ電位を計測することが脚光を浴びており、これまで多くの研究者が報告を行ってきた。Scales et al. (1992) は、界面動電現象の 1 種である流動電位 (圧力勾配を有する流れ場に生じる電位) から、石英ガラスのモル濃度および pH に対するゼータ電位を計測した。この手法は、溶液は 1 種のみ且つ定常状態で流すという前提で計測されるため、空間的に平均されたゼータ電位計測となり、異なる材質で形成された流路や混合流動場のような非一様なゼータ電位が形成される場の詳細な計測には不向きである。Huang et al. (1988) は、濃度が 5 % 異なる 2 種の溶液を流路内に送液し、電界印加により溶液中の電流値が一定になるまでの時間からゼータ電位を計測する電流モニタリング法を開発した。この手法を用いて、Ocvirk et al. (2001) は、ポリジメチルシロキサン (poly(dimethylsiloxane): PDMS) というポリマー材質の pH に対するゼータ電位を計測した。Spehar et al. (2003) は、石英ガラス、PDMS、および PDMS にガラスを貼り合わせた複合流路の 3 種において、それぞれモル濃度および pH への影響を計測した。Sze et al. (2003) は、ガラス、および PDMS にガラスを貼り合わせた流路において、2 種の電解質水溶液に対しそれぞれ 2 種のモル

濃度を用意し、計4種の溶液を計測した。この手法は、非常に容易な方法であり、多くの研究者が使用しているが、空間的に平均されたゼータ電位のみでの計測となるため、上述の流動電位による計測と同様の理由で不向きである。以上より、空間的にゼータ電位分布が計測できる手法の開発が必要不可欠である。

上記に示す計測法は、更なる改良や開発が必要なものもあるにしろ、これまで観測することが困難であった電気浸透流の流れの可視化や特徴的な物理量把握の一役を担ってきた。そのような中で、微細加工技術の更なる進歩は留まるところを知らず、流路壁面を物理的に改質することにより、ゼータ電位を変化させる技術が進展してきた (Kutter et al. 1998; Jun et al. 2002; Zhao et al. 2001; Pallandre et al. 2006)。この技術は、混合促進や流れの制御に寄与すると期待されているが、内部の流れを計測または数値解析した研究例は少なく発展途上にある。Fu et al. (2003) および Erickson and Li (2003) は、非一様なゼータ電位分布場内の電気浸透流の数値解析を行い、三次元的な流れが生じることを示した。実験的研究としては、Herr et al. (2000) がかご化蛍光色素 (Paul et al. 1998) を用いて流れ方向にゼータ電位が変化する流動場の速度計測を行い、Krishnamoorthy et al. (2006) は電流モニタリング法 (Huang et al. 1988) により流量を評価した。両手法は、空間的に平均した計測結果となるため、数値解析により報告されたような三次元流れを計測することはできなかった。その一方で、Stroock et al. (2000) および Stroock and Whitesides (2003) は、流れ方向または流路幅方向にゼータ電位が変化する場において、粒子の軌跡画像 (Brody et al. 1996) より再循環流れを有する電気浸透流の可視化に成功した。しかしながら、定量的な速度分布の評価はされておらず、残念ながら流れ場の詳細な解析には至らなかった。

以上を総括すると、電気浸透流速度の計測には空間分解能の観点からマイクロ PIV を用いた方法が有効である。ただし、計測精度向上のために、深さ方向分解能を向上させた新たな電気泳動速度の計測法の開発が必要である。また、ゼータ電位は、従来では困難であった空間分布の計測が可能な手法を提案する必要がある。さらに、新たに開発する計測法を表面改質した流路内の流れ場に適用し、三次元流れの定量的な評価を行うことが重要な課題である。

1.3 本研究の目的および本論文の構成

本研究の目的をまとめたものを Figure 1.4 に示す。対象とする流れ場は、マイクロ流路内の混合場や化学反応場および電気浸透流動場である。混合場や化学反応場において、これまで速度やイオン濃度分布の個々の状態量を評価することは可能となってきた。しかしながら、全ての研究は個々の状態量の計測に留まっており、物質輸送 (対流および拡散) を定量的に評価するために必要な両者の同時計測には至っていない。そのため、マイクロ PIV と LIF を組み合わせて速度およびイオン濃度分布の同時計測法を確立し、

空間的な対流および拡散を評価することを目的とする。一方、電気浸透流動場においては、電気浸透流速およびゼータ電位を空間的に計測する手法を開発し、複数の流路材質や表面改質による非一様なゼータ電位場の流動特性を解明することを目的とする。以上を総括して、微小空間内の流体輸送および混合現象に対する流動特性把握の基盤技術を確立することを最終的な研究目的とする。

以下に本論文の構成を、Figure 1.5 に本研究の概要を示す。第1章では、本研究の背景、従来の研究にて開発された計測法の概要、および本研究の目的を示した。

第2章では、マイクロ流路内の代表的な流れである静圧駆動流および界面動電現象に関する基礎方程式を示す。また、マイクロ流体デバイスで用いられる流路材質と作製法を記し、流路材質や溶液の性質の電気浸透流への影響に関する基礎的な知見を述べる。

第3章では、本研究で開発する光学計測法について記す。速度およびイオン濃度分布の同時計測法を確立するために、マイクロ PIV に LIF を組み入れた新たな計測システムを構築する。さらに、電気浸透流速および壁面ゼータ電位の精緻な計測を達成するために、マイクロ PIV を用いた新たな計測法を開発する。不確かさ解析を行うことで、開発した計測法の精度検証を行う。

第4章では、第3章にて開発した速度およびイオン濃度分布同時計測法を用いて、水素イオンの単純な混合場と、溶液の緩衝作用による水素イオンの生成や消滅を伴う化学反応場を評価する。これら2種の流れ場における混合過程の様相から、化学反応による濃度勾配形成への影響を検討する。さらに、数値解析と比較することで計測法の信頼性を示し、最後に対流と拡散の空間分布を明らかにする。

第5章では、第3章にて開発した電気浸透流速および壁面ゼータ電位計測法により、溶液の性質および流路材質の関連性を検証する。一様な材質（石英ガラス）で形成された流路において、pH の異なる5種の溶液の電気浸透流速およびゼータ電位をそれぞれ評価し、経験式と比較することで計測法の信頼性を立証する。さらに、複数の材質（石英ガラスおよびポリジメチルシロキサン: PDMS）を組み合わせた流路において電気浸透流速を計測し、一様な材質での結果と比較することで、本手法の特徴である二次元計測の優位性を実証する。

第6章では、表面改質パターンニングを施した流路内の電気浸透流速およびゼータ電位を評価する。流路は、PDMS にボロシリケートカバーガラスを貼り付けることで作製する。表面修飾剤はオクタデシルトリクロロシラン (octadecyltrichlorosilane: OTS) を採用し、ガラス上に3種の表面改質パターンニングを施す。それぞれの流路における電気浸透流速を計測し、連続の式を用いることで深さ方向の流量を評価する。これにより、表面改質パターンニングによりゼータ電位が非一様となる流れ場の流動特性の基礎的な知見を把握する。

第7章では、これまでの各章で得られた知見を総括し、新たに開発した複合光学計測法の信頼性および従来の計測法よりも優れた点を示して本論文の結論とした。

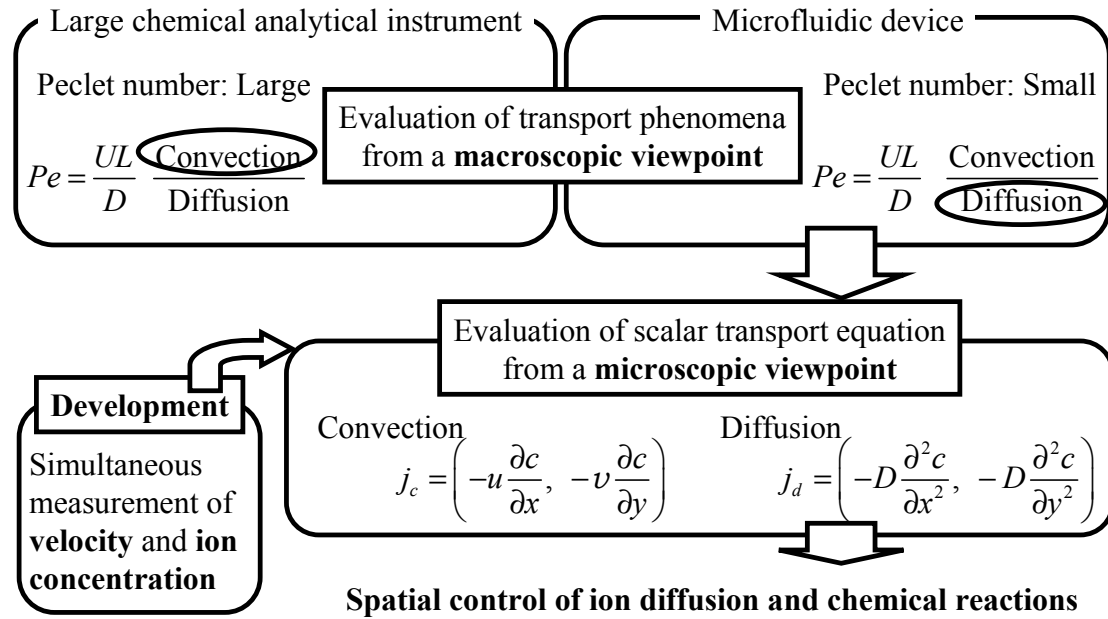


Figure 1.1. Originality of the present study for transport and mixing phenomena in microchannel.

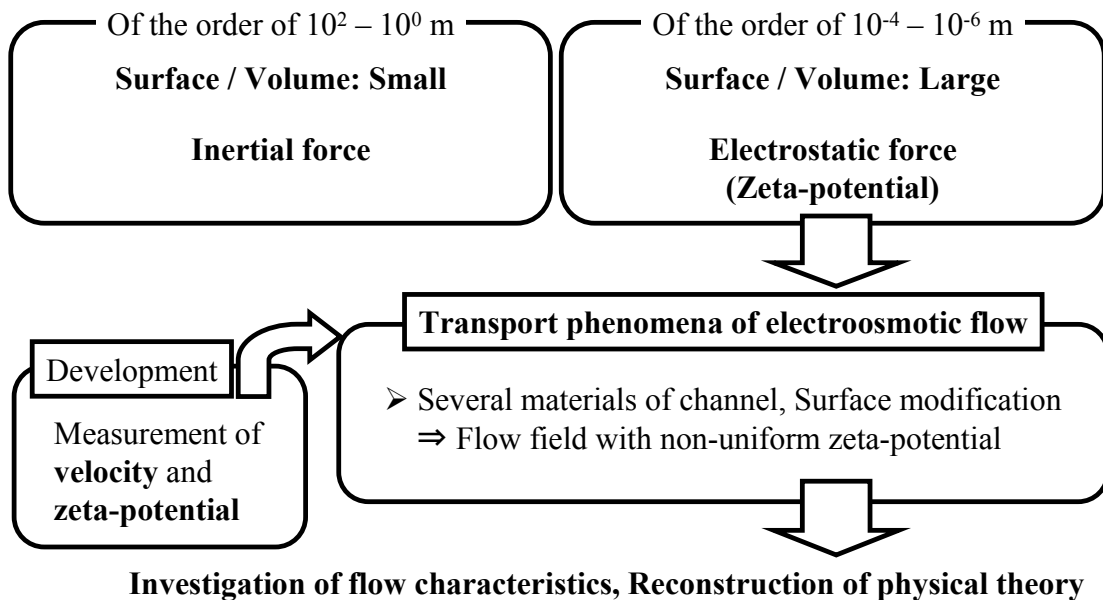


Figure 1.2. Originality of the present study for electroosmotic flow field in microchannel.

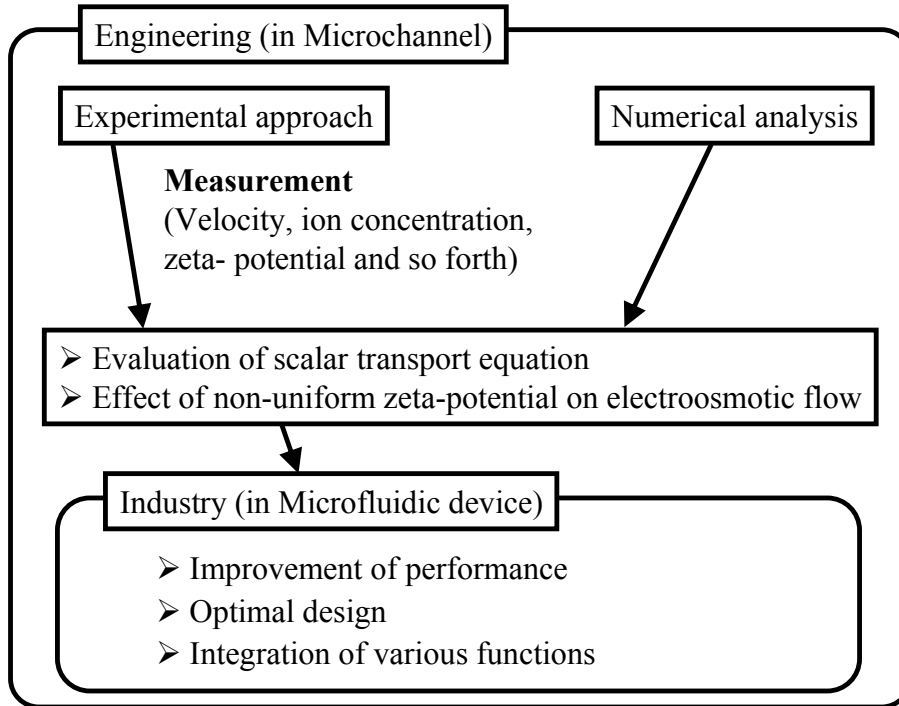


Figure 1.3. Contribution of the study of flow characteristics in microchannel to engineering and industry.

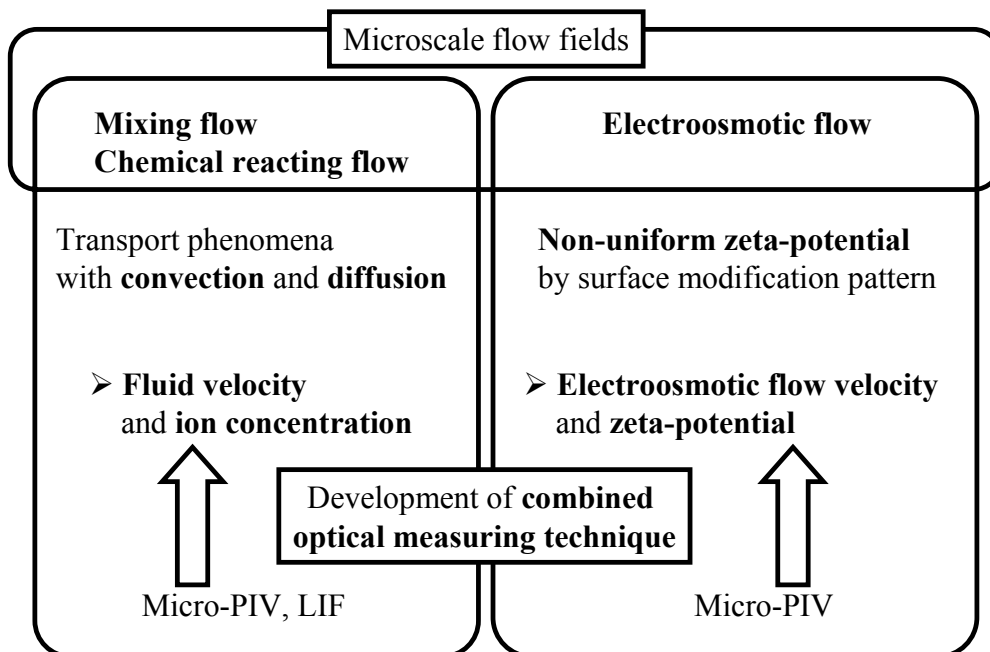


Figure 1.4. Objectives of the present study.

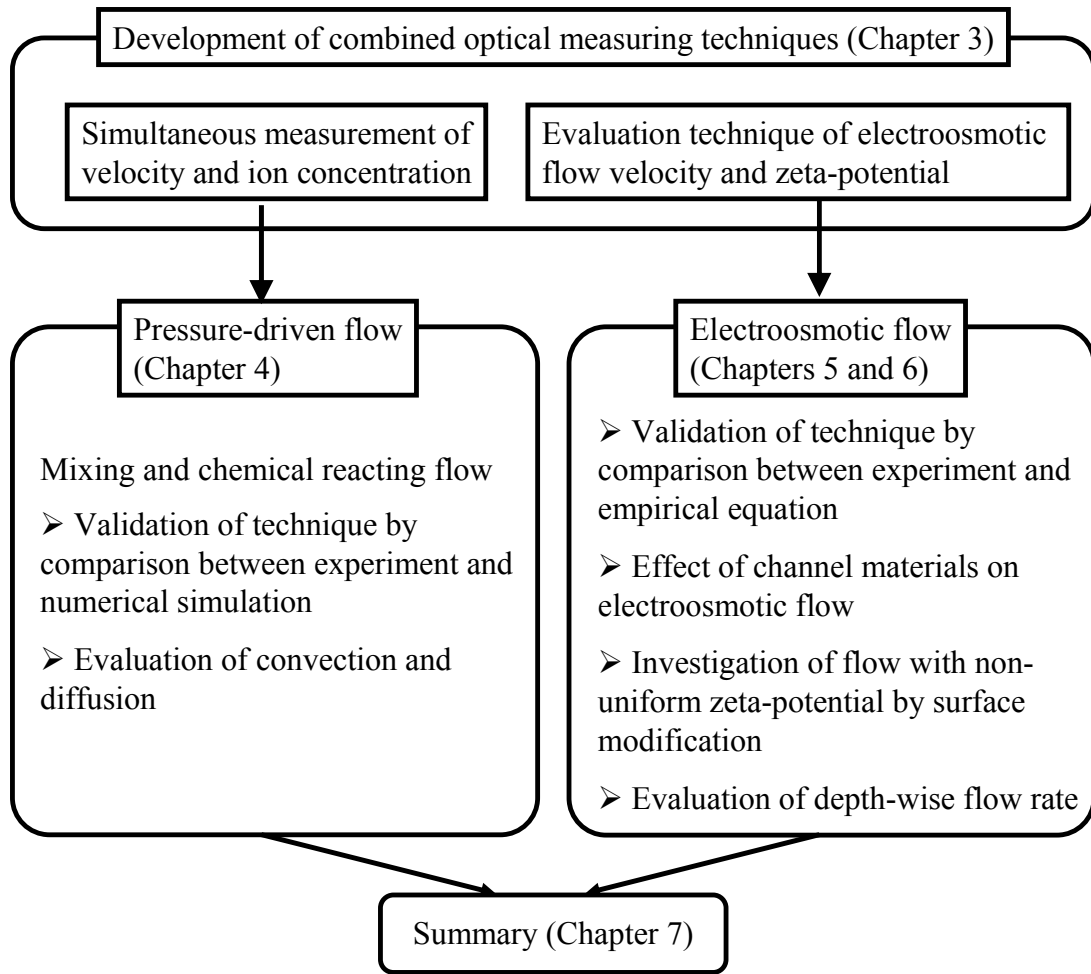


Figure 1.5. Outline of the present study.

第 2 章 基礎事項

2.1 微小空間の流れ場の特徴

連続体における流体の運動は、質量、運動量およびエネルギーの保存則により記述される。微小空間内においても、流体が連続体であると見なせる場合、基礎方程式はマクロスケールのそれと同じとなる。ただし、流体の運動方程式であるナビエ・ストークス方程式では、慣性項よりも粘性項が支配的な流れとなる。そのため、流動構造の把握は容易であると考えられるが、微小空間は表面積 / 体積比 (Surface volume ratio: S/V 比) が大となるため、バルクの流体では埋もれてしまう流路壁面および流体間の相互作用の影響が顕在化する。この力はナビエ・ストークス方程式の外力項として与えられ、最終的には界面動電現象という特有の流れが生じる。この流れは、流路の材質や溶液の性質といったバルク流体では軽視されがちな因子がその流れ場の特性を支配する。以上のことを踏まえて、本章では微小空間の代表的な流れである静圧駆動流および界面動電現象に関する基礎方程式を記載した。そして、マイクロ流体デバイスで頻繁に使用される材質とその作製法、および流れに影響を及ぼす因子に関する基礎的な知見を述べた。

2.2 静圧駆動流

流れ方向への圧力勾配によって駆動される流れを静圧駆動流という。マイクロ流路内では、注入口と出口の水頭差や機械式ポンプによって圧力勾配を発生させることにより流体は駆動される。静圧駆動流はそのメカニズムの簡易さからマイクロ流路内の流体の駆動方法として一般的に用いられている。マイクロ流路内の静圧駆動流のレイノルズ数 Re は 10^{-2} 程度であるため層流となる。非圧縮性流体の支配方程式は、以下に示す連続の式(2.1) およびナビエ・ストークス方程式(2.2) である。

$$\frac{\partial U_i}{\partial x_i} = 0 \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial U_i}{\partial t} + \frac{\partial U_i U_j}{\partial x_j} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x_i} + \nu \frac{\partial^2 U_i}{\partial x_j \partial x_j} + f_i \quad (2.2)$$

なお、 U は流れ方向速度、 ρ は密度、 p は圧力、 ν は動粘性係数、 f は外力項である。ナビエ・ストークス方程式は非線形方程式であるが、定常の静圧駆動流の場合、流路断面形状が単純であれば境界条件から解く事が可能である。なお、円管内の速度分布 $U_{pr}(r)$ は次式で表される。

$$U_{pr}(r) = -\frac{d^2}{4\mu} \frac{dp}{dx} \left(1 - \frac{r^2}{d^2}\right) \quad (2.3)$$

ここで、 μ は粘性係数、 d は流路径である。これより、円管内の速度分布は、粘性の影響により放物線状となることがわかる。一方、流路の断面形状が矩形の場合は、式(2.4)で表される。

$$U_{pr}(y, z) = \frac{16d^2}{\mu\pi^3} \left(-\frac{dp}{dx}\right) \sum_{i=1,3,5,\dots}^{\infty} (-1)^{(i-1)/2} \left[1 - \frac{\cosh(i\pi z/2d)}{\cosh(i\pi b/2d)}\right] \times \frac{\cos(i\pi y/2d)}{i^3} \quad (2.4)$$

これより、流路中央部において深さ方向 (Z 方向) は放物線状の速度分布、流路幅方向 (Y 方向) は台形状の速度分布となる。

2.3 界面動電現象

界面動電現象 (Electrokinetic phenomena) とは、固相と液相が接する界面に電界を印加して生じる移動現象のことであり、電気浸透流 (Electroosmotic flow) および電気泳動 (Electrophoresis) が含まれる (Probstein 1994)。電気浸透流の特徴は、速度分布が栓流となること (Figure 2.1)、また電界強度を変化させることで流速や流量を容易に制御できるという二点が挙げられる。一方、電気泳動とは、電界印加により溶液内の物質や分子が駆動される現象であり、キャピラリー電気泳動に代表される物質分析の分野で頻繁に用いられる。本節では、界面動電現象の基盤となる電気二重層およびゼータ電位に関して述べ、電気浸透流および電気泳動の理論的な解説を行う。

2.3.1 電気二重層およびゼータ電位

固相と液相が接すると、表面極性基の解離やイオンの吸着により、固相表面は正極または負極に帯電する。この界面電荷を中和するために、液相内に過剰に存在する逆の符号のイオンが固相壁面近傍に集まり、電気二重層が形成される。Figure 2.2 (a) にマイクロ流路壁面に形成される電気二重層の構造の模式図、Figure 2.3 (a) に粒子周りの電気二重層の構造模式図を示す。マイクロ流路の材質には、一般的に石英ガラス (fused silica) やホウケイ酸ガラス (borosilicate glass)、ポリジメチルシロキサン (poly(dimethylsiloxane): PDMS) などのポリマー材質が用いられる。これらの材質の場合シラノール基 (SiOH) の脱プロトン反応により流路壁面は負極に帯電し電気二重層が形成される (Hunter 1981; Scales et al. 1992; Probstein 1994)。

電気二重層の構造に関しては、古くから数多く研究が行われているが、イオンの層を固定層 (Stern layer) および拡散層 (Diffuse layer) に分ける Gouy-Chapman Stern モデルが最も一般的である。固定層では、固相表面電荷と逆符号のイオンが表面に引き寄せられ分子間力により吸着した動かないイオン層である。一方、拡散層内では、逆符号のイオンが表面電荷による引力とイオンの熱運動による力により拡散して存在する。拡散層と固定層の境界は、すべり面 (shear plane: $y = \gamma_s$) と呼ばれ、ここでの電位をゼータ電位 ζ と呼び、これまでの研究より固層表面から数 Å の位置に存在すると考えられている (Scales et al. 1992; Revil and Pezard 1999)。以上より、電気二重層内に電位分布が形成され、理論的には Figures 2.2 (b) および 2.3 (b) のようになると考えられている。ここで、負極に帯電した平板上にイオンが分布した場合の理論的な電位分布を、ポアソン・ボルツマンの式より導出し次式に示す。なお、固層近傍でのイオン分布は偏在しており (電荷密度は 0 ではない)、ボルツマン分布と仮定する。

$$\frac{d^2\psi}{dy^2} = -\frac{\rho_E}{\epsilon} = \frac{2z_v F c}{\epsilon} \sinh\left(\frac{kF\psi}{RT}\right), \text{ where } \rho_E \neq 0 \quad (2.5)$$

ここで、 ψ は電位、 ρ_E は電荷密度、 ϵ は誘電率、 z_v はイオンの価数、 F はファラデー定数、 c は全体のモル濃度、 R は気体定数、 T は絶対温度である。式(2.5) はポアソン・ボルツマンの式と呼ばれており、これを解くことで固層表面からの電位分布を算出できるが困難を極める。そこで、式(2.5) を簡略化するため、デバイ・ヒュッケルの近似を用いる。

$$\sinh\left(\frac{z_v F \psi}{RT}\right) \approx \frac{z_v F \psi}{RT}, \text{ when } \frac{z_v F \psi}{RT} \ll 1 \quad (2.6)$$

これより、式(2.5) は以下のように表される。

$$\frac{d^2\psi}{dy^2} = \frac{2z_v^2 F^2 c}{\epsilon RT} \psi = \frac{\psi}{\lambda_d^2} \quad (2.7)$$

式(2.7) を $y = \gamma_s$ において $\psi = \zeta$ 、また $y \rightarrow \infty$ において $\psi = 0$ および $d\psi/dy = 0$ として積分すると、滑り面からの電位分布は式(2.8) として与えられる。

$$\psi = \zeta \exp\left(-\frac{y}{\lambda_d}\right) \quad (2.8)$$

ここで、 λ_d はデバイ長と呼ばれ式(2.9) で定義される。

$$\lambda_d = \left(\frac{\epsilon RT}{2z_v^2 F^2 c} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.9)$$

式(2.8) より, デバイ長はすべり面からゼータ電位の $1/e$ の電位となる距離を表しており, 電気二重層の厚さを示す指標として用いられる. なお, 本研究における実験条件でのデバイ長は, 5 nm 程度である.

また, 拡散層と固定層の境界の電位であるゼータ電位 ζ は, Figure 2.3 に示す微粒子やコロイドの周りでは分散安定性の指標として用いられる. これは, ゼータ電位の絶対値が増加すると粒子間の反発力が強くなり粒子の安定性が高くなるが, ゼータ電位がゼロに近づくと粒子は凝集しやすくなるためである. 一方, マイクロ流路内の壁面ゼータ電位の大きさは, 壁面の帯電量を示しており, 以下に列挙する2点により大きく変化する. なお, 以下の2点に対するゼータ電位および電気浸透流への影響は 2.5.1 節にて解説する.

- 流路の材質 (ガラスやポリマー材質等)
- 溶液の性質 (水素イオン濃度 (pH) およびモル濃度)

電気浸透流速度はゼータ電位の大きさに依存し変化するため, ゼータ電位が変化する流動場では, 内部の流動構造に変化をもたらす. ここで, Scales et al. (1992) が提案した石英ガラスのゼータ電位 ζ_s を算出する式を示す.

$$\zeta_s = (-0.058 \log_{10}(pH) + 0.026) \times (-\log_{10}(c))^{1.02} \quad (2.10)$$

式(2.10) は, 電気二重層のモデル (Gouy-Chapman-Stern-Grahame モデル) を用いた電気二重層内のイオン間の平衡反応および Boltzmann 分布則より導出される理論式に, 実験値を用いて非線形近似することにより導出された, pH とモル濃度 c を変数にもつ式である.

2.3.2 電気泳動

電気泳動とは, 溶液内で帯電して存在する微粒子や分子が電気力線に沿って一方の極に向かって移動する現象である. 原理的には電気浸透と同様で, 電気浸透の場合は, 固相が固定されているため液相が移動したが, 電気泳動では液相が静止し, 溶液内で移動可能な微粒子や分子が移動する. 電気泳動による移動は, Figure 2.4 に示す様に微粒子や分子の大きさとデバイ長の比により 2 種に大別される.

分子のように、デバイ長に対してサイズが小さな場合、電気泳動による移動現象は溶液内で帯電している分子に働く静電気力と粘性抵抗との釣り合いとして表現でき、電気泳動速度 U_{EP} は式(2.11) となる。

$$U_{EP} = \frac{qE}{3\pi\mu d_m} \quad (2.11)$$

ここで、 q は分子の電荷量、 E は電界強度、 μ は粘性係数、 d_m は分子の大きさである。一方、粒子のようにデバイ長に対して径が大きな場合は、帯電した粒子の表面電荷に働く静電気力、電気二重層内に存在するイオンに働く静電気力、粒子および電気二重層内のイオンに働く粘性抵抗が考慮され、電気泳動速度は式(2.12) として表される。

$$U_{EP} = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon \zeta_p E}{\mu} H\left(\frac{d_p}{\lambda_d}\right) \quad (2.12)$$

ここで、 ε は誘電率、 ζ_p は粒子の周りに形成されるゼータ電位である。また、 $H(d_p/\lambda_d)$ は Henry 係数であり、粒子径 d_p をデバイ長で除した値の関数である。ただし、 $d_p/\lambda_d > 10^2$ の場合、Henry 係数は 1.5 と見積もられ、電気泳動速度は式(2.13) のように表される。本研究の実験条件では $d_p/\lambda_d \approx 10^2$ であるため、電気泳動速度の理論式は式(2.13) を用いる。

$$U_{EP} = \frac{\varepsilon \zeta_p E}{\mu} \quad (2.13)$$

2.3.3 一様ゼータ電位分布内の電気浸透流

マイクロ流路壁面および液相の界面に形成される電気二重層に電界を印加すると、電気二重層内のイオンが移動し巨視的には溶液の移動が起こる。この現象を電気浸透流と呼ぶ。本節では理論的な電気浸透流速度をナビエ・ストークス方程式およびポアソン方程式より導出する。以下に流れ場の仮定を列挙する。

- 定常非圧縮性流体
- 圧力項無視 (マイクロ流路の注入口と出口の水頭差が等しい)
- 慣性項無視 (Re 数が 10^{-1} 以下)
- 外力項として電氣的な力を加える

以上より、式(2.2) に示されるナビエ・ストークス方程式は、次式のように粘性と電氣的な力の釣り合いとして与えられる。

$$\mu \nabla^2 U = -\rho_E E \quad (2.14)$$

ここで、 U は流れ方向速度、 μ は粘性係数、 ρ_E は電荷密度、 E は電界強度である。一般的に微小流路で用いられる材質の壁面は負極に帯電するため、ここでは固相が負極に帯電している場合を考える。 x 方向を Figure 2.5 のように定義すると、流れ方向速度 U は y のみの関数となる。これより式(2.14) は、式(2.15) に示すポアソン方程式を用いて式(2.16) として展開される。

$$\frac{d^2 \psi}{dy^2} = -\frac{\rho_E}{\varepsilon} \quad (2.15)$$

$$\mu \frac{\partial^2 U}{\partial y^2} = -\rho_E E = \varepsilon \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} E \quad (2.16)$$

ここで、 ψ は電位、 ε は誘電率である。 $y \rightarrow \infty$ において $\partial U / \partial y = \partial \psi / \partial y = 0$ 、また $U = 0$ の時 $\psi = \zeta_w$ として式(2.16) を積分すると、次式の電気浸透流速度 U_{EOF} が得られる。

$$U_{EOF} = -\frac{\varepsilon \zeta_w E}{\mu} \left(1 - \frac{\psi(y)}{\zeta_w} \right) \quad (2.17)$$

なお、 ζ_w は壁面のゼータ電位である。式(2.17) より、電気浸透流速度分布は壁面では滑りなしの条件から流速が 0 となり、電気二重層内に非常に急な速度勾配を持つことがわかる。ただし、流路径 d とデバイ長の関係において $\lambda_d / d < 10^{-4}$ の場合、壁面近傍の速度勾配は無視できるため、式(2.18) のように一様な速度分布として扱うことができ、Helmholtz-Smoluchowski の式とよばれる。本研究の実験条件では $\lambda_d / d \approx 10^{-5}$ であるため、電気浸透流速度の理論式は式(2.18) を用いる。

$$U_{EOF} = -\frac{\varepsilon \zeta_w E}{\mu} \quad (2.18)$$

2.3.4 非一様ゼータ電位分布内の電気浸透流

ゼータ電位が非一様な流動場における電気浸透流速度を導出する (Herr et al. 2000)。モデルの単純化のため、Figure 2.6 に示すような流れ方向にステップ上にゼータ電位が変化 ($\zeta_1 \rightarrow \zeta_2$) した円管内流れとし、流動場は発達した非圧縮性流体の定常流れを仮定する。なお、ゼータ電位が不連続に変化する領域 ($x=0$) での速度分布を理論的に解析するのは困難であるので、ここでは不連続の領域から十分離れた領域 ($x \ll 0, x \gg 0$)

での速度分布を導出する。 $\lambda_d/d < 10^{-4}$ の場合における領域1および2の速度分布は、式(2.3)および式(2.18)より

$$U_i(r) = -\frac{\varepsilon\zeta_i E}{\mu} - \frac{d^2}{4\mu} \left(\frac{dp}{dx} \right)_i \left(1 - \frac{r^2}{d^2} \right) \quad (2.19)$$

となる。なお、添え字 i は Figure 2.6 の領域1および2のことを示す。ここで、円管の径方向に積分し各々の領域の流量 Q を求めると次式となる。

$$Q_i = -\frac{\varepsilon\zeta_i E}{\mu} \pi d^2 - \frac{\pi d^4}{8\mu} \left(\frac{dp}{dx} \right)_i \quad (2.20)$$

非圧縮性流体を仮定しているため、領域1および2における流量は等しくなる。また、この系の両端の圧力は大気圧とすると、各々の領域の圧力勾配は次式として与えられる。

$$\left(\frac{dp}{dx} \right)_i = \frac{8\varepsilon E}{d^2} (\zeta_{avg} - \zeta_i), \quad \zeta_{avg} = \frac{1}{L} \sum L_i \zeta_i \quad (2.21)$$

ここで、 ζ_{avg} は系全体の平均ゼータ電位、 L_i は i の領域での管の長さ、 L は管長を示す。これより、式(2.19)に式(2.21)を代入することにより、円管内でステップ上にゼータ電位が変化した際の速度分布が以下のように導出される。

$$U_i(r) = -\frac{\varepsilon E}{\mu} \left[\zeta_i + 2(\zeta_{avg} - \zeta_i) \left(1 - \left(\frac{r}{d} \right)^2 \right) \right] \quad (2.22)$$

Figure 2.6 に示される領域1および2での速度分布は、記述されたゼータ電位分布を基に式(2.22)より導出した結果である。領域1ではゼータ電位が0Vであるため、放物線形状の速度分布を示している。一方、領域2ではゼータ電位が発生しているため、壁側の速度が増大するが、領域1での流量を保つために中央付近では速度が小となることがわかる。また、式(2.24)において、ゼータ電位が一定である場合 ($\zeta_i = \zeta_{avg} = \zeta_w$)、式(2.18)の Helmholtz-Smoluchowski の式と同じになる。

2.4 微小流路の材質および作製法

これまで微小流路 (マイクロ流路) 内の流体駆動力に関して解説してきたが、本節では実際に使用される微小流路の材質の特性および作製法に関して記す。

2.4.1 流路材質の特性

マイクロ流路の材質には、一般的に石英ガラスやホウケイ酸ガラス等のガラス類、またはポリマー材質系のポリジメチルシロキサン (poly(dimethylsiloxane): PDMS) やメタクリル酸メチル樹脂 (PMMA) が用いられる。各々の流路材質としての特徴を以下にまとめた。

◆ ガラス (石英ガラス, ホウケイ酸ガラス...)

- 無色透明で光学計測に向いている (特に石英ガラスは紫外光領域の透過性に優れる)
- 電気浸透流速度が大
- 熱伝導率が高い
- 微細加工プロセスが複雑で高価である

◆ ポリマー系材質 (PDMS, PMMA...)

- 無色透明で光学計測に向いている
- 電気浸透流速度が小
- 熱伝導率が低い
- 作製プロセスが簡単で使い捨てが可能である

ガラスおよびポリマー系材質の両者は、無色透明であるため光学顕微鏡や蛍光顕微鏡での観察に適している。また、ガラス材質は、一般的にポリマー系材質に比べて電気浸透流速度が大であり、弱い電界強度でも容易に電気浸透流を発生させることができる。一方、ポリマー系材質は電気浸透流速度が小であるが、流路加工プロセスがガラスよりも簡単で安価であるため利用度が高い。しかし、ポリマー系材質を使用する際の大きな問題は、熱伝導率がガラスと比して 10 倍程度低いということである。そのため、電気浸透流を流体駆動力とする場合、電界印加によって流動場に電流が流れジュール熱が発生し、流体の温度が上昇し熱が蓄積される。この問題の解決には、ポリマー系材質の流路にガラスを貼り付けることである。これにより、流路内の温度上昇は低減可能であることが実験的に明らかになっている (Erickson et al. 2003)。

本研究では、ガラス製の流路、およびポリマー系材質 (PDMS) にカバーガラスを貼り合わせた流路の二種を使用しており、それぞれの概要図を Figures 2.7 および 2.8 に示す。ガラス流路は既製品を購入し、PDMS 製流路はソフトリソグラフィー法 (2.4.2 節) に

より作製した。なお、両流路とも流路端にリザーバ (液貯め) を設置することで、静圧駆動流および電気浸透流において定常流れを形成した (詳細は 2.5.2 節)。

2.4.2 微小流路作製法

数百 μm から数十 nm 程度のポリマー系材質の微小流路の代表的な加工技術であるフォトリソグラフィ法 (photolithography), およびソフトリソグラフィ法 (softlithography) について述べる。

◆ フォトリソグラフィ法

フォトリソグラフィ法は、リソグラフィ (litho(石)-graphy(画法)) から由来した平板印刷のことを指し、写真と同様に光を用いるため photo-lithography と呼ばれる。具体的には、加工したい基板上に感光性樹脂であるフォトレジスト (photoresist) を塗布する。この上にマスク (流路パターンが描かれたもの) を被せ露光する。現像液 (developer) により感光したフォトレジストもしくは感光していないフォトレジストを残すことで微細構造を作り出すことが可能となる。フォトレジストは、一般的に紫外線に感光性をもつ高分子であり、光を照射された部分が硬化するネガ形と、光が照射されると高分子が分解して溶解しやすくなるポジ形とがある。ネガ形は感度が高いが解像度が少し低く、逆にポジ形はネガ形より解像度が高いが機械的強度が弱く、さらに密着性が弱いので使いにくいという特徴をもつ。

ネガ型のフォトレジスト剤を使用した際のフォトリソグラフィの行程を Figure 2.9 に示す。フォトリソグラフィを行う際は、基板をよく洗浄することが重要である。有機物汚染に対しては過酸化水素水 (H_2O_2) と硫酸 (H_2SO_4) の混合液、無機物汚染には過酸化水素水と塩酸 (HCl) の混合液により洗浄する。基板表面が汚れていると、基板とフォトレジストの密着性が極端に悪くなる。洗浄後に乾燥させた基板上に滴下したフォトレジストをスピンドーターで塗布し、均一なレジスト膜を形成する (Figure 2.9 (a))。次に、フォトレジストの粘度調整のために含まれる有機溶媒を揮発させ基板との密着性を良くするために、ホットプレート等で加熱処理を行う。その後、加工したい形状が描かれたマスクをフォトレジスト膜に被せて、露光装置により紫外光を照射 (exposure) し、フォトレジスト膜にマスクの図形を転写する (Figure 2.9 (b))。露光されたフォトレジスト膜に対し、現像液 (developer) を用いて露光されていない部分を除去し、リンス洗浄を行って現像液を完全に除去 (Figure 2.9 (c))。最後に、現像液で軟化したレジストをホットプレート等により加熱処理を行い、レジストを固化させることで微細構造が完成する。

◆ ソフトリソグラフィ法 (Xia and Whitesides 1998)

ソフトリソグラフィ法とは、基板上にあらかじめフォトリソグラフィ法によりパターンニングした微細構造を鋳型にして、微細構造を型取りする手法である。一連のプロ

セスを Figure 2.10 に示す。鋳型には、実際に作りたい構造の凸型の構造を形成し (Figure 2.10 (a)), ポリマー材質であるポリジメチルシロキサン (PDMS) と重合開始剤を混合したものを鋳型に流し込む (Figure 2.10 (b)). 未重合の PDMS と重合開始剤の混合溶液は、粘性が高いため混合時に混入する気泡を取り除くために、減圧状態で硬化させる。常温では、通常 24 時間程度で完全に硬化するが、熱を加えることで硬化時間を数十倍速めることも可能である。最後に、硬化した PDMS を鋳型から引き剥がして完成である (Figure 2.10 (c)). この手法は、一度フォトリソグラフィ法でパターンニングした微細構造を作製すれば、何度も同様の形状の型取りが可能である。また、Figure 2.10 (d) に示す流路およびガラス基盤との接着に関しても、PDMS は自己吸着性を有しているため、貼り付けるだけで接着が可能となる。そのため、必要に応じて PDMS を引き剥がして洗浄し再使用することも可能である。

2.5 静圧駆動流および電気浸透流への影響因子

2.3.1 節に述べたように、ゼータ電位および電気浸透流は、流路材質および溶液の性質に影響することが一般的に知られている。そこで、本研究で使用するガラス製流路 (Figure 2.7) および PDMS 製流路 (Figure 2.8) での、溶液の性質による流れ場への影響を 2.5.1 節に示す。また、2.5.2 節では、リザーバ設置による静圧駆動流および電気浸透流への影響に関して検討する。

2.5.1 流路材質および溶液の影響

流路材質および溶液の水素イオン濃度 (pH)、モル濃度は、電気二重層形成の重要なパラメータとなっている (Probstein 1994)。その主たる要因は、流路材質と溶液の性質の変化により、壁面電位、イオン雰囲気 (電気二重層) の形成およびゼータ電位 ζ_w が連鎖的に変動し、電気浸透流速度も変わるためである。ガラス表面では Figure 2.11 (a) に示すようにシラノール基 (SiOH) の解離が起こり負極に帯電する (Hunter 1981; Scales et al. 1992; Probstein 1994)。この反応は脱プロトン反応と呼ばれ、壁面において次式の平衡が成り立っている。



脱プロトン反応の平衡は溶液の水素イオン濃度 (pH) に依存している。pH が小さい場合は平衡が左に移動し、ゼータ電位の基となる脱プロトン化されたシラノール基 (SiO⁻) の数が減少する。そのため、ゼータ電位の絶対値が小となり、それに伴い電気浸透流速度も遅くなる。逆に、アルカリ性の溶液を流した場合はゼータ電位の絶対値が大となり電気浸透流が速くなる。なお、pH 値とゼータ電位および電気浸透流の関係をまとめた

ものを Table 2.1 に示した. また, 溶液のモル濃度は, 式(2.8) および式(2.9) から明らかのように, デバイ長および電気二重層内の電位分布に影響を与える. これより, 溶液のイオン濃度が大きくなるとデバイ長が短くなり電位の絶対値も小となる. 逆にイオン濃度が小となるとデバイ長は長くなり電位の絶対値も大となる. なお, イオン濃度とゼータ電位および電気浸透流の関係をまとめたものを Table 2.2 に示した.

一方, PDMS はジオルガノシロキサンの重合体であり, ガラスと同様にその表面にはシラノール基を有する (Figure 2.11 (b)). そのため, 脱プロトン反応も生じ, 壁面のゼータ電位はガラスと同様に pH 依存性を示す (Ocvirk et al. 2001; Badal et al. 2002; Spehar et al. 2003; Sze et al. 2003). しかし, PDMS の主骨格は Si-O の鎖状構造を持つが, 側鎖はメチル基 (-CH₃) となっているため, ガラスに比べて表面積あたりのシラノール基の数が少なく帯電量も小さい. また, PDMS においても, 溶液のイオン濃度はガラスと同様にデバイ長および電気二重層内の電位分布に影響を与える. しかし, 基の帯電量が小であるため, ガラスと比して変化量は一般的に小さい.

2.5.2 リザーバ

静圧駆動流および電気浸透流におけるリザーバ (マイクロ流路注入口および出口に設置される液貯め) の大きさと流動の時間的变化について評価した.

◆ 静圧駆動流

Figure 2.12 に示す直線型の単純なマイクロ流路内で, 注入口と出口の水頭差による静圧駆動流の時間的变化を評価する. ここでは, 流路断面およびリザーバ断面が円形と仮定し, リザーバにおける表面張力は考慮していない. 水頭差が $h(t)$ の時の静圧駆動流速の平均流速は式(2.24) として表せる.

$$U_{pr} = -\frac{d^2}{32} \left(\frac{\partial p}{\partial x} \right) = \frac{d^2}{32} \left(\frac{2\rho gh(t)}{L} \right) \quad (2.24)$$

ここで, d は円管の直径, ρ は溶液の密度, g は重力加速度, L はマイクロ流路長さである. また, リザーバの水頭変化による流量と流路内の流量は保存されるため次式が成り立つ.

$$\frac{\pi D_r^2}{4} h(t) = \frac{\pi d^2}{4} \int_0^t (U_{pr}) dt \quad (2.25)$$

なお, D_r はリザーバの径である. $t = 0$ において $h(0) = h_1$ とすると, 式(2.24) および式(2.25) より時間的に変化する平均静圧駆動流速が得られる.

$$U_{pr} = \frac{d^2 \rho g h_1}{16 \mu L} \exp\left(-\frac{d^2 \rho g}{16 \mu L} \left(\frac{d}{D_r}\right)^2 t\right) \quad (2.26)$$

これより、静圧駆動流速は時間の経過と共に指数関数的に減少することがわかる。例として、溶液を水とし、流路径 d を $100 \mu\text{m}$ 、流路長さ L を 30 mm 、 h_1 を 10 mm とした際の、リザーバの径 D_r を変化させた時の平均静圧駆動流速の比較を Figure 2.13 に示す。 $D_r = 1 \text{ mm}$ の場合、10 分程度経過すると、初期の流速の 20% 程度まで落ち込むことがわかる。一方、 $D_r = 10 \text{ mm}$ では、40 分経過してもほとんど流速が変化せず、定常流れが形成されることがわかる。

◆ 電気浸透流

Figure 2.14 に示す直線型の単純なマイクロ流路内において、電界印加による流動の時間的変化を評価する。電界印加前は、Figure 2.14 (a) に示すように注入口と出口の水頭差はないものとし、 $t=0$ において電界を印加して電気浸透流を発生させる。電界印加後しばらくすると、Figure 2.14 (b) のように陰極側の水頭が上昇することにより、電気浸透流とは逆方向の静圧駆動流が発生する。電界を印加した際の、質量保存式は静圧駆動流速と電気浸透流速の平均流速を用いて、次式で与えられる。

$$\frac{\pi D_r^2}{4} h(t) = \frac{\pi d^2}{4} \int_0^t (U_{EOF} + U_{pr}) dt \quad (2.27)$$

ここで、静圧駆動流の平均流速は、式(2.3) より次式として与えられる。

$$U_{pr} = \frac{d^2}{32 \mu} \left(-\frac{\partial p}{\partial x}\right) \quad (2.28)$$

また、電気浸透流の平均流速は、式(2.18) で表されるため、 $t=0$ の時 $h(0)=0$ として式(2.18) および式(2.28) を式(2.27) に代入することにより、電界印加により生じる静圧駆動流の平均流速が次式のように導かれる。

$$U_{pr} = \frac{\varepsilon \zeta_w E}{\mu} \left(1 - \exp\left(-\frac{\rho g d^2}{16 \mu L} \left(\frac{d}{D_r}\right)^2 t\right)\right) \quad (2.29)$$

静圧駆動流は時間の経過と共に増加し、最終的には電気浸透流速と等しくなり溶液の送液ができなくなる。例として電気浸透流速度 $(-\varepsilon \zeta_w E/\mu)$ を $100 \mu\text{m/s}$ 、流路径 d を 100

μm , 流路長さ L を 30 mm とし, リザーバの径 D_r を 1, 5, 10mm と変化させた時の平均静圧駆動流速の比較を Figure 2.15 に示す. これより, リザーバ径が大きければ, 電界印加により生じる静圧駆動流の影響の除去が可能となり, 電気浸透流の定常流れの形成が可能であることが示された. 以上より, 本研究でもガラス製および PDMS 製流路ともに, 内径 10 mm のリザーバを流路端に設置した.

Table 2.1. Relationship between pH value and zeta-potential, and relationship between pH value and electroosmotic flow velocity

	Low pH value	High pH value
Absolute value of zeta-potential	Small	Large
Electroosmotic flow velocity	Small	Large

Table 2.2. Relationship between ion concentration and zeta-potential, and relationship between ion concentration and electroosmotic flow velocity

	Low ion concentration	High ion concentration
Absolute value of zeta-potential	Small	Large
Electroosmotic flow velocity	Small	Large

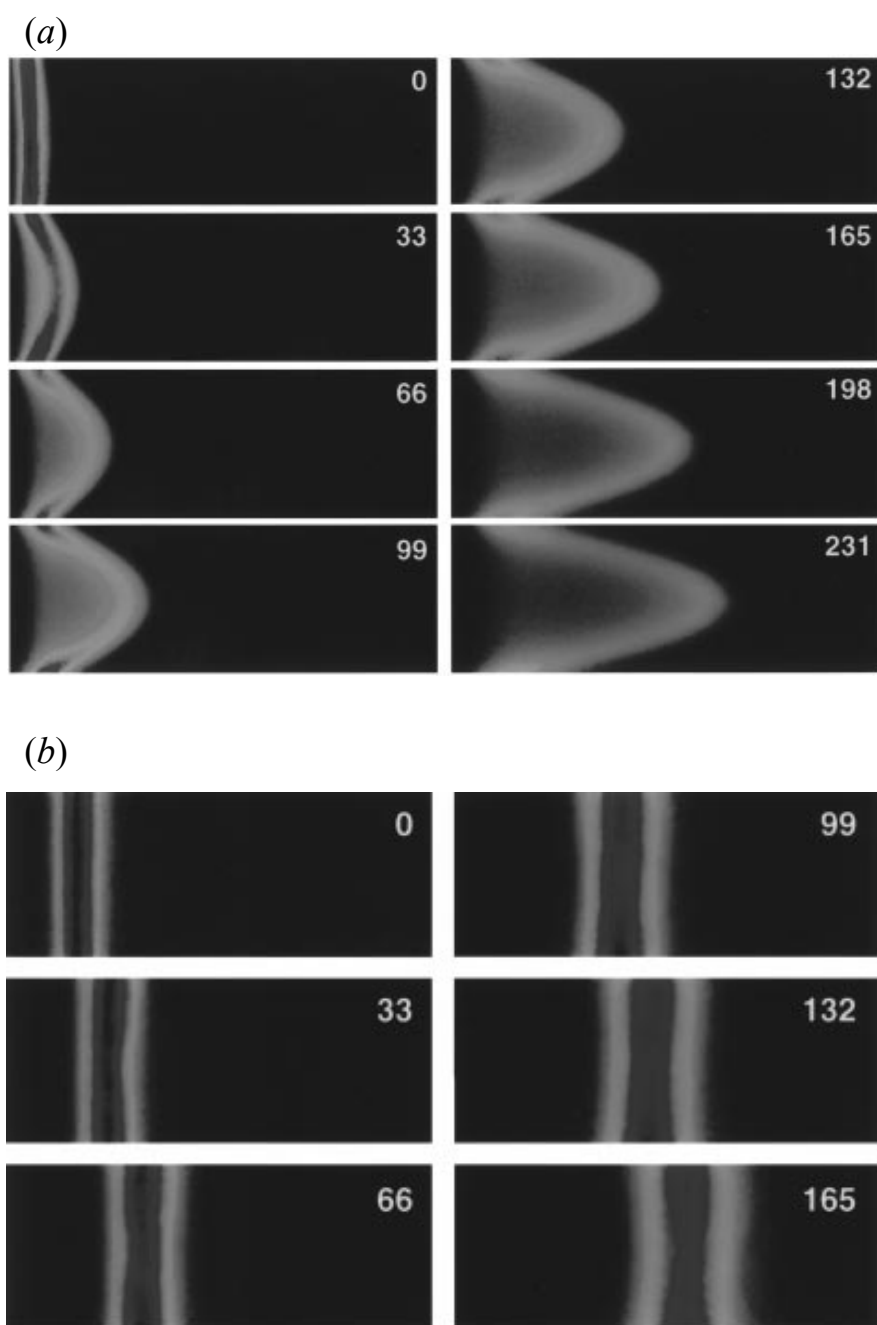


Figure 2.1. Flow patterns of (a) pressure-driven flow and (b) electrokinetically driven flow obtained by using caged fluorescent dye (Paul et al. 1998).

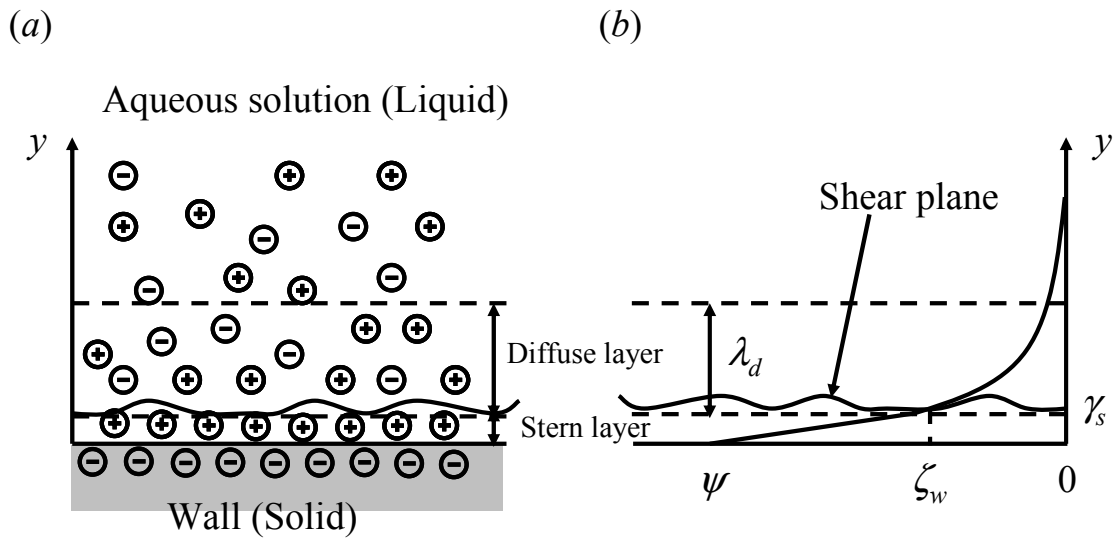


Figure 2.2. (a) Structure of the electric double layer at a wall surface. (b) A plot of the electric potential versus the distance from a wall surface.

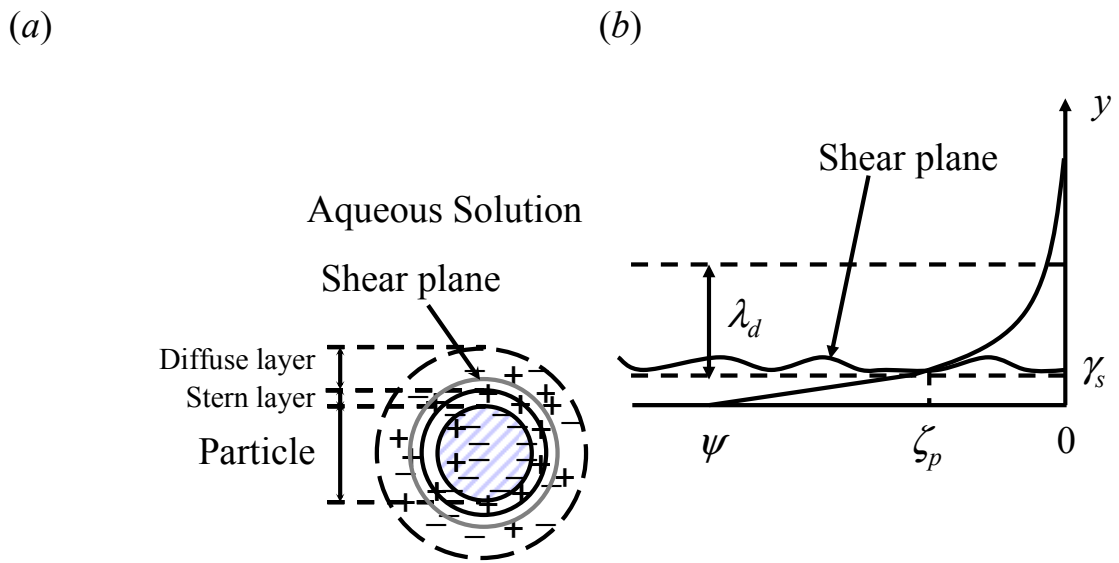


Figure 2.3. (a) Structure of the electric double layer around a particle. (b) A plot of the electric potential in the electric double layer versus the distance from the wall surface of a particle.

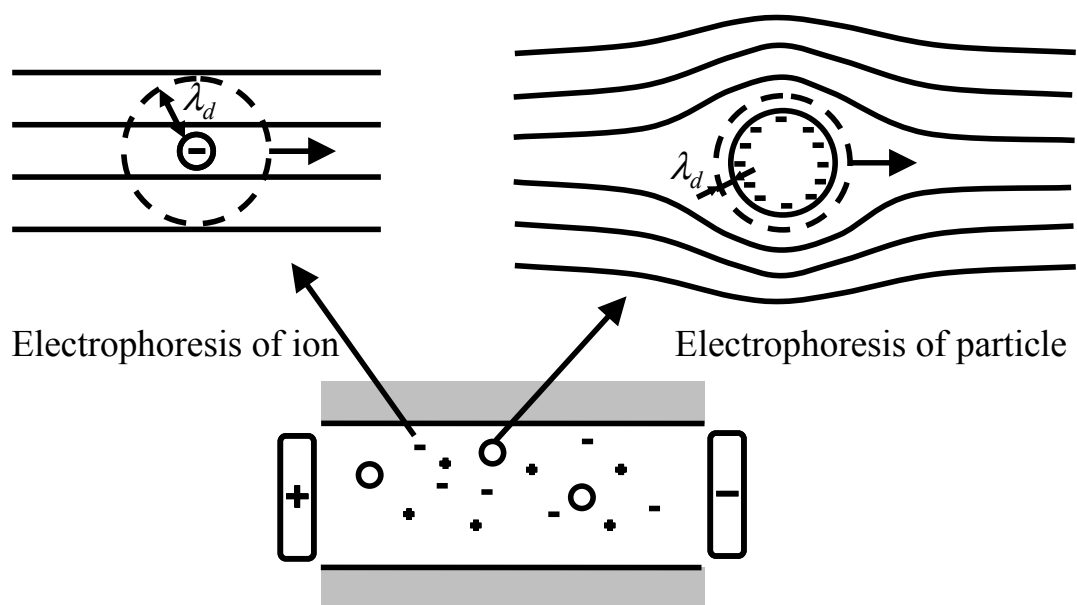


Figure 2.4. Electrophoretic motion of an ion in comparison with that of a particle.

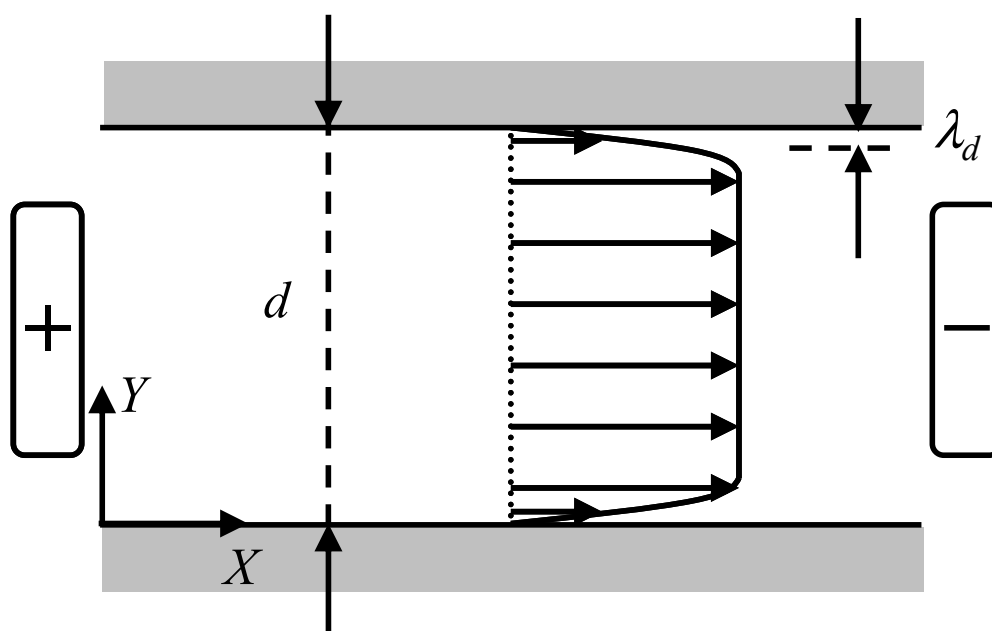


Figure 2.5. Electroosmotic flow velocity profile in the straight microchannel.

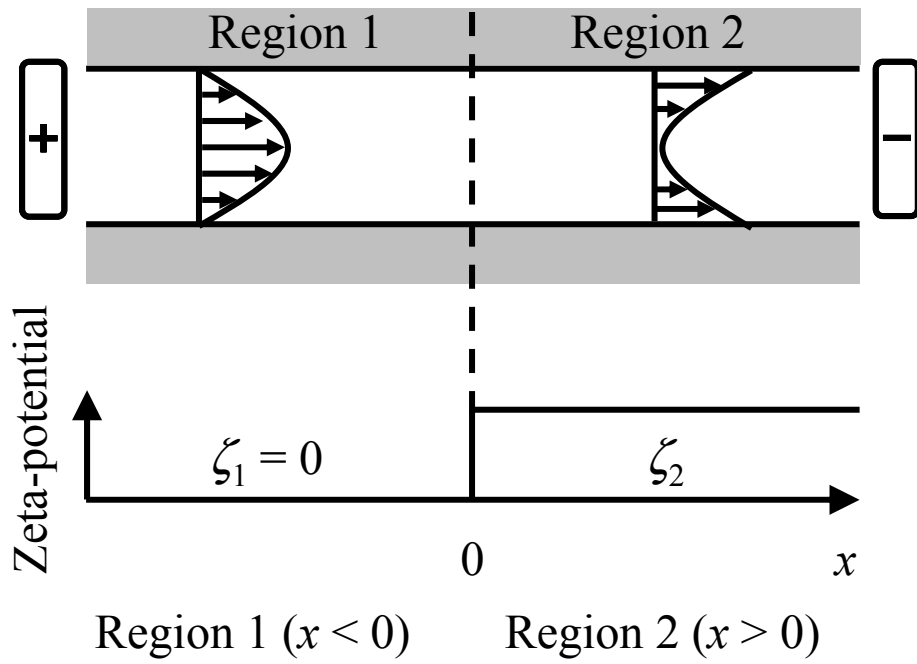


Figure 2.6. Electroosmotic flow velocity profiles in the straight microchannel with the surface charge varying perpendicular to the electric field.

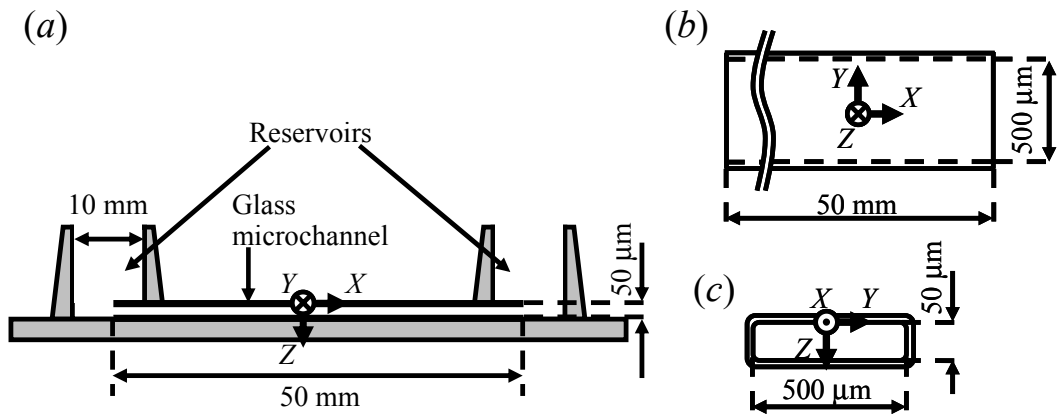


Figure 2.7. (a) Schematic of a glass microchannel. (b) Top and (c) cross-sectional views of a glass microchannel.

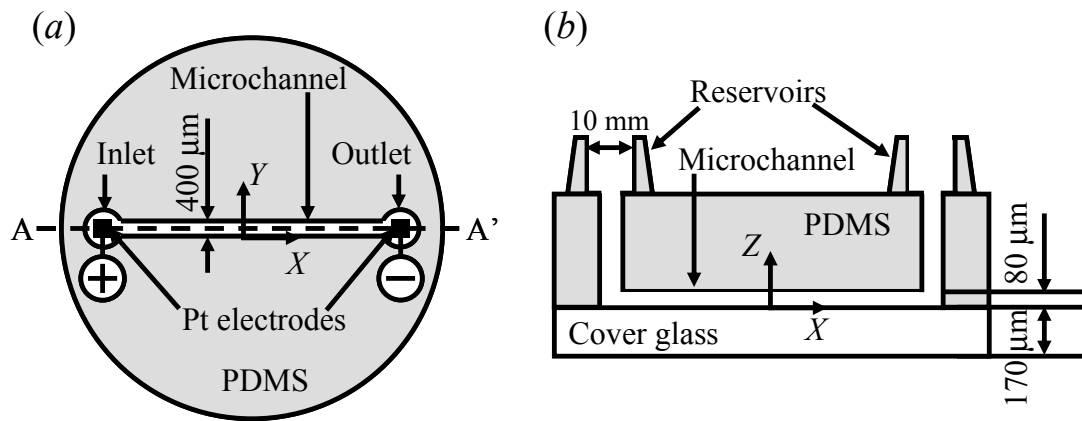


Figure 2.8. (a) Top view and (b) cross-sectional view along the A-A' of an I-shaped microchannel.

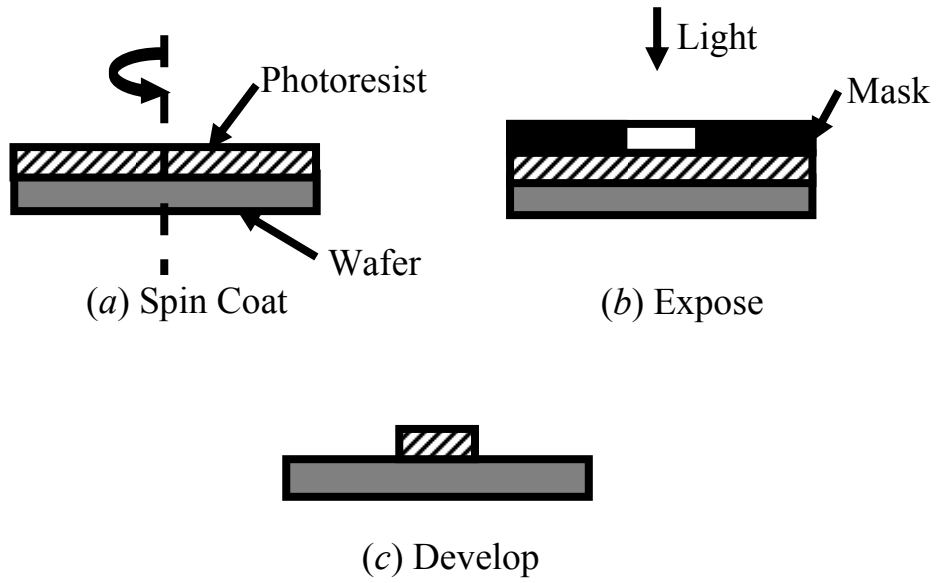


Figure 2.9. Fabrication process using photolithography technique.

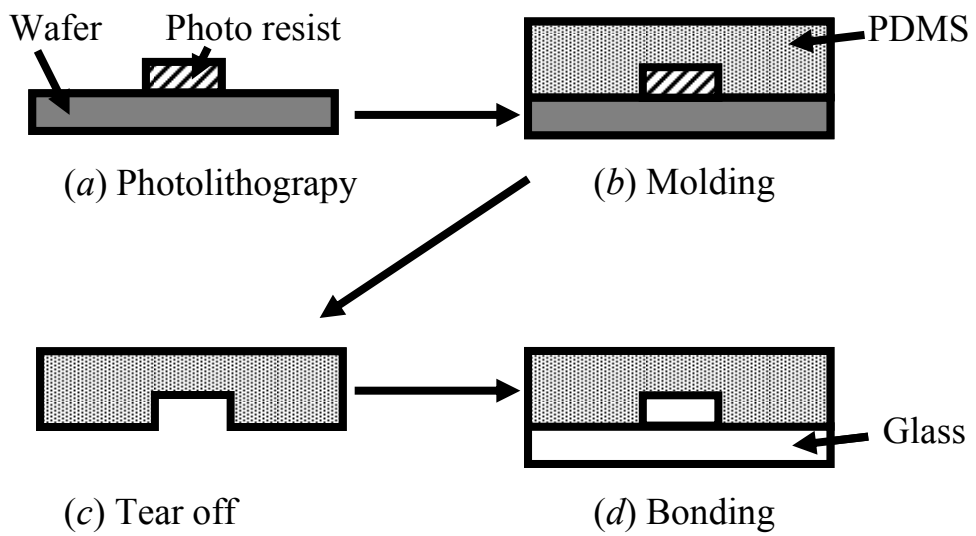


Figure 2.10. Fabrication process using softlithography technique.

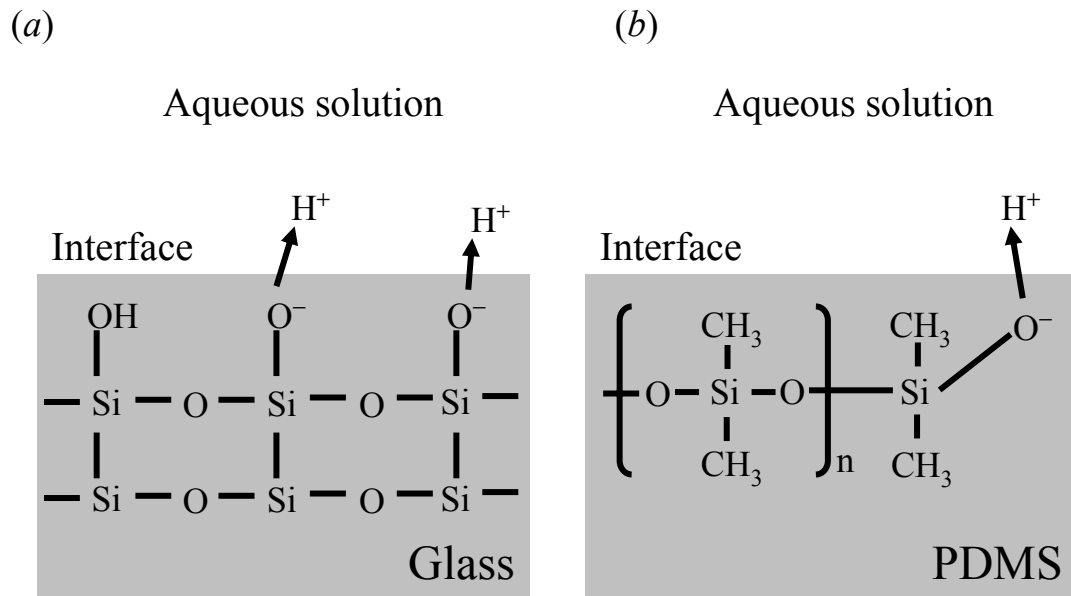


Figure 2.11. Schematic of the deprotonation on the surfaces of (a) Glass and (b) poly(dimethylsiloxane) (PDMS).

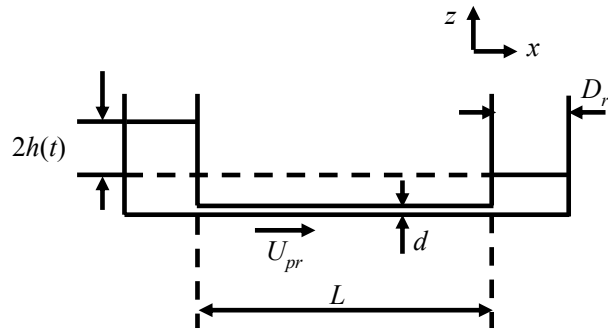


Figure 2.12. Schematic of the straight microchannel with reservoirs. The diameters of the microchannel and reservoirs were d and D_r , respectively. The pressure-driven flow was generated by the difference of $2h(t)$ height of the water surface in both reservoirs.

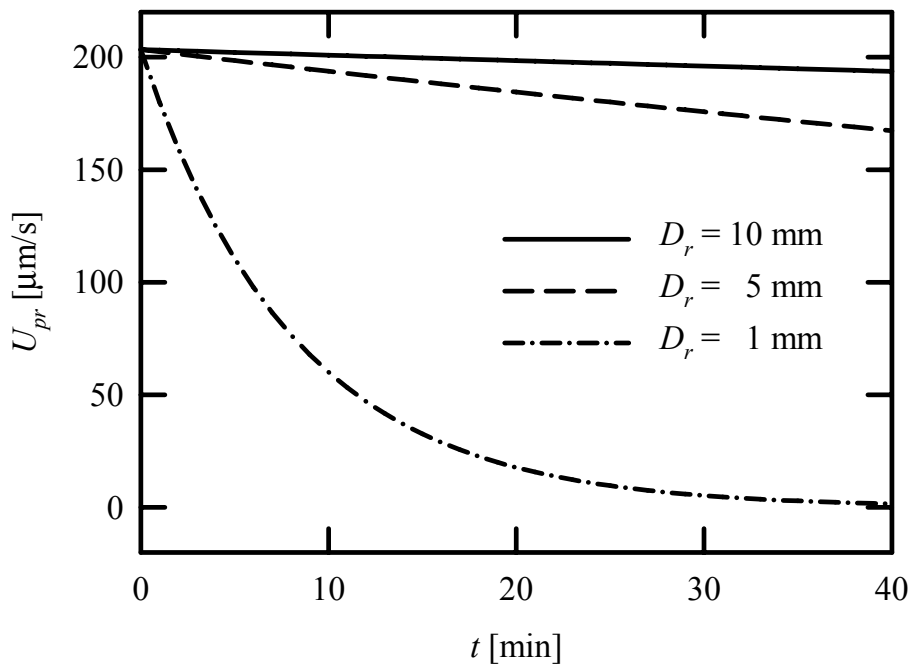


Figure 2.13. Time evolution of the pressure-driven flow velocity affected by varying the diameter size of reservoirs, which was estimated from equation 2.26. The assumptions of the estimation were that the diameter and length of the microchannel was $100 \mu\text{m}$ and 30 mm , respectively, and the initial difference of the height of the water surface was 20 mm .

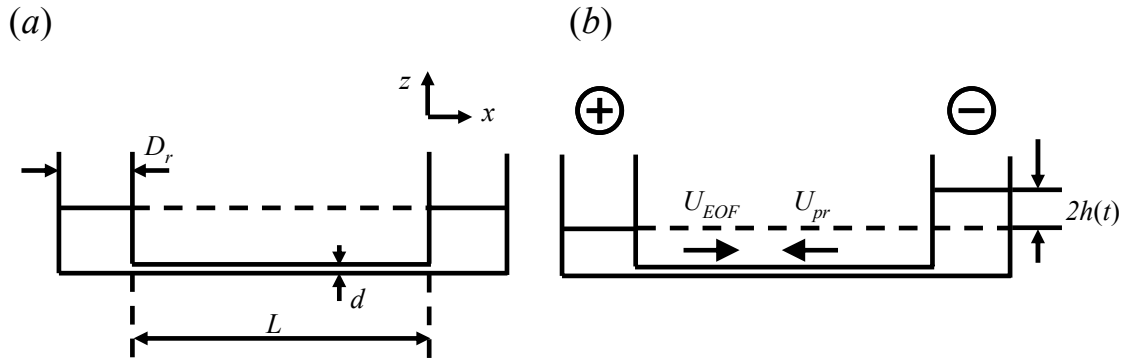


Figure 2.14. (a) Schematic of the straight microchannel with reservoirs at $t = 0$ sec, in which the height of the water surface was equal. The diameters of the microchannel and reservoirs were d and D_r , respectively. (b) At t sec after applying the electric field, the pressure-driven flow was generated by increasing $2h(t)$ height of the water surface at the cathode due to the electroosmotic flow.

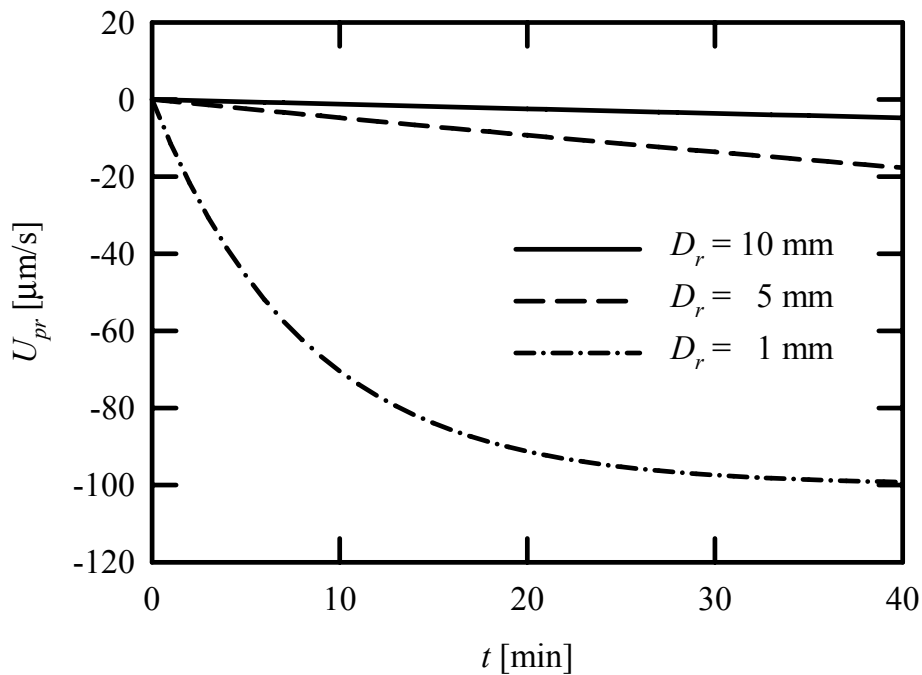


Figure 2.15. Time evolution of the pressure-driven flow velocity affected by varying the diameter size of reservoirs, which was estimated from equation 2.29. The pressure-driven flow was generated by increasing the height of the water surface due to the electroosmotic flow. The assumptions of the estimation were that the diameter and length of the microchannel was $100 \mu\text{m}$ and 30 mm , respectively, and the electroosmotic flow velocity was $100 \mu\text{m/s}$.

第3章 本研究で用いた計測法

3.1 はじめに

マイクロ流体デバイスの性能向上を目指すためには微小空間における流動特性を明らかにすることが必要不可欠であり、特徴的な物理量を把握するための計測法が開発されてきた。流動場を可視化するための既存の計測法として、マイクロ粒子画像流速計 (Micron-resolution particle image velocimetry, マイクロ PIV) による速度計測 (Santiago et al. 1998; Meinhart et al. 1999), およびレーザ誘起蛍光法 (Laser induced fluorescence: LIF) による温度またはイオンの二次元分布計測 (Sato et al. 2003b; Shinohara et al. 2004, 2005) が挙げられる。両手法は、微小空間における流動場計測の礎となる技術であり、既存の計測法として 3.2 節に記した。

3.3 節には、本研究で開発した複合計測法をまとめた。空間的な物質輸送の評価を実現するために、マイクロ PIV と LIF を組み合わせて速度およびイオン濃度分布の同時計測法を開発した (3.3.1 節)。また、電気浸透流における特徴的な物理量として、ゼータ電位が挙げられ、その計測法は電流モニタリング法 (Huang et al. 1988) や流動電位計測法 (Scales et al. 1992) が代表的であった。しかしながら、上述の二手法は空間的に平均されたゼータ電位の計測となるため、ゼータ電位が非一様な流路には適用が不可であった。この問題を解決するために、本研究ではマイクロ PIV を用いた電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法を新たに開発し、詳細を 3.3.2 節に記載した。

3.2 既存の計測法

本節では、微小空間の速度およびイオン濃度分布の計測法として、マイクロ PIV と LIF の計測法の原理を記す。また、マイクロ PIV を用いた研究では、蛍光顕微鏡または共焦点顕微鏡を基本とした計測システムを構築しているため、その詳細および深さ方向分解能を評価する式を記述する。

3.2.1 顕微鏡および深さ方向分解能

◆ 蛍光顕微鏡 (Inoué and Spring 1997; 野島 1997)

本研究にて蛍光顕微鏡を基本として構築した計測システムの概要を Figure 3.1 に示す。一般的に、蛍光顕微鏡は、光源、フィルタブロック、対物レンズの3点で構成されており (詳細は Appendix A.1 参照), それに検出器 (CCD または CMOS カメラ等の画像記録機器) を備え付けることで対象物の撮像が可能となる。また、蛍光顕微鏡は、対物レンズの向きによって正立顕微鏡 (Figure 3.1 (a)) および倒立顕微鏡 (Figure 3.1 (b)) に分類される。正立顕微鏡 (本研究では株式会社ニコン E800 を採用) は、マイクロ流路の上部から流動場を計測する場合に使用される。一方、倒立顕微鏡 (本研究では株式会社ニ

コン TE2000U を採用) は下部から計測する場合に使用される。両者には光学的な構造に大差はなく、用途に応じて使い分けられる。

以下に蛍光顕微鏡の面方向ならびに深さ方向の分解能の評価式を列挙する。面方向の分解能 Δx_E は、対物レンズの開口数 NA と蛍光発光波長 λ_{em} を用いて次式で表される。

$$\Delta x_E = \frac{\lambda_{em}}{2NA} \quad (3.1)$$

蛍光発光波長と対物レンズの開口数は反比例の関係にあるため、油浸系対物レンズを用いることにより、顕微鏡の解像度は格段に向上する。ここでは、蛍光顕微鏡観察で一般的に用いられる光源波長の範囲において、異なる開口数での面方向の分解能を算出し、Table 3.1 にまとめた。

一方、深さ方向の分解能は、被写界深度 (Depth of field) で定義される。被写界深度とは、顕微鏡を使って計測対象に焦点を正確に合わせた際に、対物レンズの焦点が合う深さ方向の距離 (厚さ) のことをいう。被写界深度が深いレンズで計測対象を観察すると、比較的明瞭に全体に焦点が合って見える。一般的な被写界深度 Δz_E は、媒質の屈折率 n 、蛍光発光波長 λ_{em} 、および対物レンズの開口数 NA を用いて次式で表される。

$$\Delta z_E = \frac{n\lambda_{em}}{2NA^2} \quad (3.2)$$

すなわち、媒質と観察する光の波長が一定ならば開口数が大きくなると被写界深度は開口数の2乗に反比例して浅くなり、深さ方向の分解能が高い観察が可能となる。ただし、本研究では流動場の撮像に CCD カメラを用いるため、空間的に離散した情報しか入手することができず、式(3.2) を適用することができない。そこで、CCD カメラなどの離散的な情報における被写界深度 Δz_D は次式で与えられる。

$$\Delta z_D = \frac{n\lambda_{em}}{NA^2} + \frac{ne}{NA \cdot M} \quad (3.3)$$

ここで、 e は CCD 素子の大きさ、 M は光学系の総合倍率である。第一項は散乱による被写界深度を、第二項は幾何光学的な被写界深度を表す。

次に、マイクロ PIV を用いた際の被写界深度を考える。マイクロ PIV では粒子を流動場に混入し CCD カメラにより粒子像を撮像するため、一般のレンズのみで決まる被写界深度とは異なる。Meinhart et al. (2000a) は、被写体に粒子、撮像機器に CCD カメラを用いた際の深さ方向での焦点が合う厚さを計測深度 Δz_{MD} (Measurement depth) として定義している。

$$\Delta z_{MD} = \frac{3n\lambda_{em}}{NA^2} + \frac{2.16d_p}{\tan\theta} + d_p \quad (3.4)$$

なお、 d_p は粒子径、 θ は粒子が対物レンズに張る円錐の頂角の 1/2 である。第一項は回折による被写界深度を表し、第二項は幾何光学的な被写界深度、第三項は粒子径そのものが計測深度に含まれることを意味する。特に第二項は、焦点面からの位置のずれによって、粒子像の輝度が 1/10 に低下するまでの範囲を焦点の合う厚さとして定義したものである。ここでは、後述する実験装置および実験条件を例に、異なる開口数および粒子径での計測深度を算出し Table 3.2 に示した。

◆ 共焦点顕微鏡 (Wilson 1990)

共焦点顕微鏡の構造上の大きな特徴は、Figure 3.2 に示すように検出器の前にピンホールが配置してある点である。計測対象と共役した位置にピンホールが置かれるので、計測対象または他の光学系から射出した光は検出器には入射しない。このため、蛍光顕微鏡と比較して焦点外の散乱光や蛍光が取り除かれ、焦点面のみ画像の取得が可能となる。Sandison and Webb (1994) の研究では、蛍光顕微鏡と比して 10 倍程度の信号対雑音比 (Signal to noise ratio: SN 比) が向上することが明らかとなっており、これにより深さ方向の分解能の向上にもつながる。ただし、1 つのピンホールを通った光は 1 点のみの情報であるため、面情報の取得には走査が必要となる。共焦点顕微鏡で用いられる走査方式には、Figure 3.3 に示すようにガルバノミラー走査方式とニポウディスク回転走査方式がある。ガルバノミラー走査方式は、ガルバノミラーによってレーザービームの走査を行う方式であり、1 画像形成に約 1 秒要する (一般的な CCD カメラの時間分解能は数十 ms であるため時間分解能は非常に低い)。一方、ニポウディスク回転走査方式は、微小な穴が螺旋状に並んだ円盤 (ニポウディスク) を回転させることにより走査を行う方式である。例えば、横河電機株式会社の共焦点スキャナ CSU 22 は、5000 rpm でニポウディスクが回転し、1 画像の形成には 30 度の回転が必要であるため、約 10^{-3} 秒の時間分解能を達成している。これより、ニポウディスク回転走査方式は、ガルバノミラー走査方式の約 1000 倍時間分解能に優れている。さらに近年では、ニポウディスク走査方式の欠点であったレーザー光の透過効率の低さも改善されている。Figure 3.4 に示すように、ニポウディスクとマイクロレンズアレイディスク (ニポウディスクの微小な穴と同じ位置にマイクロレンズが配置されており、ニポウディスクの回転と同期をとっている) を配置するシステムが開発され、光の透過効率が 10 倍となり背景光の低減を達成している。

なお、共焦点顕微鏡の分解能は、ピンホール径の大きさにより以下に示す 2 種に分類して評価される。

$$PD > 1.0AU \quad (3.5a)$$

$$PD < 0.25AU \quad (3.5b)$$

なお, PD および AU は次式にて定義される.

$$PD = \frac{d_{pin}}{M_0} \quad (3.5c)$$

$$AU = \frac{1.22\lambda_{ex}}{NA} \quad (3.5d)$$

ここで, d_{pin} はピンホール径, M_0 は対物レンズの倍率, λ_{ex} は励起波長, および NA は開口数を示す. 式(3.5a) の場合, 幾何光学に基づいて分解能を定義し, 式(3.5b) の場合, 波動光学に基づいて分解能を定義している. 以下に, 両者の場合における共焦点顕微鏡の面方向の分解能 Δx_C を示す. これらは全て, 点光源がピンホールを通過した後の点像分布関数に対する半値全幅 (Full-width at half-maximum: FWHM) の理論的解析および実験値との総合的な評価により定義されている.

$$\Delta x_C = \frac{0.88\lambda_{ex}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad \text{when } PD > 1.0AU \text{ and } NA \geq 0.5 \quad (3.6a)$$

$$\Delta x_C = \frac{1.67n\lambda_{ex}}{NA^2} \quad \text{when } PD > 1.0AU \text{ and } NA < 0.5 \quad (3.6b)$$

$$\Delta x_C = \frac{0.64\lambda_{avg}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad \text{when } PD < 0.25AU \text{ and } NA \geq 0.5 \quad (3.6c)$$

$$\Delta x_C = \frac{1.28n\lambda_{avg}}{NA^2} \quad \text{when } PD < 0.25AU \text{ and } NA < 0.5 \quad (3.6d)$$

$$\lambda_{avg} = \frac{\sqrt{2}\lambda_{ex}\lambda_{em}}{\sqrt{\lambda_{ex}^2 + \lambda_{em}^2}} \quad (3.6e)$$

一方, 深さ方向分解能 Δz_{OST} も, 面方向分解能と同様に理論的解析および実験値との総合評価により以下の式(3.7) として与えられる.

$$\Delta z_{OST} = \sqrt{\left(\frac{0.88\lambda_{em}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2}nPD}{NA}\right)^2} \quad \text{when } PD > 1.0AU \quad (3.7a)$$

$$\Delta z_{OST} = \frac{0.64\lambda_{avg}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad \text{when } PD < 0.25AU \quad (3.7b)$$

本研究における共焦点顕微鏡での条件，面方向および深さ方向分解能を Table 3.3 に表記する．これより，本研究では式(3.5a) の条件となることがわかる．

3.2.2 マイクロ粒子画像流速計

微小空間における流体の速度計測には，2次元2方向速度を計測可能なマイクロ粒子画像流速計 (Micron-Resolution Particle Image Velocimetry, マイクロ PIV) が，その汎用性および簡便性から一般的に用いられる (Santiago et al. 1998; Meinhart et al. 1999, 2000b)．マイクロ PIV は，マクロスケールでの流体速度計測である粒子画像流速計 (Particle Image Velocimetry : PIV) (Adrian 1991) を，顕微鏡を用いて微小空間に適用したものであるため，その基本原理は従来の PIV に準ずる．つまり，トレーサ粒子が流体に追従すると見なせるとき，計測された粒子速度が流体の速度として扱われる．この特性を活かし，CCD カメラ等の画像記録機器により 2 時刻間の粒子像を撮像し，粒子追跡アルゴリズムを用いて粒子速度を算定することで流体の速度を求める．本節では，マイクロ PIV の速度算出を行う粒子追跡アルゴリズム，トレーサ粒子の選定，並びにブラウン運動の流体速度計測への影響について記す．

◆ 粒子追跡アルゴリズム

粒子画像から粒子の移動量を推定するアルゴリズムは，(1) 粒子追跡法，(2) 輝度パターン法に大分され，マイクロ PIV では輝度パターン法を用いている．粒子追跡法と輝度パターン法の比較の概念図を Figure 3.5 に示す．粒子追跡法 (Figure 3.5 (a)) は，個々の粒子に関して Δt 時間後に移動する量を求める方法である．一方，輝度パターン法 (Figure 3.5 (b)) は，得られた粒子画像を輝度値の分布と考え，粒子群の輝度値パターンが Δt 時間後に移動する量を定量的に解析する方法である．輝度パターン法は，複数個の粒子を輝度パターンとして用いており，得られる速度ベクトルは空間的に均等に配列させることが可能であるため，流体现象の解析が容易となる．2 画像間の輝度パターンから移動量を算出するアルゴリズムは，輝度差累積法，相互相関法および階層的探索法に分類される (詳細は Appendix A.2 参照)．なお，本研究では相互相関法および階層的探索法をソフトウェアに実装した．

◆ トレーサ粒子の選定

PIV はトレーサ粒子の速度を計測し流体の速度とするため，トレーサ粒子の流体への追従性が重要となる．流体内の粒子の運動は，ストークス (Stokes) の粒子運動方程式より導かれ，粒子の流体への追従性の時定数 (緩和時間: τ_s) は次式で表される．

$$\tau_s = \frac{d_p^2}{18\nu} (\rho_p - \rho) \quad (3.8)$$

ここで、 d_p は粒子径、 ν は流体の動粘性係数、 ρ_p は粒子の密度、および ρ は溶液の密度である。これより、流体と粒子の密度差が小さいとき、追従性が高くなることがわかる。作動流体が水である研究の多くは、水の密度 (1 g/cm^3) と近いポリスチレン粒子 (1.055 g/cm^3) を一般的に用いる。

また、マイクロ PIV における粒子径は、数百 nm – 1 μm 程度が一般的である。それより大きな径の粒子を用いると、流体への追従性が低くなるのみならず、カメラに撮像される粒子像も大きくなり空間分解能の低下を招いたり (Westerweel 1997)、流路を詰まらせたりするといった問題が生じる。そのため、追従性や空間分解能といった観点では、数百 nm – 1 μm 程度の粒子が最適であるが、粒子径が小さいことによる問題も 2 点生じる。1 点目は粒子のブラウン運動が顕著となるため流体速度計測に誤差が生じること、2 点目は粒子からの散乱光強度が著しく低下することである (西野 2001)。ブラウン運動の流体速度計測への影響は次段落にて詳細に解説することとし、本節では散乱光強度の問題および解決法について述べる。散乱光強度は、粒子と作動流体の屈折率比にも依存しているが、主に粒子径と光源波長 λ_{ex} の比である粒径パラメータ $\alpha_p = \pi d_p / \lambda_{\text{ex}}$ に依存する。 $\alpha_p < 1$ では d_p^6 に比例し、 $\alpha_p > 10$ では d_p^2 に比例する。すなわち、数百 nm の粒子は散乱光強度が急速に低下し、明るく鮮明な粒子像を撮像することが困難となる。そのため、マイクロ PIV では、粒子に蛍光色素が練りこまれた蛍光粒子を用いるのが一般的である。蛍光色素が粒子に均一に含まれており、球形であると仮定すると粒子からの蛍光強度は、 d_p^3 に比例する。粒子径が小さくなった場合、散乱光強度が d_p^6 に比例して減少するのに対して、輝度の減少がより緩やかであることがわかる。

◆ ブラウン運動の流体速度計測への影響の低減

PIV は、トレーサ粒子が流れに追従するという仮定のもとで、算出された粒子の速度を流体の速度としてみなす。しかし、微小空間ではトレーサ粒子が小さいためブラウン運動が顕著となり、流体の流れから外れた動きを示す。そのため、PIV による速度計測を行う際には、ブラウン運動の流体速度計測への影響を考慮する必要があり、ブラウン運動による粒子の移動量 s_B の二乗平均は次式で表される (詳細は Appendix A.3 参照)。

$$\begin{aligned} \langle s_B^2 \rangle &= 2D\Delta t \\ D &= \frac{k_B T}{3\pi\mu d_p} \end{aligned} \tag{3.9}$$

ここで、 d_p は粒子径、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 Δt は時間間隔、 μ は粘性係数である。また、粒子 1 個あたりのブラウン運動による速度計測誤差 ϵ_B は、流体の速度を U 、画像フレーム間隔を Δt とすると、以下の式(3.10) と定義できる。

$$\varepsilon_B = \frac{\langle S_B^2 \rangle^{1/2}}{U\Delta t} = \frac{1}{U} \sqrt{\frac{2D}{\Delta t}} \quad (3.10)$$

流速が速いときは、ブラウン運動による速度検出への影響は相対的に小さくなるが、本研究で対象とする流れ場は微小空間を対象とするため流速は遅く（数百 $\mu\text{m/s}$ 程度）、ブラウン運動の影響が顕著となる。ブラウン運動は偏りのないランダムな運動のため、粒子の速度ベクトルを時間平均または空間平均することでブラウン運動による計測誤差 ε_B を低減させることができる。

マイクロ流路内における代表的な2時刻の粒子画像をFigure 3.6に示し、Figure 3.7 (a)にマイクロPIVによって求められた瞬時のベクトル図を示す。Figure 3.7 (a)に示した流動場は、 $Re = 5.0 \times 10^{-3}$ と層流であるにも関わらず、計測された速度ベクトルは乱れていることがわかる。Santiago et al. (1998)は、ブラウン運動が時間的に偏りのないランダムな運動であることに着目し、瞬時の速度ベクトルを時間平均（正確には、ある時間間隔 Δt で得られた連続した複数枚の瞬時速度ベクトルを平均）することで、その影響を取り除く手法を提案した。Figure 3.7 (b)は連続した10枚の瞬時速度ベクトルを平均したものを示しており、ブラウン運動による流体速度計測への誤差が取り除かれていることがわかる。また、Meinhart et al. (1999; 2000b)は、粒子追跡アルゴリズムの相互相関演算の際に算出される相関値マップを時間平均することで、同様にブラウン運動による影響を除去することに成功した。

本研究ではSantiago et al. (1998)による平均手法を採用した。平均する速度ベクトル数を決めるために、モンテカルロ法を用いて粒子のブラウン運動を組み込んだ粒子画像を作成してPIVを施し、平均数の変えた際の主流速度に対する標準偏差を評価した。なお、粒子像を生成する上での各種パラメータは、すべて実験条件と揃えた。作動流体は水、温度293 K、粒子径は0.5 μm 、一様流（10 pixels/frame）の粒子像を作成した。PIVの参照窓の大きさは50 \times 50 pixelsとして計算した。Figure 3.8は、平均数を変化させた際の主流速度に対する標準偏差の比を示したものである。この結果より、平均数が増えるごとに誤差が低減していることが見てとれる。平均なしではブラウン運動による速度検出の誤差は約5%であるが、平均が40ベクトルでは1%を下回り、100ベクトルでは平均しない場合と比して約1/10に軽減される。本研究では、ブラウン運動による流体速度計測への誤差が主流の約0.5%となる100ベクトルを平均数とした。

3.2.3 レーザ誘起蛍光法

流体中の温度やイオン濃度の計測には、二次元分布の取得が可能なレーザー誘起蛍光法（Laser Induced Fluorescence: LIF）が広く用いられる（Walker 1987; Coppeta and Rogers 1998; Ismagilov et al. 2000; Sato et al. 2003b; Shinohara et al. 2004, 2005）。LIFは、流れ場に

適当な波長のレーザを照射し、励起された蛍光物質からの蛍光強度により、温度やイオン濃度情報を得る可視化技術である。以下に、LIFの計測原理、蛍光発光プロセスおよび蛍光色素の選定について解説する。

◆ レーザ誘起蛍光法の原理

計測対象となるイオンの濃度 c により蛍光強度が変化する色素を溶液中に溶かし、マイクロ流路内に注入する。励起光の照射により発光した蛍光画像を、CCDカメラにより二次元情報として取得し、蛍光強度分布からイオン濃度分布を得る。励起光強度を I_e とした際の蛍光強度 I_f は次式で表せる。

$$I_f(\lambda_{em}) = I_e(\lambda_{ex}) c_f \phi \epsilon_m(c) \quad (3.11)$$

ただし、励起光波長 λ_{ex} 、蛍光発光波長 λ_{em} 、蛍光色素のイオン濃度 c_f 、量子収率 ϕ 、モル吸光係数 ϵ_m および計測対象となるイオンの濃度 c であり、モル吸光係数が計測対象となるイオンの濃度依存性を有することがわかる。ここで、CCDカメラで感知される蛍光強度は

$$\int I_f(\lambda_{em}) d\lambda_{em} = f_a(\lambda_{ex}) \epsilon_m(c) \quad (3.12)$$

と表せる。 f_a は蛍光色素の吸収スペクトルによって決定された係数である。これより、蛍光強度はイオン濃度の他に励起光強度にも依存するが、計測面内において励起光強度を一定に保つのは困難である。そのため、任意のイオン濃度における蛍光強度分布 I_{ref} を測定し、励起光強度分布の参照値として次式のように補正を行う。

$$\frac{I_f(\lambda_{em})}{I_{ref}(\lambda_{em})} = \frac{\epsilon_m(c)}{\epsilon_m(c_{ref})} \quad (3.13)$$

さらに、CCDカメラの暗電流ノイズも計測誤差の要因となるため、励起光を照射せずに流動場を撮像した強度 I_{back} を用いて

$$I_c = \frac{I_f(\lambda_{em}) - I_{back}}{I_{ref}(\lambda_{em}) - I_{back}} \quad (3.14)$$

として補正することにより、イオン濃度の二次元分布計測が可能となる。なお、全ての蛍光色素があらゆるイオン濃度を計測することは不可能であり、計測対象となるイオンに応じて蛍光色素の選定をすることが必要となる。以下に、蛍光色素の発光プロセスお

よびその選定に関して記述した。また、LIFの特徴や詳細な注意点に関しては Appendix A.4 に明記した。

◆ 蛍光発光プロセスおよび蛍光色素の選定

ある種の物質は、エネルギーを吸収し熱を伴わずに光を放出する。この現象をルミネッセンスとよび、その中でも紫外線や可視光線をエネルギーとして吸収し光を放出するものを光ルミネッセンスという。蛍光と燐光はこれに属する現象であるが、両者の違いは蛍光残光時間の違いであり、一般的に 0.1 秒以上の現象を燐光という。この発光時間の違いは、Figure 3.9 に示す蛍光発光プロセスの違いから生じるものである。分子は光を吸収する前には、エネルギー的に最も低い状態（基底状態: S_0 ）にある。その基底状態にある分子が光エネルギーを吸収して励起状態 S_n となった後、一部が分子内運動で赤外線（熱エネルギー）となり最低次の励起状態 S_1 になる。そして、この第一励起の最低次の振動レベルから基底状態に落ちるが、この遷移では発光過程と無放射過程の2つの確率過程が競合する。発光過程を経るもののうち同一の多重度をもつ S_1 から S_0 への光放射失活現象を蛍光と呼び、この現象は $10^{-9} - 10^{-6}$ sec で速やかに起こる。以上のように、吸収した光のエネルギーは、振動や熱エネルギーとして一部が失われるため、蛍光の波長は吸収した光の波長よりもエネルギーの小さい長波長部に移りかつ鏡像をなしている（ストークスの法則）。

また、蛍光発光するためには、光を吸収する化学構造である必要があり、そのためには共役二重結合系（ π 電子系）の構造が必要となる。これは、ベンゼン、ナフタレン、アントラセンの量子収率が 0.11, 0.29, 0.46 と分子中の共役系が増すほど増大し、蛍光性が高くなることから理解できる。また、分子内の回転や振動による無放射遷移のなるべく少ない構造が望ましい。すなわち分子全体が固定化し、 π 電子系が共役したものほど蛍光が強くなる。例えば、Figure 3.10 に示すように、無蛍光性の Phenolphthalein および Malachite green の芳香環を酸素原子で架橋した Fluorescein および Rhodamine B は強い蛍光を発する。これは、基底状態では平面性の共鳴構造をとっているが、励起状態では平面性を失いねじれ構造となり、回転に伴う内部転換が生じるためである。さらに、共役系に対し光吸収性を高める作用のある置換基のうち、一般に電子供与性の置換基、すなわち-OH 基、 $-\text{NH}_2$ 基、 $-\text{OCH}_3$ 基などは蛍光を増大させる効果を有する。ここで、代表的な蛍光物質（蛍光色素）の性質を Table 3.4 にまとめる。これより、可視光での励起が可能かつ pH 7 近傍で水素イオン濃度に依存性を有する色素は、Fluorescein および HPTS の2種である。両者の温度依存性を比較すると、Fluorescein は 488 nm の励起で $20 - 60$ °C において -0.16 ± 0.07 % per °C であり、HPTS の約 1/8 倍である。また、Fluorescein は、安価で使用も簡便という利点も備えており、これまでの研究 (Shinohara et al. 2005) でも使われているため、本研究でも採用する。

なお、Fluorescein の蛍光強度が pH 依存性を有する原因について説明する。主たる要因は、Figure 3.10 (c) に示すように Fluorescein の官能基にはカルボキシル基 (COOH) が

あり, pH 5–9 の領域において次式に示すカルボキシル基の脱プロトン反応が生じることである (Fluorescein の酸解離定数 $pK_a = 6.4$ である).



これより, 水素イオン濃度が高いとき脱プロトン反応は左方向の平衡状態となり, 逆に水素イオン濃度が低いときは右方向の平衡状態となる. Fluorescein は脱プロトン化されたカルボキシル基 (COO^-) の数が多いとき蛍光強度が大きくなるため, 水素イオン濃度が低いとき蛍光強度が大となり, 水素イオン濃度が高いとき小となる.

3.3 本研究で開発した複合光学計測法

本節では, 本研究で新たに開発した計測法に関して述べる. 3.3.1 節には微小空間に適用可能な速度およびイオン濃度分布の同時計測法を, 3.3.2 節にはマイクロ PIV を用いた電気浸透流速度および壁面のゼータ電位計測法に関して記し, 3.3.3 節に両手法の不確かさ解析を行う.

3.3.1 速度およびイオン濃度分布の同時計測法

マイクロ流路内の速度およびイオン濃度を同時に計測するために, 本研究にて新たに開発した計測法の概要を Figure 3.11 に示す. 同時計測を行うためには, マイクロ PIV と LIF の複合化を実現するための計測システムの構築が要となる. 本研究では, Figure 3.12 に示すような倒立蛍光顕微鏡 (株式会社ニコン TE2000U) に, 共焦点スキャナ (横河電機株式会社 CSU 22) および 3CCD カメラ (浜松ホトニクス株式会社, C7780-20, 672×512 pixels, 8 bits \times 3) を取り付けた計測システムを構築した (Ichiyangi et al. 2007). 光源には連続光の Ar レーザ (波長 488 nm, 出力 50 mW) を用い, 光ファイバにより共焦点スキャナへ導入され, 20 倍の乾燥系対物レンズ (株式会社ニコン, CFI S Fluor, NA 0.75) により集光し, 蛍光粒子および色素を励起した. 以下に, 計測システムを構築する上で工夫した点を列挙する.

1. レーザ 1 波長で粒子および色素を励起
2. カメラ 1 台で粒子および色素の蛍光を分光
3. 深さ方向の分解能向上のための共焦点顕微鏡

マクロスケールにおける速度およびイオン濃度の同時計測では、粒子および色素の観察のためにレーザを2波長、カメラを2台用いて複雑な光学系を構築していた (Hishida and Sakakibara 2000; 一柳ら, 2003)。一方、マイクロ流路内の観察には、対象を拡大するために蛍光顕微鏡が必要となるため、複雑な光学系の構築は困難を極める。そこで本研究では、Table 3.5 に示す粒径 $1 \mu\text{m}$ の粒子 (Invitrogen Corp.: TransFluoSpheres, Carboxylate-modified microspheres) および Table 3.6 に示す水素イオン濃度に依存して蛍光強度が変化する色素 (Fluorescein: 和光純薬工業株式会社) を選定した。両者の吸収波長帯が重なるためレーザ1波長 (Ar レーザ: 波長 488 nm) で粒子と色素の同時励起が可能となった。

また、選定した粒子と色素の蛍光波長帯は 100 nm 以上離れているため、プリズムにより光学的に分光が可能である。本研究では、3CCD カメラを用いて、内部のプリズムにて3原色 (R, G, B) に分光した。ここで、3CCD カメラのスペクトル感度特性を Figure 3.13 (a) に、また粒子および色素の蛍光発光スペクトル分布を Figure 3.13 (b) に示す。これより、カメラの R 領域で粒子、G 領域で色素を撮像することで2種の蛍光の分光が可能となり、カメラ1台で粒子および色素を同時に撮像することを実現した。それぞれの画像にマイクロ PIV および LIF を施すことで、速度およびイオン濃度分布の同時計測が可能となった。

さらに、深さ方向の分解能向上、および粒子と色素を混入することによる信号対雑音比の向上のために、蛍光顕微鏡に共焦点スキャナを取り付けた (これを共焦点顕微鏡と呼ぶ)。レーザより出射された光は、共焦点スキャナおよび20倍の乾燥系対物レンズを介して、粒子および色素を励起した。蛍光発光は、共焦点スキャナ内のピンホールディスクを通過することで、対物レンズの焦点外れ面の蛍光は除去され、焦点面のみの蛍光が3CCD カメラに撮像可能となった。

なお、深さ方向分解能は式(3.7a)にて定義され、 $5.0 \mu\text{m}$ と見積もられた。計測領域は $434 \mu\text{m} \times 330 \mu\text{m}$ であり、速度分布の空間分解能は $15 \times 15 \mu\text{m}$ (マイクロ PIV の参照窓)、濃度分布計測では $5 \times 5 \mu\text{m}$ (空間平均の大きさ) となった。時間分解能は、3CCD カメラのフレーム間隔に依存しており 55 ms である。

3.3.2 電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法

◆ 概要

電気浸透流速度およびゼータ電位を計測するために本研究にて開発した複合計測法の概要を Figure 3.14 に示す。両者の計測を実現させるために、計測法 (マイクロ PIV)、理論および密閉セルを用いた電気泳動速度計測を複合化した。以下に複合化の方法論を展開する。

マイクロ流路内に電界を印加すると、負に帯電した粒子は電気泳動により正極へ移動し、流体は栓流となって負極へ駆動される (Probstein 1994)。そのため、マイクロ PIV による見かけの粒子速度 U_{obs} は、電気泳動速度 U_{EP} と電気浸透流速度 U_{EOF} の合成速

度となり、次式のように表される (森・岡本 1980a; Oddy and Santiago 2004).

$$U_{obs} = U_{EOF} + U_{EP} \quad (3.16)$$

従って、電気浸透流速度の評価は、あらかじめ電気泳動速度を計測し、見かけの粒子速度から差し引くことで可能となる。本研究では、密閉セルを用いて電気泳動速度を事前に計測することで (計測原理は以下の電気泳動速度および粒子表面ゼータ電位の項を参照、計測法はマイクロ PIV) 電気浸透流速度の計測が可能となった。また、壁面ゼータ電位は電気浸透流速度との線形関係として理論的に表される。この理論式を併用することで壁面ゼータ電位を評価することが可能となった。以上の複合化により、従来の手法では困難であった電気浸透流速度およびゼータ電位の空間分布の計測が実現された。

本計測法は、粒子の電気泳動速度を求めてマイクロ PIV による粒子速度から差し引くため、精度を向上させるためには電気泳動速度の計測精度の向上が重要となる。密閉セルを用いた本手法は、セル内の深さ方向の速度分布を解析することで電気泳動速度の評価を行うため (計測原理の詳細は次項参照)、精度は速度分布の取得方法に依存する。以下に、従来の速度計測法 (MacInnes et al. 2003) および本研究にて実現した計測法 (一柳ら, 2005) の対比を示す。

従来の計測法： レーザドップラ流速計
計測領域は流路全域
速度の分散から速度分布推定

本研究の計測法： マイクロ PIV
深さ方向分解能 2.2 μm を実現
深さ方向に 13 面の速度計測

従来の手法の計測領域は流路全域であったため、得られた情報から速度分布を推定しており精度は極めて低かった。それに対し、本研究ではマイクロ PIV を導入したことで、深さ方向に 13 面の計測が可能となり精緻な速度分布が得られ、精度向上につながった。

◆ 電気泳動速度および粒子表面ゼータ電位

電気泳動速度の計測原理を示す (田中 1979a, 1979b, 1983; 森・岡本 1980a, 1980b). セルに溶液を満たして密閉した後に電界を印加すると、Figure 3.15 に示すように、壁面近傍の溶液が電気浸透流により、陰極側に駆動され流れが生じる。作動流体が非圧縮性の溶液である場合、密閉セル内では電気浸透流により生じる流れを補償するため、密閉セル中心部で陽極側への流れが生じ、還流が形成される。密閉セルのアスペクト比 (密閉セルの幅 / 深さ: k) が 20 以上の場合、密閉セルの幅方向 (Y 方向) は一様な流れで

あると仮定できるため、Figure 3.15 のように流れ方向 (X 方向) と深さ方向 (Z 方向) の 2 次元の還流と見なすことができる。これより、電気浸透流により陰極側へ駆動された流量と陽極側へ駆動された流量が等しくなり、溶液の正味の移動量は 0 と見なすことができる。一方、粒子による電気泳動は深さ方向 (Z 方向) において一様に生じるため、電気浸透流速度の影響を除去することによって電気泳動速度の評価が可能となる。森・岡本 (1980a) は、密閉セル内の電気浸透流速度を理論的に解析し、以下に示す式(3.17) – (3.19) を導出した。セルの上面速度 U_T と下面速度 U_B を用いて、深さ方向に複数の計測面 (XY 平面) において計測された速度 U_{cell} を次式のように無次元化する。

$$U^* = U_{cell} / (U_T + U_B) \quad (3.17a)$$

また、密閉セルの深さ (Z 方向) を $2b$ とし、深さ中心を原点に座標変換し、位置座標 z を無次元化する。

$$z^* = (z - b) / b \quad (3.17b)$$

式(3.17) で無次元化された速度および位置座標 U^* , z^* を用いて、深さ方向に計測された速度分布を、最小二乗法により 2 次曲線として近似する。

$$U^* = K_2 z^{*2} + K_1 z^* + K_0 \quad (3.18)$$

式(3.18) より求められた K_0 , K_2 および密閉セルのアスペクト比 k を次式に代入することで電気泳動速度 U_{EP} が評価できる。

$$U_{EP} = (K_0 + (1/3 + 0.420/k) K_2) (U_T + U_B) \quad (3.19)$$

また、電気泳動速度は式(2.13) に示す Helmholtz-Smoluchowski の式として表される (Probstein 1994)。これを粒子のゼータ電位 ζ_p の式として表すと次式となる。

$$\zeta_p = \frac{\mu}{\epsilon E} U_{EP} \quad (3.20)$$

本章での実験では、作動流体として緩衝溶液を使用している。緩衝溶液のモル濃度が 5

$\times 10^{-3}$ mol/l であるのに対し、水のモル濃度は 55 mol/l と約 10^4 倍の濃度となるため、本研究では誘電率 ϵ および粘性係数 μ に、それぞれ水の誘電率および粘性係数を代入した。以上より、電気泳動速度から粒子のゼータ電位を評価することが可能となる。

◆ 電気浸透流速度および壁面ゼータ電位

マイクロ PIV により計測した見かけの粒子速度 U_{obs} から、電気泳動速度 U_{EP} を差し引くことで、電気浸透流速度 U_{EOF} を評価する。また、電気浸透流速度は式(2.18)に示す Helmholtz-Smoluchowski の式として表され、これを壁面のゼータ電位 ζ_w の式として表すと次式となる。

$$\zeta_w = -\frac{\mu}{\epsilon E} U_{EOF} \quad (3.21)$$

ここで、誘電率 ϵ および粘性係数 μ に、それぞれ水の誘電率および粘性係数を代入することにより、電気浸透流速度から壁面のゼータ電位を評価することが可能となる。また、石英ガラス流路で実験を行い、式(2.10)に示す石英ガラスのゼータ電位を算出する経験式と比較することで、本手法の信頼性が評価できる。

◆ 計測誤差要因の検討

計測誤差につながる以下の4種の要因に関して検討する。

1. 粒子のブラウン運動の電気浸透流速度計測への影響

電気浸透流が定常に達するまでの時間は、次式により評価できる (Oddy and Santiago 2004).

$$\tau_{EOF} = O\left(\frac{d^2 \rho}{\mu}\right) \quad (3.22)$$

ここで、 d は流路径、 ρ は溶液の密度、および μ は粘性係数である。本実験条件では、 $\tau_{EOF} = O(10^{-1})$ と見積もられた。一方、計測システムの時間分解能は $\tau_{Meas} = O(10^{-2})$ であり、電気浸透流の緩和時間よりも1桁オーダー小となる。ここで、計測システムの時間スケール程度においてブラウン運動の移動距離の空間平均が 0 に漸近すれば、ブラウン運動をランダムな運動として扱うことができ電気浸透流の速度計測が可能となる。

空間平均する粒子速度の個数を変化させた際の、主流速度に対する標準偏差を評価するために、モンテカルロ法を用いて粒子のブラウン運動を組み込んだ粒子画像を作成して粒子追跡法 (Particle tracking velocimetry: PTV) を施した。なお、粒子像

を生成する上での各種パラメータは、すべて実験条件と揃えた。作動流体は水、温度 293 K, 粒子径は 0.5 μm , 一様流 (10 pixels/frame) の粒子像を作成した。Figure 3.16 に平均する粒子速度の数を変化させた際の、主流速度に対する標準偏差の比を示す。この結果より、平均する速度ベクトル数が増えるごとに偏差が低減していることが見てとれる。約 500 の粒子速度の平均では 0.03 % となり、本論文にて用いた PIV の誤差率 0.02 % (PIV の誤差が 0.002 pixel で主流が 10 pixel/frame であるため) と同程度となることがわかる。これより、計測システムの時間分解能においてブラウン運動は空間的にランダムな運動として扱うことができるため、粒子を用いた電気浸透流の速度計測が可能となる。

2. 粒子の電気泳動の電気浸透流への影響

粒子が駆動すると粒子周りの電気二重層も移動し、それに伴い電解質溶液のイオン雰囲気も変化する。この電解質溶液の緩和時間 τ_p と電気浸透流速度が定常に達するまでの時間 τ_{EOF} を比較することによって、電気泳動の電気浸透流への影響を評価する。電解質溶液の緩和時間 τ_p は次式にて表される (Oddy and Santiago 2004).

$$\tau_p = O\left(\frac{d_p^2}{D}\right) \quad (3.23)$$

ここで、 d_p は粒子径、 D は溶液の拡散係数である。本実験条件では、 $\tau_p = O(10^{-4})$, $\tau_{EOF} = O(10^{-1})$ と見積もられた。これより、電解質溶液の緩和時間は、電気浸透流の定常までの時間と比して十分短いため、粒子が駆動されたとしても電気浸透流は定常状態を維持する。

3. 密閉セルおよびI字型流路内の電気力線

本評価手法では、電界強度の大きさだけでなく、密閉セルおよびI字型流路内の電気力線も同様であることが必要条件となる。そのため、密閉セルおよびI字型流路内の電気力線を有限要素法 (Commercial code, FEMLAB: Stockholm, Sweden) により解析した結果、計測領域内において一様の分布を示した。

4. ジュール熱の影響

電界を印加することにより生じるジュール熱の影響を評価した。電界を 30 秒間印加したと仮定すると、熱量が 1.1×10^{-8} J, 上昇温度が 2.2×10^{-3} K と見積もられた (Knox and McCormack 1994; Sinton et al. 2004; Shinohara et al. 2005)。これより、上昇温度は非常に小さいため、電界印加によるジュール熱の影響は無視できる。

3.3.3 不確かさ解析

◆ 評価法

本研究で提案した計測法の不確かさを評価するため、以下に解析方法に関して述べる。国際標準化機構の国際文書 GUM (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement, 今井, 1996) に準拠した不確かさ評価を本手法に適用することが困難であったため、アメリカ機械学会編 (1987) による手法を採用した。計測における誤差は、計測値から真値を引いた差として定義でき、全誤差は一定の偏り誤差と偶然誤差 (ばらつき) からなる。偏り誤差は、被計測値の真値と計測値の平均との差で正確度として表される。一方、偶然誤差は、計測の繰り返し過程で観測されるばらつきのことであり、標準偏差の値で定量的に表され、精密度として推定される。本来、計測の不確かさは、すべての計測装置、較正法、データ取得およびデータ処理のすべてにおいて重複され伝播する。従って、計測装置全体の不確かさを求めるためには、すべての誤差要因を含んだ総括正確度 B_m および総括精密度 S_m を求める必要がある。 B_m および S_m は、要素正確度 B_i 、要素精密度 S_i の総括として、それぞれ式(3.24) および式(3.25) のように表され、95% 包括度不確かさ U_{RSS} は B_m 、 S_m および学生数値 t_s を用いて式(3.26) として表される。

$$B_m = \left[\sum B_i^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.24)$$

$$S_m = \left[\sum S_i^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.25)$$

$$U_{RSS} = \left[B_m^2 + (t_s S_m)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.26)$$

◆ 速度およびイオン濃度分布の同時計測法の不確かさ解析

本同時計測法は4章にて用いており、詳細な不確かさ解析は4.3節にて記載する。そのため、ここでは簡単に解析結果をまとめる。マイクロ PIV の計測の不確かさは、計測システム、計測領域の大きさ、粒子径、さらには参照窓の大きさに依存する。そのため、Table 3.7 に4章での計測システムおよびマイクロ PIV の条件を列挙し、Table 3.8 に95% 包括度不確かさおよび代表速度を示す。正確度は PIV による偏り誤差 (Appendix A.2 より 0.002 pixels と評価) および理論速度分布と計測した速度分布との差による偏り誤差から、また精密度は計測した速度の標準偏差より導出し、両者より95% 包括度不確かさを見積もった。この結果より、不確かさは代表速度の5.9% となることがわかった。

一方、LIF によるイオン濃度の二次元分布計測の不確かさは、計測システム、計測領域の大きさ、溶液作製時に使用した pH メーターの誤差、励起光の時間的揺らぎによる誤差、さらには CCD カメラのピクセルごとの感度の揺らぎによる誤差に依存するため、Table 3.7 に計測システムおよび画像処理の条件を併記した。不確かさは、5種の水素イオン濃度の異なる緩衝溶液の蛍光強度を計測し、求めた較正曲線より評価した。正確度

は pH メーターの誤差および励起光の時間的揺らぎによる誤差から、また精密度は較正曲線より再計算した蛍光強度分布と計測した蛍光強度分布の差による標準偏差から見積もった。以上より 95 % 包括度不確かさを評価し Table 3.9 にまとめた。

◆ 電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法の不確かさ解析

本計測法は 5 章および 6 章にて用いており、計測対象により粒子像の撮影条件が異なる。そのため、不確かさ解析は各章ごとに行っており、電気泳動速度および粒子表面のゼータ電位計測に関する詳細は 5.4 節および 6.3 節にて後述し、ここでは簡潔に解析結果のみを示す。Table 3.10 に 5 章および 6 章での計測システムおよびマイクロ PIV の条件を列挙し、Table 3.11 に 95 % 包括度不確かさをまとめた。なお、粒子の電気泳動速度の真値を得ることは困難であるため、実験に使用した計測器 (pH メーターおよび電圧計) の誤差および PIV による偏り誤差 (Appendix A.2 より 0.002 pixels と評価) を正確度とした。精密度は計測された速度の標準偏差より評価し、95 % 包括度不確かさを見積もった。

一方、電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測の不確かさは、Table 3.12 にまとめて表記した (詳細は 5.5 節および 6.4 節参照)。精密度は、電気泳動速度計測と同様に、速度計測の標準偏差より評価した。また、正確度は、PIV の偏り誤差、pH メーターの誤差、電圧計の誤差および電気泳動速度の 95 % 包括度不確かさを加味して見積もった。Table 3.12 より、不確かさは代表速度の 6.1 % 以下となることが明らかとなった。

Table 3.1. Axial resolution of epi-fluorescent microscope

NA	[-]	0.75	1.3	1.4
Axial resolution ($\lambda_{em} = 515$ nm)	[nm]	343	198	184
Axial resolution ($\lambda_{em} = 560$ nm)	[nm]	373	215	200
Axial resolution ($\lambda_{em} = 645$ nm)	[nm]	430	248	230

Table 3.2. Depth of field and measurement depth when the emission wavelength is (a) 515 nm, (b) 560 nm and (c) 645 nm

(a) When the emission wavelength, λ_{em} , is 515 nm and the pixel size, e , is 9.9 μm .

Refractive index, n	[-]	1.515 (Oil)	1.515 (Oil)	1 (Air)
Magnification, M	[-]	60	40	20
Numerical aperture, NA	[-]	1.4	1.3	0.75
Depth of field	[μm]	0.58	0.75	1.58
Measurement depth ($d_p = 0.5$ μm)	[μm]	2.14	2.53	4.20
Measurement depth ($d_p = 1$ μm)	[μm]	3.09	3.68	5.65

(b) When the emission wavelength, λ_{em} , is 560 nm and the pixel size, e , is 9.9 μm .

Refractive index, n	[-]	1.515 (Oil)	1.515 (Oil)	1 (Air)
Magnification, M	[-]	60	40	20
Numerical aperture, NA	[-]	1.4	1.3	0.75
Depth of field	[μm]	0.61	0.79	1.66
Measurement depth ($d_p = 0.5$ μm)	[μm]	2.25	2.65	4.44
Measurement depth ($d_p = 1$ μm)	[μm]	3.19	3.80	5.89

(c) When the emission wavelength, λ_{em} , is 645 nm and the pixel size, e , is 9.9 μm .

Refractive index, n	[-]	1.515 (Oil)	1.515 (Oil)	1 (Air)
Magnification, M	[-]	60	40	20
Numerical aperture, NA	[-]	1.4	1.3	0.75
Depth of field	[μm]	0.68	0.87	1.81
Measurement depth ($d_p = 0.5$ μm)	[μm]	2.44	2.88	4.89
Measurement depth ($d_p = 1$ μm)	[μm]	3.39	4.03	6.34

Table 3.3. Optical parameters, axial resolution and optical slice thickness of confocal microscope

Excitation wavelength, λ_{ex}	[nm]	488	488	488
Emission wavelength, λ_{em}	[nm]	515	515	645
Mean wavelength, $\bar{\lambda}$	[nm]	502	502	550
Refractive index, n	[-]	1.515 (Oil)	1 (Air)	1 (Air)
Numerical aperture, NA	[-]	1.3	0.75	0.75
Magnification, M_0	[-]	40	20	20
Pinhole diameter, d_{pin}	[μm]	50	50	50
AU	[μm]	0.46	0.79	0.79
PD	[μm]	1.25	2.5	2.5
Axial resolution, Δx_C	[μm]	0.58	1.27	1.27
Optical slice thickness, Δz_{OST}	[μm]	2.15	4.90	5.00

Table 3.4. Overview of dye behavior (Coppeta and Rogers 1998)

Dye	Peak value (Abs/Em)* ¹	pH-dependent absorption	Temperature dependent adsorption	Temperature dependent emission
Fluorescein	488/514	5–9	Yes	2.43 % per °C, Ex* ² = 514 –0.16 % per °C, Ex = 488
HPTS	455/520	6–9	Yes	1.21 % per °C, Ex = 488 High uncertainty
Lucifer Yellow	400/560	None over pH range 3–10	Not tested	Not tested
Rhodamine B	560/585	Below 6	Yes	–1.54 % per °C, Ex = 514
Sulforhodamine	585/607	None over pH range 3–10	Minimal	0.22 % per °C, Ex = 514
Liton red	565/592	None over pH range 3–10	Yes	–1.55 % per °C, Ex = 514
Phloxine B	540/564	None over pH range 4–9	Yes	0.53 % per °C, Ex = 514
LDS 698	435/687	Below 6	Yes	–1.24 % per °C, Ex = 488
1-4 DHPN	Acid 366/453 Base 402/483	6–9	Yes	–1.1 % per °C Excitation blacklight

*1 Abs/Em (Absorption wavelength [nm] / Emission wavelength [nm])

*2 Ex (Excitation wavelength [nm])

Table 3.5. Properties of fluorescent particles

Material		Polystyrene
Number mean diameter	[μm]	1.0
Density	[g/cm^3]	1.055
Absorption wavelength	[nm]	488
Emission wavelength	[nm]	645
Optical slice thickness ‡	[μm]	5.0

‡The optical slice thickness was calculated from equation 3.7a.

Table 3.6. Properties of fluorescent dye

Material		Fluorescein
Molecular weight	[g/mol]	376.28
Absorption wavelength	[nm]	494
Emission wavelength	[nm]	518
Optical slice thickness ‡	[μm]	5.0

‡The optical slice thickness was calculated from equation 3.7a.

Table 3.7. List of measurement systems and micro-PIV and LIF conditions in chapter 4

Measurement technique		Micro-PIV	LIF
Microscope		CM* ¹	CM* ¹
Camera		3CCD	3CCD
Pixel size	[μm]	12.9	12.9
Magnification of Objective lens	[–]	20	20
Magnification of system	[–]	20	20
Refractive index	[–]	1	1
Particle diameter	[μm]	1	–
Excitation wavelength	[nm]	488	494
Emission wavelength	[nm]	645	518
Depth resolution	[μm]	5.0* ²	5.0* ²
Frame interval	[ms]	55	55
Interrogation window size	[pixels]	24 × 24	–
Average number of velocity-vectors	[–]	100	100
Spatial averaging size* ³	[pixels]	–	8 × 8

*1 CM is the confocal microscope.

*2 Depth resolution is calculated from equation 3.7a.

*3 For eliminating the effect of fluctuation of pixel.

Table 3.8. Measurement uncertainty in 95 % confidence level of micro-PIV and bulk velocity in chapter 4

Bias index	B_m	[$\mu\text{m/s}$]	± 1.9
Precision index	S_m	[$\mu\text{m/s}$]	± 1.6
Measurement uncertainty	U_{RSS}	[$\mu\text{m/s}$]	± 3.8
Bulk velocity		[$\mu\text{m/s}$]	64.3
Error ratio		[%]	5.9

Table 3.9. Measurement uncertainty in 95 % confidence level of laser induced fluorescence using the single calibration in chapter 4

Bias index	B_m	[-]	$\pm \text{pH } 0.09$
Precision index	S_m	[-]	$\pm \text{pH } 0.04$
Measurement uncertainty	U_{RSS}	[-]	$\pm \text{pH } 0.11$

Table 3.10. List of measurement systems and micro-PIV conditions in chapters 5 and 6

Chapter		5	6
Microscope		EM* ¹	CM* ²
Camera		CCD	CCD
Pixel size	[μm]	9.9	9.9
Magnification of Objective lens	[–]	40	40
Magnification of system	[–]	24	24
Refractive index	[–]	1.515	1.515
Particle diameter	[μm]	0.5	0.5
Excitation wavelength	[nm]	505	505
Emission wavelength	[nm]	515	515
Depth resolution	[μm]	2.5* ³	2.2* ⁴
Frame interval	[ms]	37	37
Interrogation window size	[pixels]	50 × 50	40 × 40
Average number for velocity-vectors	[–]	100	100

*1 EM is the epi-fluorescent microscope.

*2 CM is the confocal microscope.

*3 Depth resolution is calculated from equation 3.4.

*4 Depth resolution is calculated from equation 3.7a.

Table 3.11. List of measurement uncertainties in 95 % confidence level of electrophoretic velocity and zeta-potential of particles in chapters 5 and 6

Chapter			5	6
Bias index	B_m	[$\mu\text{m/s}$]	$\pm 2.6 \times 10^{-1}$	$\pm 4.5 \times 10^{-1}$
Precision index	S_m	[$\mu\text{m/s}$]	± 3.1	± 2.9
Measurement uncertainty	U_{RSS}	[$\mu\text{m/s}$]	$\pm 6.8^{*1}$	± 5.8
Measurement uncertainty	U_{RSS}	[$\times 10^{-3} \text{ V}$]	$\pm 4.4^{*1}$	± 1.9

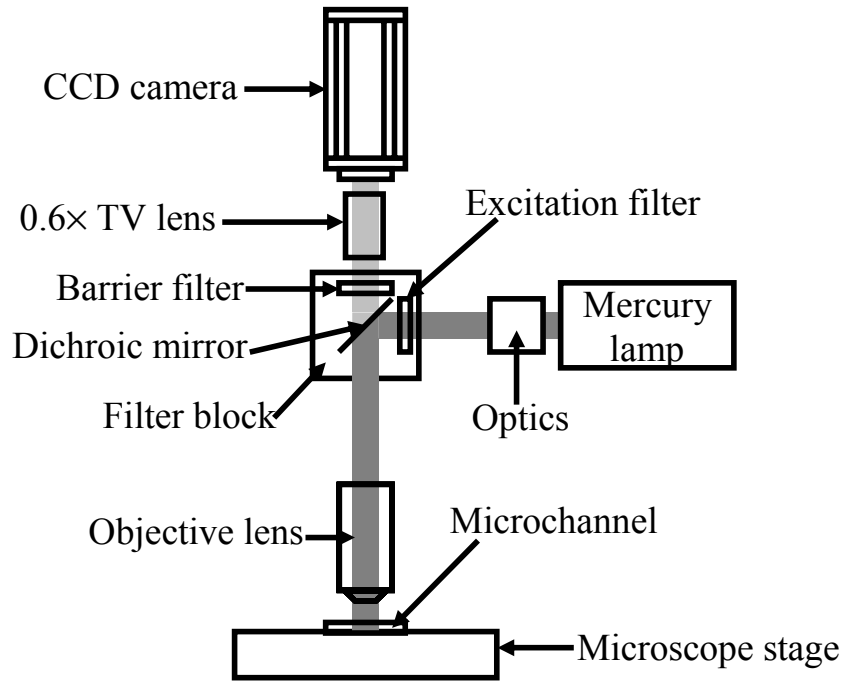
*1 Maximum value in chapter 5.

Table 3.12. List of measurement uncertainties in 95 % confidence level of electroosmotic flow velocity and zeta-potential at wall surface in chapters 5 and 6

Chapter			5	6
Bias index	B_m	[$\mu\text{m/s}$]	± 6.8	± 5.9
Precision index	S_m	[$\mu\text{m/s}$]	$\pm 1.9 \times 10^{-1}$	± 3.6
Measurement uncertainty	U_{RSS}	[$\mu\text{m/s}$]	$\pm 6.8^{*1}$	± 9.4
Measurement uncertainty	U_{RSS}	[$\times 10^{-3} \text{ V}$]	$\pm 4.4^{*1}$	± 3.0
Bulk velocity		[$\mu\text{m/s}$]	111	223
Error ratio		[%]	6.1	4.2

*1 Maximum value in chapter 5.

(a) Epi-fluorescent microscope



(b) Inverted epi-fluorescent microscope

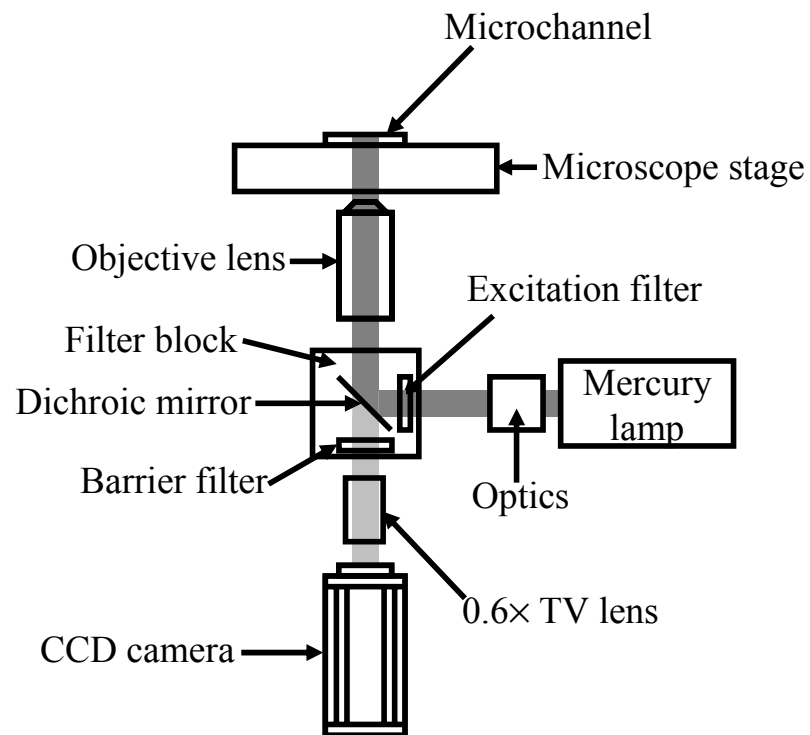


Figure 3.1. Schematic of the measurement system using (a) epi-fluorescent microscope and (b) inverted epi-fluorescent microscope.

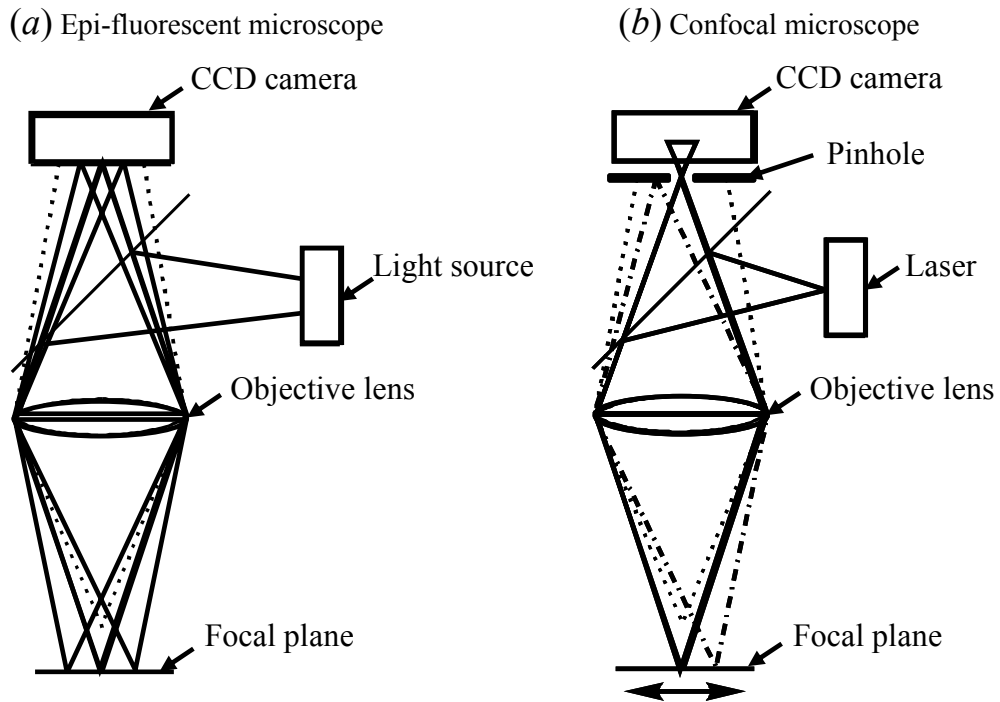


Figure 3.2. Schematic concept of (a) epi-fluorescent microscope and (b) confocal microscope.

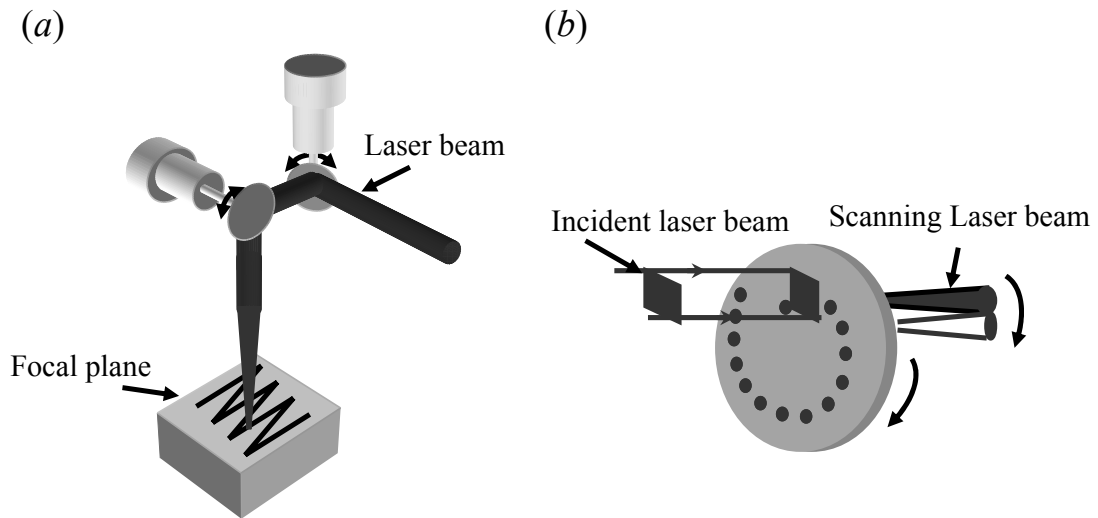


Figure 3.3. Schematic of (a) Galvano mirror scan and (b) Nipkow-disc scan.

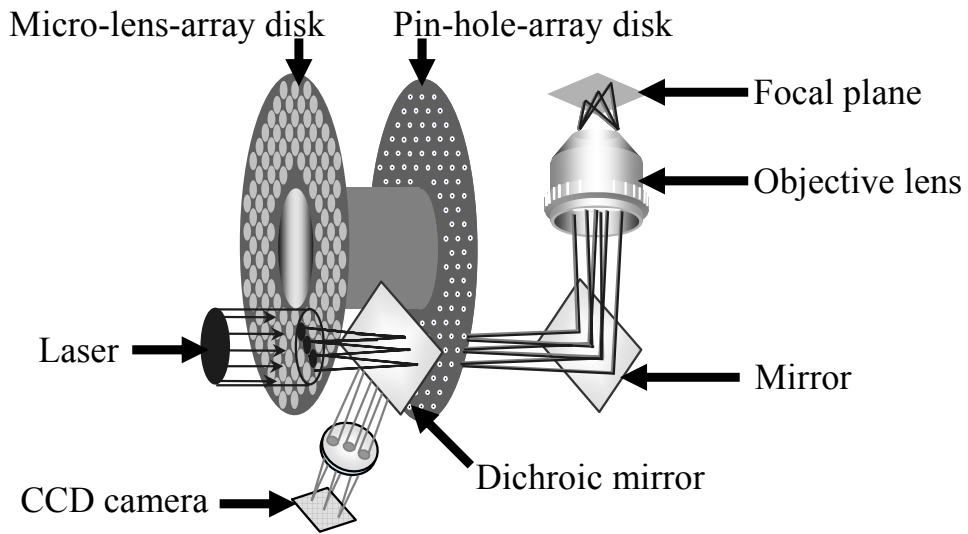


Figure 3.4. Schematic of Nipkow-disc with micro-lens-array disc.

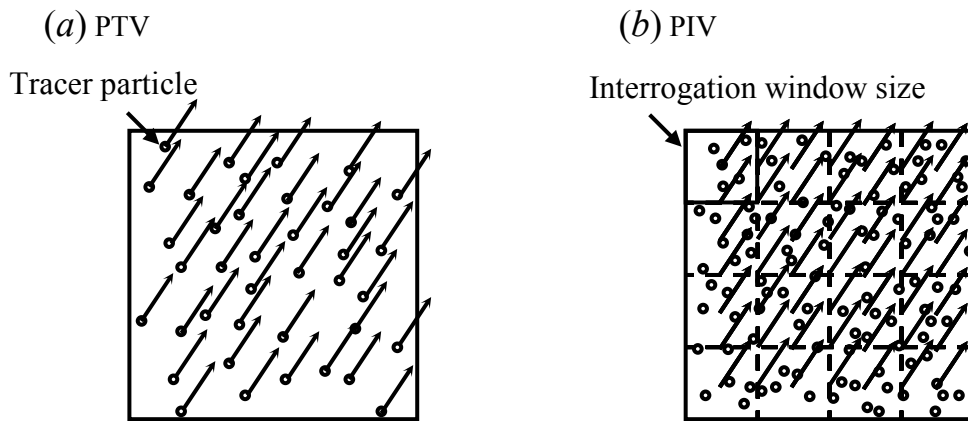


Figure 3.5. (a) Particle tracking velocimetry and (b) particle image velocimetry.

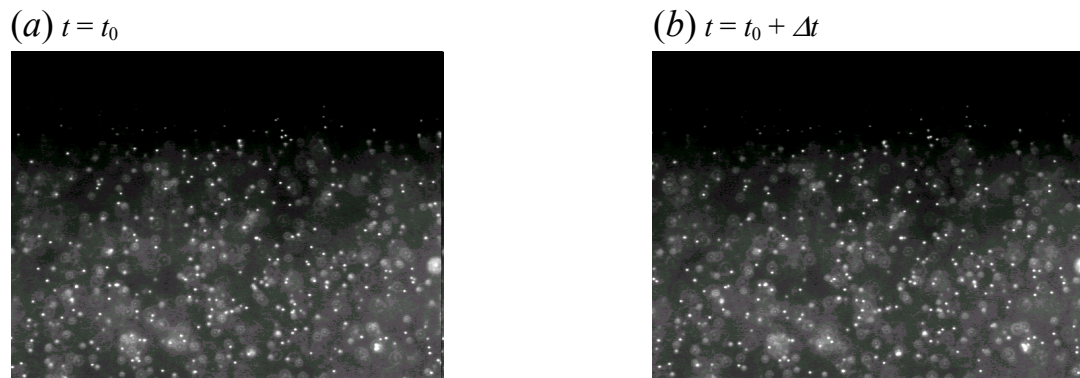


Figure 3.6. Sample particle images at (a) $t = t_0$, (b) $t = t_0 + \Delta t$.

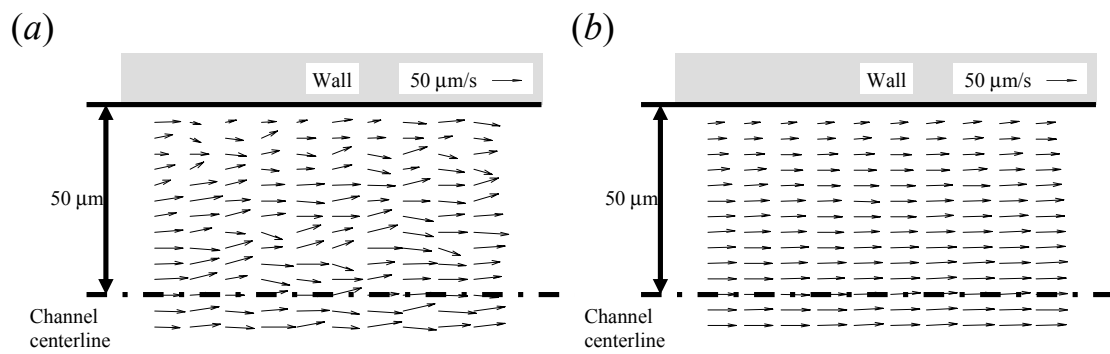


Figure 3.7. (a) Instantaneous velocity-vector field in a microchannel and (b) time-averaged velocity-vector field in a microchannel.

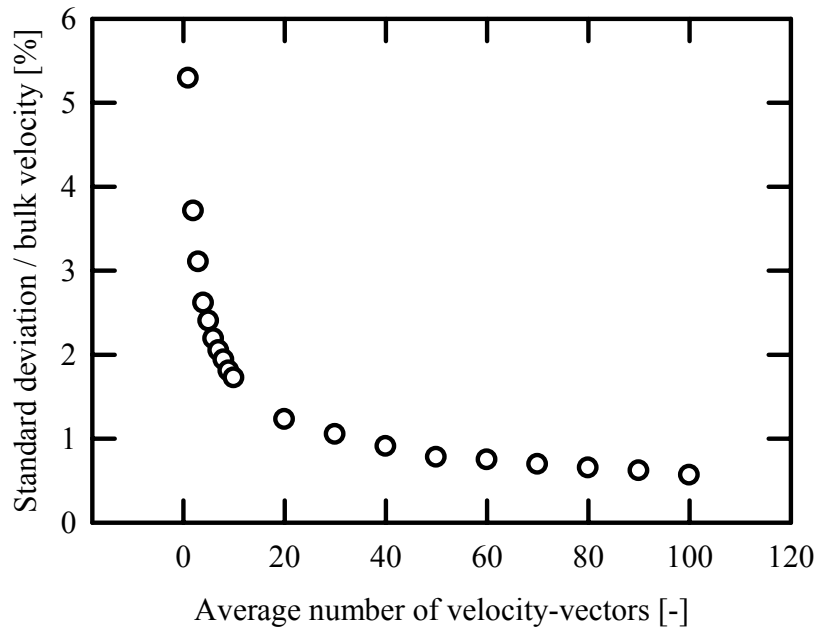


Figure 3.8. Ratio between standard deviation and bulk velocity affected by average number of velocity-vectors.

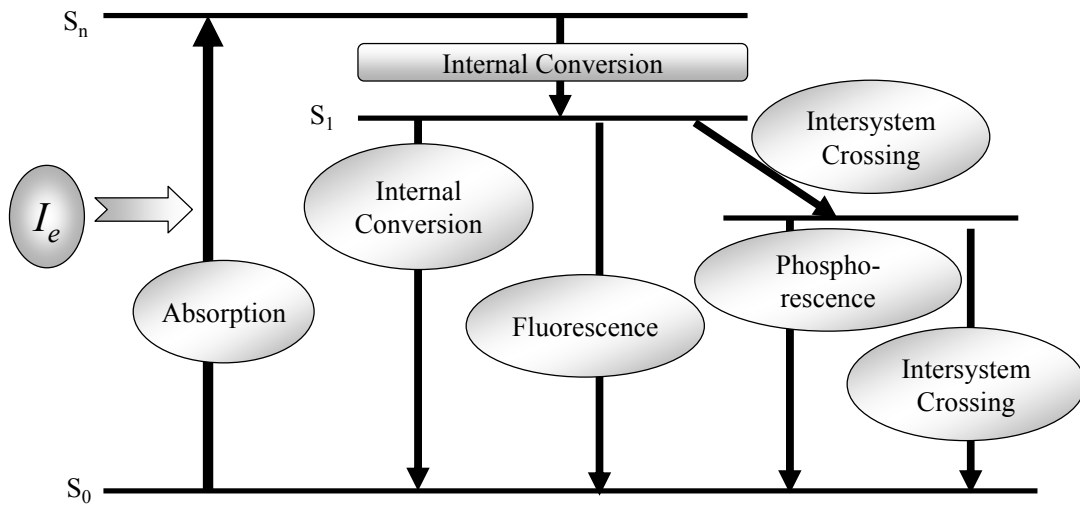


Figure 3.9. Process from absorption to fluorescence and phosphorescence.

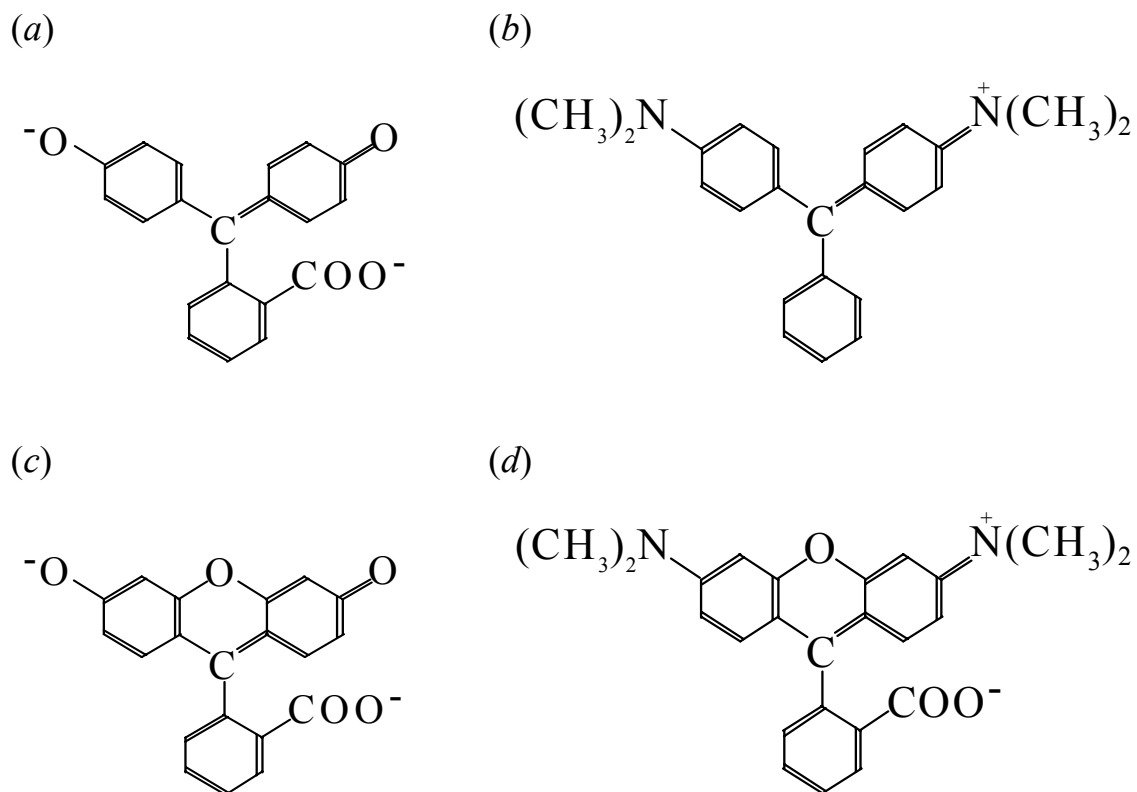


Figure 3.10. Relationship between the chemical structure and fluorescence. (a) Phenolphthalein and (b) malachite green have no fluorescence. (c) Fluorescein and (d) rhodamine B have fluorescence because the chemical structures of fluorescein and rhodamine B have the conjugate double bond.

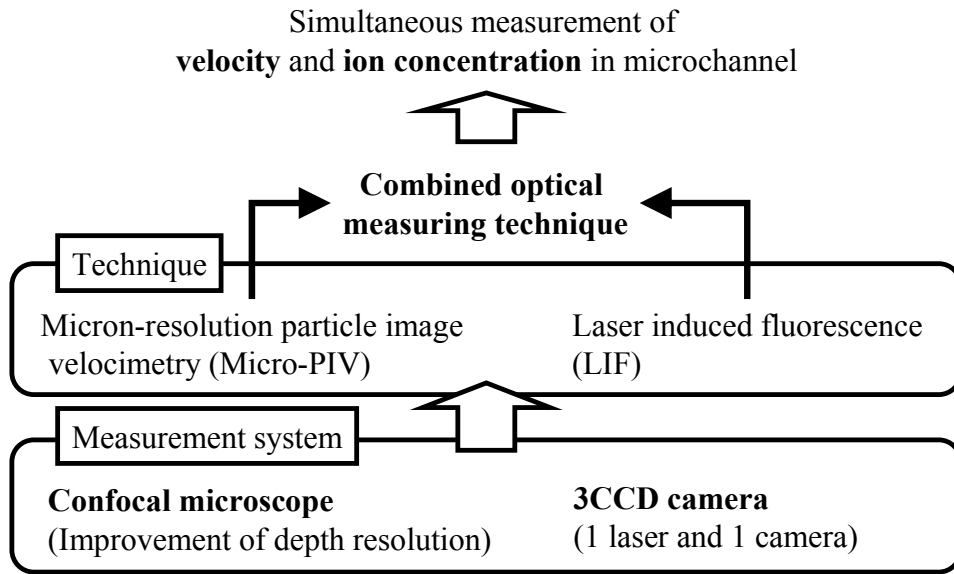


Figure 3.11. Concept of combined optical measurement of velocity and ion concentration in microchannel.

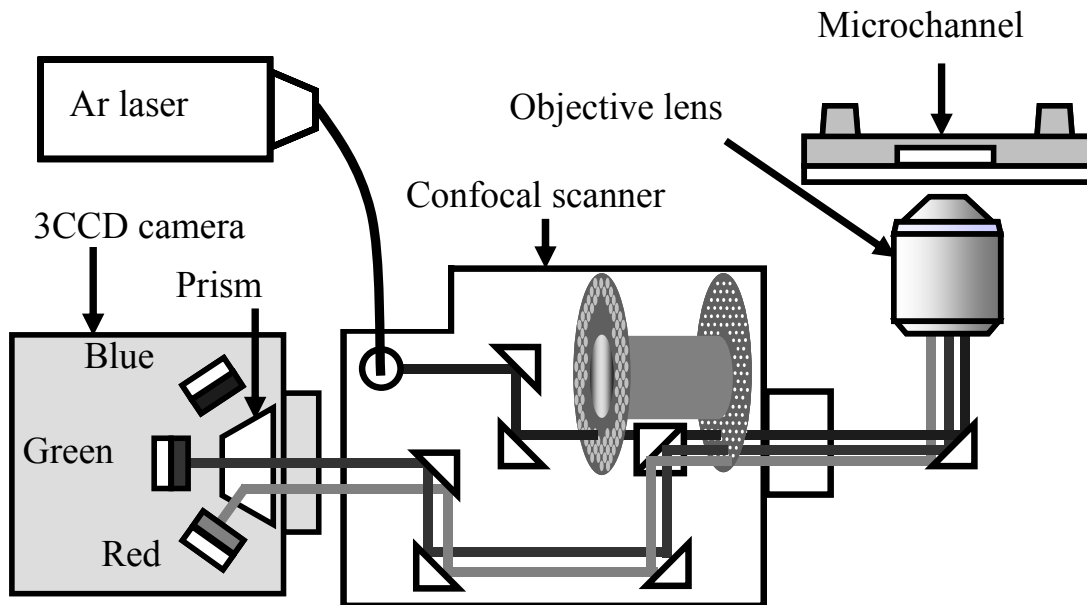


Figure 3.12. Schematic of the measurement system using the confocal microscope which is comprised of the epi-fluorescent microscope and the confocal scanner.

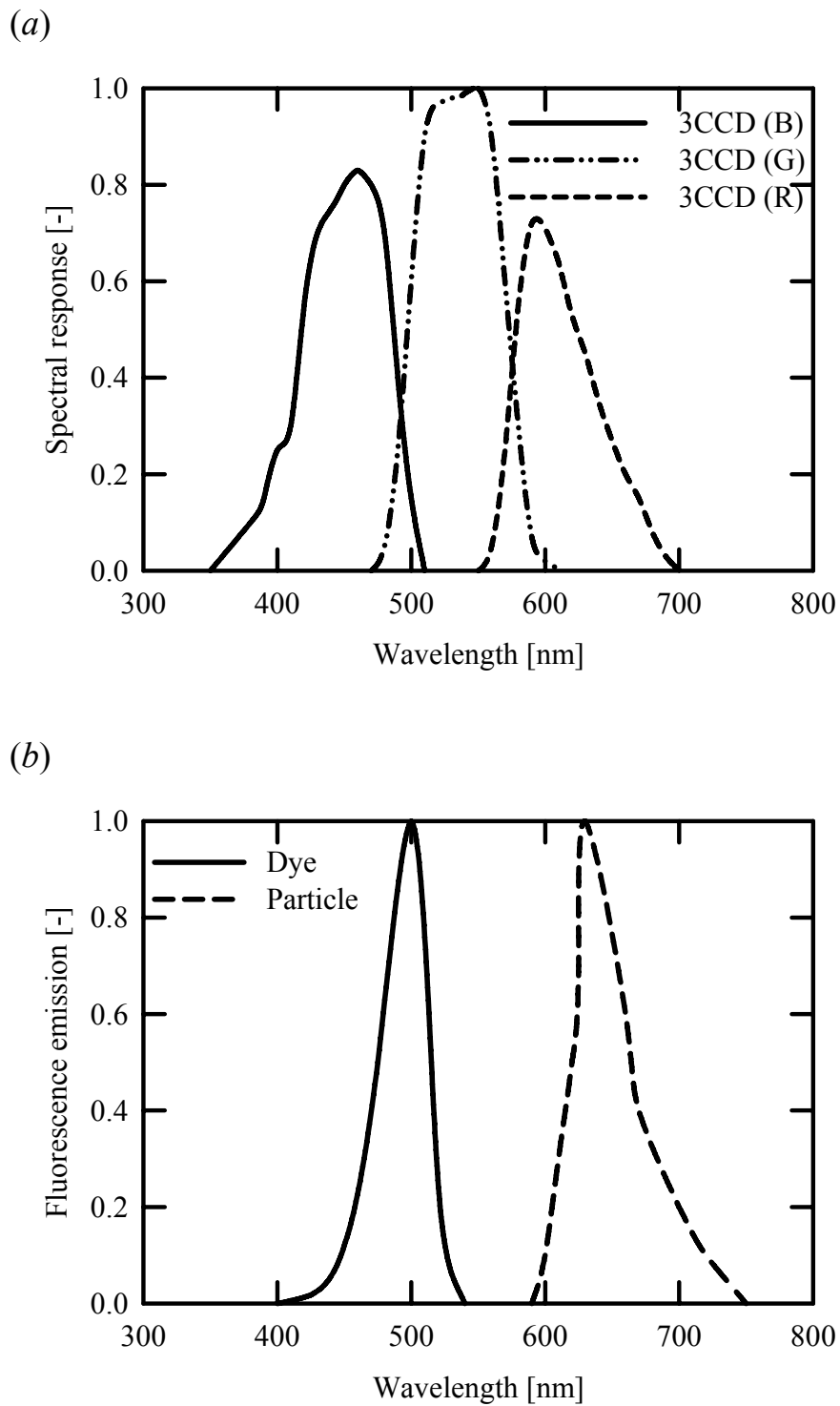


Figure 3.13. (a) Spectral response of the 3CCD color camera and (b) spectrum of fluorescent particles and dye.

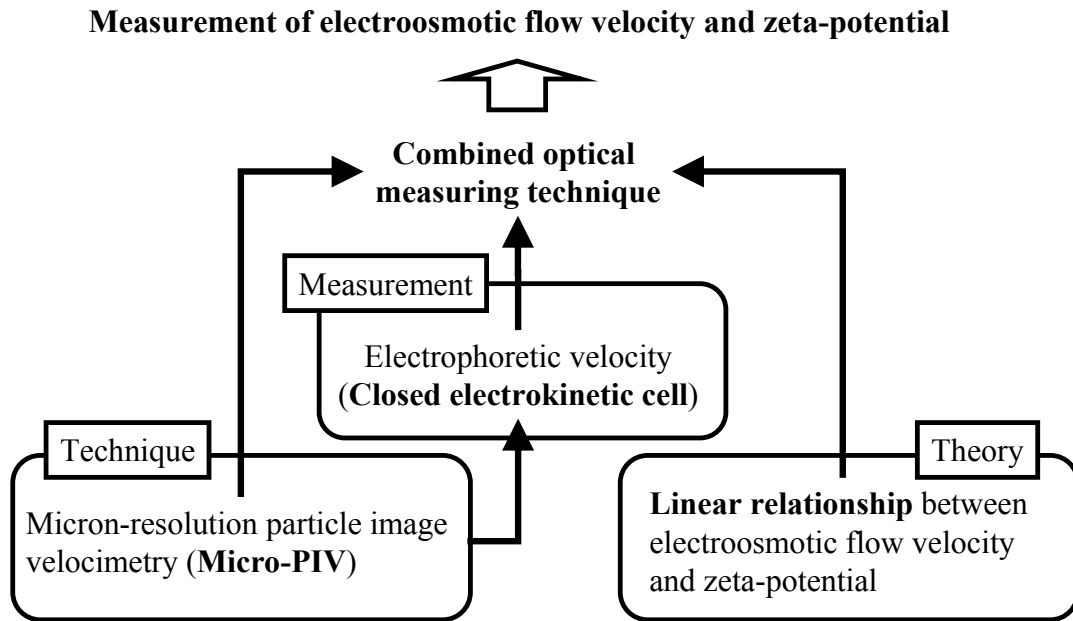


Figure 3.14. Concept of combined optical measurement of electroosmotic flow velocity and zeta-potential in microchannel.

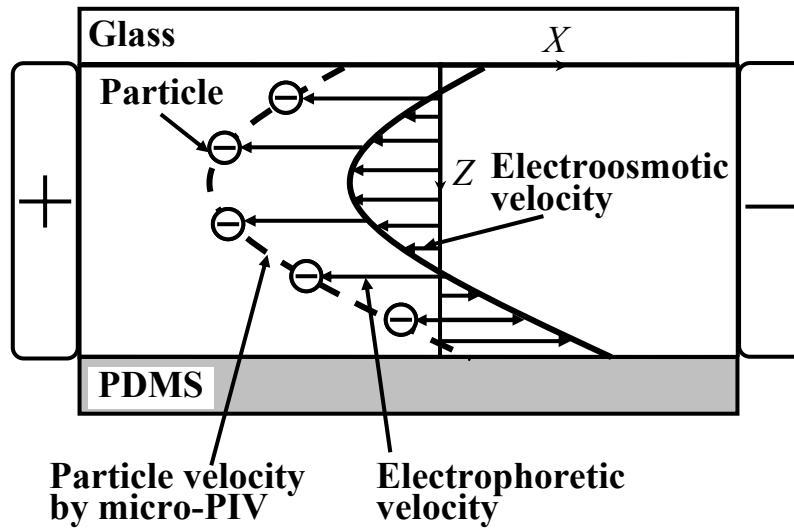


Figure 3.15. Schematic of electroosmotic flow and electrophoresis in a closed electrokinetic cell.

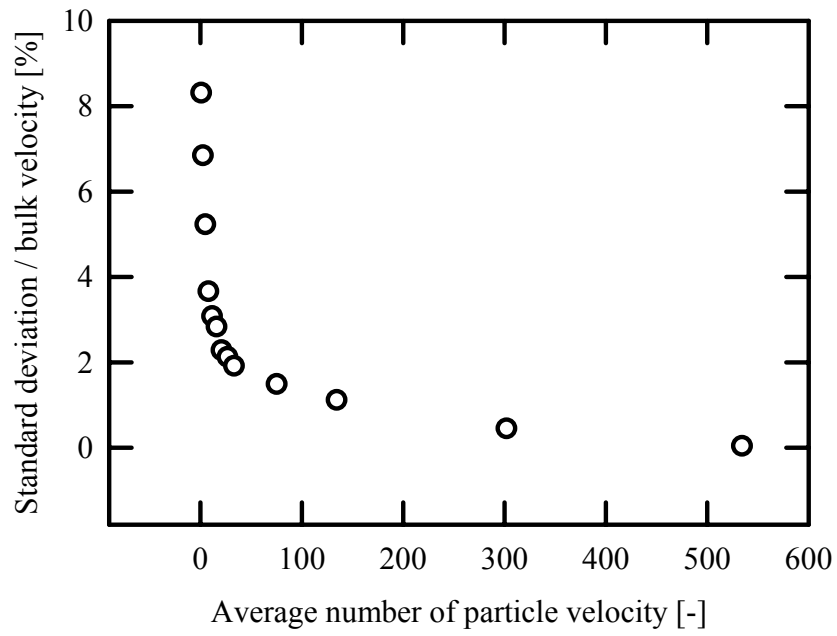


Figure 3.16. Ratio between standard deviation and bulk velocity affected by average number of particle velocities.

第4章
速度およびイオン濃度分布の同時計測

4.1 はじめに

マイクロ流体デバイスとは既存の大型化学分析機器や化学反応器を超小型化したものであり、幅数十 – 数百 μm の流路が多数配置され、流体の混合や化学反応といった操作が行われている。この種のデバイスにおける従来の混合の評価は、ペクレ数を用いて対流や拡散といった支配的要因を大まかに判断するのみであった。それに対し、空間的な混合輸送の評価（物質輸送方程式の評価）が可能となれば、将来的には混合物質の局所拡散制御や反応の促進や抑制につながり、デバイスの性能向上や革新的な機能の付加に寄与する。本章では、3.3.1節で開発した流体の速度（マイクロPIV）およびイオン濃度（LIF）の同時計測法を用いて、空間的な物質輸送を評価することを目的とする。対象とする流れ場は、水素イオンの単純な混合場と、溶液の緩衝作用による水素イオンの生成や消滅を伴う化学反応場である。これら2種の流れ場に対し、数値解析との比較を行うことで計測法の信頼性を評価し、最後に物質輸送方程式に記述される対流および拡散の空間分布を評価した。

4.2 実験条件

本章で使用した蛍光粒子、蛍光色素および計測装置概要は3.3.1節にて記載したため、本節では作動流体およびマイクロ流路に関して述べる。

4.2.1 作動流体

水素イオン濃度と蛍光強度の較正曲線を求めるための実験（以下、較正実験という）、水素イオンの混合場の実験（以下、混合場という）および溶液の緩衝作用による化学反応場の実験（以下、化学反応場という）で使用した作動流体を以下に列挙する。なお、全ての溶液に、体積比率0.05%で蛍光粒子（Table 3.5）を、また100 $\mu\text{mol/l}$ の蛍光色素（Table 3.6）を混入した。

1. **較正実験：** リン酸緩衝溶液（pH 6.0, 6.5, 6.9, 7.2, 7.7）
（リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムの混合比を変化させることにより作製）
2. **混合場：** イオン交換水（pH 6.2）、リン酸水素二ナトリウム（pH 7.2）
3. **化学反応場：** リン酸緩衝溶液（pH 6.0）、リン酸緩衝溶液（pH 7.7）

4.2.2 マイクロ流路

Figures 4.1 および 4.2 に, I 字型および T 字型流路の概要図を示す. これらの流路は, ソフトリソグラフィ法 (Xia and Whitesides 1998, 2.4.2 節) によりポリジメチルシロキサン (poly(dimethylsiloxane): PDMS) (信越化学工業株式会社, KE-1606) にて作製し, ボロシリケートカバーガラス (松浪硝子株式会社, 厚さ 170 μm) を貼り合せて作製された. 流路端には, リザーバとして, プラスチックの円筒 (直径 10 mm, 高さ 12 mm) をエポキシ系接着剤により接着した. 注入口および出口の水頭差を設けることにより溶液を駆動させた. なお, 流れ方向を X 方向, 流路幅方向を Y 方向および深さ方向を Z 方向とする.

4.3 較正および不確かさ解析

本節では, pH 値と蛍光強度の較正曲線を求め, さらに速度計測および pH の二次元分布計測の不確かさ評価を行った.

4.3.1 速度計測手法

マイクロ PIV の不確かさを評価するため, 静圧駆動流動場を計測した. 作動流体には pH 6.9 のリン酸緩衝溶液を用意し, 実験流路は Figure 4.1 に示す I 字型流路を用いた. リザーバ間に 0.5 mm の水頭差を設けることにより, 静圧駆動流を発生させた. 粒子画像は, 深さ方向 5 面の位置 ($z = 5, 10, 15, 20$ および 25 μm) にて, 3CCD カメラにより撮像した. PIV の参照窓の大きさは, 15.48 $\mu\text{m} \times 15.48 \mu\text{m}$ (24 \times 24 pixels) である. なお, 流動場の定常性は, マイクロ PIV 計測を繰り返し行い, 速度分布が変わらないことより確認した.

Figure 4.3 は, 流路幅方向 (Y 方向) に対する $z = 5 \mu\text{m}, 25 \mu\text{m}$ での速度分布を示しており, 併記したエラーバーは標準偏差を示している. 実線で示される台形型の速度分布は, 式(2.4) より算出した理論上の速度分布であり, マイクロ PIV 計測と良好な一致を示している (平均偏り誤差 1.9 $\mu\text{m/s}$). なお, 不確かさ解析のためには, 正確度 (式(3.24)) および精密度 (式(3.25)) を求める必要がある. 正確度は, PIV による偏り誤差 B_1 (Appendix A.2 より 0.002 pixels と評価) と, 理論速度分布と計測した速度分布との差による偏り誤差 B_2 から見積もった. 一方, 精密度は計測した速度の標準偏差より導出した. 以上より, マイクロ PIV 計測での要素正確度, 要素精密度, 総括正確度, 総括精密度および 95 % 包括度不確かさを評価し Table 4.1 にまとめた. なお, 代表速度が 64.3 $\mu\text{m/s}$ であるため, 不確かさは 6 % 以下となる.

4.3.2 pH の二次元分布計測手法

LIF による pH の二次元分布計測の不確かさを評価するため、静圧駆動流動場における pH と蛍光強度の関係 (較正曲線) を求めた。計測システムおよびマイクロ流路は、4.3.1 節のマイクロ PIV の不確かさ解析時と同様のものを用いた。作動流体は、4.2.1 節に示したように pH 6.0, 6.5, 6.9, 7.2 および 7.7 の 5 種のリン酸緩衝溶液を用意し、蛍光色素はそれぞれ 100 $\mu\text{mol/l}$ 混入した。蛍光色素画像は、 $z = 25 \mu\text{m}$ (深さ方向中心位置) にて、3CCD カメラにより撮像した。なお、3CCD カメラの素子ごとの感度の揺らぎの影響を除去するために、取得した画像に 8×8 pixels の空間平均操作を施した。

Figure 4.4 に示す計測領域内 5 点での蛍光強度と pH の関係を Figure 4.5 に示す。レーザー光の空間的な強度分布の不均一性の影響により、各点での較正曲線は異なった曲線となっている。この影響を除去するために、pH 6.9 での蛍光強度分布を参照強度 I_{ref} として、式(3.14) に示すように正規化を行った結果を Figure 4.6 に示す。これより、励起光強度分布による誤差が抑制され、各点における較正曲線が一致しているのがわかる。なお、正規化された蛍光強度分布 I_c の標準偏差より、励起光の時間的な揺らぎによる誤差は 2.18 % と見積もられた。

LIF 計測では、ピクセルごとに pH を較正する手法 (以下、全点較正法とよぶ) および計測面内の正規化された蛍光強度分布を平均して較正曲線を導出する手法 (以下、平均較正法とよぶ) の 2 種法に対し不確かさ解析を行い、Table 4.2 にまとめた。なお、較正曲線は、両手法とも最小二乗法により 1 次関数として近似した。統括正確度 B_m は、pH メーターの誤差 B_1 および励起光の時間的な揺らぎによる誤差 B_2 から評価し、両手法ともに pH 0.09 と見積もられた。一方、精密度は、較正曲線より再計算した蛍光強度分布 (計測面内が一様な pH 分布と仮定する) と計測した蛍光強度分布の差による標準偏差から見積もった。以上より不確かさを評価したところ、両手法ともに pH 0.11 と評価され、差は見られなかった。本研究ではより簡易な平均較正法を採用し Figure 4.7 に示した。図中の実線が、平均した蛍光強度より導出された較正曲線である。また、Table 4.2 から明らかなように、不確かさの主たる要因は励起光の時間的な揺らぎによる誤差である。そのため、安定性の高いレーザーを用意するか、または蛍光強度分布計測と同時に励起光分布を計測し時系列かつ計測面内全点で較正をすることによって、精度は格段に向上すると期待される。

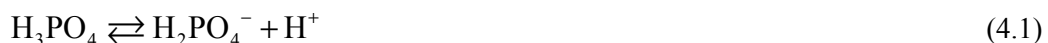
4.4 速度および pH の二次元分布

水素イオンの混合過程の知見を得るため、二流体混合流動場の速度および pH の二次元分布の可視化を行った。Figure 4.2 に示す T 字型流路の注入口 A および B より等流量で溶液を流し、ジャンクション部の $y = 200 \mu\text{m}$ にて液液界面を形成させた。実験は、4.2.1 節に示すように混合場および化学反応場の 2 条件行い、代表速度およびレイノルズ数は

Table 4.3 にまとめた. 混合場では, 注入口 A より pH 6.2 のイオン交換水, 注入口 B より pH 7.2 のリン酸水素二ナトリウムを流した. 一方, 化学反応場では, 注入口 A および B にそれぞれ pH 6.0, 7.7 のリン酸緩衝溶液を注入した. ここで, 化学反応 (本章では緩衝作用によるもの) によるジュール熱の蛍光強度への影響を評価する. Fukada and Takahashi (1998) の報告では, リン酸緩衝溶液の熱量は $5.12 \times 10^3 \text{ J/mol}$ である. そのため, 上昇温度は $1.2 \times 10^{-2} \text{ K}$ (Shinohara et al. 2005) と見積もられた. これより, 上昇温度は非常に小さいため, 化学反応によるジュール熱の影響は無視できる.

蛍光粒子および色素の画像は, Figure 4.2 に示すジャンクション部および下流部 (ジャンクション部から $400 \mu\text{m}$ 下流) にて, それぞれ深さ方向 5 面 ($z = 5, 10, 15, 20$ および $25 \mu\text{m}$) トラバースして撮像された. なお, マイクロ PIV にて時間平均を施すため, 各計測面においてそれぞれ 100 時刻 (5.5 s) 撮像した. また, 励起光強度分布の不均一性の影響を除去するため, 参照の蛍光強度分布 I_{ref} も各位置にて計測し, 式(3.14) および Figure 4.7 に示す較正曲線を用いて pH の二次元分布を求めた. Figure 4.8 (a) は混合場におけるジャンクション部 ($x = 0 \mu\text{m}$) の $z = 15 \mu\text{m}$ 位置での速度ベクトルおよび pH の二次元分布を示し, Figure 4.8 (b) は下流部 ($x = 400 \mu\text{m}$) を示す. なお, 図中の矢印が速度ベクトルで, 等高線図が pH の二次元分布である. ジャンクション部における速度ベクトルは $y = 200 \mu\text{m}$ の液液界面を向き, pH の二次元分布は流路幅方向 (Y 方向) に pH 6.2 – 7.2 の濃度勾配が形成されていることが確認できる. 下流部では全ての速度ベクトルは下流を向き, pH 6.6 – 7.0 の濃度勾配が形成されていることがわかる. また, Figure 4.9 は, $x = 200 \mu\text{m}$ および $400 \mu\text{m}$ の pH 分布を示しており, 下流部での pH 勾配はジャンクション部での勾配よりも小となることがわかる. 以上の実験結果は, 流路幅方向の分子拡散の影響により生じた現象を表していると推察される.

Figure 4.10 (a) は化学反応場におけるジャンクション部の $z = 15 \mu\text{m}$ 位置での速度ベクトルおよび pH の二次元分布を, Figure 4.10 (b) は下流部を示す. また, Figure 4.11 は $x = 200 \mu\text{m}$ および $400 \mu\text{m}$ の pH 分布を示す. Figure 4.10 の速度分布は, ジャンクション部では $y = 200 \mu\text{m}$ の液液界面を向き, 下流部では全てのベクトルが下流方向を向いている. そのため, 化学反応場の速度分布は, 混合場の分布 (Figure 4.8) と同様の傾向を示している. 一方, Figure 4.11 の下流部における pH 勾配は, ジャンクション部とほぼ同様の勾配を有する. そのため, 下流部での勾配がジャンクション部と比して小となる混合場 (Figure 4.9) とは様相を異にする. この結果は, 以下に示す混合場では生じないリン酸緩衝溶液の平衡反応 (緩衝作用) に起因した現象と考えられる.



$y < 200 \mu\text{m}$ での水素イオンは濃度勾配により $y > 200 \mu\text{m}$ へ拡散するが, 上述の平衡反応 (右方向への平衡) により $y < 200 \mu\text{m}$ では水素イオンの生成が生じる. 一方, $y > 200 \mu\text{m}$

では拡散の影響により水素イオンの数が増大するが、それと同時に左方向への平衡反応により水素イオンの数は減じられる。以上の関係より、水素イオンの流路幅方向への拡散現象は生じるものの、上流および下流側での水素イオンの総数がほぼ同数となるため、化学反応場でのジャンクション部と下流部の pH 勾配がほぼ同様になったと考えられる。

4.5 数値解析による水素イオン濃度勾配の評価

Figures 4.8 および 4.10 の水素イオン濃度勾配を評価するため、実験結果および数値解析結果を比較した。数値解析による濃度分布は、マイクロ PIV により計測された速度分布を物質輸送方程式に代入することで求めた。物質輸送方程式 (Patankar 1980) は、次式に示すように化学反応による生成項なし並びに非圧縮性流体とした。

$$\frac{\partial c}{\partial t} + U \frac{\partial c}{\partial x} + V \frac{\partial c}{\partial y} + W \frac{\partial c}{\partial z} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (4.2)$$

ここで、 U は流れ方向速度、 V は流路幅方向速度、 W は深さ方向速度、 c は水素イオン濃度、および D は水素イオンの拡散係数である。式(4.2) は中心差分法により離散化されており (詳細は Appendix A.5 参照)、コントロールボリュームの大きさは $7.74 \mu\text{m} \times 7.74 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$ ($\Delta x \times \Delta y \times \Delta z$) である。水素イオン濃度の境界条件は Figure 4.2 に示す注入口 A および B の水素イオン濃度とし、速度の境界条件は滑りなしとした。なお、式(4.2) の左辺第 1 項は、定常の流れ場で実験を行っているため 0 となる。また、深さ方向速度も 0 と見なせる。これは、流れ方向および流路幅方向の速度分布から、注入口側および出口側の流量を評価したところ、両者が等しくなったためである。

水素イオンの拡散係数は、作動流体の pH 値に依存して変化することが知られている (Choi et al. 2001)。そのため、水素イオンの拡散係数の変化が数値解析結果へ及ぼす影響を検討する。Figure 4.12 は混合場における実験と数値解析を比較した結果であり、エラーバーは水素イオン濃度分布計測の 95 % 包括度不確かさ (Table 4.2 (b) より評価) を示している。拡散係数は Table 4.4 に示す 4 種を用いた。図中の数値解析の結果と実験値との差は拡散係数の値により大小はあるものの、全てが計測の 95 % 包括度不確かさに含まれていることが確認できる。そのため、拡散係数の変化の影響は計測と比すると小であることがわかった。なお、以後の数値解析では、実験条件および実験値とも比較的整合の取れる $8.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ を水素イオンの拡散係数として用いた。

Figure 4.13 (a) は混合場における $x = 100 \mu\text{m}$ での水素イオン濃度分布の実験と数値解析との比較結果を、Figure 4.13 (b) は化学反応場での結果を示す。図中のエラーバーは水素イオン濃度分布計測の 95 % 包括度不確かさを示しており、混合場における実験お

および数値解析の両者が良好に一致することがわかる。実験結果および数値解析結果の差から標準偏差を求めたところ、 $\pm 2.2 \times 10^{-8} \text{ kg/m}^3$ となった。この値は、 $\pm \text{pH } 0.06$ に相当し、計測の不確かさ $\pm \text{pH } 0.11$ (Table 4.2 (b)) より十分小さいことが明らかである。一方、化学反応場では、数値解析による濃度勾配が実験と比して小となることがわかる。これは、式(4.1) に記した緩衝作用による水素イオンの生成や消滅を考慮せずに物質輸送方程式を解いたことに起因する。そのため、緩衝作用の反応速度式を立てて物質輸送方程式の右辺に加算して解けば実験値と良好な一致を示すと期待されるが (平野・石塚 1996)、緩衝作用のモデル化が十分にされていないため、現状で解くのは困難である。

4.6 対流および拡散の空間分布

T字型流路内の物質輸送の空間分布を明らかにするため、物質輸送方程式に記述される対流および拡散を実験結果より評価し両者の比較を行った。対流 j_c は次式のように表される。

$$j_c \equiv \left(-U \frac{\partial c}{\partial x}, -V \frac{\partial c}{\partial y} \right) \quad (4.3)$$

一方、拡散 j_d は次式のように表される。

$$j_d \equiv \left(-D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, -D \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right) \quad (4.4)$$

水素イオン濃度分布は5次の多項式により流路幅方向 (Y方向) に近似し、計算間隔は $\Delta x = 15.48 \text{ }\mu\text{m}$, $\Delta y = 15.48 \text{ }\mu\text{m}$ である。 $\partial c/\partial x$ および $\partial c/\partial y$ は、それぞれ Δx , Δy に対する濃度勾配より算出した。

Figure 4.14 (a) は混合場における $x = 100 \text{ }\mu\text{m}$, $z = 15 \text{ }\mu\text{m}$ での対流および拡散の絶対値を、また Figure 4.14 (b) は化学反応場での結果を示している。化学反応場の対流は混合場の約2倍となっており、同様に化学反応場の拡散も混合場の約2倍であることがわかる。この結果は、微小空間内における対流および拡散は、速度よりもイオン濃度勾配が大きな影響を与えていると示唆している。また、混合場および化学反応場での $y < 100 \text{ }\mu\text{m}$ および $200 < y < 400 \text{ }\mu\text{m}$ での対流および拡散はほぼ等倍であるが、 $100 < y < 200 \text{ }\mu\text{m}$ では拡散が対流の約6倍と見積もられた。この結果を踏まえると、本実験の約10倍の速度 (3 mm/s: $Re = 0.3$) 以上の場合、マクロスケールでの混合と同様に対流が支配的となり、混合促進に寄与すると期待される。

4.7 本章のまとめ

物質輸送の空間分布を定量的に明らかにするために、マイクロ PIV に LIF を組み合わせた速度およびイオン濃度分布の同時計測法を提案した。空間分解能は、速度計測が $15.48 \mu\text{m} \times 15.48 \mu\text{m}$, pH の二次元分布計測が $5.16 \mu\text{m} \times 5.16 \mu\text{m}$ となり、95 % 包括度不確かさはそれぞれ $\pm 3.8 \mu\text{m/s}$, $\pm \text{pH } 0.11$ を達成した。本計測手法を混合場および化学反応場 (溶液の緩衝作用) それぞれに適用し、以下の知見を得た。

実験および数値解析から得られた水素イオン濃度分布を比較したところ、混合場では実験と数値解析は良好な一致を示した。一方、化学反応場では数値解析による濃度分布の勾配が実験よりも小となった。これは、緩衝作用により生じた水素イオンの生成と消滅の影響に起因した結果である。

また、物質輸送方程式に記述される対流および拡散の空間分布を、実験より得られた速度および水素イオン濃度分布から評価した。混合場および化学反応場ともに、水素イオンの濃度勾配が小となる領域では対流と拡散はほぼ等倍で、濃度勾配が大となる領域では拡散が対流の約 6 倍となると見積もられた。以上のように、速度およびイオン濃度分布の同時計測により、空間的に物質輸送現象を評価することが可能となった。この結果は、従来の巨視的な評価であるペクレ数とは対照的であり、本手法の開発により実現した成果である。

Table 4.1. Measurement uncertainties in 95 % confidence level of micro-PIV using the confocal microscope

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 2.3 \times 10^{-2}$
Bias error	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	± 1.9
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 1.9
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 1.6
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 1.6
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 3.8

Table 4.2. Measurement uncertainties in 95 % confidence level of laser induced fluorescence using (a) the whole image calibration and (b) the single calibration

(a) Whole image calibration of pixel-by-pixel

Error factor		Symbol	Accuracy
pH meter	[-]	B_1	± pH 0.01
Fluctuation of excitation light	[-]	B_2	± pH 0.08
Bias index	[-]	B_m	± pH 0.09
Standard deviation	[-]	S_1	± pH 0.03
Precision index	[-]	S_m	± pH 0.03
Measurement uncertainty	[-]	U_{RSS}	± pH 0.11

(b) Single calibration using normalized fluorescent intensity averaged over measurement area

Error factor		Symbol	Accuracy
pH meter	[-]	B_1	± pH 0.01
Fluctuation of excitation light	[-]	B_2	± pH 0.08
Bias index	[-]	B_m	± pH 0.09
Standard deviation	[-]	S_1	± pH 0.04
Precision index	[-]	S_m	± pH 0.04
Measurement uncertainty	[-]	U_{RSS}	± pH 0.11

Table 4.3. Experimental conditions

		Mixing flow	Chemical reacting flow
Inlet A	[-]	pH 6.2	pH 6.0
Inlet B	[-]	pH 7.2	pH 7.7
Hydraulic diameter	[μm]	89	89
Bulk velocity	[$\mu\text{m/s}$]	333	272
Reynolds number	[-]	2.95×10^{-2}	2.41×10^{-2}

Table 4.4. Diffusion coefficient of proton (Choi et al. 2001)

Solvent	pH	Diffusion coefficient
Aqueous	4.1	11.8
Aqueous	6.5	8.7
Aqueous		5.3
Aqueous	8.2	1.9

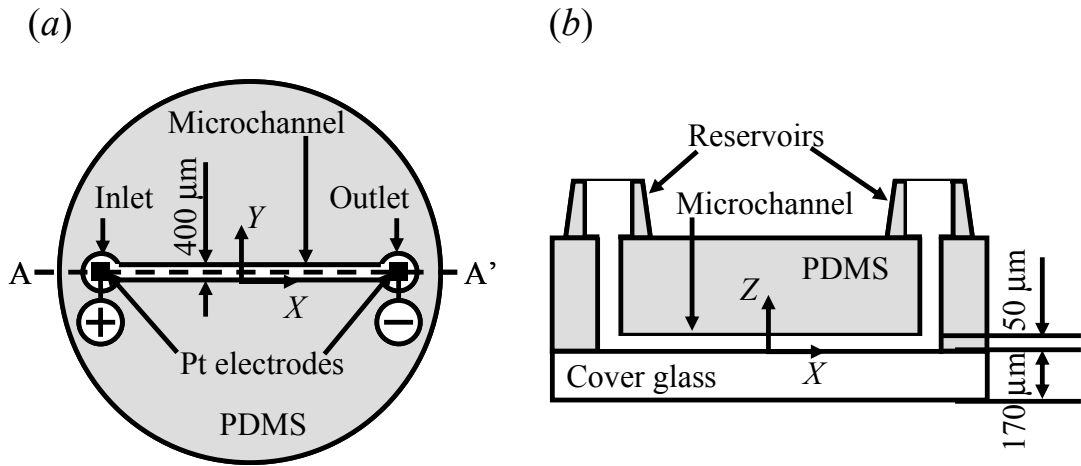


Figure 4.1. (a) Top view and (b) cross-sectional view along the A-A' of the I-shaped microchannel.

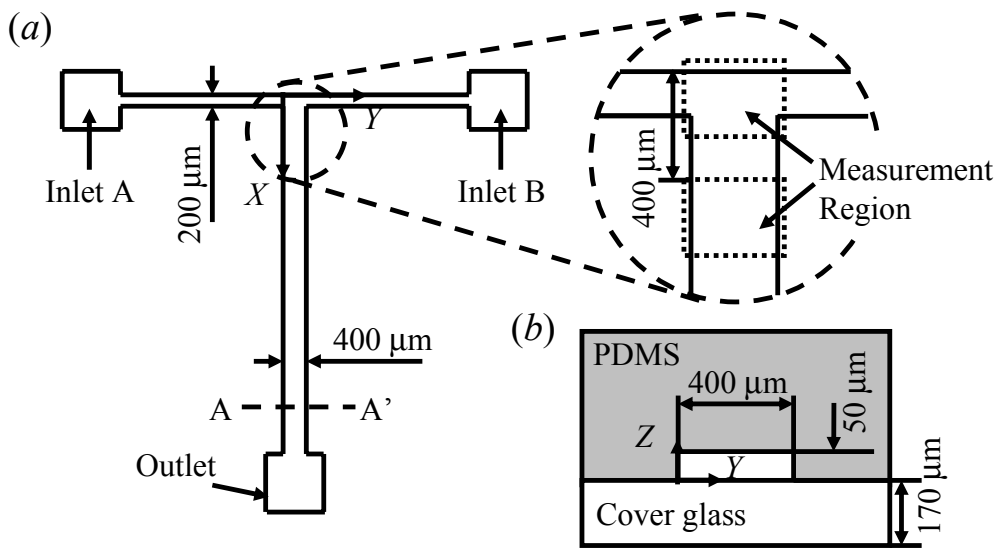


Figure 4.2. (a) Top view and (b) cross-sectional view along the line A-A' of the T-shaped microchannel.

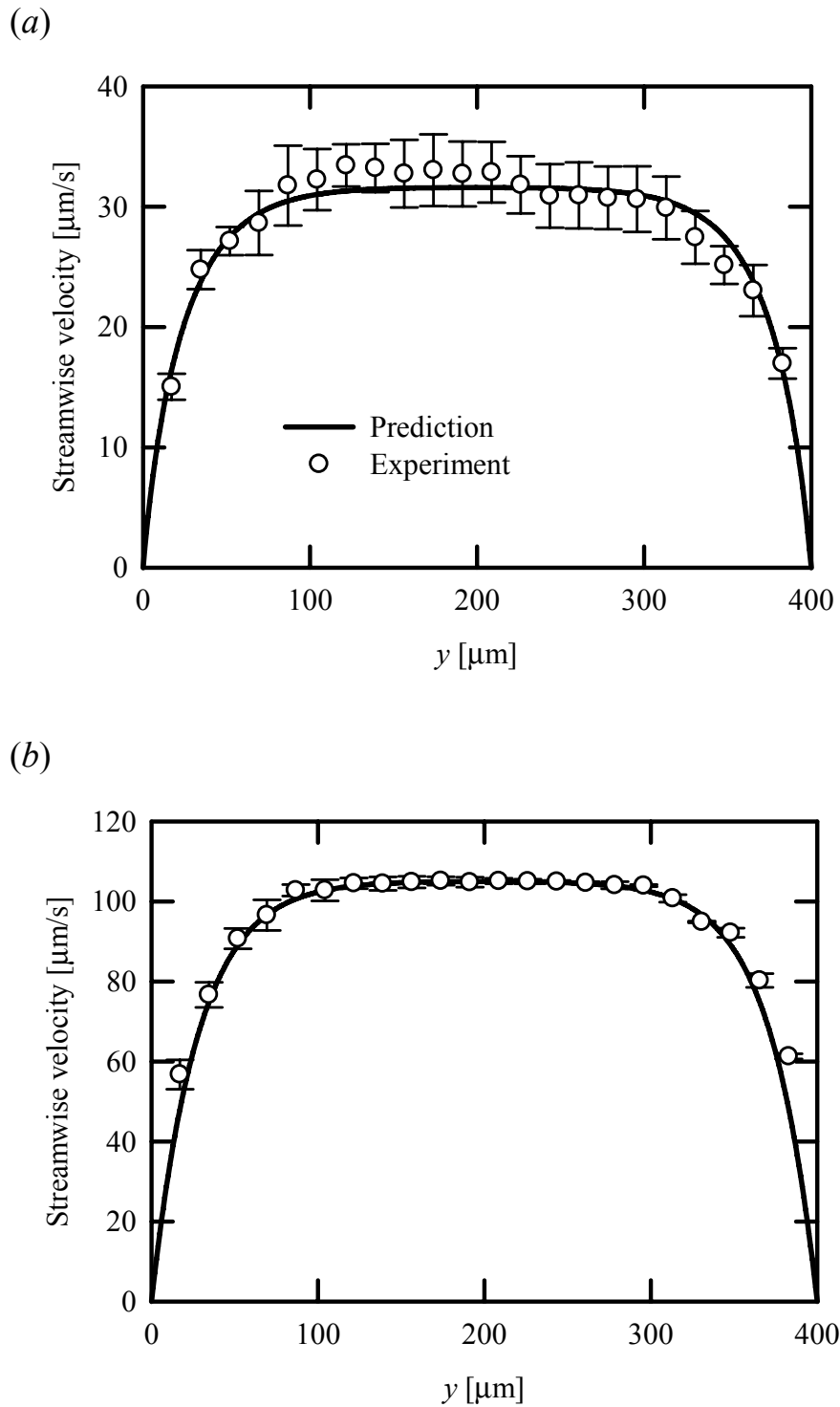


Figure 4.3. Comparison between the streamwise velocity profile with standard deviation measured by the confocal microscope at (a) $z = 5 \mu\text{m}$ and (b) $25 \mu\text{m}$. The trapezoidal curve shows the velocity profile by the prediction of Hagen-Poiseuille flow in a rectangular channel.

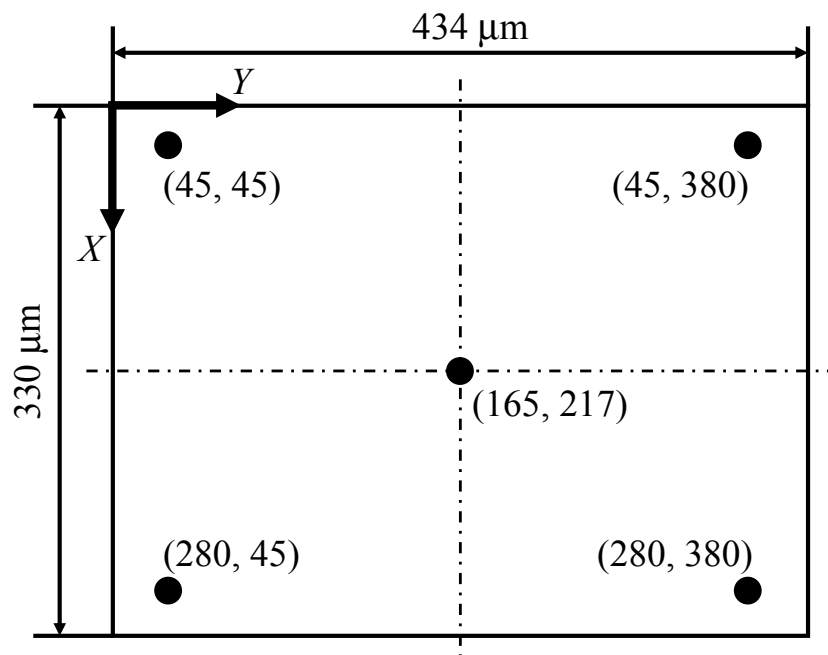


Figure 4.4. Schematic of the sample calibration location for the pH calibration.

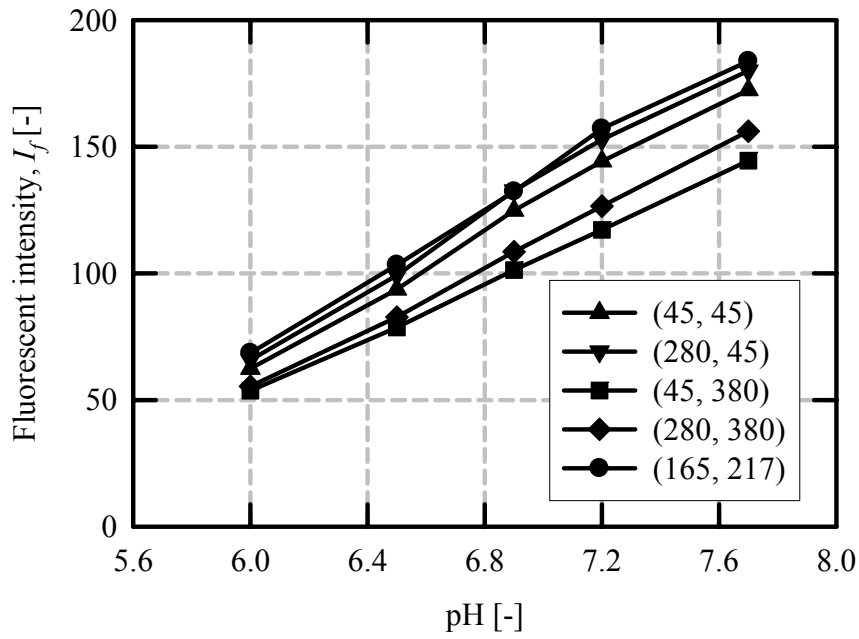


Figure 4.5. Calibration curves depicting the relationship between fluorescent intensity and pH value at five locations shown in Figure 4.4.

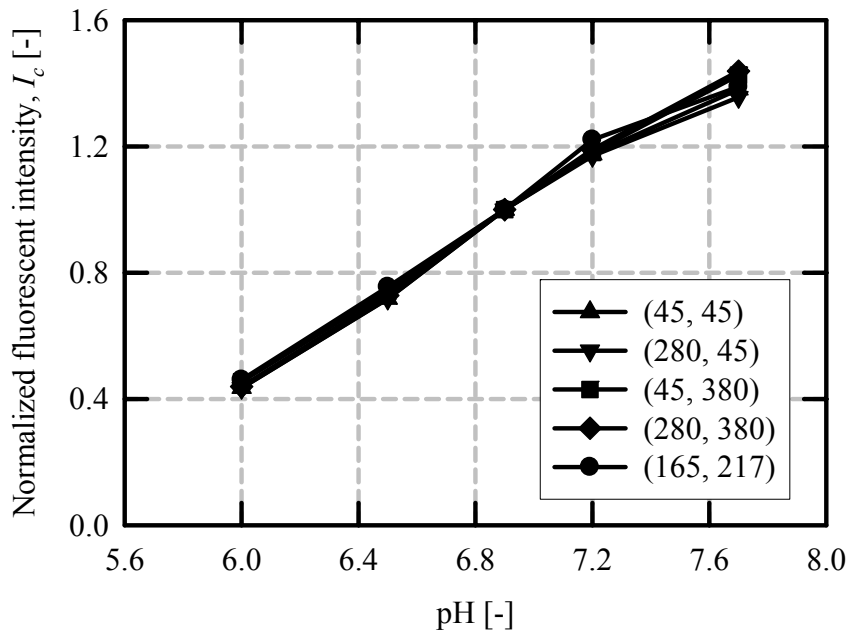


Figure 4.6. Calibration curves obtained by the correction using a reference value at pH 6.9.

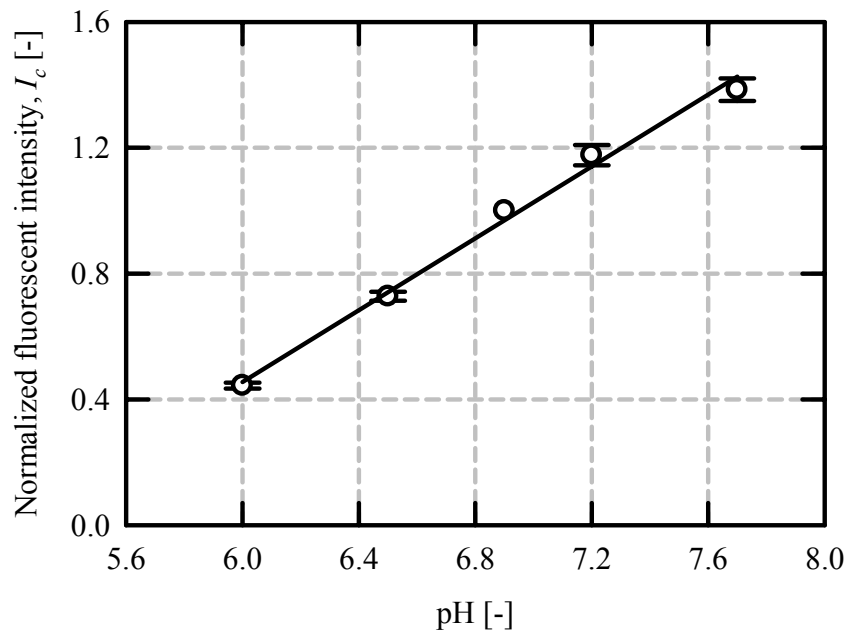


Figure 4.7. Calibration curve obtained from normalized fluorescent intensity averaged over measurement area.

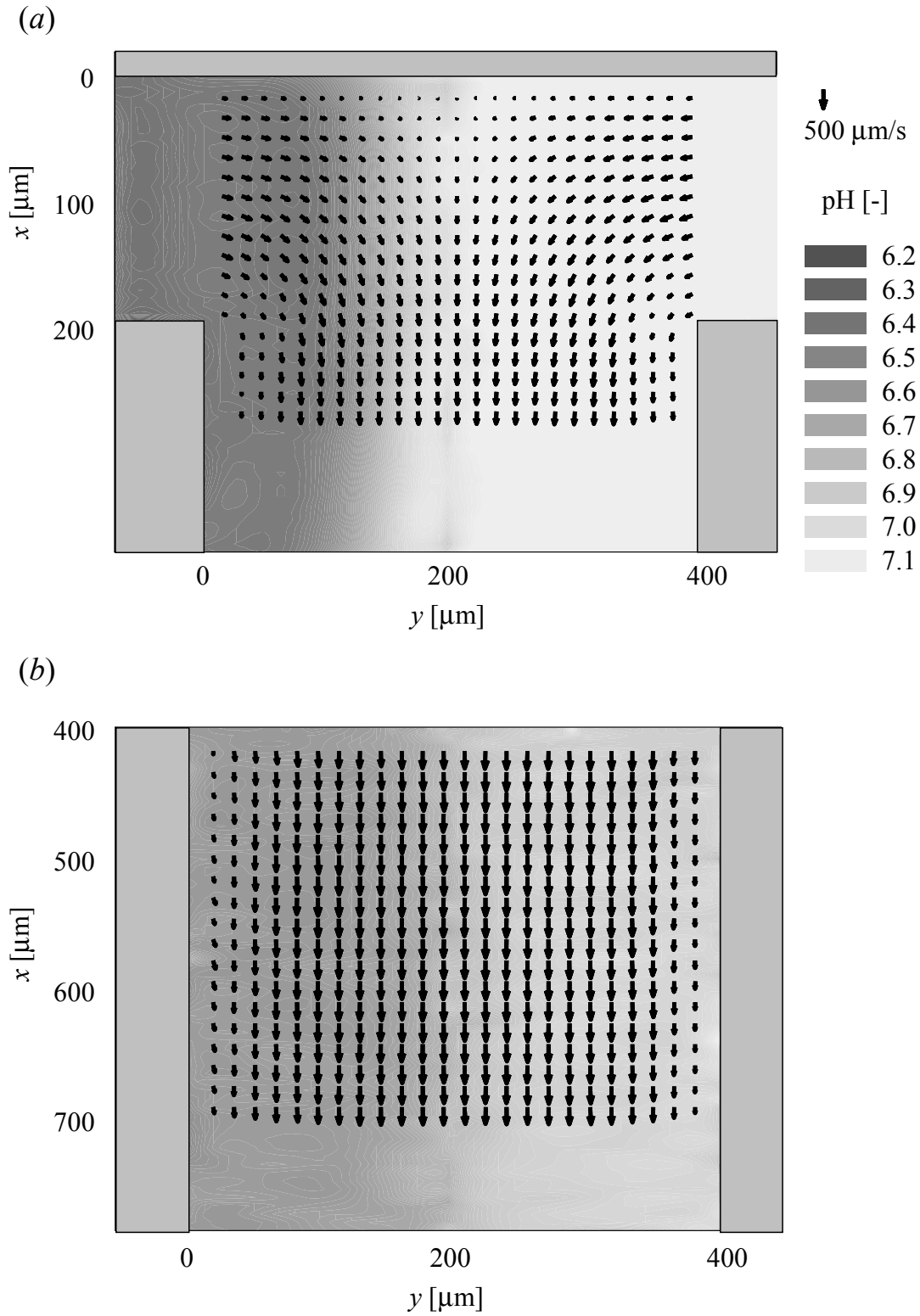


Figure 4.8. Velocity-vector and pH distribution (a) in the junction area ($x = 0 \mu\text{m}$) and (b) in downstream ($x = 400 \mu\text{m}$) at $z = 15 \mu\text{m}$ for the mixing flow. The arrows show the velocity-vectors and the pH distribution is shown with shading.

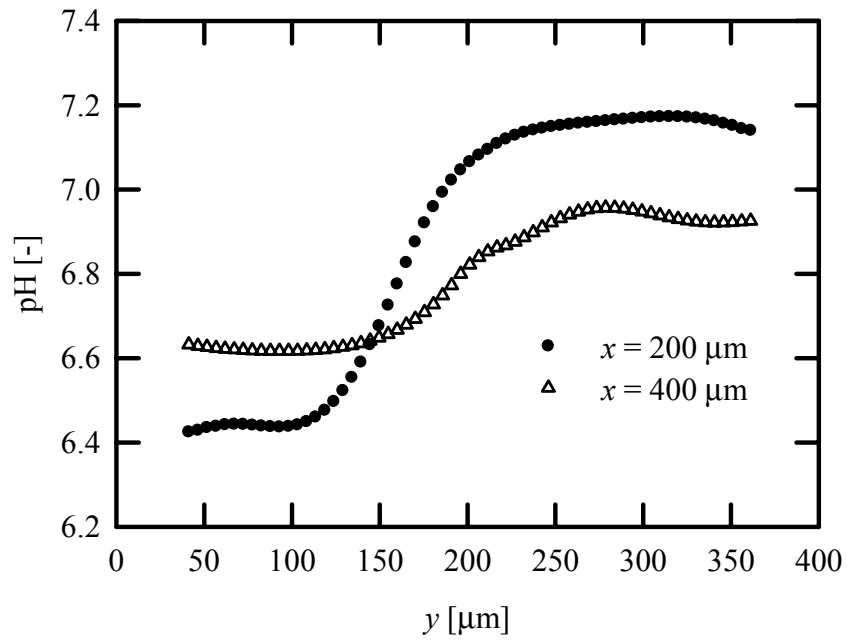


Figure 4.9. pH profiles at $z = 15 \mu\text{m}$ for the mixing flow comparison between at $x = 200$ and $400 \mu\text{m}$.

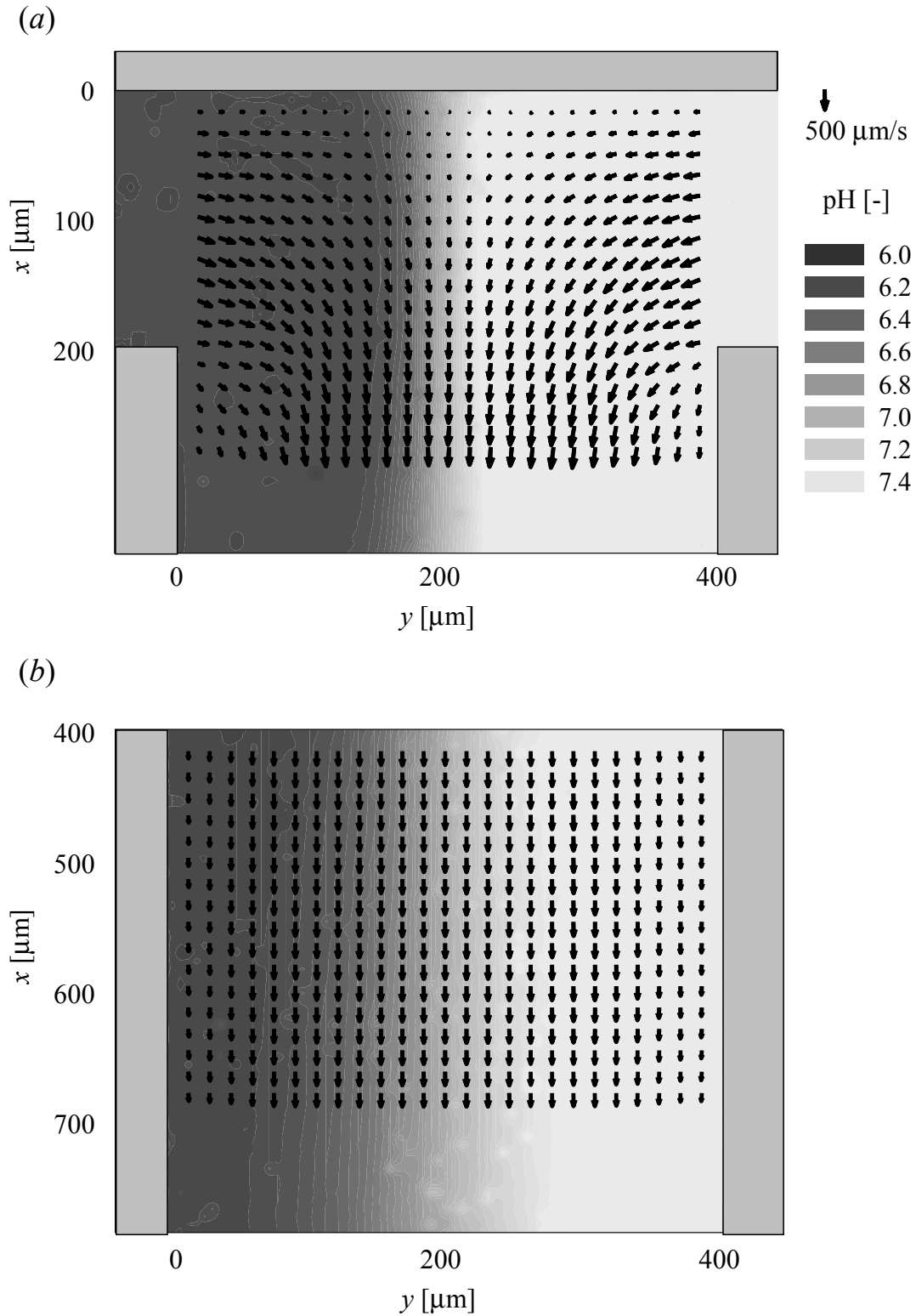


Figure 4.10. Velocity-vector and pH distribution (a) in the junction area ($x = 0 \mu\text{m}$) and (b) in downstream ($x = 400 \mu\text{m}$) at $z = 15 \mu\text{m}$ for the chemical reacting flow. The arrows show the velocity-vectors and the pH distribution is shown with shading.

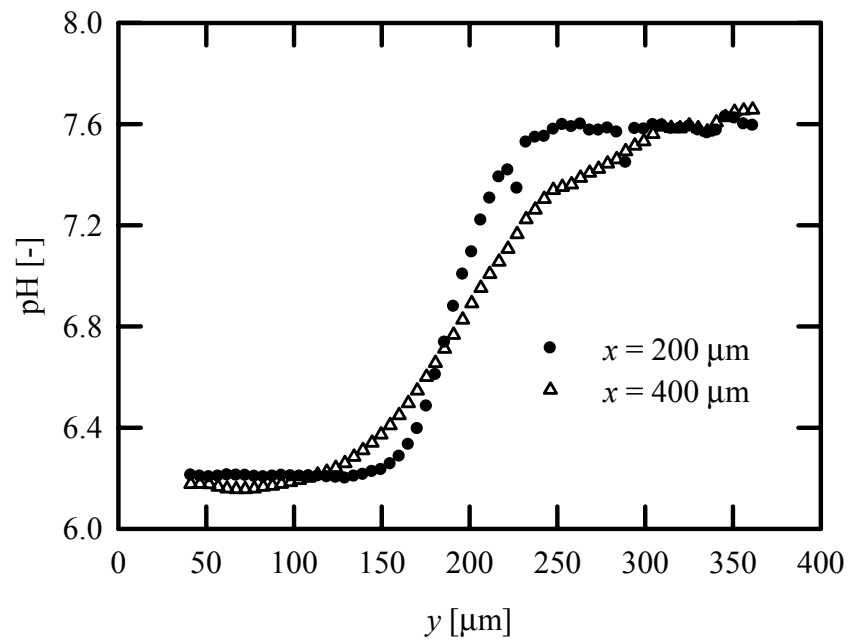
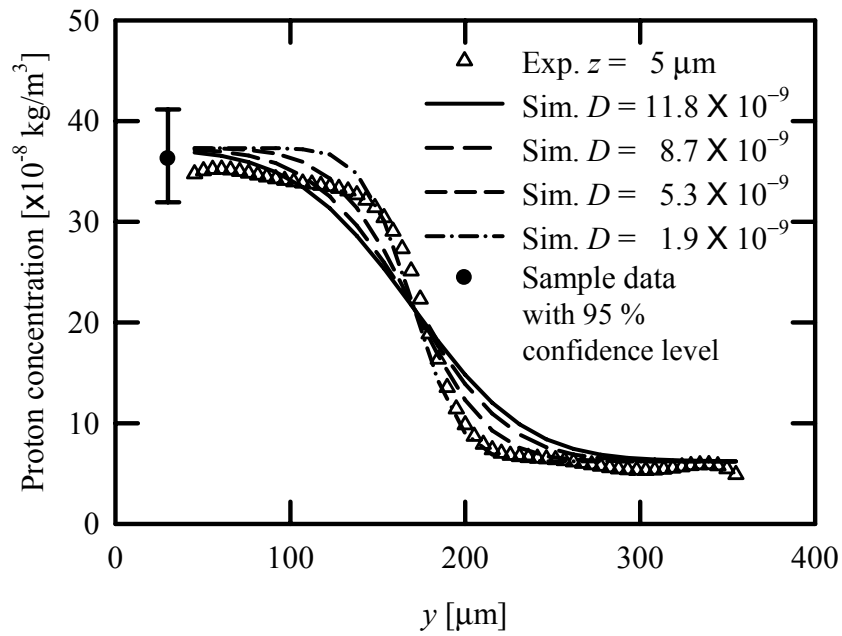


Figure 4.11. pH profiles at $z = 15 \mu\text{m}$ for the chemical reacting flow comparison between at $x = 200$ and $400 \mu\text{m}$.

(a)



(b)

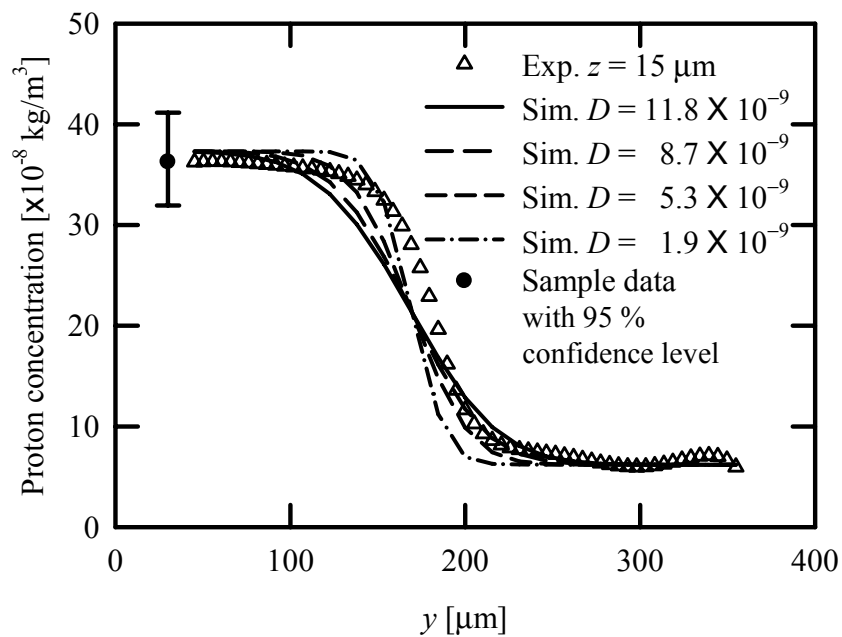


Figure 4.12. Effect of the diffusion coefficient on proton concentration profiles obtained from the numerical simulation. The plot and lines indicate the proton concentration profiles at (a) $x = 100 \mu\text{m}$ and $z = 5 \mu\text{m}$ and (b) $x = 100 \mu\text{m}$ and $z = 15 \mu\text{m}$ for the mixing flow whose Reynolds number is 2.95×10^{-2} .

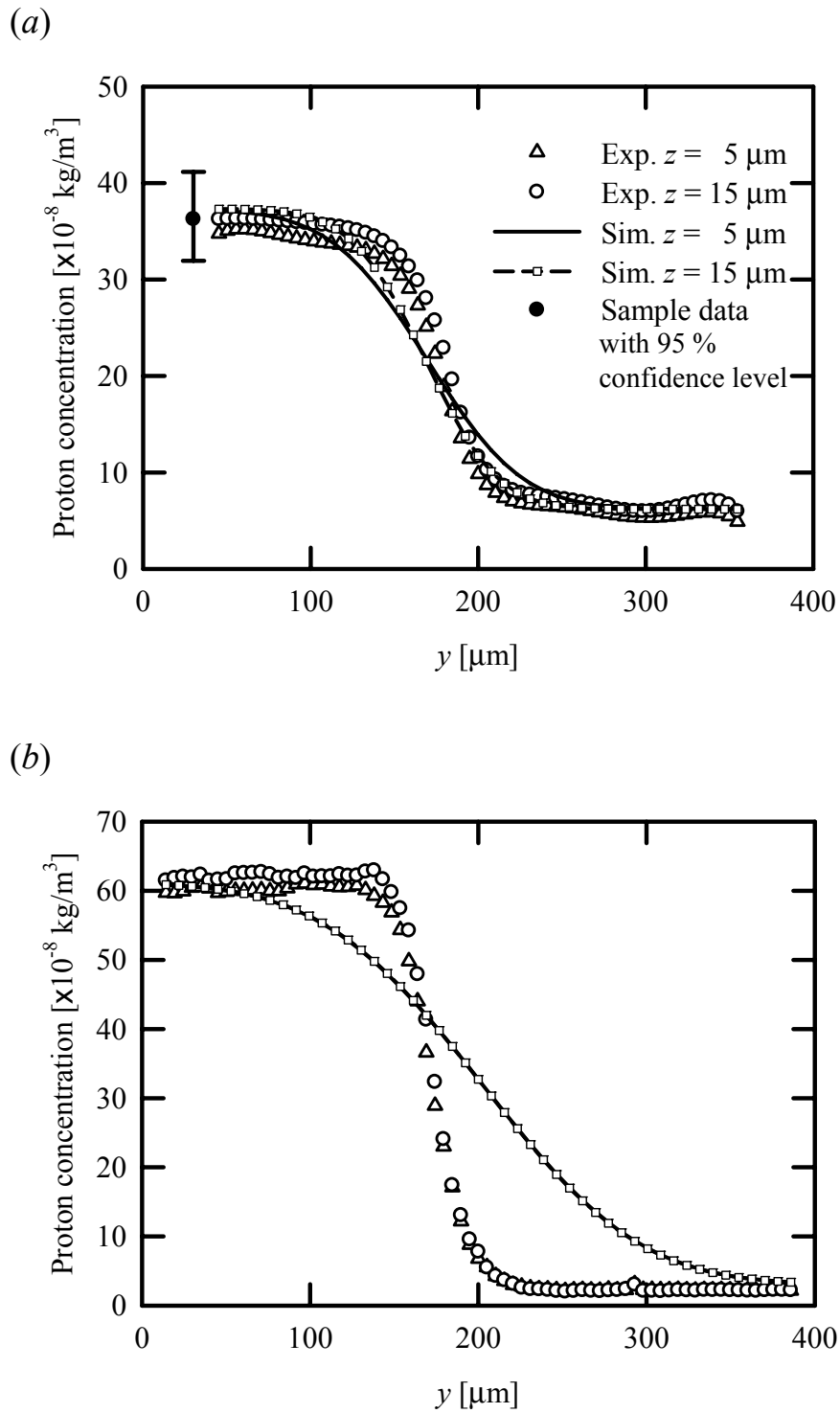


Figure 4.13. Proton concentration profiles at $x = 100 \mu\text{m}$ obtained from the experiments and the numerical simulation for (a) the mixing flow whose Reynolds number is 2.95×10^{-2} and (b) the chemical reacting flow whose Reynolds number is 2.41×10^{-2} .

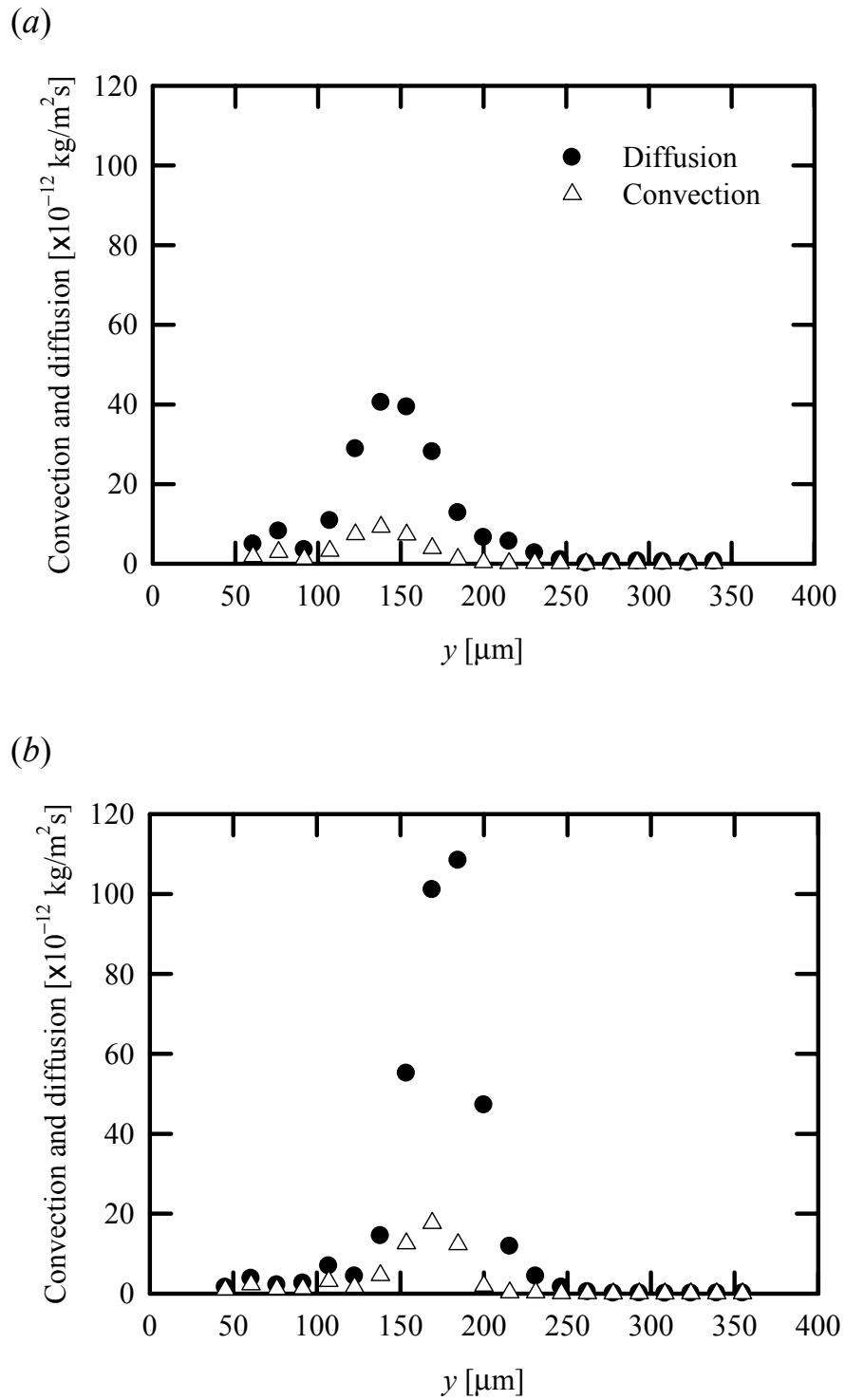


Figure 4.14. Comparison between the magnitude of the diffusion and that of convection at $x = 100 \mu\text{m}$ and $z = 15 \mu\text{m}$ for (a) the mixing flow whose Reynolds number is 2.95×10^{-2} and (b) the chemical reacting flow whose Reynolds number is 2.41×10^{-2} .

第 5 章
電気浸透流速度およびゼータ電位の評価

5.1 はじめに

微小空間特有の流れである電気浸透流の速度はゼータ電位の大きさに依存しており、またゼータ電位は流路材質や溶液の性質に依存して変化する。本章では、溶液の性質（水素イオン濃度）および流路材質に対する電気浸透流速度およびゼータ電位の影響を定量的に評価した。計測法には、3.3.2節で提案したマイクロPIVを用いた電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法を用いた。マイクロPIVを用いることで生じる問題は、粒子の沈降により数密度が不均一になると、粒子のゼータ電位の変化に伴い電気浸透流速度の計測誤差が大きくなることである。そこで5.3節では2種の異なる粒径による粒子沈降の影響を評価し数密度が均一となる粒子の選定を行い、5.4節では選定された粒子の電気泳動速度を算出した。5.5節では、石英ガラス流路内の電気浸透流速度および壁面ゼータ電位を5種の異なるpHの溶液ごとに評価し、式(2.10)と比較することで本手法の信頼性を検証した。さらに5.6節では、複合型流路（ガラスとポリジメチルシロキサン (poly(dimethylsiloxane): PDMS) を貼り合せて製作）により形成される非一様なゼータ電位場の速度分布を計測し、本手法の特徴である二次元計測の優位性を示唆した。

5.2 実験装置

5.2.1 作動流体および蛍光粒子

作動流体には、Table 5.1 に示す Acetate 緩衝溶液 (pH 4.6), Phosphate 緩衝溶液 (pH 6.0), HEPES 緩衝溶液 (pH 7.1), Borate/HCl 緩衝溶液 (pH 8.1), および Borate 緩衝溶液 (pH 9.3) の pH の異なる 5 種を選定し、Figure 5.1 にそれぞれの化学構造式を示す。モル濃度によるゼータ電位の変化を無くすため、全ての緩衝溶液にイオン交換水および塩化カリウム (KCl) を加えることで 5×10^{-3} mol/l に調整した。

Table 5.2 に蛍光粒子の特性を示す。本章では粒子径 $0.5 \mu\text{m}$ および $1 \mu\text{m}$ の負極帯電粒子 (Invitrogen Corp.: FluoSpheres, Carboxylate-modified microspheres) を選定し、各々の緩衝溶液に体積比率 0.2 % で混入した。なお、蛍光粒子の表面にはカルボキシル基 (-COOH) が付加されており、緩衝液内では相互のクーロン力により均一に分散する。

5.2.2 計測装置概要

蛍光粒子を観測するために、Figure 3.1 (a) に示す蛍光顕微鏡を用いた。光源には連続光である水銀ランプを用い、Table 5.2 に示す粒子の光学特性に合わせたフィルターブロック (Table A.1, Blue) により励起した。粒子からの蛍光発光は、CCD カメラ (浜松ホトニクス株式会社, C4880-80, $656 \text{ pixels} \times 494 \text{ pixels} \times 8 \text{ bits}$) により、フレーム間隔 37 ms で撮像した。電気泳動速度の計測には、倍率 60 倍の油浸系対物レンズ (株式会社ニコン, CFI Plan Fluor, NA 1.4) を使用した。一方、電気浸透流速度の計測には、倍率 40

倍の油浸系対物レンズ (株式会社ニコン, CFI Plan Fluor, NA 1.3) および 0.6 倍の TV レンズを使用して計測領域を広くした. それぞれの計測領域は, $108\ \mu\text{m} \times 82\ \mu\text{m}$ および $270\ \mu\text{m} \times 204\ \mu\text{m}$ である.

5.2.3 マイクロ流路

◆ 密閉セル (電気泳動速度)

Figure 5.2 に密閉セルの概要図を示す. 幅 1 mm, 深さ $26\ \mu\text{m}$ (密閉セルの幅 / 深さのアスペクト比: $k=38.5$) の流路をソフトリソグラフィ法 (Xia and Whitesides 1998) により PDMS (信越化学工業株式会社, KE-1606) にて作製し, ボロシリケートカバーガラス (松浪硝子株式会社, 厚さ $170\ \mu\text{m}$) を貼り合せた. その後, 蛍光粒子を含む作動流体を注入し, カバーガラス側に設けられた注入口と出口を PDMS 片で塞ぐことで密閉した. カバーガラスには, 電極作製のためにスパッタ装置 (Plasma Sciences Inc., CrC-150) により白金薄膜を製膜し, 高圧電源 (KEPCO Inc., BOP 1000M) により電界を印加した. なお, 流れ方向を X 方向, 流路幅方向を Y 方向および深さ方向を Z 方向とする.

◆ I 字型流路 (電気浸透流速度)

電気浸透流速度は 2 種のマイクロ流路内にて計測された. 1 種目は本計測法の信頼性を検証するため, Figure 5.3 に示す幅 $500\ \mu\text{m}$, 深さ $50\ \mu\text{m}$ の石英ガラスで作製されたマイクロ流路 (VitroCom Inc., VITROTUBES SYNTHETIC FUSED SILICA 5005S) を用意した. 流路端にはプラスチックの円筒 (直径 10 mm, 高さ 12 mm) をエポキシ系接着剤により接着し, 溶液のリザーバとした. 白金電極をリザーバに挿入して電圧を印加し, 流動場に界面動電現象を発生させた. 以後, この流路を石英ガラス流路と呼ぶ.

2 種目は, Figure 5.4 に示す幅 $400\ \mu\text{m}$, 深さ $80\ \mu\text{m}$ のマイクロ流路である. このマイクロ流路は, ソフトリソグラフィ法により作製された PDMS (信越化学工業株式会社, KE-1606) と, 石英ガラス (松浪硝子株式会社, 厚さ $170\ \mu\text{m}$) を貼り合わせることで作製された. 流路端にはプラスチックの円筒 (直径 10 mm, 高さ 12 mm) をエポキシ系接着剤により接着し, 溶液のリザーバとした. 白金電極をリザーバに挿入し電圧を印加した. 以後, この流路を複合型流路と呼ぶ.

5.3 粒径による粒子沈降の影響

電気浸透流速度の計測誤差を軽減するためには, 計測面内全域において粒子数密度の均一性を保持し, 粒子のゼータ電位をある一定値に保つことが必要となる. Figure 5.2 に示す密閉セル内における粒子数密度を画像処理により評価することで, マイクロ PIV 計測に適した粒子を選定した. pH 9.3 の緩衝溶液に Table 5.2 に示す $0.5\ \mu\text{m}$ (沈降速度: $7.5 \times 10^{-12}\ \text{m/s}$) および $1.0\ \mu\text{m}$ (沈降速度: $30 \times 10^{-12}\ \text{m/s}$) の 2 種の粒子をそれぞれ体積比

率 0.2 % で混入し密閉セル内に注入した。カバーガラス側に設けられた注入口および出口は PDMS 片により塞いでいるが、密閉セル内には気相 (バブル等) が存在しないことを顕微鏡にて確認した。還流は高圧電源 (KEPCO Inc., BOP 1000M) により電界 20 V/cm を印加することで発生させた。その後、定常状態になった際に、深さ方向 (Z 方向) に対物レンズを移動させて、 $z = 1 \mu\text{m}$, $7 \mu\text{m}$, $13 \mu\text{m}$, $19 \mu\text{m}$ および $25 \mu\text{m}$ での粒子画像を CCD カメラにより撮像した。なお、還流の定常状態は、マイクロ PIV 計測を複数回行い、速度分布結果がほぼ一様であったことから確認した。

Figure 5.5 (a) は $z = 1 \mu\text{m}$ (密閉セル内の上部) における粒径 $0.5 \mu\text{m}$ の粒子像を、Figure 5.5 (b) は $z = 25 \mu\text{m}$ (密閉セル内の下部) の粒子像を示す。一方、Figure 5.6 (a) および 5.6 (b) は、それぞれ $z = 1 \mu\text{m}$ および $z = 25 \mu\text{m}$ での粒径 $1.0 \mu\text{m}$ の粒子像である。画像内の白点が蛍光粒子で黒領域が背景画像となっており、256 階調 (8 bits の CCD カメラのため) における 255 が白色で 0 が黒色となる。CCD カメラにおけるバックグラウンドノイズは大きく見積もっても 20 程度であるが、個々の粒子を区別するために閾値 100 以上の輝度を粒子、100 以下を背景像として二値化およびラベリング処理 (閾値以上の輝度を有する画素が複数隣り合っている場合、それらを同じ粒子像として認識する処理) を施した。各計測面における連続した 100 枚の粒子像に上述の画像処理を適用し、平均粒子数密度を算出した結果を Figure 5.7 に示す。これより、 $0.5 \mu\text{m}$ の粒子では全ての計測面において数密度がほぼ同様であるのに対し、 $1.0 \mu\text{m}$ では密閉セルの下部へ向かうほど数密度が増加する傾向にあり、粒子が沈降していることは明らかである。粒子数密度の均一性保持のため、電気泳動および電気浸透流の実験では $0.5 \mu\text{m}$ の粒子を採用する。

5.4 電気泳動速度および粒子表面ゼータ電位の評価

電気泳動速度を評価するため、Table 5.1 に示す 5 種の pH の異なる緩衝溶液に $0.5 \mu\text{m}$ の蛍光粒子を混入し、それぞれを密閉セルに注入した。20 V/cm の電界を印加し還流が定常状態に達した後、深さ方向に 13 面 ($z = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23$ および $25 \mu\text{m}$) トラバースして粒子画像をそれぞれ 100 時刻 (3.7 s) 撮像した。粒子のブラウン運動による誤差を除去するために、各々の計測面において 100 時刻の速度ベクトルを平均した。PIV の参照窓の大きさは $8.25 \mu\text{m} \times 8.25 \mu\text{m}$ (50×50 pixels) であり、各々の参照窓は 50 % オーバーラップをしているため、速度ベクトル間隔は $4.125 \mu\text{m}$ である。なお、一般的にガラスや PDMS 等の壁面は負極に帯電しており壁面近傍に正電荷のイオンが偏在し、電界を印加すると電気浸透流は負電極側へ駆動されることから負電極側への流れを正方向として定義した。

代表的な結果として、pH 9.3 の緩衝溶液での $z = 7 \mu\text{m}$, $13 \mu\text{m}$, $19 \mu\text{m}$ における粒子速度ベクトルを Figure 5.8 に示し、この結果を流れ方向に平均した速度分布を Figure 5.9 に図示した。Figure 5.9 の速度分布は放物線の速度分布とは異なり栓流であることが定

性的に見てとれる。そのため、各々の pH および計測面における標準偏差を求めその最大値を Table 5.3 にまとめた。本研究で用いた CCD カメラの 1 pixel の素子サイズが $9.9 \mu\text{m} \times 9.9 \mu\text{m}$ 、対物レンズは 60 倍、CCD カメラのフレームレートは 37 ms であることから、2 画像間で 1 pixel 移動した場合、 $4.5 \mu\text{m/s}$ の速度を有することとなる。Table 5.3 に示される標準偏差は、全ての pH で $4.5 \mu\text{m/s}$ 以下であるため、本実験の結果が栓流であると定量的にも示された。また、 $-250 \mu\text{m} < y < 250 \mu\text{m}$ の区間においても、栓流となることは実験的に確認済みであり、密閉セルの幅方向 (Y 方向) は全ての pH および各計測面において一様な流れと見なせるため、流れ方向 (X 方向) および深さ方向 (Z 方向) の 2 次元流れと仮定することができる。そこで、各計測面 (XY 平面) において空間平均を施した粒子速度を求め Figure 5.10 に記した。併記した実線は粒子速度データに最小二乗法を施し 2 次曲線に近似した結果であり、全ての結果において重決定係数が 0.98 を超えており良好な近似が行われた。また、図中の破線は粒子の電気泳動速度 U_{EP} を示しており、各計測面における粒子速度を式(3.17) のように無次元化し、最小二乗法を用いて式(3.18) に示す 2 次曲線に近似を行い、式(3.19) を適用することにより求めた。以上のように、従来の手法 (MacInnes et al. 2003) では困難であった深さ方向に 13 面の速度計測を行い、より精緻な速度分布から電気泳動速度の評価が実現できた。

Figure 5.11 に、各 pH に対する電気泳動速度および式(3.20) から評価した粒子のゼータ電位をまとめる。併記したエラーバーは 95 % 包括度不確かさを示しており、以下に記す正確度および精密度から見積もった。各 pH における粒子の電気泳動速度の真値を得ることは困難であるため、実験の準備時に使用した計測器 (pH メーターおよび電圧計) の誤差および PIV による偏り誤差 (Appendix A.2: 0.002 pixels) を正確度とした。本実験で使用した pH メーターの誤差は 0.01 である。pH 間の電気泳動速度がそれぞれ線形であると仮定し、pH 0.01 変化した際の速度が誤差であると見積もった。電圧計の誤差は、表示電圧の 0.4 % となる。本実験で印加した電界は 20 V/cm であることから、実際には 19.92 – 20.08 V/cm であったと推測される。これより、実験により求めた電気泳動速度に対し、式(2.15) を用いて電界を 19.92 – 20.08 V/cm に変化させた際の速度変動を誤差とした。一方、精密度に関しては、データ収集およびデータ処理に伴う誤差として、計測された速度の標準偏差より評価した。なお、上記の誤差要因および 95 % 包括度不確かさを Table 5.4 にまとめた。

また、Figure 5.11 において pH 6.0 – 9.3 での電気泳動速度およびゼータ電位の絶対値はほぼ同等の値を示すのに対し、pH 4.6 では他よりも小さな値を示すことがエラーバーより明らかである。この現象は、粒子表面のカルボキシル基の平衡反応 (式(3.15) を再表記) およびカルボキシル基の酸解離定数 $pK_a = 4.5$ (Chow and Takamura 1988) との関係に起因している。



一般的に、 $\text{pH} = \text{p}K_a$ の場合、カルボキシル基の約 50 % が解離することが知られている。また、 $\text{pH} = \text{p}K_a + 1$ の場合、約 90 % が解離し、脱プロトン化したカルボキシル基 (COO^-) となる。粒子のゼータ電位は脱プロトン化されたカルボキシル基の総数によって決定されるため、 $\text{pH} 4.6$ でのゼータ電位の絶対値および電気泳動速度は、他の pH での値よりも小となる。

5.5 電気浸透流速度および壁面ゼータ電位の評価

電気浸透流速度を評価するため、Figure 5.3 に示す石英ガラス流路に、蛍光粒子を含む 5 種の pH の異なる緩衝溶液をそれぞれ注入した。流路端に設置したリザーバの水面の高さを等しくすることにより、静圧駆動流の影響を除去した後、リザーバに挿入した白金電極に電界 20 V/cm を印加することで電気浸透流を発生させた。深さ方向に 6 面 ($z = 1 \mu\text{m}, 10 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}, 30 \mu\text{m}, 40 \mu\text{m}$ および $49 \mu\text{m}$) トラバースして、それぞれの計測面において粒子画像を 100 時刻 (3.7 s) 撮像した。粒子のブラウン運動による誤差を除去するために、各々の計測面において 100 時刻の速度ベクトルを平均して見かけの粒子速度 U_{obs} を算出した。Figure 5.11 に示す電気泳動速度 U_{EP} をそれぞれ差し引くことにより、電気浸透流速度 U_{EOF} を求めた。なお、PIV の参照窓の大きさは $20.6 \mu\text{m} \times 20.6 \mu\text{m}$ (50×50 pixels) であり、各々の参照窓は 50 % オーバーラップをしているため、ベクトル間隔は $10.3 \mu\text{m}$ である。

代表的な結果として、Figure 5.12 に $\text{pH} 9.3$ での $z = 1 \mu\text{m}, 25 \mu\text{m}, 49 \mu\text{m}$ における速度ベクトルおよび Figure 5.13 に流れ方向 (X 方向) に平均した速度分布を示す。全ての深さにおいて、流路幅方向 (Y 方向) に速度が一様で栓流となっていることが定性的に確認できる。この結果は、過去に報告されたかご化蛍光色素を用いた電気浸透流の計測結果 (Figure 2.1 (b); Paul et al. 1998) との定性的一致が確認できる。また、各 pH における平均した電気浸透流速度および標準偏差を Table 5.5 にまとめた。ここで、本研究で用いた CCD カメラの 1 pixel の素子サイズが $9.9 \mu\text{m} \times 9.9 \mu\text{m}$ 、40 倍の対物レンズおよび 0.6 倍の TV レンズ (計測システムの総合倍率 24 倍)、CCD カメラのフレームレートは 37 ms であるため、2 画像間で 1 pixel 移動した場合、 $11.1 \mu\text{m/s}$ の速度を有することとなる。Table 5.5 に示す標準偏差は全て $11.1 \mu\text{m/s}$ 以内であるため、本実験の結果が栓流であると定量的にも示された。

電気浸透流速度計測の不確かさは、以下に示す正確度および精密度から算出された。正確度は、PIV の偏り誤差、 pH メーターの誤差、電圧計の誤差および電気泳動速度の 95 % 包括度不確かさを加味して見積もった。一方、精密度は速度計測の標準偏差より評価した。正確度、精密度および 95 % 包括度不確かさは Table 5.6 にまとめて表記した。なお、不確かさは最大で主流の 7 % 程度である。Figure 5.14 に、各 pH に対する電気浸透流速度および壁面ゼータ電位を記す。併記したエラーバーは 95 % 包括度不確かさを

示しており、実線の曲線は Scales et al. (1992) が提案した経験式(2.10) より算出した石英ガラスのゼータ電位 ζ_s である。これより、経験式によるゼータ電位および本研究で実験的に評価したゼータ電位は、良好な一致を示しており、本計測法の信頼性が示された。また、Figure 5.14 において pH の値が大きくなるにつれて、石英ガラス壁面の電気浸透流速度およびゼータ電位の絶対値が大きくなっていることが確認される。これは、2.5.1 節に示すように、pH 値の増大に伴い、脱プロトン化したシラノール基の総数が増え、ゼータ電位の絶対値が大となることに起因する。

5.6 複合型流路内の電気浸透流速度分布

ガラス素材のマイクロ流体デバイスは加工困難かつ高コストであるため、近年では PDMS 流路とガラスを貼り合わせた複合型流路の需要が高い。本実験では、Figure 5.4 に示す複合型流路に、5種類の pH の異なる粒子溶液を注入し、深さ方向に9面 ($z = 1 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$, $40 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, $60 \mu\text{m}$, $70 \mu\text{m}$ および $79 \mu\text{m}$) トラバースして、各計測面における粒子画像を 100 時刻 (3.7 s) 撮像した。電気浸透流速度の計測法、PIV の参照窓の大きさおよびベクトル間隔は 5.5 節と同様である。

Figure 5.15 に全ての pH での各計測面における流れ方向 (X 方向) に平均した速度分布を示す。石英ガラス壁面 ($z = 1 \mu\text{m}$) では、流路幅方向の中心 ($y = 0 \mu\text{m}$) の速度を基準とすると、流路側壁 ($y = -185 \mu\text{m}$ or $185 \mu\text{m}$) の速度は 15 – 25 % 程度遅くなっている。一方、PDMS 壁面 ($z = 79 \mu\text{m}$) では、流路中心と比して側壁の速度は 2 – 4 % 程度遅い。5.5 節にて本計測法の最大の不確かさは主流の 7 % と評価されたため、PDMS 壁面では一様な流れと見なせる。これより、石英ガラス流路とは異なり、複合型流路では、流路幅方向に速度勾配を有する流れとなる。ガラス壁面の速度勾配が最大で、PDMS 壁面に近づくにつれ勾配は緩やかとなり、PDMS 壁面では栓流となる。

石英ガラス流路の流路幅方向の中心位置 ($y = 0 \mu\text{m}$) および流路側壁位置における電気浸透流速度と深さの関係を Figure 5.16 (a) に、また複合型流路での結果を Figure 5.16 (b) に示す。石英ガラス流路では深さ方向に速度勾配は見られないのに対し、複合型流路では深さ方向にも速度勾配を有していることが明らかである。また、 $z = 1 \mu\text{m}$ での石英ガラス流路および複合型流路の電気浸透流速度は、それぞれ $111 \mu\text{m/s}$, $113 \mu\text{m/s}$ であり、95 % 包括度不確かさを考慮すると両者は良好に一致している。従って、複合型流路のガラス壁面の流路中心では、石英ガラスのゼータ電位が電気浸透流を支配していると考えられる。しかしながら、複合型流路の $z = 1 \mu\text{m}$ における側壁では $15 \mu\text{m/s}$ 程度遅くなっていることが確認できる。これは、側壁の PDMS および壁面の石英ガラスの双方のゼータ電位により形成された複雑な電気二重層に起因した流れによるものと推測される。一方、複合型流路の PDMS 壁面 ($z = 79 \mu\text{m}$) では、流路中心および側壁において速度が同等となることがわかる。これは、流路下面および側壁が PDMS であるため、

ゼータ電位分布が一様となるためと考えられる。

また、各 pH に対する石英ガラスと PDMS の電気浸透流速度および壁面ゼータ電位を Figure 5.17 に記す。なお、併記したエラーバーは 95 % 包括度不確かさを示している。これより、PDMS の pH に対する関係は、石英ガラスのそれと同様に pH 値が大となるにつれてゼータ電位の絶対値も大となっている。しかしながら、PDMS での値は、全ての pH において石英ガラスよりも小となっている。これは、2.5.1 節に示したように PDMS の化学構造的に、石英ガラスと比して表面積あたりのシラノール基の絶対数が少ないことに起因する (Ocvirk et al. 2001; Badal et al. 2002; Spehar et al. 2003; Sze et al. 2003)。

以上より、複合型流路の流れの特徴をまとめる。ガラス壁面近傍における流路幅方向の中心では、ガラスのゼータ電位に電気浸透流速度は支配される。しかしながら、側壁近傍では流路の上面と側壁の影響により速度が遅くなり、流路幅方向に速度勾配を形成する。この速度勾配は PDMS 壁面に近づくにつれ緩やかとなり、PDMS 壁面近傍では下面および側壁が同材質のため栓流となる。また、上面がガラス、下面が PDMS で形成されているため、深さ方向にも速度勾配を有する流れ場となっている。

5.7 本章のまとめ

溶液の性質や流路材質に対する電気浸透流およびゼータ電位の影響を明らかにするため、マイクロ PIV を用いた電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法を用いて定量的な評価を行った。2 種の流路に水素イオン濃度の異なる 5 種の緩衝溶液をそれぞれ注入し、本手法により実験を行い以下の知見を得た。

電気泳動速度は、密閉セルとマイクロ PIV を併用することで計測が可能となった。また、粒子表面のゼータ電位は電気泳動速度との線形関係より評価した。これより、粒子表面の官能基 (本章ではカルボキシル基) の酸解離定数とほぼ同等の pH 値でのゼータ電位は、酸解離定数より 1 以上大となる pH 値でのゼータ電位よりも大幅に小さくなるのがわかった。これは、官能基の脱プロトン反応が酸解離定数と緩衝溶液の pH 値との関係に依存することに起因する。

一方、電気浸透流速度は、マイクロ PIV により計測された見かけの粒子速度から、電気泳動速度を差し引くことで算出し、壁面ゼータ電位は電気浸透流速度との線形関係より評価した。石英ガラス流路の電気浸透流は、全ての pH 値および各計測面において栓流を示した。また、pH 値が大となるにつれて、ゼータ電位の絶対値も大となり、電気浸透流速度も速くなった。これは、石英ガラスの表面がシラノール基で形成されており、pH 値が大となるとシラノール基の脱プロトン反応が促進され、ゼータ電位が大となるためである。

複合型流路内の電気浸透流は、ガラス壁面では流路幅方向に速度勾配が形成され、PDMS 壁面に近づくにつれ勾配が緩やかになり、PDMS 壁面では栓流となることがわか

った。これは、流路底面 (石英ガラス) のゼータ電位の絶対値が側壁 (PDMS) のゼータ電位よりも大であったことに起因する。このように、空間的にゼータ電位が非一様に分布している流動場においても、本手法は面的に詳細な結果を取得することが可能となった。従来の手法 (Huang et al. 1988; Scales et al. 1992) では空間平均された電気浸透流速のみの計測であったことを鑑みると、この結果は本手法の大きな特徴といえる。

Table 5.1. Fluid properties

Buffer solution	Acetate	Phosphate	HEPES	Borate/HCl	Borate
pH [-]	4.6	6.0	7.1	8.1	9.3
Molarity [$\times 10^{-3}$ mol/l]	5	5	5	5	5
Conductivity [μ S/cm]	775	1115	777	1664	777

Table 5.2. Property of fluorescent particles

Material		Polystyrene	Polystyrene
Number mean diameter	[μ m]	0.5	1.0
Density	[g/cm ³]	1.055	1.055
Absorption wavelength	[nm]	505	505
Emission wavelength	[nm]	515	515
Charge	[C/g]	13.6	1.41
Sedimentation velocity	[m/s]	7.5×10^{-12}	30×10^{-12}
Measurement depth ($NA = 1.3$) [‡]	[μ m]	2.5	3.7
Measurement depth ($NA = 1.4$) [‡]	[μ m]	2.2	3.1

[‡]The measurement depth was calculated from equation 3.4.

Table 5.3. Maximum standard deviation of particle velocity in the closed electrokinetic cell

pH	[-]	4.6	6.0	7.1	8.1	9.3
Maximum standard deviation	[μ m/s]	2.1	3.7	2.8	3.6	4.5

Table 5.4. Measurement uncertainty of electrophoretic velocity and zeta-potential of particles at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3

(a) pH 4.6

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 8.9 \times 10^{-3}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.7 \times 10^{-1}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 1.3 \times 10^{-1}$
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 1.7
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 1.3
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 1.3
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 2.9
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 1.8

(b) pH 6.0

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 8.9 \times 10^{-3}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 2.6 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 2.3 \times 10^{-1}$
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	$\pm 2.3 \times 10^{-1}$
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 2.4
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 2.4
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 5.3
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 3.4

(c) pH 7.1

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 8.9 \times 10^{-3}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.9 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 2.4 \times 10^{-1}$
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	$\pm 2.4 \times 10^{-1}$
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 1.6
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 1.6
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 3.6
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 2.3

Tables 5.4. (d) and (e). For caption see page 105.

(d) pH 8.1

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 8.9 \times 10^{-3}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.8 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 2.5 \times 10^{-1}$
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	$\pm 2.5 \times 10^{-1}$
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 2.4
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 2.4
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 5.2
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 3.3

(e) pH 9.3

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 8.9 \times 10^{-3}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.8 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 2.6 \times 10^{-1}$
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	$\pm 2.6 \times 10^{-1}$
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 3.1
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 3.1
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 6.8
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 4.4

Table 5.5. Electroosmotic flow velocity with maximum standard deviation classified by pH value of buffer solutions

pH	[-]	4.6	6.0	7.1	8.1	9.3
Electroosmotic flow velocity	[$\mu\text{m/s}$]	49.2	74.8	84.9	95.5	111
Maximum standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	1.0	0.6	0.4	2.2	0.2

Table 5.6. Measurement uncertainty of electroosmotic flow velocity and zeta-potential at wall surface in the silica glass microchannel at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3

(a) pH 4.6

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 2.2 \times 10^{-2}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.8 \times 10^{-1}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 2.0 \times 10^{-1}$
Electrophoretic velocity	[$\mu\text{m/s}$]	B_4	± 2.9
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 2.9
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	$\pm 6.9 \times 10^{-1}$
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	$\pm 6.9 \times 10^{-1}$
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 3.2
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 2.0

(b) pH 6.0

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 2.2 \times 10^{-2}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 7.0 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 3.0 \times 10^{-1}$
Electrophoretic velocity	[$\mu\text{m/s}$]	B_4	± 5.3
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 5.3
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	$\pm 3.8 \times 10^{-1}$
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	$\pm 3.8 \times 10^{-1}$
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 5.3
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 3.4

Tables 5.6. (c), (d) and (e). For caption see page 107.

(c) pH 7.1

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 2.2 \times 10^{-2}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 7.6 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 3.4 \times 10^{-1}$
Electrophoretic velocity	[$\mu\text{m/s}$]	B_4	± 3.6
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 3.6
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	$\pm 2.8 \times 10^{-1}$
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	$\pm 2.8 \times 10^{-1}$
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 3.6
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 2.3

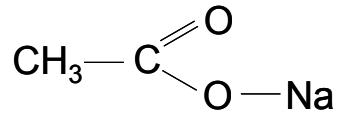
(d) pH 8.1

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 2.2 \times 10^{-2}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.1 \times 10^{-1}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 3.8 \times 10^{-1}$
Electrophoretic velocity	[$\mu\text{m/s}$]	B_4	± 5.2
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 5.2
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	± 1.8
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	± 1.8
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 6.3
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 4.1

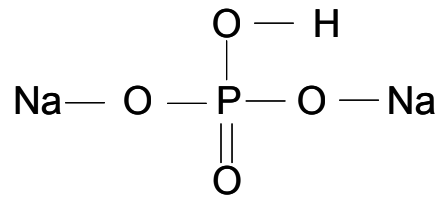
(e) pH 9.3

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m/s}$]	B_1	$\pm 2.2 \times 10^{-2}$
pH meter	[$\mu\text{m/s}$]	B_2	$\pm 1.1 \times 10^{-1}$
Power supply	[$\mu\text{m/s}$]	B_3	$\pm 4.5 \times 10^{-1}$
Electrophoretic velocity	[$\mu\text{m/s}$]	B_4	± 6.8
Bias index	[$\mu\text{m/s}$]	B_m	± 6.8
Standard deviation	[$\mu\text{m/s}$]	S_1	$\pm 1.9 \times 10^{-1}$
Precision index	[$\mu\text{m/s}$]	S_m	$\pm 1.9 \times 10^{-1}$
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m/s}$]	U_{RSS}	± 6.8
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3}$ V]	U_{RSS}	± 4.4

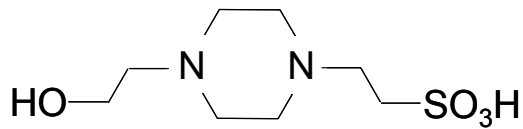
(a) Acetate CH_3COONa



(b) Phosphate Na_2HPO_4



(c) HEPES $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$



(d) Borate $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$

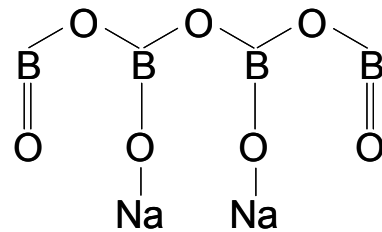


Figure 5.1. Chemical structures of (a) Acetate buffer solution (pH 4.6), (b) Phosphate buffer solution (pH 6.0), (c) HEPES buffer solution (pH 7.1) and (d) Borate/HCl or Borate buffer solution (pH 8.1 or 9.3).

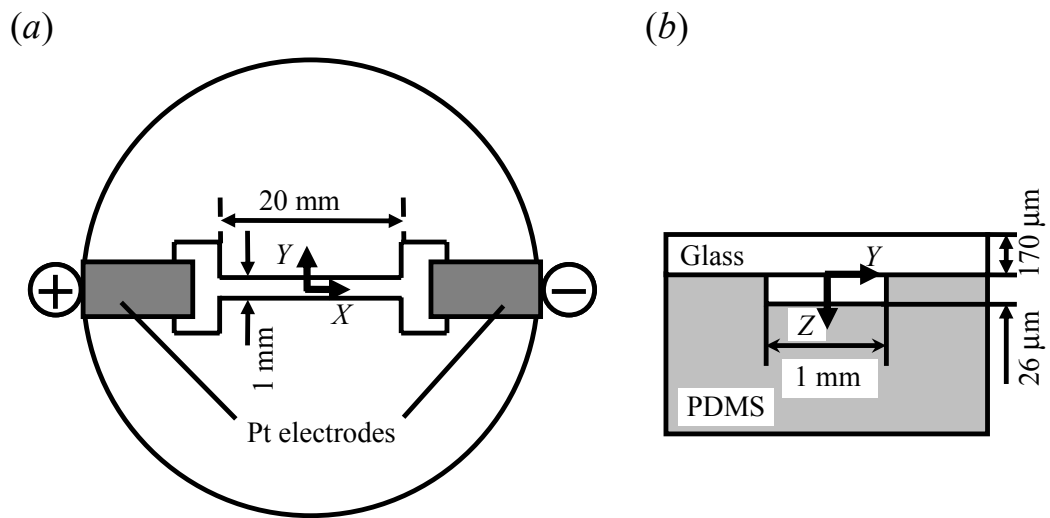


Figure 5.2. (a) Top and (b) cross-sectional views of the closed electrokinetic cell.

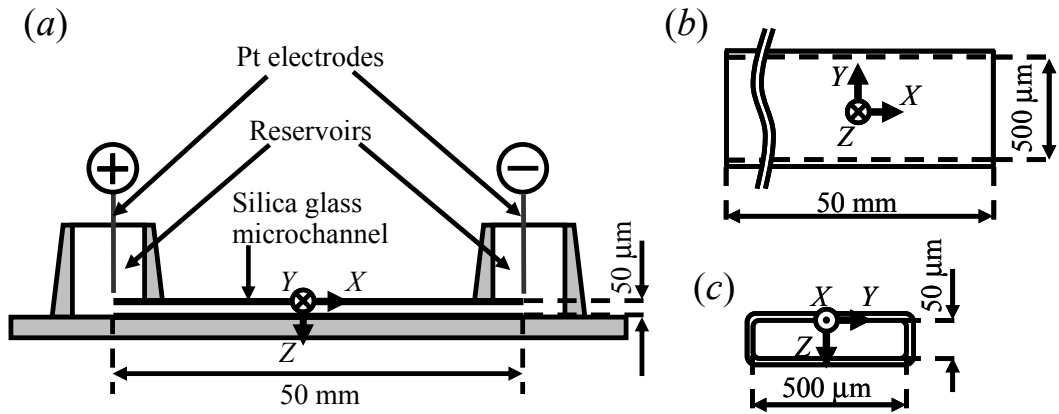


Figure 5.3. (a) Schematic of the silica glass microchannel. (b) Top and (c) cross-sectional views of a silica glass microchannel.

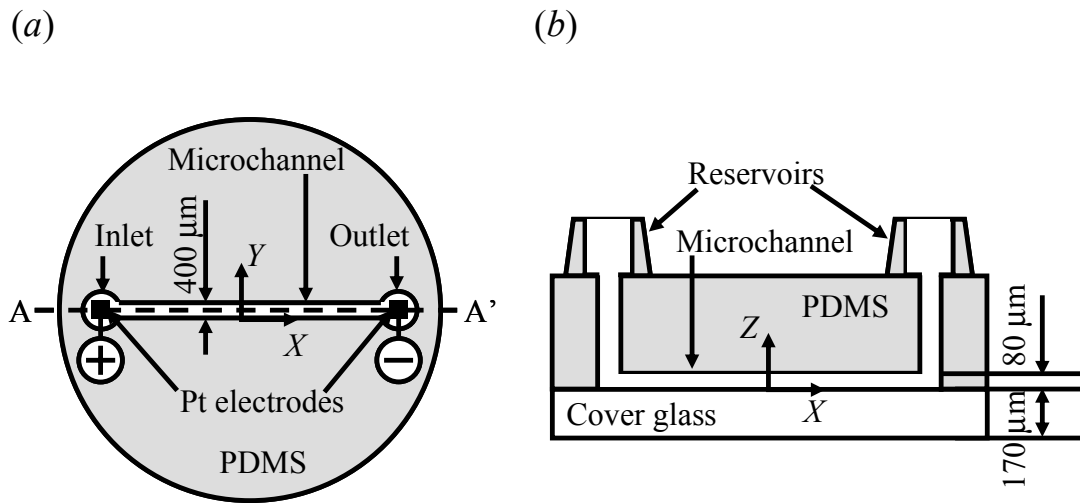


Figure 5.4. (a) Top view and (b) cross-sectional view along the A-A' of the I-shaped microchannel.

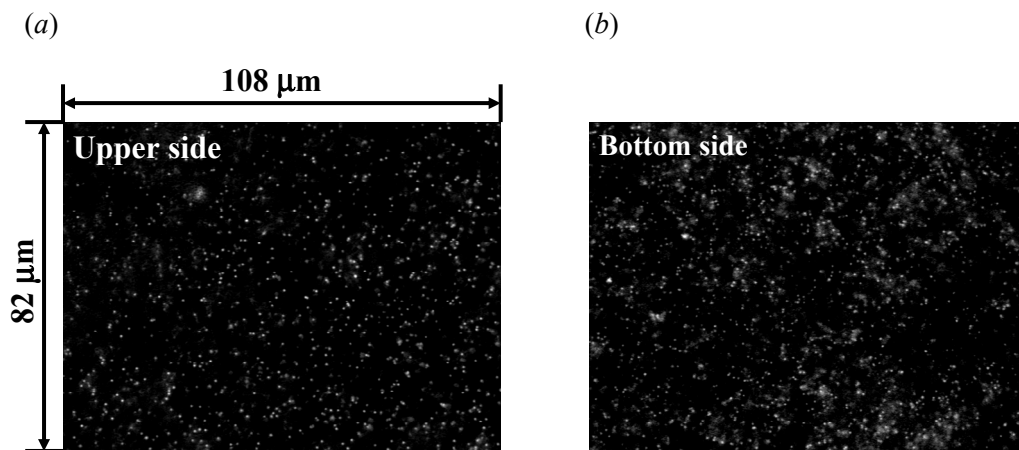


Figure 5.5. Instantaneous images of 0.5 μm diameter particles at (a) $z = 1 \mu\text{m}$ (upper side) and (b) 25 μm (bottom side) of the closed electrokinetic cell. pH of buffer solution was 9.3. The number densities of particles per unit area were (a) 68.7 and (b) 68.0 [$10^{-3}/\mu\text{m}^2$].

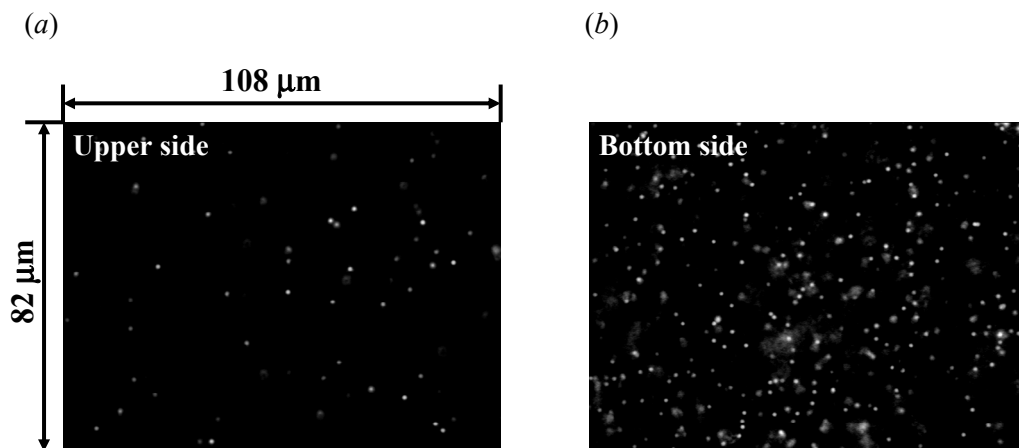


Figure 5.6. Instantaneous images of 1.0 μm diameter particles at (a) $z = 1 \mu\text{m}$ (upper side) and (b) 25 μm (bottom side) of the closed electrokinetic cell. pH of buffer solution was 9.3. The number densities of particles per unit area were (a) 8.6 and (b) 25.4 [$10^{-3}/\mu\text{m}^2$].

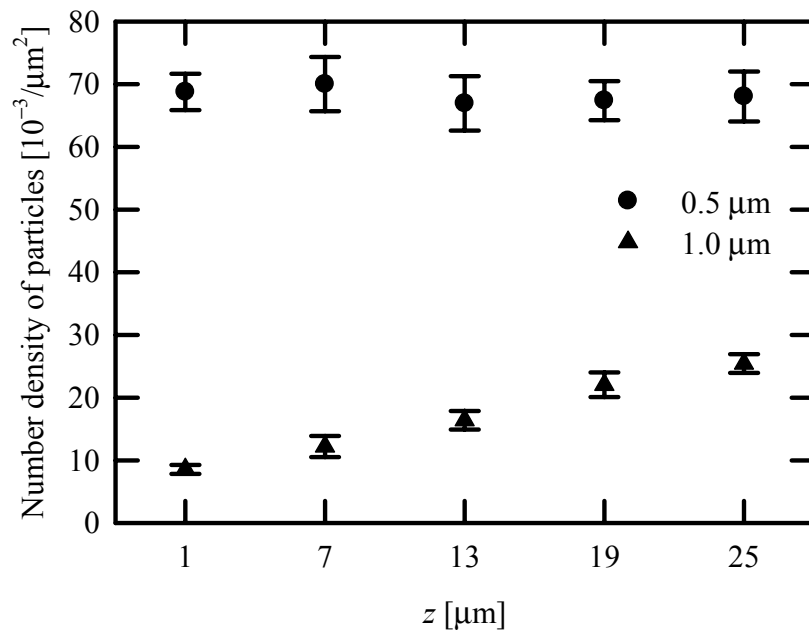


Figure 5.7. The number density of 0.5 μm and 1.0 μm diameter particles per unit area in terms of the depth-wise direction in the closed electrokinetic cell. pH of buffer solution was 9.3.

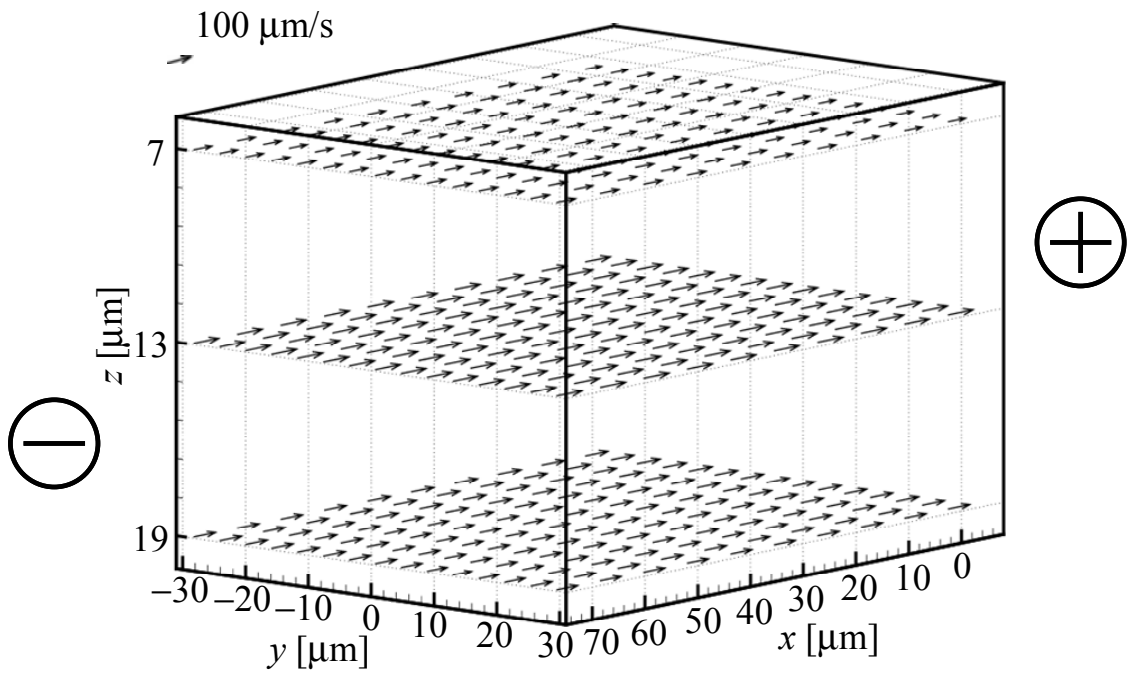


Figure 5.8. Ensemble-averaged velocity-vector field at pH 9.3 in the closed electrokinetic cell on application of 20 V/cm.

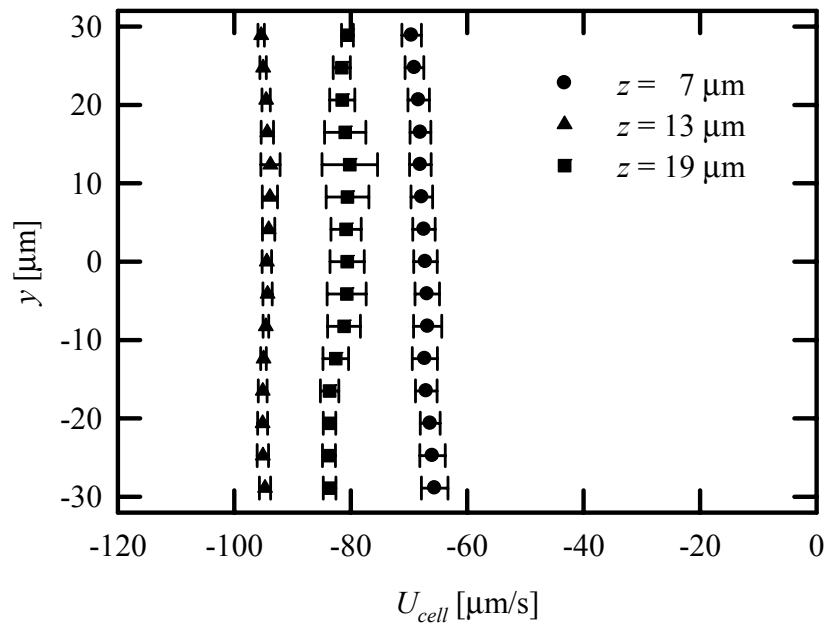


Figure 5.9. Velocity profiles with the standard deviation at each plane in Z direction for pH 9.3 in the closed electrokinetic cell on application of 20 V/cm: near the glass wall ($z = 7 \mu\text{m}$, ●), at the depth-midpoint ($z = 13 \mu\text{m}$, ▲) and near the poly(dimethylsiloxane) (PDMS) wall ($z = 19 \mu\text{m}$, ■).

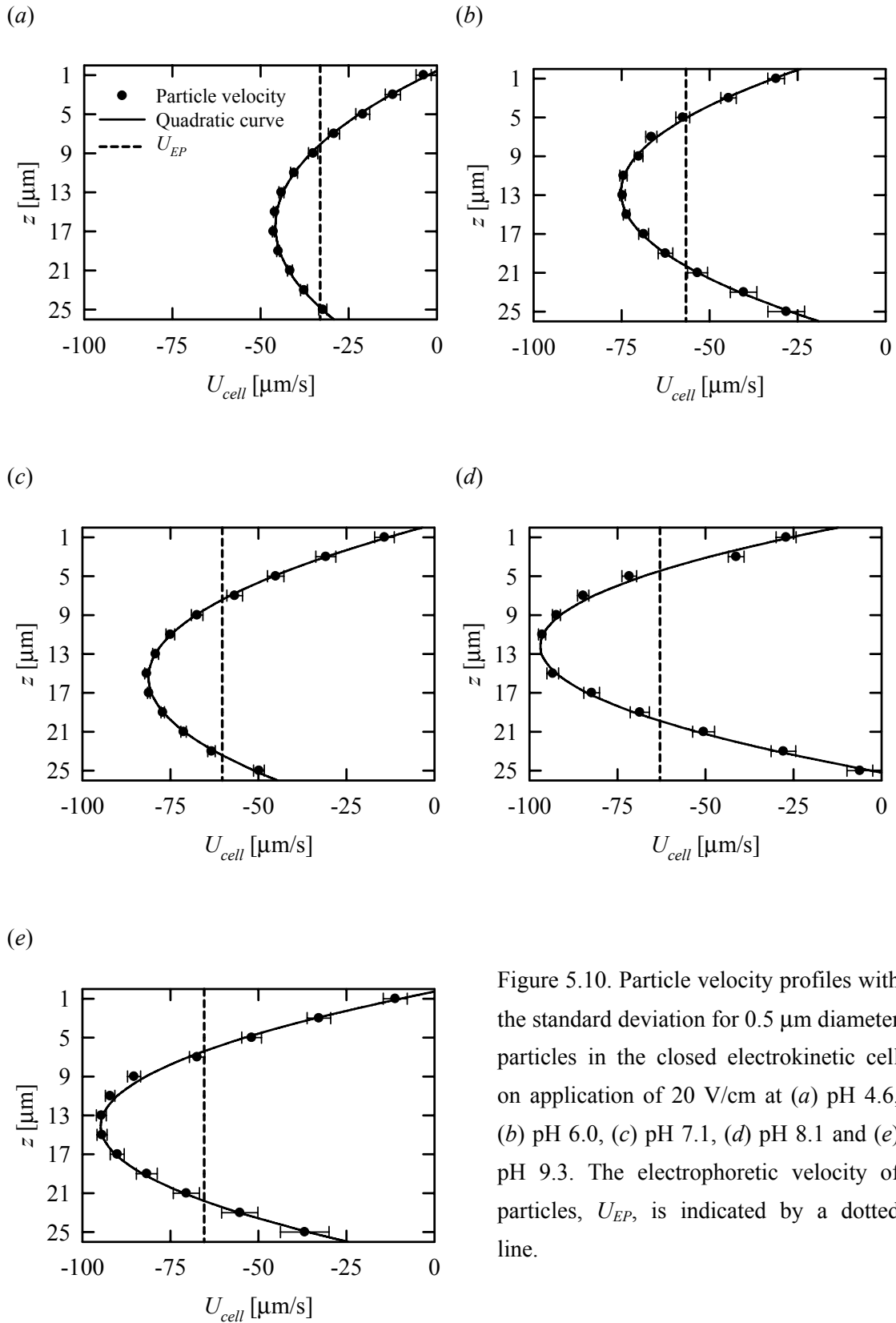


Figure 5.10. Particle velocity profiles with the standard deviation for 0.5 μm diameter particles in the closed electrokinetic cell on application of 20 V/cm at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3. The electrophoretic velocity of particles, U_{EP} , is indicated by a dotted line.

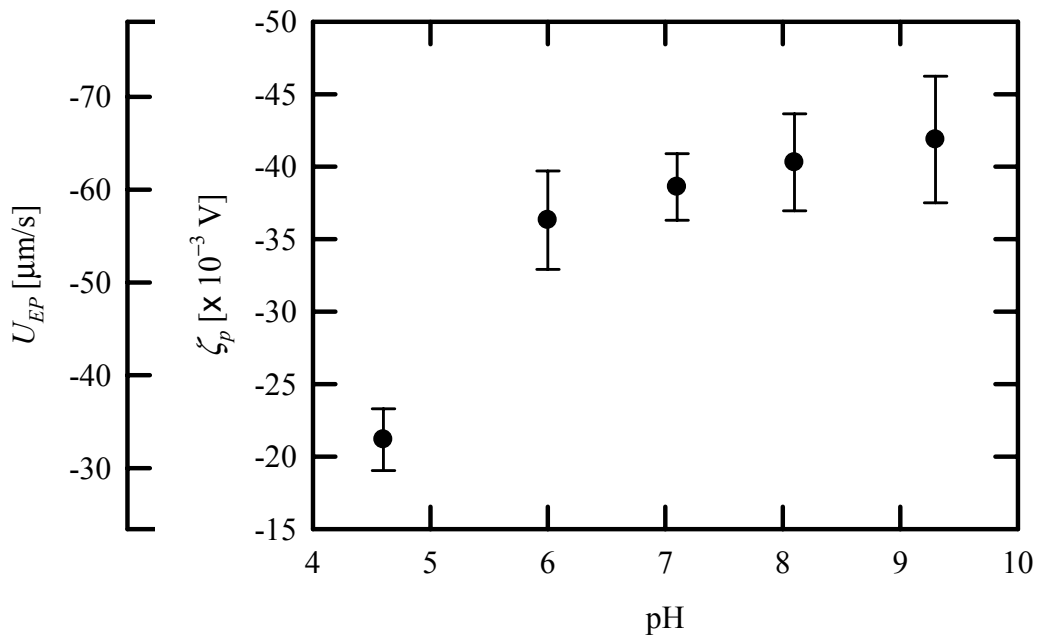


Figure 5.11. Electrophoretic velocity and zeta-potential at 0.5 μm diameter particle surface with 95% confidence interval versus pH.

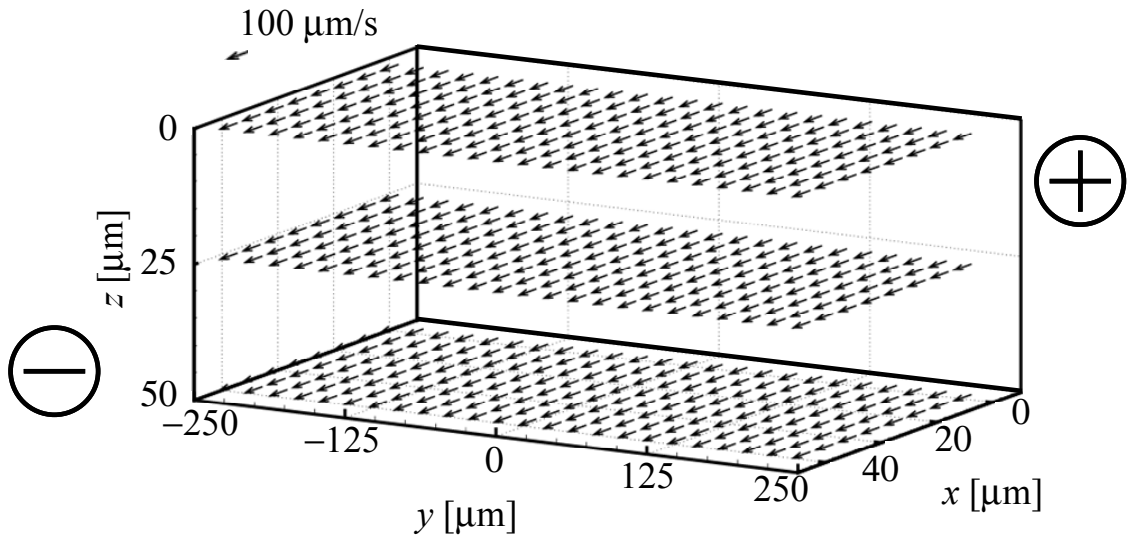


Figure 5.12. Ensemble-averaged velocity-vector field of electroosmotic flow at pH 9.3 in the silica glass microchannel on application of 20 V/cm.

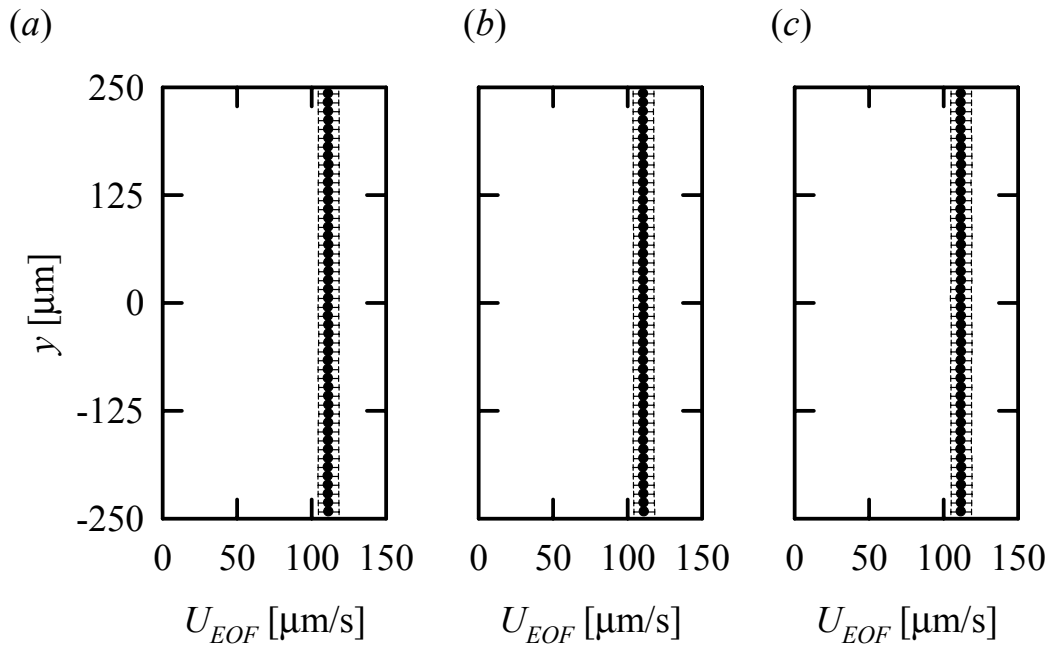


Figure 5.13. Electroosmotic flow velocity profiles with standard deviation at pH 9.3 in the silica glass microchannel on application of 20 V/cm at (a) $z = 1 \mu\text{m}$, (b) $z = 25 \mu\text{m}$ and (c) $z = 49 \mu\text{m}$.

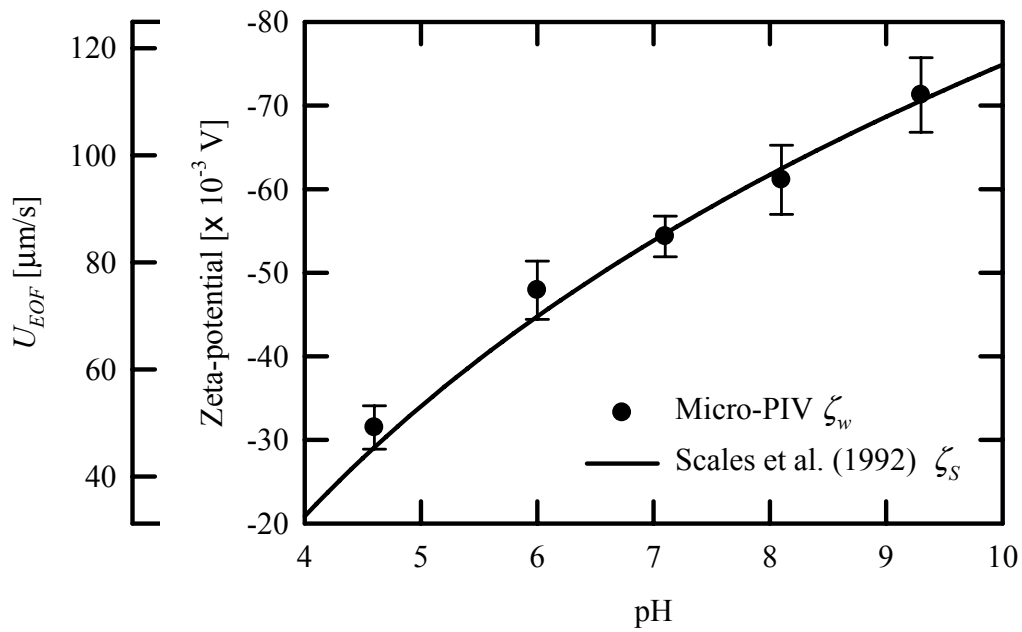
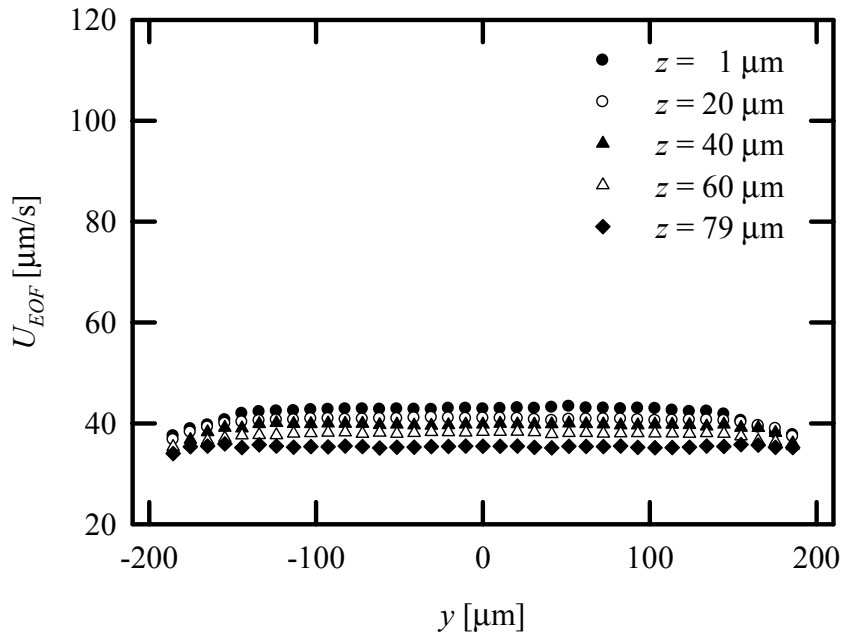
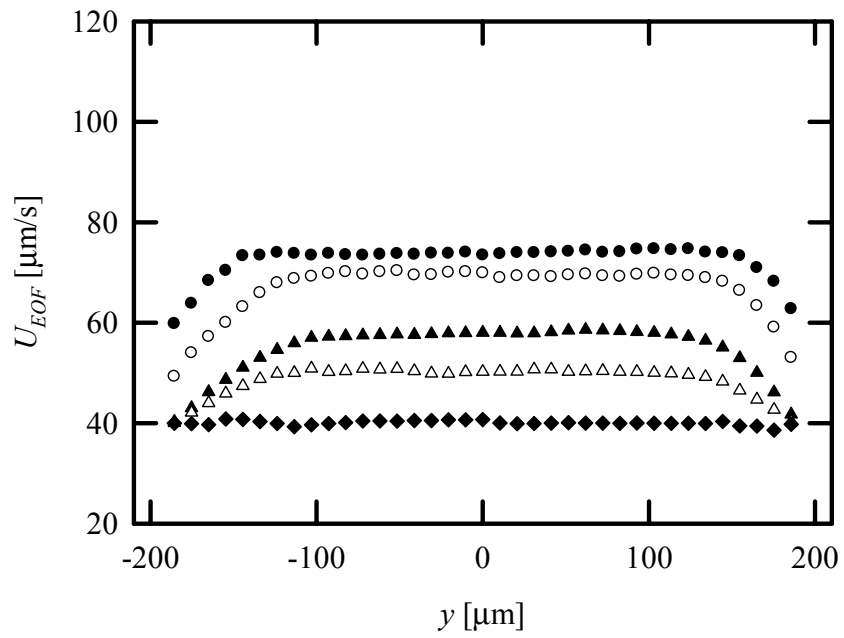


Figure 5.14. Electroosmotic flow velocity and zeta-potential of the silica glass microchannel with 95% confidence intervals in comparison to the equation proposed by Scales et al. (1992) versus pH.

(a)

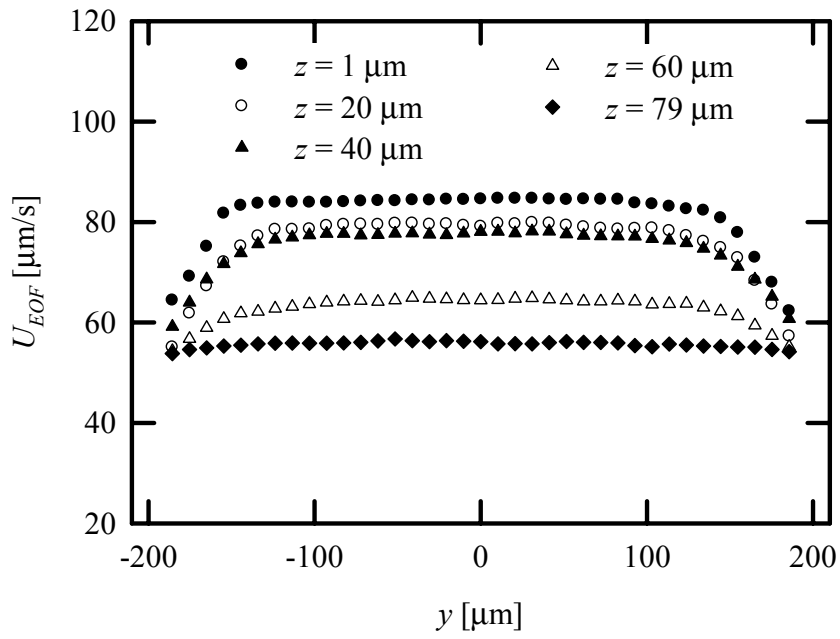


(b)

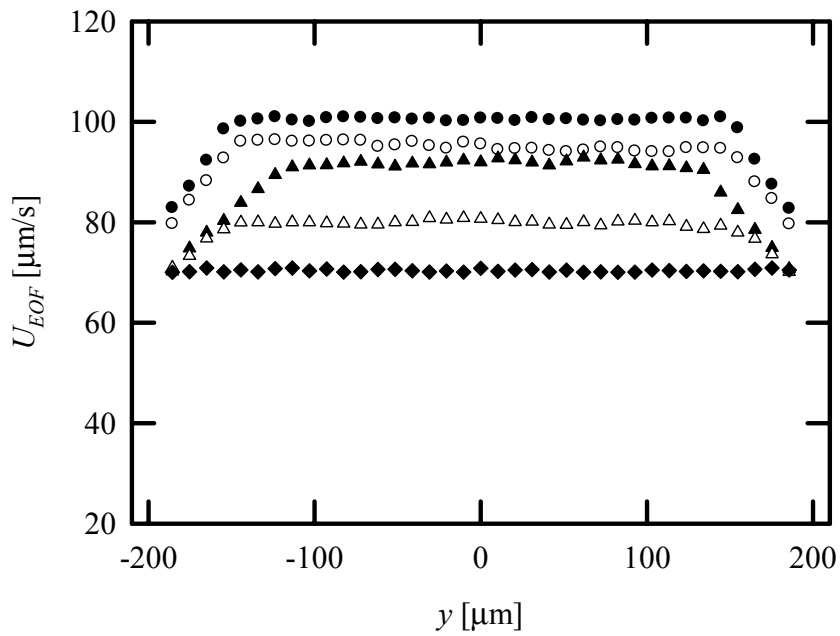


Figures 5.15. (a) and (b). For caption see page 121.

(c)



(d)



Figures 5.15. (c) and (d). For caption see page 121.

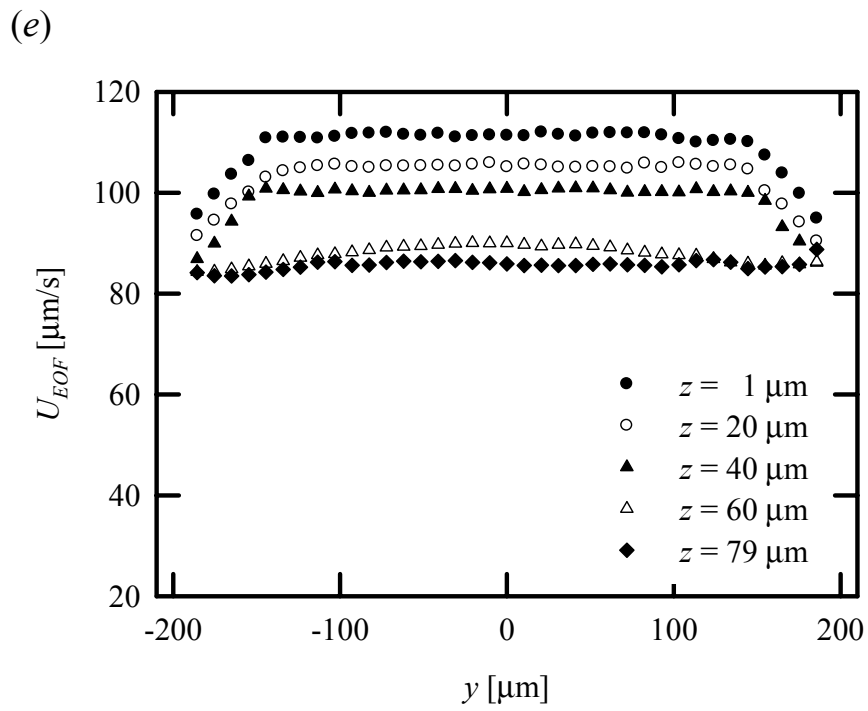
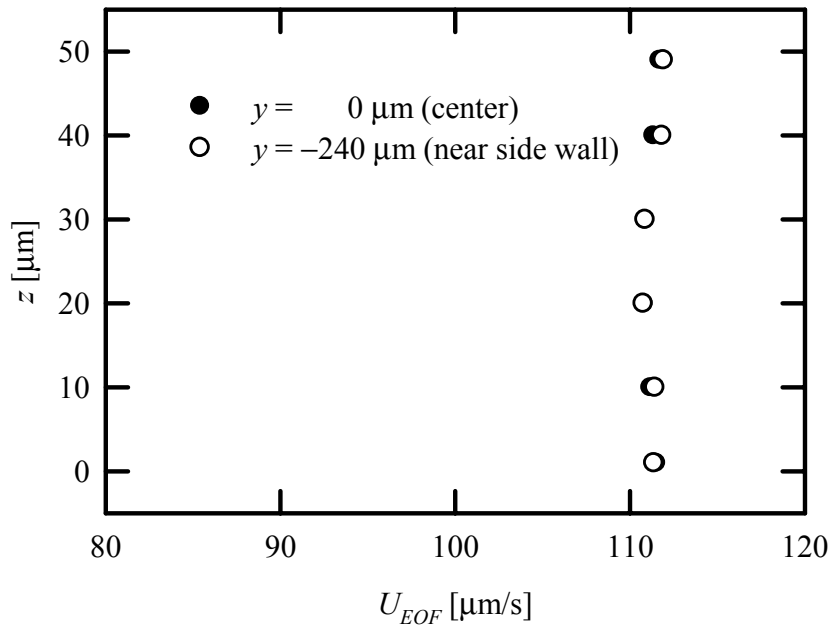


Figure 5.15. Electroosmotic flow velocity profiles in the complex microchannel on application of 20 V/cm at (a) pH 4.6, (b) pH 6.0, (c) pH 7.1, (d) pH 8.1 and (e) pH 9.3.

(a)



(b)

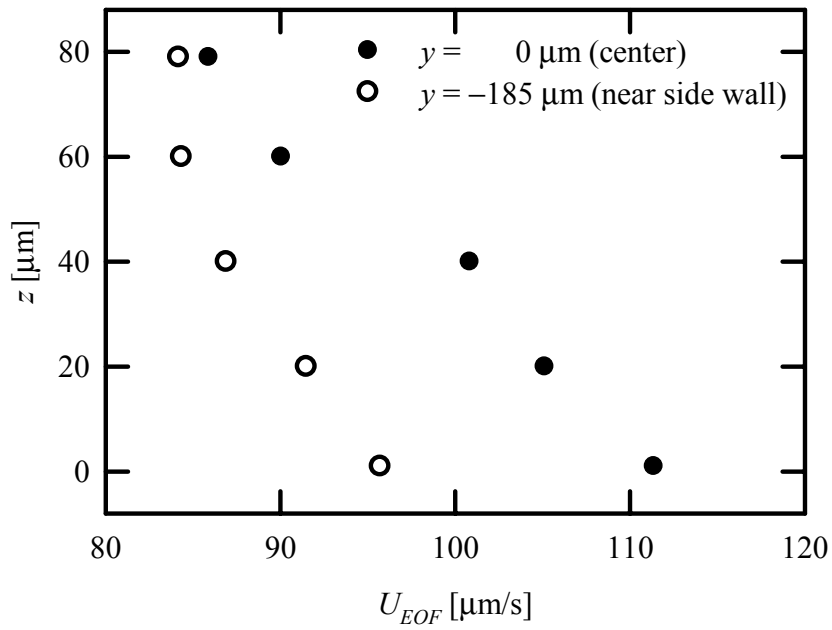


Figure 5.16. Comparison between electroosmotic velocity profile for pH 9.3 at the center in the spanwise direction and that near the side wall in (a) silica glass microchannel and (b) complex microchannel.

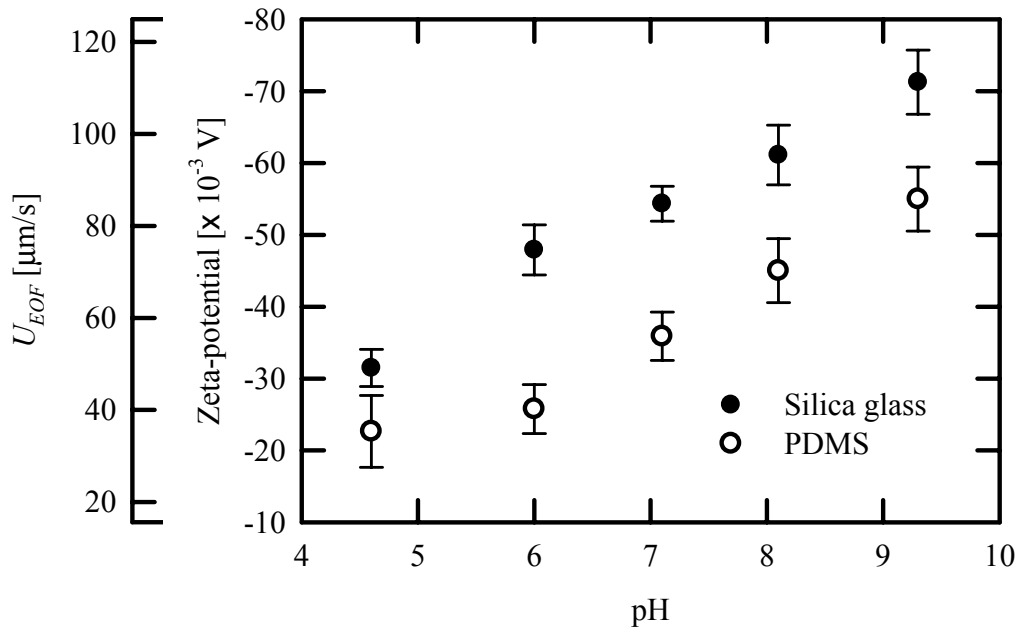


Figure 5.17. Electroosmotic flow velocity and zeta-potential with 95% confidence intervals of the silica glass in comparison to those of PDMS.

第6章
表面改質による電気浸透流の流動特性

6.1 はじめに

流路の複雑化に伴い流路材質が複数に渡ることによってゼータ電位が非一様となる場が形成されており、5章ではガラスとポリジメチルシロキサン (PDMS) の複合型流路内の速度分布を明らかにした。それに対し、近年では流路壁面を物理的に改質することでゼータ電位を非一様に分布させる技術 (表面改質技術) も進展してきており (Kutter et al. 1998; Jun et al. 2002; Zhao et al. 2001; Reyes et al. 2002; Quist et al. 2005; Pallandre et al. 2006), この技術を用いれば上述の非一様な分布を一様分布に変えることや、逆により非一様にすることで混合促進の効果が期待される。しかしながら、表面改質技術により形成される非一様なゼータ電位場の流れを計測または数値解析した研究例は少なく発展途上にある。そこで本章では、表面改質をパターンニングした流路内の流動特性の基礎的知見を得ることを目的とする。マイクロ流路は PDMS にボロシリケートカバーガラスを貼り付けることで作製された。表面修飾剤にはオクタデシルトリクロロシラン (octadecyltrichlorosilane: OTS) を採用し、ガラス上に3種の表面改質パターンニングを行いそれぞれの電気浸透流速度の評価を行った。

6.2 実験装置および評価法

6.2.1 作動流体および蛍光粒子

作動流体には、pH 7.0 の HEPES 緩衝溶液を選定し、イオン交換水により 5×10^{-3} mol/l に調整した。蛍光粒子は、Table 6.1 に示す粒子径 $0.5 \mu\text{m}$ の負極帯電粒子 (Invitrogen Corp.: FluoSpheres, Carboxylate-modified microspheres) を使用し、作動流体に体積比率 0.1 % で混入した。なお、蛍光粒子の表面には、カルボキシル基 (-COOH) が付加されており、緩衝液内では相互のクーロン力により均一に分散する。

6.2.2 計測装置概要

蛍光粒子を観測するために、Figure 3.12 に示す共焦点顕微鏡を用いた。光源には連続光の Ar レーザ (波長 488 nm, 出力 50 mW) を用い、光ファイバにより共焦点スキャナへ導入して粒子を励起した。粒子からの蛍光発光は、CCD カメラ (浜松ホトニクス株式会社, C4880-80, $656 \text{ pixels} \times 494 \text{ pixels} \times 8 \text{ bits}$) により、フレーム間隔 37 ms で撮像した。なお、電気泳動速度の計測には、倍率 60 倍の油浸系対物レンズ (株式会社ニコン, CFI Plan Fluor, NA 1.4) を使用した。一方、電気浸透流速度の計測には、倍率 40 倍の油浸系対物レンズ (株式会社ニコン, CFI Plan Fluor, NA 1.3) および 0.6 倍の TV レンズを使用した。それぞれの計測領域は、 $108 \mu\text{m} \times 82 \mu\text{m}$ および $270 \mu\text{m} \times 204 \mu\text{m}$ である。

6.2.3 表面改質法

Figure 6.1 (a) および 6.1 (b) に、PDMS (信越化学工業株式会社, KE-1606) と、ボロシリケートカバーガラス (松浪硝子株式会社, 厚さ 170 μm) を貼り合せて作製した I 字型流路の概要図を示す。PDMS とガラスで構成されたマイクロ流路は、側壁のゼータ電位の影響により、速度分布が台形型となることが 5.6 節よりわかっている。そのため、流路の幅および深さをそれぞれ 1 mm, 50 μm とし、アスペクト比を 20 以上にすることで側壁の影響を無視した (森, 岡本 1980a)。流路端には、プラスチックの円筒 (直径 10 mm, 高さ 12 mm) をエポキシ系接着剤により接着し、溶液のリザーバとした。白金電極をリザーバに挿入し電圧を印加した。なお、流れ方向を X 方向、流路幅方向を Y 方向および深さ方向を Z 方向とする。

本研究での表面改質では、マイクロコンタクトプリンティング法 (Jun et al. 2002; Quist et al. 2005) を採用し、表面修飾剤にはオクタデシルトリクロロシラン (octadecyltrichlorosilane: OTS, $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-SiCl}_3$) を用いた。この手法により、ガラス上に OTS の自己組織化単分子膜の形成が可能となる。OTS の特性は、ガラス表面が親水性 (接触角: 約 3°) に対し、疎水性 (接触角: 約 110°) を示し、電気浸透流速度はガラスと比して遅くなる。これは、Figure 6.2 に示すようにガラスの末端基 (シラノール基: -SiOH) が、メチル基 (-CH_3) となることに起因する。また、Figure 6.1 (c) – (e) は、表面改質パターンングを示している。Figure 6.1 (c) は、電界と垂直方向にゼータ電位を変化させており、以後、ステップ型流路という。Figure 6.1 (d) は、電界と平行にゼータ電位を変えており、平行型流路という。Figure 6.1 (e) は、タイル型流路という。これら 3 種のパターンングは、全てガラスと OTS の面積比を等しくした。以下に、マイクロコンタクトプリンティング法をまとめる。

1. OTS にて表面改質する領域のみ 100 μm の高さを有する PDMS スタンプをフォトリソグラフィー法 (2.4.2 節) により作製する。
2. PDMS スタンプに、1 分間 OTS 溶液に浸漬させる。なお、OTS 溶液とは、トルエンを溶媒として 5×10^{-3} mol/l OTS を溶かしたものである。
3. 10 分間窒素下で PDMS スタンプを乾燥させ、それと同時にガラスに酸素プラズマを照射する。その後、1 分間 PDMS スタンプをガラスに接触させる。
4. PDMS スタンプをガラスから剥がし、エタノール、塩酸および超純水にて、それぞれ 3 分間洗浄する。

なお、OTS により表面改質されたガラスの三次元構造を、走査型白色干渉法 (New View 6000 Series of 3D Optical Profilers, Zygo Corporation) により計測したところ、OTS の領域

はガラスよりも約 5 nm 厚さが増した。この膜厚さは、流路深さ 50 μm に対し 0.01 % 程度であるため、流れに影響を及ぼさない。

6.2.4 深さ方向流量の評価法

過去の研究において、非一様なゼータ電位場内の電気浸透流の数値解析を行った結果、三次元流れが発生することが示された (Fu et al. 2003; Erickson and Li 2003)。本研究でもその事実を確認するため、深さ方向流量の評価を行った。その手法は、マイクロ PIV により得られた流れ方向および流路幅方向の電気浸透流速度を、下記の連続の式 (式(2.1) を再表記) に代入し算出するというものである。

$$\frac{\partial U}{\partial x} + \frac{\partial V}{\partial y} + \frac{\partial W}{\partial z} = 0 \quad (2.1)$$

ここで、 U は流れ方向速度、 V は流路幅方向速度、 W は深さ方向速度である。式(2.1) は中心差分法により離散化されており、コントロールボリュームの大きさはマイクロ PIV のベクトル間隔および深さ方向位置より定義され 8.25 $\mu\text{m} \times 8.25 \mu\text{m} \times 4.4 \mu\text{m}$ ($\Delta x \times \Delta y \times \Delta z$) である。なお、正の値は深さ方向に対してコントロールボリューム内に流入する量を表し、負の値は逆に流出する量を示す。

6.3 電気泳動速度の評価

3.3.2 節に示すように、マイクロ PIV 計測から電気浸透流速度を評価するためには、電気泳動速度を密閉セル内で計測し、見かけの粒子速度から差し引く必要がある。そのため、本節では電気泳動速度の評価を行った。Figure 6.3 に密閉セルの概要図を示す。密閉セルは、幅 1 mm、深さ 50 μm (密閉セルの幅 / 深さのアスペクト比: $k=20$) のボロシリケート流路 (VitroCom Inc., Large Ratio Rectangle Tubing RT5015) およびシリコンチューブで作製し、両者を接着する際に白金電極を挿入した。流路内に蛍光粒子を含む作動流体を注入し、チューブクランプで閉じることで密閉した。高圧電源 (KEPCO Inc., BOP 1000M) により 40 V/cm の電界を印加して還流が定常状態に達した後、深さ方向に 11 面トラバースして粒子画像をそれぞれ 100 時刻 (3.7 s) 撮像した。粒子のブラウン運動による誤差を除去するために、各々の計測面において粒子速度に時間および空間平均を施し Figure 6.4 に示す。併記した実線は、粒子速度データに最小二乗法を施し 2 次曲線に近似した結果、破線は粒子の電気泳動速度 U_{EP} である。これは、各計測面における粒子速度を式(3.17) のように無次元化し、最小二乗法を用いて式(3.18) に示す 2 次曲線に近似を行い、式(3.19) を適用することにより求めた。これより、電気泳動速度および式(3.20) から評価した粒子のゼータ電位は、それぞれ $-112 \mu\text{m/s}$, $-36.0 \times 10^{-3} \text{ V}$ であった。

また、95 % 包括度不確かさを、以下に記す正確度および精密度から見積もり、Table 6.2 にまとめた。正確度は pH メーターおよび電圧計の誤差および PIV による偏り誤差から、精密度は計測した速度の標準偏差より評価した。

6.4 表面改質の電気浸透流への影響

OTS の電気浸透流への影響を評価するため、ガラス流路 (表面改質なしのガラスと PDMS を貼り合せて作製) および OTS 流路 (全面を表面改質したガラスと PDMS を貼り合せて作製) 内の電気浸透流速度を比較した。上述の2種の流路に、蛍光粒子を含む緩衝溶液を注入し、流路端に設置したリザーバの水面の高さを等しくすることで静圧駆動流の影響を除去した。注入口および出口に白金電極を挿入し、電界 40 V/cm を印加して電気浸透流を発生させた。深さ方向に 11 面トラバースして、それぞれの計測面において粒子画像を 100 時刻 (3.7 s) 撮像した。粒子のブラウン運動による速度検出への誤差を除去するために、各々の計測面において 100 時刻の速度ベクトルを平均して見かけの粒子速度 U_{obs} を算出した。電気浸透流速度 U_{EOF} は、6.3 節にて求めた電気泳動速度 U_{EP} を見かけの粒子速度から差し引くことにより求めた。なお、PIV の参照窓の大きさは $16.5 \mu\text{m} \times 16.5 \mu\text{m}$ (40×40 pixels) であり、各々の参照窓は 50 % オーバーラップをしているため、ベクトル間隔は $8.25 \mu\text{m}$ である。

ガラス流路および OTS 流路内の電気浸透流速度を Figure 6.5 に示し、式(3.21) より評価したボロシリケートガラス、OTS および PDMS のゼータ電位を Table 6.3 に表記した。ガラスおよび OTS のゼータ電位はそれぞれの流路の $z = 4.4 \mu\text{m}$ での速度から、PDMS は $z = 48.4 \mu\text{m}$ の位置での速度から見積もった。本計測における不確かさは、PIV の偏り誤差、pH メーターの誤差、電圧計の誤差、電気泳動速度計測の 95 % 包括度不確かさ、および速度計測の標準偏差より評価し、Table 6.4 にまとめて表記した。これより、不確かさは代表速度 ($223 \mu\text{m/s}$) の 4.2 % 以下となる。Figure 6.5 に示す 2 種の流路の PDMS 近傍 ($z = 48.4 \mu\text{m}$) の速度はほぼ同じ値を示している。一方、OTS 近傍の速度はガラス近傍の速度よりも小となっている。これらの結果は、ゼータ電位が等しい PDMS 近傍では両流路とも速度がほぼ等しくなるが、OTS によりガラス表面を改質すると末端基がシラノール基からメチル基に変わるため、ゼータ電位の絶対値が小となり電気浸透流速度も小となることを示している。なお、Table 6.4 より OTS のゼータ電位は、ガラスのそれよりも 20 % 程度小となることがわかる。また、電界を 30 秒間印加した際に陰極側の水頭が上昇することによって生じる静圧駆動流は、 $0.06 \mu\text{m/s}$ と見積もられた。この値は、Table 6.4 に示す 95 % 包括度不確かさ $9.4 \mu\text{m/s}$ よりも十分小さいこと、および代表速度の 0.03 % 以下であることから、静圧駆動流は電気浸透流に影響しない。

6.5 非一様ゼータ電位分布内の電気浸透流速度

6.5.1 ステップ型流路

表面改質パターンニングによる非一様ゼータ電位分布内の流動特性を把握するため Figure 6.1 に示す3種のマイクロ流路内の電気浸透流速度を評価し、本節ではステップ型流路での結果を示す。Figure 6.6 は流路内の OTS 領域 ($x = -200 \mu\text{m}$, $y = 0 \mu\text{m}$) およびガラス領域 ($x = 200 \mu\text{m}$, $y = 0 \mu\text{m}$) での電気浸透流速度分布である。この結果より、ガラスおよびOTS領域でのPDMS近傍 ($z = 35.2 \mu\text{m}$) の速度は両者ともほぼ同じ速度を有しているが、OTS近傍 ($z = 4.4 \mu\text{m}$) での速度はガラス近傍での速度より小となっていることがわかる。また、OTS領域での深さ方向中心位置 ($z = 22.0 \mu\text{m}$) での速度はOTSおよびPDMS近傍 ($z = 4.4 \mu\text{m}$ および $35.2 \mu\text{m}$) よりも大となっており、速度分布は二次曲線を示している。以上の結果は、OTSおよびガラス領域において質量保存則が成立し、流量が等しくなったことに起因する。

一方、Figure 6.7 はOTSとガラスの境界領域 ($x = 0 \mu\text{m}$, $y = 0 \mu\text{m}$) での電気浸透流速度分布であり、Figure 6.8 はFigure 6.7の速度分布より評価した深さ方向流量を示している。これより、ガラス領域 ($x > 0 \mu\text{m}$) における $z = 4.4 \mu\text{m}$ での速度分布はOTS領域 ($x < 0 \mu\text{m}$) と比して $40 \mu\text{m/s}$ 程度上昇し、深さ方向流量分布は正の値を示すためコントロールボリューム内に流入していることがわかる。また、 $z = 22.0 \mu\text{m}$ および $35.2 \mu\text{m}$ での速度分布は流れ方向に減少し、深さ方向流量分布は負の値を示すためコントロールボリュームから流出していることが確認できる。これらの結果を総括すると、流れ方向にゼータ電位が変化する流動場では、その境界領域にて流路上部 (PDMS側) から流路下部 (ガラス側) への深さ方向速度を有する電気浸透流動場が形成されると推察される。

6.5.2 平行型流路

平行型流路内の流路幅方向に対する電気浸透流速度分布を Figure 6.9 に、深さ方向に対する速度分布を Figure 6.10 に示す。なお、 $y < 0 \mu\text{m}$ はガラス領域、 $y > 0 \mu\text{m}$ はOTS領域の結果である。Figure 6.9 より、ガラス近傍の速度勾配 ($z = 4.4 \mu\text{m}$) は、PDMS近傍の勾配 ($z = 35.2 \mu\text{m}$) よりも大となっており、特に $-50 \mu\text{m} < y < 50 \mu\text{m}$ では流体の粘性の影響により遷移領域となっている。また、Figure 6.10 での深さ方向に対する速度分布は、勾配の大きさに差はあるものの全てが線形を有している。これらの結果は、過去の研究 (Erickson and Li 2003) と定性的に一致する。一方、Figure 6.11 に示した深さ方向流量分布の結果は全ての領域においてほぼ0という値を示しており、深さ方向に流れが生じなかったことを意味している。流れ方向にゼータ電位が変化するステップ型流路では深さ方向流れが生じたことを鑑みると、平行型流路は流れ方向にゼータ電位が一様であるため深さ方向に流れが生じなかったと推測される。

6.5.3 タイル型流路

タイル型流路の計測領域における表面改質パターンニングの概要図を Figure 6.12 (a) に示す. Figures 6.12 (b), (c) および (d) は, それぞれ $z = 4.4 \mu\text{m}$, $22.0 \mu\text{m}$ および $35.2 \mu\text{m}$ での電気浸透流速度ベクトル (図中の矢印) および速度の絶対値 U_{mag} (図中の等高線図) である. また, $y = -50 \mu\text{m}$ および $50 \mu\text{m}$ での電気浸透流の流れ方向速度を Figure 6.13 (a) に, 流路幅方向速度を Figure 6.13 (b) に示す. Figure 6.12 の $z = 4.4 \mu\text{m}$ では, 速度の絶対値が大となる領域がガラスの領域とほぼ一致し, 逆に速度の絶対値が小となる領域は OTS と一致することがわかる. 一方, $z = 22.0 \mu\text{m}$ および $35.2 \mu\text{m}$ では, 速度の絶対値はほぼ一様の値を示している. 着目すべき点は, $z = 4.4 \mu\text{m}$ および $35.2 \mu\text{m}$ では流れ方向速度が支配的な流動場であるのに対し, $z = 22.0 \mu\text{m}$ での速度ベクトルは, $x < 0 \mu\text{m}$, $y < 0 \mu\text{m}$ のガラス領域から $x > 0 \mu\text{m}$, $y > 0 \mu\text{m}$ のガラス領域へ向いていることである. すなわち, 流路の深さ方向中心位置にて, 流路幅方向の電気浸透流速度がもたらされたことを提示している. なお, Figure 6.13 (b) より $z = 22.0 \mu\text{m}$ での流路幅方向速度は, $z = 4.4 \mu\text{m}$ および $35.2 \mu\text{m}$ よりも約3倍大となると見積もられた. 上述の結果から, 表面改質によるガラス近傍 ($z = 4.4 \mu\text{m}$) での速度分布の影響 (Figure 6.13 (a) に示す $y < 0 \mu\text{m}$ での速度の減少および $y > 0 \mu\text{m}$ での速度の増大) が, 流路深さ方向中心位置 ($z = 22.0 \mu\text{m}$) にて流路幅方向速度を誘起したと推察される.

Figure 6.14 は $z = 4.4 \mu\text{m}$ での深さ方向流量の二次元分布を描画しており, Figures 6.15 (a) および (b) はそれぞれ $y = -50 \mu\text{m}$ および $50 \mu\text{m}$ での深さ方向流量分布を表す. 流れ方向にガラスから OTS に変わる境界領域 ($y < 0 \mu\text{m}$ で Figure 6.13 (a) に示す流れ方向速度が減少する領域) では, 流量分布が負の値を有しているため, コントロールボリューム内から流出することがわかる. 一方, 流れ方向に OTS からガラスに変わる境界領域 ($y > 0 \mu\text{m}$ で Figure 6.13 (a) に示す流れ方向速度が増大する領域) では, 流量分布が正の値を有しているため, コントロールボリューム内に流入することがわかる. これらの結果を総括すると, 流れ方向にゼータ電位が変化する場では, その境界領域にて深さ方向速度を有する電気浸透流が生じる. さらに, 流れ方向および流路幅方向にゼータ電位が変化する場では, 流路幅方向および深さ方向の速度が誘起され, I 字型流路内に三次元流動場が形成される.

6.6 本章のまとめ

表面改質をパターンニングした流路内の流動特性の基礎的知見を得るため, マイクロ PIV により電気浸透流速度を評価した. さらに, 得られた流れ方向および流路幅方向の速度結果を連続の式に代入することで, 深さ方向流量の評価も行った. マイクロ流路は, PDMS にボロシリケートカバーガラスを貼り付けることで作製した. 表面改質パターンニングは, OTS を使ったマイクロコンタクトプリンティング法によりガラス上に施した.

OTSの電気浸透流への影響を評価するため、ガラス流路(表面改質なしの流路)およびOTS流路(ガラス全面を表面改質した流路)内の電気浸透流速度を比較した結果、OTS近傍での速度はガラスよりも小となった。これは、表面改質によりガラスの末端基であるシラノール基がメチル基に変わったことにより、ゼータ電位の絶対値が小となったことに起因する。

表面改質パターニングによる流動特性への影響を把握するため、3種の異なる表面改質を施したマイクロ流路内の電気浸透流速度を評価した。ステップ型流路内では、OTS近傍での速度は、ガラスよりも小となった。一方、流路の深さ方向中心位置では、質量保存則が成立するため、OTS領域での速度が、ガラスよりも大となった。また、深さ方向流量分布結果から、流路上部から下部への深さ方向速度が生じたことが明らかとなった。平行型流路内では、流路幅方向の速度勾配は形成されていたが、流れ方向にゼータ電位が変化しないため、深さ方向速度は生じなかった。タイル型流路では、流れ方向および流路幅方向共にゼータ電位が変化する境界領域にて、流路幅方向および深さ方向の速度が誘起され、三次元流動場が形成された。

Table 6.1. Property of fluorescent particle

Material		Polystyrene
Number mean diameter	[μm]	1.0
Density	[g/cm^3]	1.055
Absorption wavelength	[nm]	505
Emission wavelength	[nm]	515
Optical slice thickness ‡	[μm]	2.2

‡The optical slice thickness was calculated from equation 3.7a.

Table 6.2. Measurement uncertainty of electrophoretic velocity and zeta-potential of particles

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	B_1	$\pm 8.9 \times 10^{-3}$
pH meter	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	B_2	$\pm 5.0 \times 10^{-2}$
Power supply	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	B_3	$\pm 4.5 \times 10^{-1}$
Bias index	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	B_m	$\pm 4.5 \times 10^{-1}$
Standard deviation	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	S_1	± 2.9
Precision index	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	S_m	± 2.9
Measurement uncertainty	[$\mu\text{m}/\text{s}$]	U_{RSS}	± 5.8
Measurement uncertainty	[$\times 10^{-3} \text{ V}$]	U_{RSS}	± 1.9

Table 6.3. Zeta-potentials of glass, octadecyltrichlorosilane (OTS) and poly(dimethylsiloxane) (PDMS) surfaces

Glass	$[\times 10^{-3} \text{ V}]$	-78.6 ± 1.0
OTS	$[\times 10^{-3} \text{ V}]$	-62.2 ± 1.2
PDMS	$[\times 10^{-3} \text{ V}]$	-59.5 ± 1.5

Table 6.4. Measurement uncertainty of electroosmotic flow velocity and zeta-potential at wall surface

Error factor		Symbol	Accuracy
PIV	$[\mu\text{m/s}]$	B_1	$\pm 2.2 \times 10^{-2}$
pH meter	$[\mu\text{m/s}]$	B_2	$\pm 9.4 \times 10^{-2}$
Power supply	$[\mu\text{m/s}]$	B_3	$\pm 8.9 \times 10^{-1}$
Electrophoretic velocity	$[\mu\text{m/s}]$	B_4	± 5.8
Bias index	$[\mu\text{m/s}]$	B_m	± 5.9
Standard deviation	$[\mu\text{m/s}]$	S_1	± 3.6
Precision index	$[\mu\text{m/s}]$	S_m	± 3.6
Measurement uncertainty	$[\mu\text{m/s}]$	U_{RSS}	± 9.4
Measurement uncertainty	$[\times 10^{-3} \text{ V}]$	U_{RSS}	± 3.0

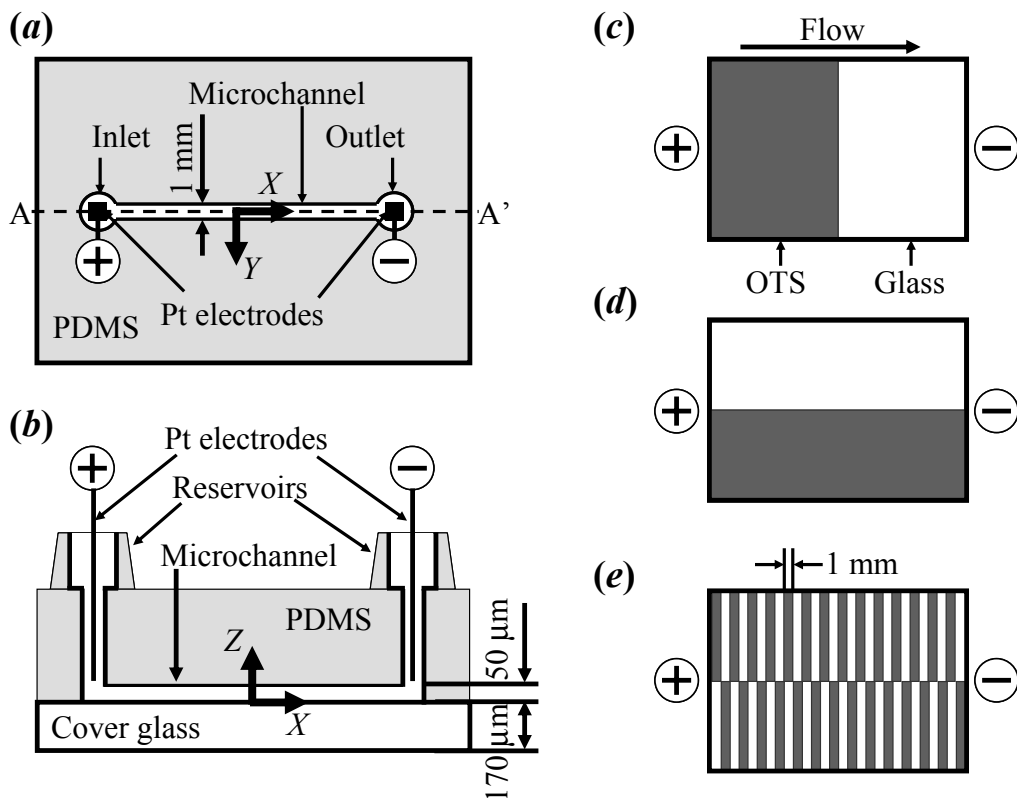


Figure 6.1. (a) Top and (b) cross-sectional views along the line A-A' of the I-shaped microchannel. Three surface modification patterns on cover glasses by octadecyltrichlorosilane (OTS). (c) Step, (d) parallel and (e) tile pattern microchannel.

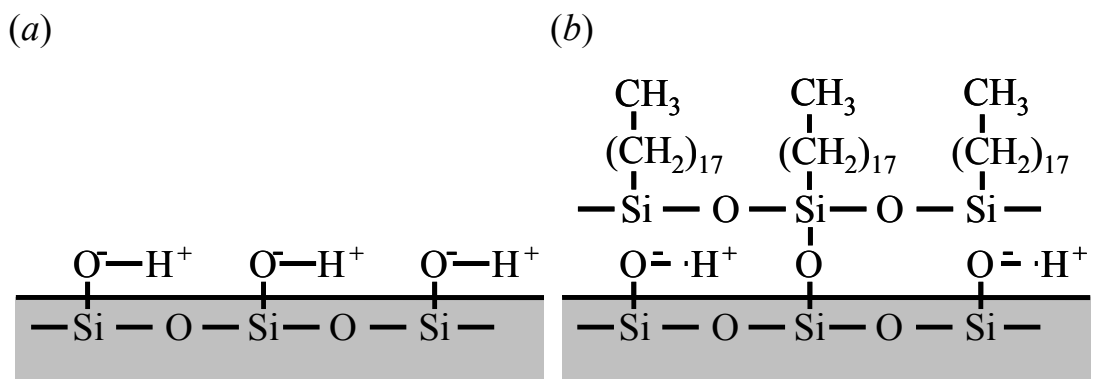


Figure 6.2. (a) Chemical structure of glass surface and (b) that of glass surface modified by OTS.

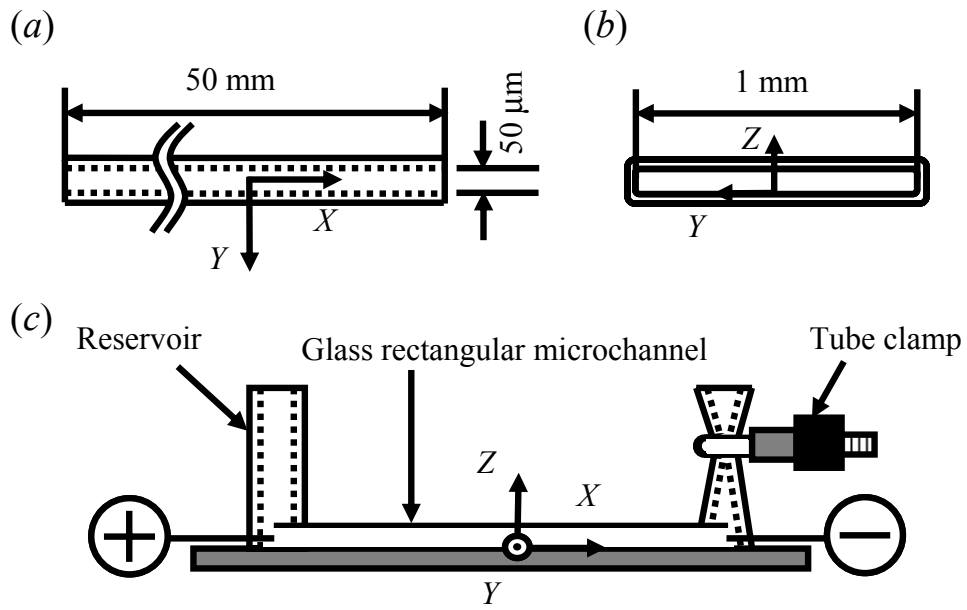


Figure 6.3. (a) Top and (b) cross-sectional views of the glass rectangular microchannel. (c) Schematic of the closed electrokinetic cell.

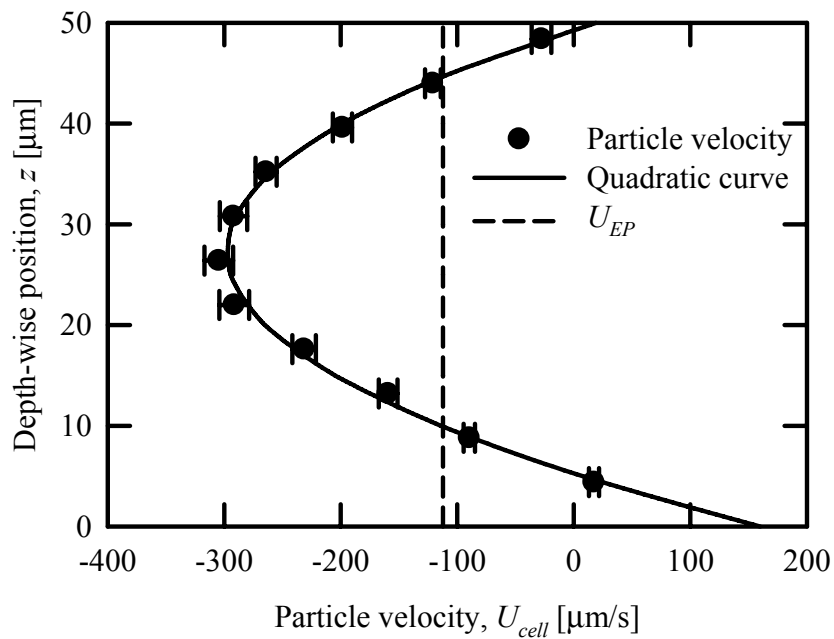


Figure 6.4. Particle velocity profile with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the closed electrokinetic cell on an application of 40 V/cm. The electrophoretic velocity of particles, U_{EP} , is indicated by a dotted line.

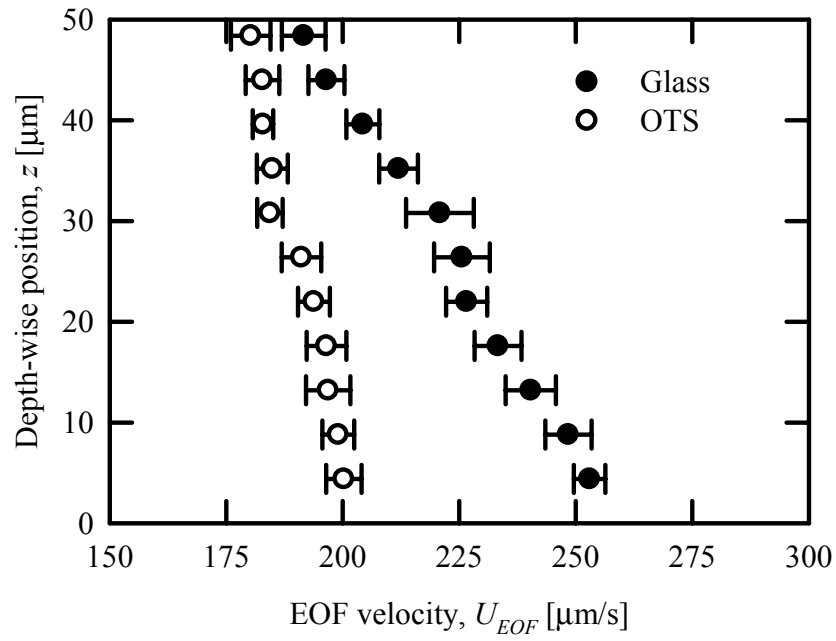


Figure 6.5. Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the glass and the OTS microchannels on an application of 40 V/cm.

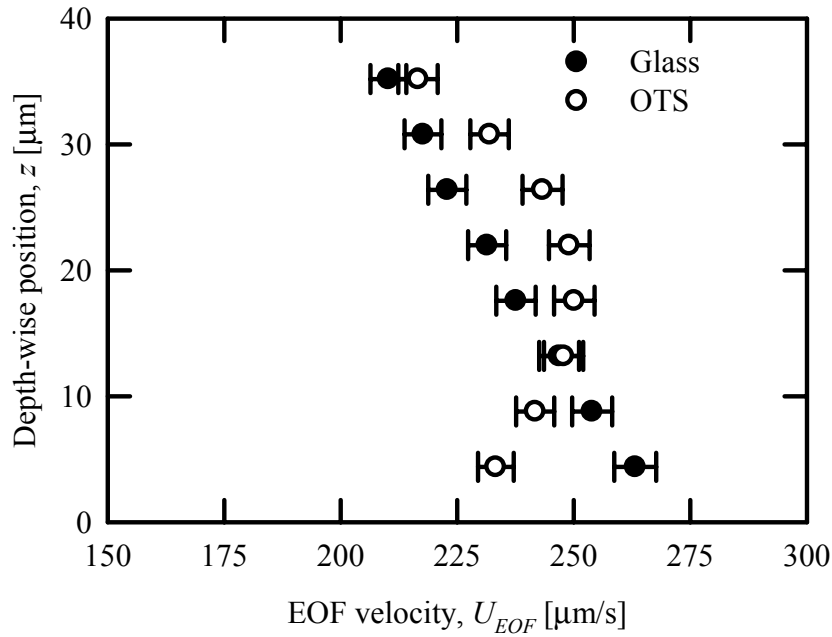


Figure 6.6. Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the step pattern microchannel on an application of 40 V/cm. OTS and glass were captured at $x = -200 \mu\text{m}$ and $x = 200 \mu\text{m}$, respectively.

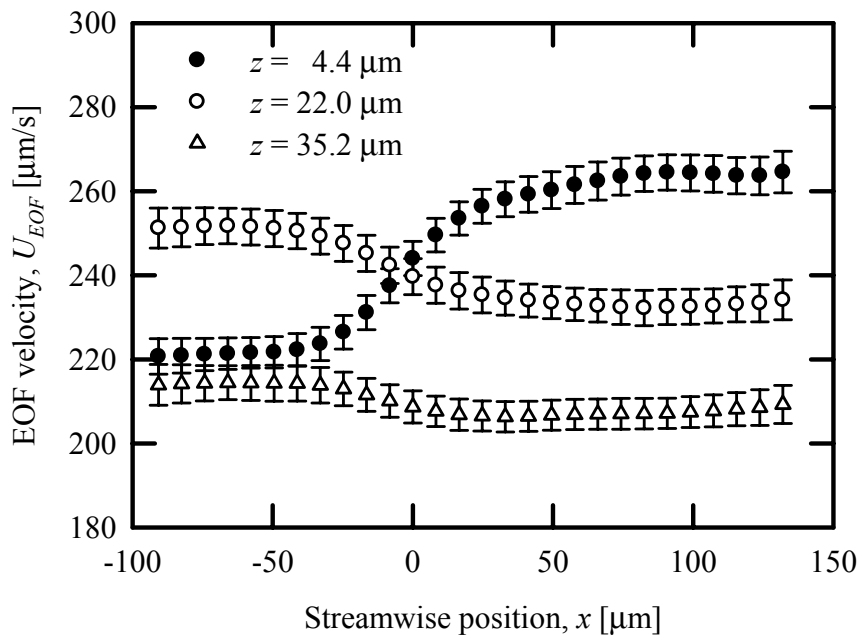


Figure 6.7. Electroosmotic flow velocity profiles at $y = 0 \mu\text{m}$ in terms of stream-wise direction in the step pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $x < 0 \mu\text{m}$ and $x > 0 \mu\text{m}$ indicate OTS and glass surfaces, respectively.

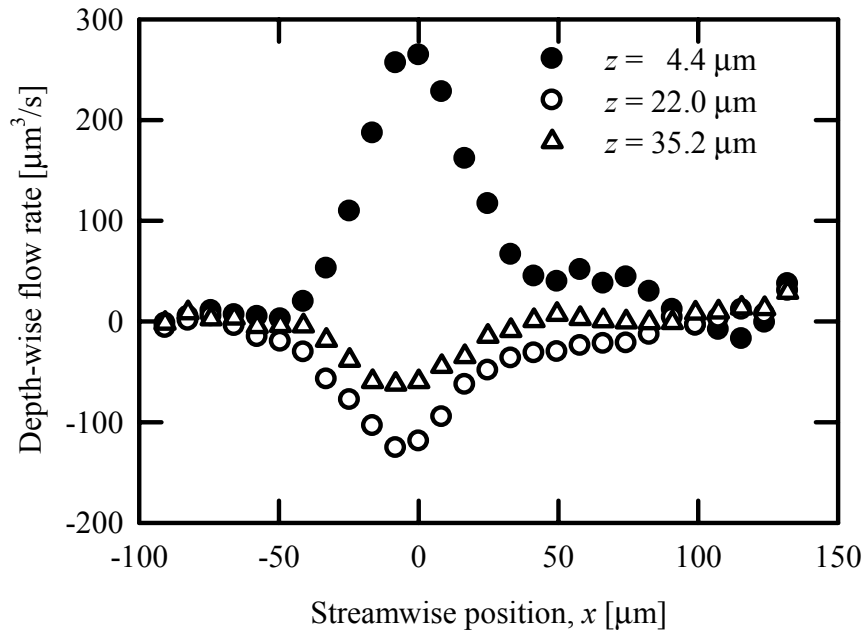


Figure 6.8. Depth-wise volumetric flow rate profiles at $y = 0 \mu\text{m}$ in terms of the stream-wise position in the step pattern microchannel on an application of 40 V/cm . The areas at $x < 0 \mu\text{m}$ and $x > 0 \mu\text{m}$ indicate OTS and glass surfaces, respectively.

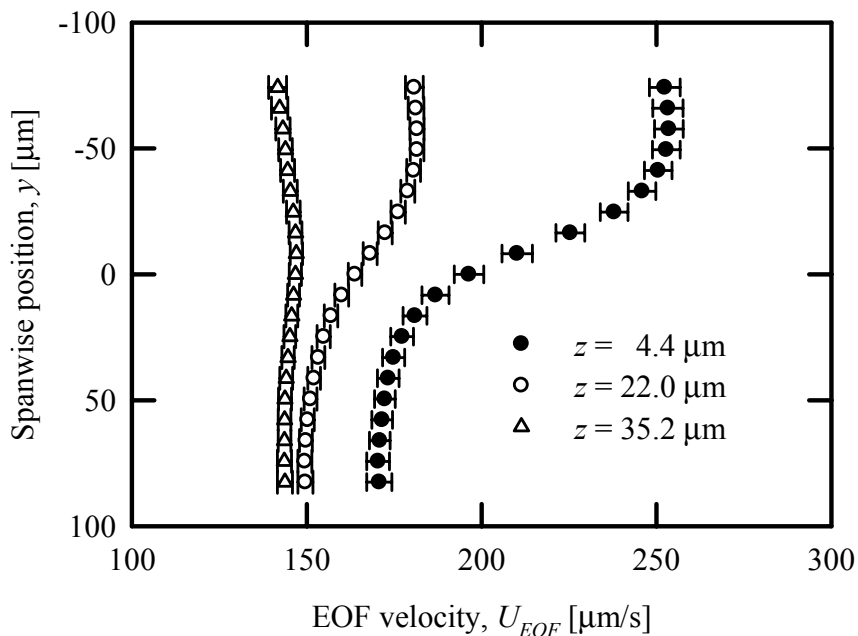


Figure 6.9. Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the span-wise direction in the parallel pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $y < 0 \mu\text{m}$ and $y > 0 \mu\text{m}$ indicate glass and OTS surfaces, respectively.

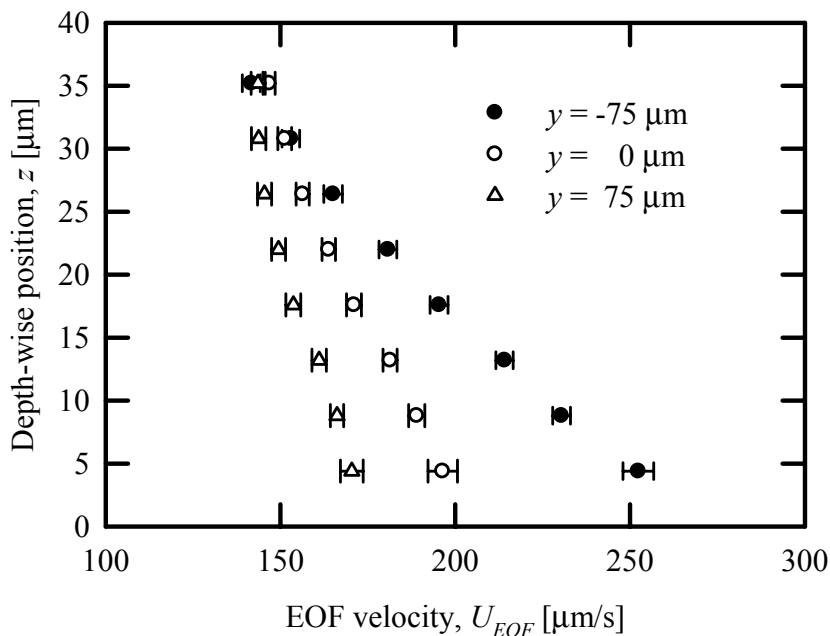


Figure 6.10. Electroosmotic flow velocity profiles with the standard deviation in terms of the depth-wise direction in the parallel pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $y < 0 \mu\text{m}$ and $y > 0 \mu\text{m}$ indicate glass and OTS surfaces, respectively.

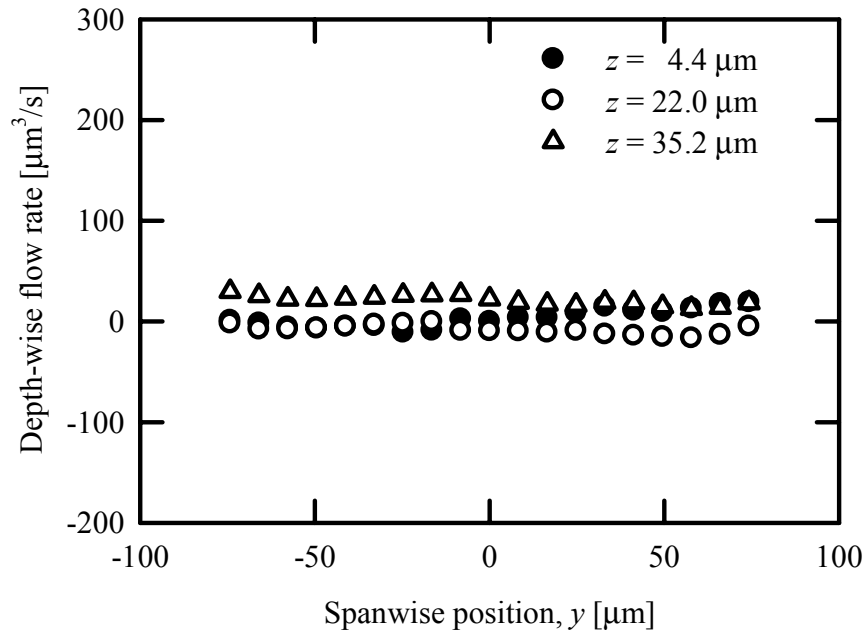
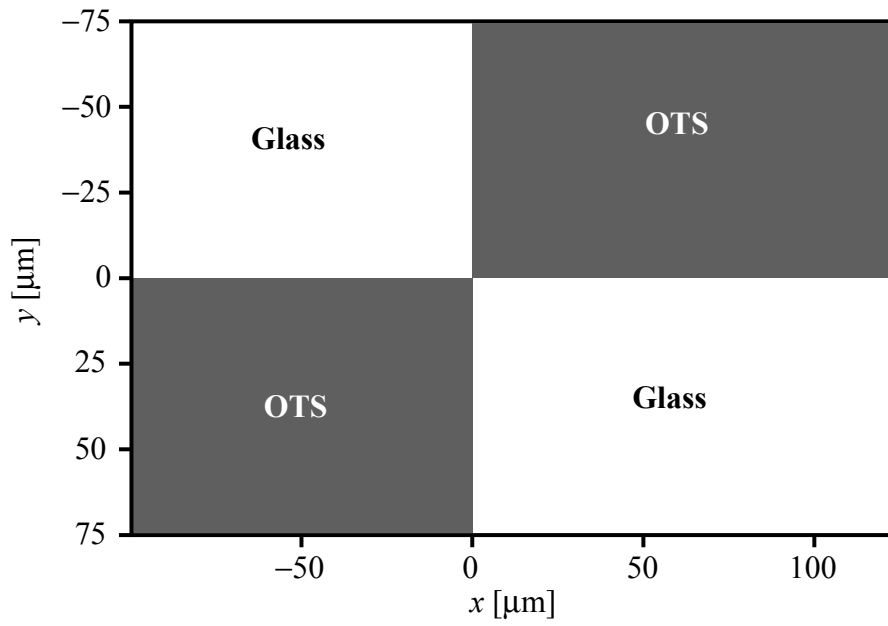
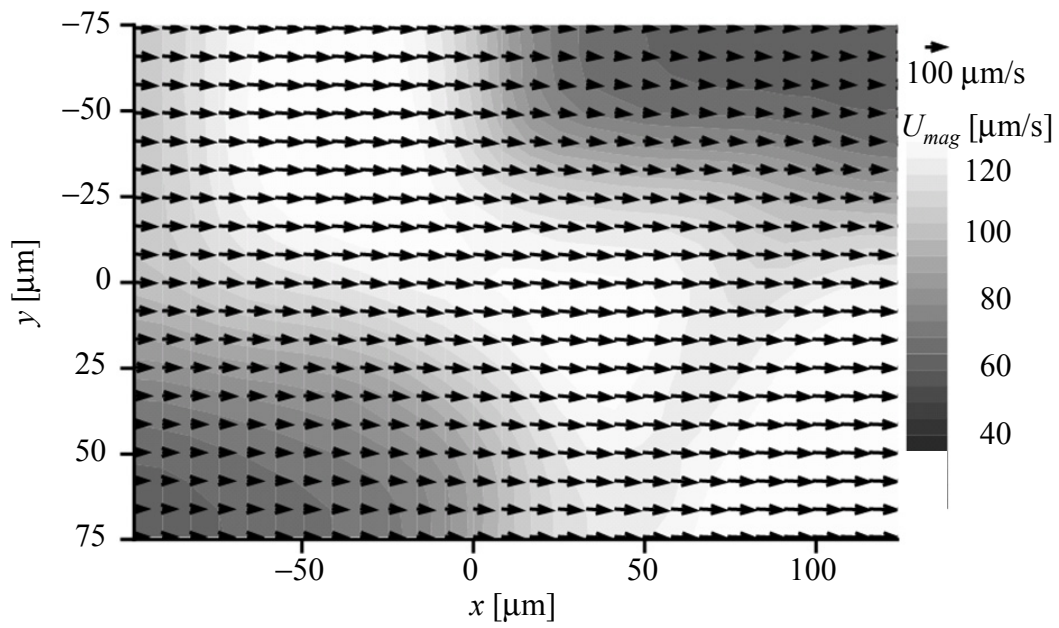


Figure 6.11. Depth-wise volumetric flow rate profiles in terms of the span-wise position in the parallel pattern microchannel on an application of 40 V/cm. The areas at $y < 0 \mu\text{m}$ and $y > 0 \mu\text{m}$ indicate glass and OTS surfaces, respectively.

(a)



(b)



Figures 6.12. (a) and (b). For caption see page 142.

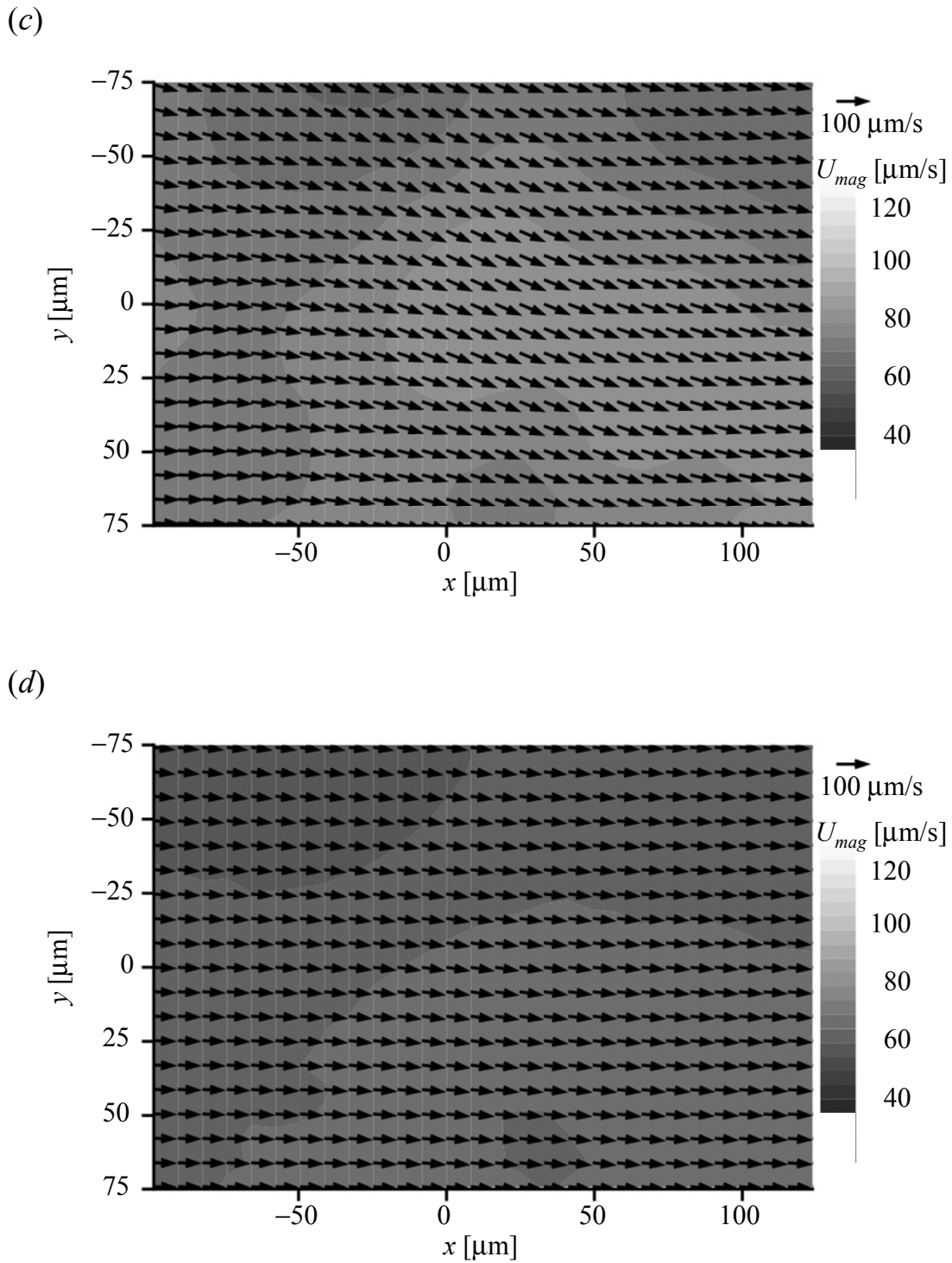
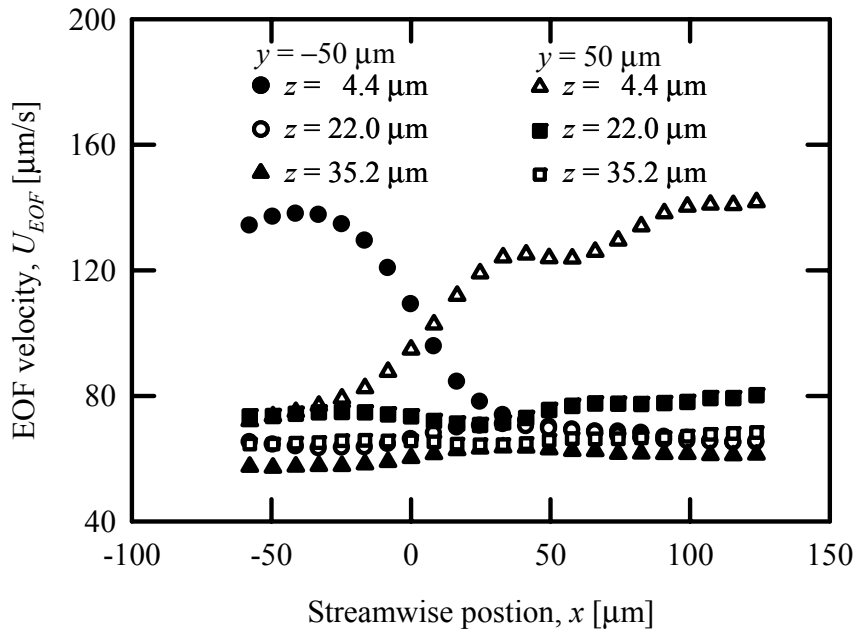


Figure 6.12. (a) Schematic of surface modification patterning in the measurement area. Electroosmotic flow velocity-vectors and the magnitude of the velocity at (b) $z = 4.4 \mu\text{m}$, (c) $22.0 \mu\text{m}$ and (d) $35.2 \mu\text{m}$ in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm . The arrows and the contour map show the velocity-vectors and the velocity magnitude, respectively.

(a)



(b)

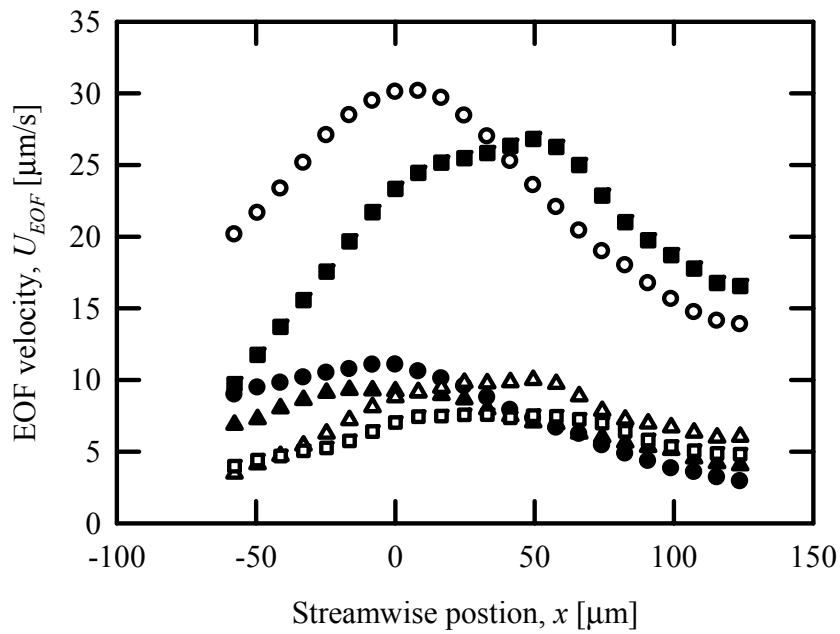


Figure 6.13. (a) Streamwise and (b) spanwise electroosmotic flow velocity profiles at $y = -50 \mu\text{m}$ and $50 \mu\text{m}$ in terms of the stream-wise direction in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm .

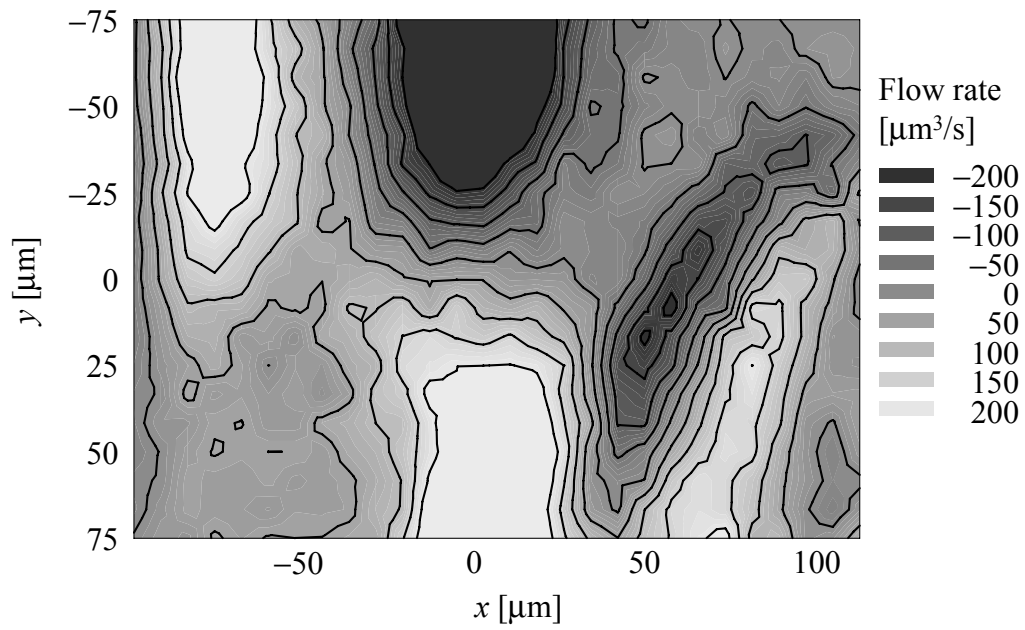


Figure 6.14. Depth-wise volumetric flow rate distribution at $z = 4.4 \mu\text{m}$ in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm.

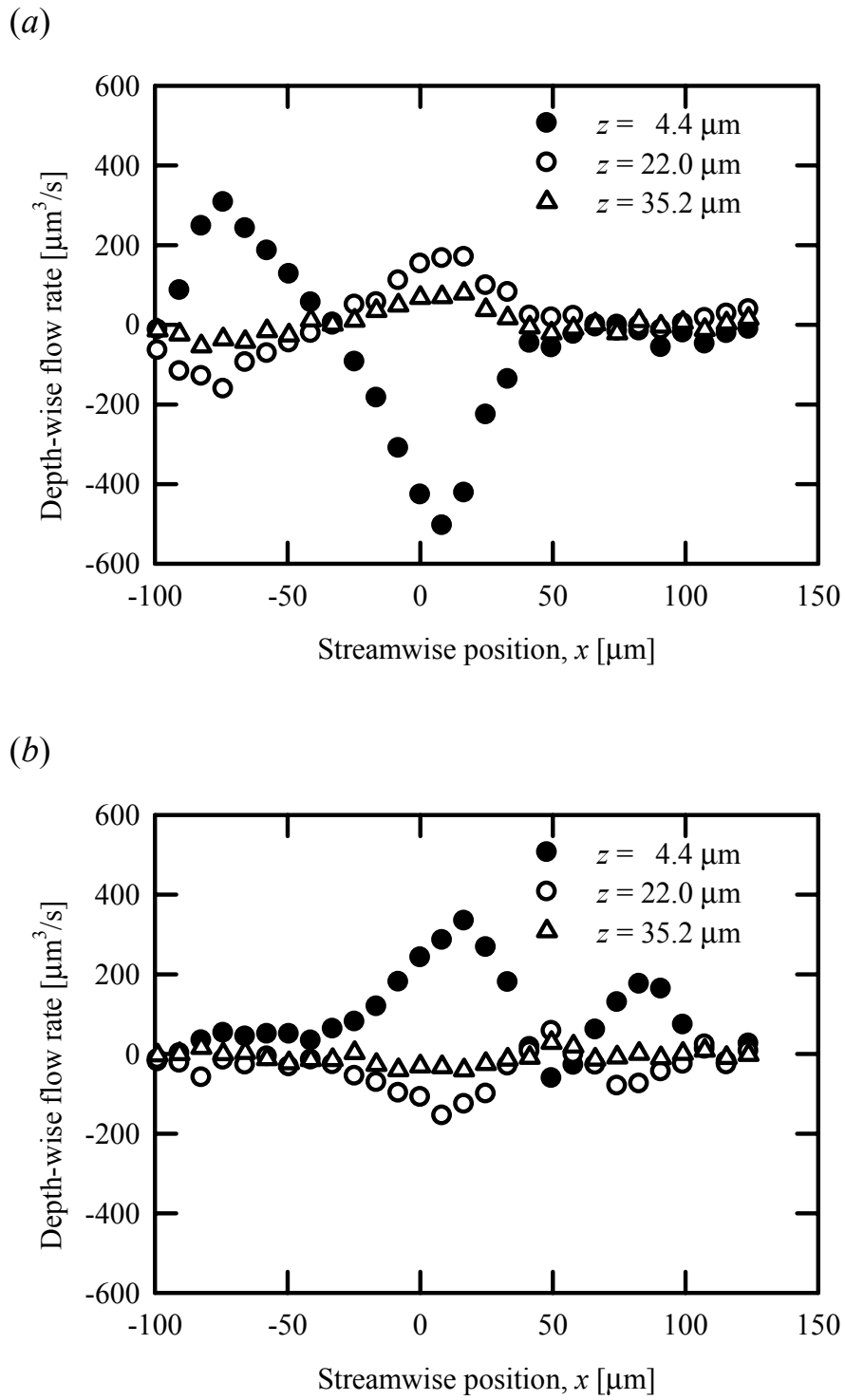


Figure 6.15. Depth-wise volumetric flow rate profiles in the tile pattern microchannel on an application of 40 V/cm, located at (a) $y = -50 \mu\text{m}$ and (b) $50 \mu\text{m}$.

第 7 章
結 論

7.1 本論文の結論

従来の大型化学分析機器を超小型化し、微量液体試料の輸送、混合および化学反応を可能にしたマイクロ流体デバイスが工業上広く用いられている。この種のデバイスには幅数 μm から数百 μm の流路が設置されており、内部の流れは流体の速度、イオン濃度、ゼータ電位などの物理量により支配されている。これらの物理量を同時に計測できれば、従来では不可能であった空間的な物質輸送の評価が実現され、将来的には混合物質の局所拡散制御や化学反応の促進や抑制が可能となり、デバイスの性能向上や革新的な機能の付加につながると期待できる。本研究では、マイクロ流路内の多種の物理量計測のための複合光学計測法の開発を目的とし、水素イオン濃度の異なる二流体混合場の物質輸送の評価および電気浸透流動場の流動特性を実験的に明らかにした。

本研究で開発した複合計測法は、速度およびイオン濃度分布の同時計測法、ならびに電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法の二種がある。それぞれの特徴、空間分解能および計測精度に関して以下に示す。前者は、微小空間において速度およびイオン濃度を同時に計測する手法を確立するために、マイクロ PIV と LIF を組み入れた新たな計測システムを構築した。計測システムを構築する上で工夫した点を以下に示す。従来のマクロスケールにおける速度およびイオン濃度の同時計測ではレーザ 2 波長およびカメラ 2 台を用いた複雑な光学系を要していたのに対し、本研究では粒子と色素の選定および 3CCD カメラを用いたことでレーザ 1 波長およびカメラ 1 台の簡易な光学装置で 2 種の物理量の取得が実現できた。さらに、光学系に顕微鏡を用いることでの深さ方向分解能の劣化の問題解決や粒子と色素を混入することによる信号対雑音比の向上を目的として、共焦点顕微鏡を導入した。以上により、微小空間における速度およびイオン濃度分布の同時計測を初めて可能にした。この計測法の空間分解能ならびに計測精度は、速度計測が $15.48 \mu\text{m} \times 15.48 \mu\text{m}$ 、pH の二次元分布計測が $5.16 \mu\text{m} \times 5.16 \mu\text{m}$ となり、95 % 包括度不確かさはそれぞれ $\pm 3.8 \mu\text{m/s}$ (主流の 5.9 %), $\pm \text{pH } 0.11$ を達成した。一方、後者は電気浸透流速度および壁面ゼータ電位の精緻な計測を達成するために、マイクロ PIV を用いた計測法を開発した。従来では空間平均された電気浸透流速度およびゼータ電位の計測であったのに対し、マイクロ PIV を導入したことで初めて二次元計測が実現された。なお、計測誤差につながる 5 種の要因 (粒子数密度の影響、粒子のブラウン運動の電気浸透流速度計測への影響、粒子の電気泳動の電気浸透流への影響、密閉セルおよび I 字型流路内の電気力線の一様性、および電界印加によるジュール熱の影響) に関して、実験的および理論的検討により解決した。この計測法の空間分解能は $20.6 \mu\text{m} \times 20.6 \mu\text{m}$ となり、計測精度は 95 % 包括度不確かさより電気浸透流速度は主流の 6.1 %、ゼータ電位は $\pm 4.4 \times 10^{-3} \text{ V}$ を達成した。

上記の速度およびイオン濃度分布の同時計測法を用いて、第 4 章では静圧駆動流における二流体混合場および溶液の緩衝作用を伴う化学反応場を評価し、明らかとなったことを Figure 7.1 (a) にまとめた。本手法により得られた速度結果を基に水素イオン濃度

分布の数値解析した結果と実験結果から評価した水素イオン濃度分布を比較したところ、混合場では両者の良好な一致が見られ本計測法の信頼性が示された。一方、化学反応場では、水素イオンの生成や消滅した状態を定量的に評価可能となった。また、同時計測の最大の特徴である空間的な物質輸送（物質輸送方程式に記述される対流および拡散）の評価を行った。これにより、従来のペクレ数を用いた巨視的な評価だけでなく、微視的観点での物質輸送の評価が可能となった。この評価により期待される効果は、Figure 7.2 に示すようにイオンの局所拡散制御や化学反応の促進・抑制といった機能をマイクロ流体デバイスに付加できるという点である。

第5章では電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法を用いて、流路材質および溶液の性質に対する速度および壁面ゼータ電位への影響を検討し、明らかとなったことをFigure 7.1 (b) にまとめた。本計測法は、2種の流路（一様材質の流路および複数の材質を組み合わせた流路）および5種のpHの異なる溶液に適用された。一様材質の流路内における電気浸透流は従来の研究と同様に栓流を示し、pH値が大となるにつれて電気浸透流速度およびゼータ電位の絶対値も大となった。この結果を既存の経験式と比較したところ、両者の良好な一致が得られたため、本計測法の信頼性が示された。また、複数の流路材質を組み合わせることで形成される非一様なゼータ電位場の電気浸透流速度を計測したところ、栓流ではなく台形型の速度分布を示した。これは、流路底面のゼータ電位の絶対値が側壁のそれよりも大であったことに起因する。従来の研究では空間平均された電気浸透流速度の計測に留まっていたのに対し、上述のような面的な結果が得られたことは、本手法の大きな特徴として挙げられる。

第6章では第5章にて信頼性が示された計測法を更に発展させ、得られた速度結果および連続の式を併用することにより深さ方向の流量評価も可能となった。この計測法を3種の表面改質パターンニングを施された流路内の流れ場の解明に適用した。その結果、流れ方向にゼータ電位が変化する流動場では深さ方向に流れが生じるが、流れ方向にゼータ電位が変化しない流動場では深さ方向流れは生じないことが明らかとなった。また、流れ方向および流路幅方向共にゼータ電位が変化する境界領域では、流路幅方向および深さ方向の速度が誘起され、三次元流動場が形成されることがわかった。上述のようなゼータ電位が変化する境界領域の速度分布は理論解析が困難なため、本手法により得られた知見は物理モデルの再構築に役立つと期待される (Figure 7.2)。

これまで述べてきたように、本論文では微小空間内の流体の輸送現象解明を目的とした複合計測法の開発を行い、その計測法の信頼性や従来の計測法よりも優位な点を中心に論じた。開発した二種の手法は、既存の手法と比して高い精度を有し、これまでに計測や評価が困難であった条件に対して詳細な実験データの取得を実現した。以上により、工業上広く用いられるマイクロ流体デバイスの性能向上に大きく貢献する基盤技術を確立した。

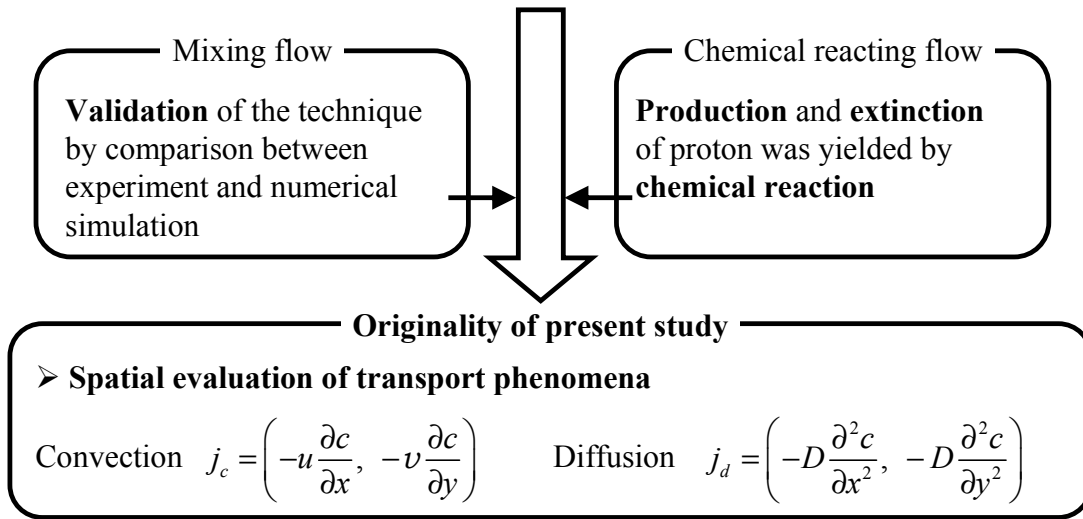
7.2 今後の課題

本論文にて開発した複合計測法や提示した計測結果は、できる限り実用性の高いものであるように配慮したが、決して十分であるとは言えないため、今後の進展に期待するところも大きい。本研究の枠組みの中で考えた場合、まず速度およびイオン濃度分布の同時計測法に関しては、非定常混合流動場への適用性が重要な課題となる。本論文における速度計測にはマイクロ PIV を用いたが、この手法は時間平均を施すため時間分解能の低下を招く。Sato et al. (2003a) はその問題を解決するため、ブラウン運動が空間的にも偏りのないランダムな運動であることに着目し、空間平均により時系列速度計測が可能な手法 (Spatial Averaged Time-Resolved Particle Tracking Velocimetry: SAT-PTV) を提案している。また、イオン濃度分布計測に関しては、レーザ光の時々刻々の揺らぎの影響による蛍光強度の測定誤差を、二色 LIF という手法により解決している (Sakakibara and Adrian 1999, 2004; Kim 2005)。以上より、SAT-PTV と二色 LIF を併用することで、非定常混合流動場への適用が可能となることは原理上明らかであるが、これら計測法の条件に合う蛍光色素および粒子の選定は現在困難を極めている。この問題が容易に解決できれば、本手法は飛躍的に応用性が広がる。また、本手法は速度およびイオン濃度分布の同時計測の代わりに、速度および温度分布の同時計測にも同様の原理で適用可能である (Walker 1987; Coppeta and Rogers 1998, Ross et al. 2001a; Erickson et al. 2003)。これを利用すると、化学反応により温度上昇などが生じ、性能低下を招くような流動場のモニタリング法としての応用も可能である。

一方、電気浸透流速度および壁面ゼータ電位計測法に関しては、特に密閉セルを用いた電気泳動速度の計測において、実験上の熟練度が必要となっている。これまでも、計測精度は非常に高くても、その操作性が複雑なために実用に供せず全く利用されていない計測法が多々存在する。工業的応用を鑑みると、汎用性が高く且つ操作性が容易な計測装置への改良が、計測器開発と工業機器の基礎研究の双方に有益である。また、速度結果および連続の式を併用することで評価した深さ方向の流量に関しては、流路壁面近傍における速度情報の欠落により、最終的な深さ方向速度の算出までには至っていない。そのため、壁面極近傍における速度計測法 (Zettner and Yoda 2003; Sadr et al. 2004, 2005; Li et al. 2006) との併用により、深さ方向速度の定量的評価が期待される。

(a)

Simultaneous measuring technique of velocity and ion concentration



(b)

Measuring technique of electroosmotic flow velocity and zeta-potential

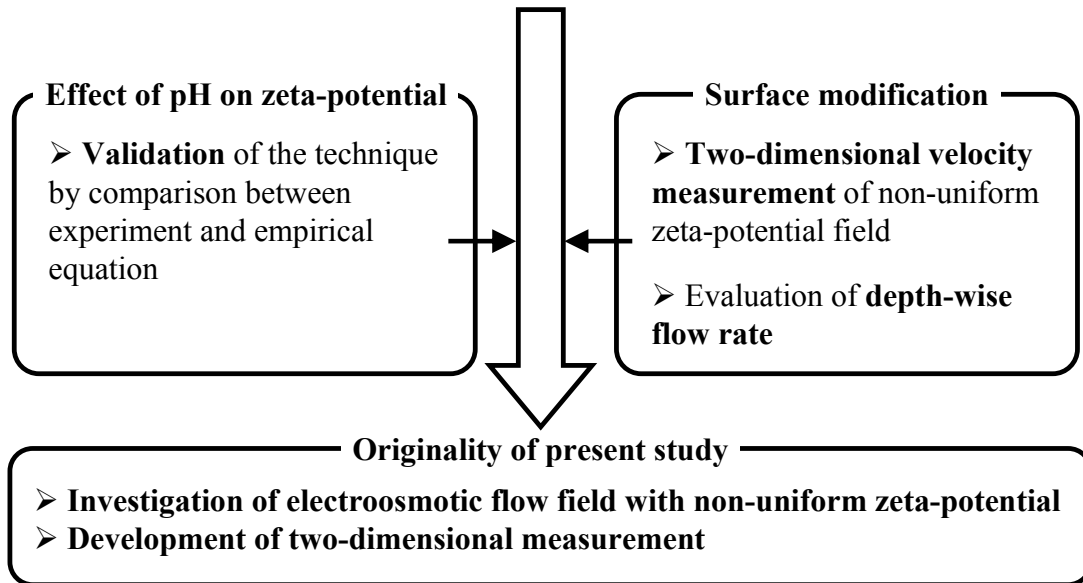


Figure 7.1. Summary of the present study for (a) transport and mixing phenomena in microchannel and (b) electroosmotic flow field.

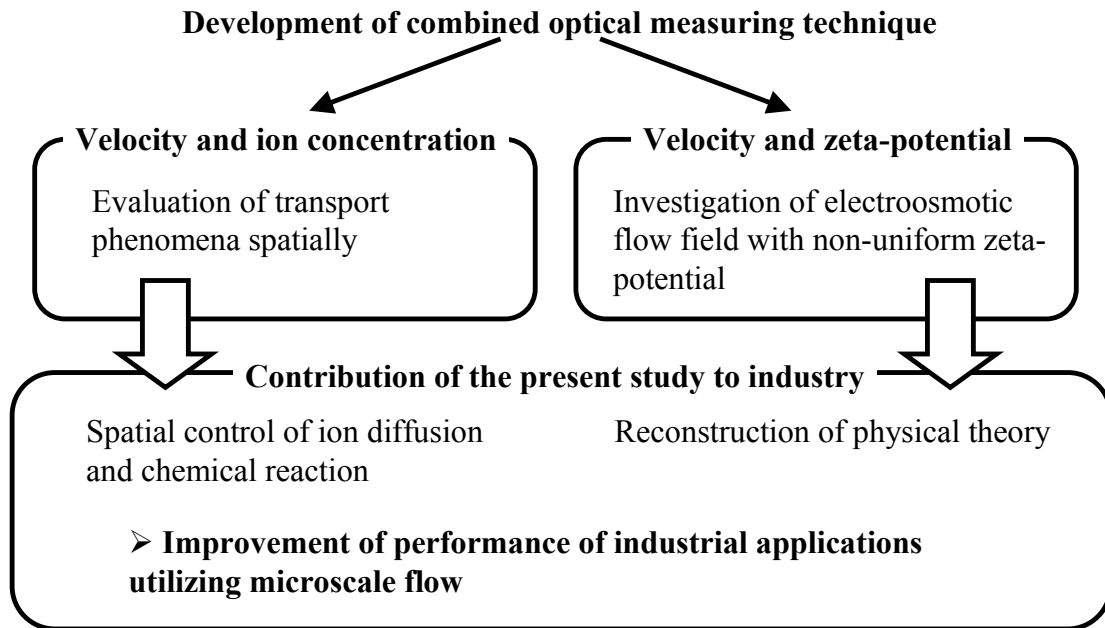


Figure 7.2. Contribution of the present study to industrial applications.

謝 辞

末筆ではございますが、本研究を遂行する上でお世話になった方々に感謝の意を述べさせていただきます。

本研究は慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科，菱田公一教授のご指導のもとに進められたものであります。菱田公一教授には研究の方向付けから現象に関する詳細な議論に至るまで，終始御指導頂きました。深い尊敬と共に心から感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

慶應義塾大学理工学部電子工学科，神成文彦教授，慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科，長坂雄次教授，佐藤洋平准教授，慶應義塾大学理工学部機械工学科，小川邦康准教授には本研究の全般に渡り適切な御助言と激励を頂き，深く感謝致します。特に佐藤洋平准教授には，日々の研究室生活において研究の位置付けや論文のまとめかたなど多くのことをご教授頂き感謝の意に耐えません。

稲葉靖二郎氏，入澤元太郎氏，山本尊博氏には，本研究室の先輩として多くのご助言を頂きました。深く感謝致します。

菱田・佐藤研究室で研究生活をともにした嘉副裕君，齋木康一郎君には，実験を進める上で多くの助言を頂きました。研究に協力して下さった福村公基君，佐々木誠一君，筒井一成君，中村翼君，宮川修君，そして共に研究室生活を過ごした皆さんに深く感謝致します。

本研究の一部を行うにあたり，文部科学省平成 15 年度 21 世紀 COE プログラム「知能化から生命化へのシステムデザイン」，平成 18 年度藤原奨学基金，および平成 19 年度日本学術振興会特別研究員奨励費 (DC2) を頂き，研究の遂行に役立たせて頂きましたことを記し，感謝の意を表します。

最後に自分を温かく見守り支えて下さった父・一柳友久氏，母・一柳尚美氏に心より感謝致します。

2008 年 1 月
一柳満久

参考文献

和書

- アメリカ機械学会編, (1987) 計測の不確かさ, 丸善
- 一柳満久, 黒沢亮, 菱田公一, 前田昌信 (2003) 干渉画像法と LIF を用いた噴霧流計測 (蒸気濃度と液滴数密度および速度の詳細), 第 40 回日本伝熱シンポジウム, 191-192
- 一柳満久, 佐藤洋平, 菱田公一 (2005) サブミクロン蛍光粒子を用いたマイクロチャネル内電気浸透流速度及びゼータ電位の評価, 日本機械学会論文集 B 編 71-709: 2316-2323
- 今井秀孝, (1996) 計測における不確かさの表現のガイド, 日本規格協会
- 北森武彦, 庄子習一, 馬場嘉信, 藤田博之 (2004) マイクロ化学チップの技術と応用, 丸善
- 田中浩雄 (1979a) 顕微鏡電気泳動法によるゼータ電位の測り方(I), 紙パ技協誌 33-2: 166-173
- 田中浩雄 (1979b) 顕微鏡電気泳動法によるゼータ電位の測り方(II), 紙パ技協誌 33-3: 204-213
- 田中浩雄 (1983) 顕微鏡電気泳動法による沈降性粒子のゼータ電位測定, 日本化学会誌 11: 1556-1561
- 西野耕一 (2001) マイクロ流れの速度場計測, ながれ 20: 83-91
- 野島博 (1997) 顕微鏡の使い方ノート, 羊土社
- 平野敏右, 石塚悟 (1996) 化学流体力学, 丸善
- 森祐行, 岡本寿夫 (1980a) 顕微鏡電気泳動法における長方形セル内の流れの解析, 浮選 27-3: 117-126
- 森祐行, 岡本寿夫 (1980b) 顕微鏡電気泳動法による鉱物粒子のゼータ電位測定, 浮選 27-4: 171-178
- 米沢富美子 (1986) ブラウン運動, 共立出版

洋書

- Adrian RJ** (1988) Statistical properties of particle image velocimetry measurements in turbulent flow. in *Laser Anemometry in Fluid Mech III*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 115–129.
- Adrian RJ** (1991) Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics. *Annu Rev Fluid Mech* 23: 261–304
- Auroux PA; Iossifidis D; Reyes DR; Manz A** (2002) Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal Chem* 74: 2637–2652
- Badal MY; Wong M; Chiem N; Hossein SM; Harrison DJ** (2002) Protein separation and surfactant control of electroosmotic flow in poly(dimethylsiloxane)-coated capillaries and microchips. *J Chromagr* 947: 277–286
- Brody JP; Yager P; Goldstein RE; Austin RH** (1996) Biotechnology at low Reynolds numbers. *Biophysical J* 71: 3430–3441
- Chen JM; Horng TL; Tan WY** (2006) Analysis and measurements of mixing in pressure-driven microchannel flow. *Microfluid nanofluid* 2: 455–469
- Chen Z; Milner TT; Dave D; Nelson JS** (1997) Optical Doppler Tomographic imaging of fluid flow velocity in highly scattering media. *Optics Lett* 22-1: 64–67
- Choi J; Hirota N; Terazima M** (2001) A pH-jump reaction studied by the transient grating method: Photodissociation of o-Nitrobenzaldehyde. *J Phys Chem A* 105: 12–18
- Chow RS; Takamura K** (1988) Effects of surface roughness (hairiness) of latex particles on their electrokinetic potentials. *J Colloid Interface Sci* 125: 226–236
- Coppeta J; Rogers C** (1998) Dual emission laser induced fluorescence for direct planar scalar behavior measurements. *Exp Fluids* 25: 1–15
- Devasenathipathy S; Santiago JG; Takehara K** (2002) Particle tracking techniques for electrokinetic microchannel flows. *Anal Chem* 74: 3704–3713
- Erickson D; Li D** (2003) Three-dimensional structure of electroosmotic flow over heterogeneous surfaces. *J Phys Chem B* 107: 12212–12220
- Erickson D; Sinton D; Li D** (2003) Joule heating and heat transfer in poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems, *Lab Chip*, 3: 141–149
- Fu LM; Lin JY; Yang RJ** (2003) Analysis of electroosmotic flow with step change in zeta potential. *J Colloid Interface Sci* 258: 266–275
- Fukada H; Takahashi K** (1998) Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins-Structure function and Genetics* 33: 159–166
- Herr AE; Molho JI; Santiago JG; Mungal MG; Kenny TW; Garguilo MG** (2000) Electroosmotic capillary flow with nonuniform zeta potential. *Anal Chem* 72: 1053–1057
-

-
- Hishida K; Sakakibara J** (2000) Combined planar laser-induced fluorescence-particle image velocimetry technique for velocity and temperature fields. *Exp Fluids* 29: S129–S140
- Huang H; Dabiri D; Gharib M** (1997) On errors of digital particle image velocimetry. *Meas Sci Technol* 8: 1427–1440
- Huang HT; Fiedler HE; Wang JJ** (1993) Limitation and improvement of PIV, Part II: Particle image distortion, a novel technique. *Exp Fluids* 15: 263–273
- Huang X; Gordon MJ; Zare RN** (1988) Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 60: 1837–1838
- Hunter RJ** (1981) *Zeta potential in colloid science : principles and applications*, London, Academic Press
- Ichiyanagi M; Sato Y; Hishida K** (2007) Optically sliced measurement of velocity and pH distribution in microchannel. *Exp Fluids* 43: 425–435
- Inoué S; Spring KR** (1997) *Video microscopy: The fundamentals*, 2nd edition. Springer
- Ismagilov RF; Stroock AD; Kenis PJA; Whitesides G; Stone HA** (2000) Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flow in microchannels. *Appl Phys Lett* 76: 2376–2378
- Jun Y; Le D; Zhu XY** (2002) Microcontact Printing directly on the silicon surface. *Langmuir* 18: 3415–3417
- Kamholz AE; Weigl BH; Finlayson BA; Yager P** (1999) Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel: The T-sensor. *Anal Chem* 71: 5340–5347
- Kamholz AE; Yager P** (2001) Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels. *Biophysical J* 80: 155–160
- Keane RD; Adrian RJ** (1994) Theory of cross-correlation analysis of PIV images. *Appl Sci Res* 49: 191–215
- Kim HJ** (2005) Measurements of temperature and flow fields with sub-millimeter spatial resolution using two-color laser induced fluorescence (LIF) and micro-particle image velocimetry (PIV). *J Mech Sci Tech* 19: 730–741
- Kim MJ; Beskok A; Kihm KD** (2002) Electro-osmosis-driven micro-channel flows: A comparative study of microscopic particle image velocimetry measurements and numerical simulations. *Exp Fluids* 33: 170–180
- Kirby BJ; Hasselbrink Jr. EF** (2004a) Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis* 25: 187–202
- Kirby BJ; Hasselbrink Jr. EF** (2004b) Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis* 25: 203–213
- Knight JB; Vishwanath A; Brody JP; Austin RH** (1998) Hydrodynamic focusing on a silicon chip: Mixing nanoliters in microseconds. *Phys Rev Lett* 80: 3863–3866
- Knox JH; McCormack KA** (1994) Temperature effects in capillary electrophoresis. 1: Internal
-

-
- capillary temperature and effect upon performance. *Chromatographia* 38: 207–214
- Kobayashi K; Sakakibara J; Hishida K; Maeda M** (1991) Time-series measurements of flow field using image processing system. *Experimental and Numerical Flow Visualization*, ASME FED, 128: 155–162
- Krishnamoorthy S; Feng J; Henry AC; Locascio LE; Hickman JJ; Sundaram S** (2006) Simulation and experimental characterization of electroosmotic flow in surface modified channels. *Microfluid Nanofluid* 2: 345–355
- Kutter JP; Jacobson SC; Matsubara N; Ramsey JM** (1998) Solvent-programmed microchip open-channel electrochromatography. *Anal Chem* 70: 3291–3297
- Lam YC; Chen X; Yang C** (2005) Depthwise averaging approach to cross-stream mixing in a pressure-driven microchannel flow. *Microfluid nanofluid* 1: 218–226
- Lanzillotto AM; Leu TS; Amabile M** (1997) A Study of Structure and Motion in Fluidic Microsystems. AIAA 28th Fluid Dynamics Conf Snowmass Village CO: Paper 97-1790
- Lanzillotto AM; Leu TS; Amabile M; Wildes R; Dunsmit J** (1996) An investigation of microstructure and microdynamics of fluid flow in MEMS. *Proc ASME Aerospace Division*: 789–795
- Li H; Sadr R; Yoda M.** (2006) Multilayer nano-particle image velocimetry. *Exp Fluids* 41: 185–194
- Lima R; Wada S; Tsubota K; Yamaguchi T** (2006) Confocal micro-PIV measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel. *Meas Sci Technol* 17: 797–808
- MacInnes JM; Du X; Allen RWK** (2003) Prediction of electrokinetic and pressure flow in a microchannel T-junction. *Phy Fluids* 15: 1992–2005
- Meinhart CD; Wereley ST; Gray MHB** (2000a) Volume illumination for two-dimensional particle image velocimetry. *Meas Sci Technol* 17: 809–814
- Meinhart CD; Wereley ST; Santiago JG** (2000b) A PIV algorithm for estimating time-averaged velocity fields. *J Fluids Eng* 122: 285–289
- Meinhart CD; Wereley ST; Santiago JG** (1999) PIV measurements of a microchannel flow. *Exp Fluids* 27: 414–419
- Ocvirk G; Munroe M; Tang T; Oleschuk R; Westra K; Harrison DJ** (2001) Electrokinetic control of fluid in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices. *Electrophoresis* 21: 107–115
- Oddy MH; Santiago JG** (2004) A method for determining electrophoretic and electroosmotic mobilities using AC and DC electric field particle displacements. *J Colloid Interface Sci* 269: 192–204
- Pallandre A; Lambert B; Attia R; Jonas AM; Wiovy JL** (2006) Surface treatment and characterization: Perspectives to electrophoresis and lab-on-chips. *Electrophoresis* 27:
-

584–610

- Park JS; Choi CK; Kihm KD** (2004) Optically sliced micro-PIV using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Exp Fluids* 37: 105–119
- Park JS; Kihm KD** (2006) Use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) for depthwise resolved microscale-particle image velocimetry (μ -PIV). *Optics Lasers Eng* 44: 208–223
- Patankar SV** (1980) Numerical heat transfer and fluid flow. McGraw-Hill
- Paul PH; Garguilo MG; Rakestraw DJ** (1998) Imaging of pressure- and electrokinetically driven flows through open capillaries. *Anal Chem*, 70: 2459–2467
- Probstein RF** (1994) Physicochemical hydrodynamics, An introduction second edition. John Willy & Sons
- Reyes DR; Iossifidis D; Auroux PA; Manz A** (2002) Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal Chem* 74: 2623–2636
- Probstein RF** (1994) Physicochemical hydrodynamics, JOHN WILEY & SONS
- Quist AP; Pavlovic E; Oscarsson S** (2005) Recent advances in microcontact printing. *Anal Bioanal Chem* 381: 591–600
- Revil A; Pezard PA** (1999) Streaming potential in porous media 1. Theory of zeta potential. *J Geophys Res* 104: 20021-20031
- Ross D; Gaitan M; Locascio LE** (2001a) Temperature measurement in microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent dye. *Anal Chem* 73: 4117–4123
- Ross D; Johnson TJ; Locascio LE** (2001b) Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels. *Anal Chem* 73: 2509–2515
- Ross D; Locascio LE** (2003) Effect of caged fluorescent dye on the electroosmotic mobility in microchannels. *Anal Chem* 75: 1218–1220
- Sadr R; Yoda M; Zheng Z; Conlisk AT** (2004) An experimental study of electro-osmotic flow in rectangular microchannels. *J Fluid Mech* 506: 357–367
- Sadr R; Li H; Yoda M** (2005) Impact of hindered Brownian diffusion on the accuracy of particle-image velocimetry using evanescent-wave illumination. *Exp Fluids* 38: 90–98
- Sakakibara J; Adrian RJ** (1999) Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence. *Exp Fluids* 26: 7–15
- Sakakibara J; Adrian RJ** (2004) Measurement of temperature field of a Rayleigh-Bénard convection using two-color laser induced fluorescence. *Exp Fluids* 37: 331–340
- Sandison DR; Webb WW** (1994) Background rejection and signal-to-noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes. *Appl Optics* 33: 603–615
- Santiago JG; Wereley ST; Meinhart CD; Beebe DJ; Adrian RJ** (1998) A particle image velocimetry system for microfluidics. *Exp Fluids* 25: 316–319
- Sato Y; Inaba S; Hishida K; Maeda M** (2003a) Spatial averaged time-resolved particle tracking velocimetry in microspace considering Brownian motion of sub-micron fluorescent

-
- particles. *Exp Fluids* 35: 167–177
- Sato Y; Irisawa G; Ishizuka M; Hishida K; Maeda M** (2003b) Visualization of convective mixing in microchannel by fluorescence imaging. *Meas Sci Technol* 14: 114–121
- Scales PJ; Grieser F; Healy W** (1992) Electrokinetics of the silica-solution interface: A flat plate streaming potential study. *Langmuir* 8: 965–974
- Shinohara K; Sugii Y; Hibara M; Tokeshi M; Kitamori T; Okamoto K** (2005) Rapid proton diffusion in microfluidic devices by means of micro-LIF technique. *Exp Fluids* 38: 117–122
- Shinohara K; Sugii Y; Okamoto K; Madarame H; Hibara A; Tokeshi M; Kitamori T** (2004) Measurement of pH field of chemically reacting flow in microfluidic devices by laser-induced fluorescence. *Meas Sci Technol* 15: 955–960
- Sinton D** (2004) Microscale flow visualization. *Microfluid nanofluid* 1: 2–21
- Sinton DA; Li D** (2003) Microfluidic velocimetry with near-wall resolution. *Int J Therm Sci* 42: 847–855
- Sinton DA; Xuan X; Li D** (2004) Thermally-induced velocity gradients in electroosmotic microchannel flows: the cooling influence of optical infrastructure. *Exp Fluids* 37: 872–882
- Spehar AM; Koster S; Linder V; Kulmala S; Rooij NF; Sigrist H; Thormann W** (2003) Electrokinetic characterization of poly(dimethylsiloxane) microchannels. *Electrophoresis* 24: 3674–3678
- Stroock AD; Weck M; Chiu DT; Huck WTS; Kenis PJA; Ismagilov RF; Whitesides GM** (2000) Patterning electro-osmotic flow with patterned surface charge. *Phys Rev Lett* 84: 3314–3317
- Stroock AD; Whitesides GM** (2003) Controlling flows in microchannels with patterned surface charge and topography. *Acc Chem Res* 36: 597–604
- Sze A; Erickson D; Ren L; Li D** (2003) Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *J Colloid Interface Sci*, 261: 402–410
- Taylor A; Yeung ES** (1993) Imaging of hydrodynamic and electrokinetic flow profiles in capillaries. *Anal Chem* 65: 2928–2932
- Tieu AK; Mackenzie MR; Li EB** (1995) Measurements in microscopic flow with a solidstate LDA. *Exp Fluids* 19: 293–294
- Tsuda T; Ikedo M; Jones G; Daddo R; Zare RN** (1993) Observation of flow profiles in electroosmosis in a rectangular capillary. *J Chromatogr* 632: 201–207
- Walker DA** (1987) A fluorescence technique for measurement of concentration in mixing fluids. *J Physique* 20: 217–224
- Westerweel J** (1997) Fundamentals of digital particle image velocimetry. *Meas Sci Technol* 8: 1397–1392
- White FM** (2006) *Viscous fluid flow*, Third edition. McGraw-Hill
-

- Wilson T** (1990) Confocal microscopy. Academic Press
- Xia Y; Whitesides GM** (1998) Soft lithography. *Annu Rev Mater Sci* 28: 153–184
- Zettner CM; Yoda M** (2003) Particle velocity field measurements in near-wall flow using evanescent wave illumination. *Exp Fluids* 34: 115–121
- Zhao B; Moore JS; Beebe DJ** (2001) Surface-directed liquid flow inside microchannels. *Science* 291: 1023–1026

付録 Appendix

Appendix A.1 顕微鏡の詳細

蛍光顕微鏡を構成する光源，フィルタブロック，対物レンズの詳細を以下に示す。

◆ 光源

従来のマクロスケールでの計測では，シリンドリカルレンズ等によりレーザ光をシート状（厚さ：数百 μm – 数 mm）にして照射するが，微小領域での計測では，マイクロチャネルが数百 μm 程度であるので，結局流路全体が照射されることとなる。そのため，対物レンズの被写界深度内の光を観測することになる。通常，光源にはレーザまたは水銀ランプが用いられる。レーザを用いる場合は，波長が限定されてしまいその波長に合った蛍光粒子や蛍光色素しか使用できない上に，顕微鏡装置にレーザを導入する際には複雑な光学系を導入する必要がある。

一方，水銀ランプは，紫外光から可視光までの広い波長帯を照射するため，励起フィルタの異なるフィルタブロックを交換することにより，蛍光粒子や蛍光色素の励起波長に合った光のみを抽出し流動場に照射することが可能である。そのため，レーザと比して汎用性が高い（例えば，株式会社ニコン TE2000U では，フィルタブロック用のターゲットには 5 個のブロックが入るため，交換は容易）。

以上の光学系の煩雑さから考慮すると，蛍光顕微鏡における光源には水銀ランプの使用が有効であるといえるが，さらに計測対象となる流動場の速度に応じて光源を選定する必要がある。水銀ランプは連続光であるため，計測の時間分解能は検出器の時間分解能（例えば CCD カメラのフレームレート）に依存する。カメラの性能にもよるが，微弱な蛍光観察が可能な高感度 CCD カメラの場合，フレームレートは数十 ms 程度である。そのため，流速が比較的小さい場合は水銀ランプによる照射で問題ないが，流速が大きい場合は撮像された粒子像は軌跡を描くこととなる。すると，粒子画像流速計（3.3 節）による 2 枚の粒子の対応付けが困難となり，流速の算出が困難となる。流れが速い流動場に対応するためには，従来のマクロスケールでの計測と同様に，短時間に高出力の光を発振可能なダブルパルスレーザを用いる手法が有効である。

◆ フィルタブロック

フィルタブロックは，励起フィルタ（Excitation filter），ダイクロイックミラー（Dichroic mirror），吸収フィルタ（Barrier filter）および迷光吸収機構により構成されており，各部の機能を以下に簡単にまとめる。

励起フィルタ： 水銀ランプからの幅広い波長帯の光束から，蛍光粒子および蛍光色素に最適な励起波長帯の光（励起光）だけを透過する。

ダイクロイックミラー： 所定の波長を境界にして，短波長側を反射し，長波長側を透過する．つまり，励起光を反射して対物レンズ光路に送り，蛍光物質からの蛍光は透過して，検出器光路に送る．

吸収フィルタ： ダイクロイックミラーから漏れ出た励起光を完全に遮断し，蛍光だけを透過する．

迷光吸収機構： フィルタブロック内の励起光の迷光を吸収し，不要な自家蛍光の発生を防ぐ．

フィルタブロックの選定には，蛍光粒子や蛍光色素の吸収特性および発光特性と，フィルタブロックの励起波長帯および吸収波長帯をほぼ一致させることが重要となる．しかし，それらの特性が完全に一致することは稀なので，蛍光物質の波長帯に近接したフィルタブロックを選ぶのが主流となっている．Table A.1 に代表的なフィルタブロックを示す．

◆ 対物レンズ

対物レンズを大別すると，乾燥系と液浸系がある．乾燥系対物レンズは，レンズと観察物の間が空気となっており，開口数 (Numerical aperture: NA) が比較的低い．一方，液浸系対物レンズは，観察物とレンズの間を水または油浸オイルで満たすことにより高い開口数が得られ，乾燥系対物レンズと比して解像度の高い観察が可能となる．また，様々な収差の補正方法の違いから以下の5種類に分類できる．

アクロマート対物レンズ

対物レンズとして基本的な条件を備えた最も一般的に使用される対物レンズである．このレンズはC線 (656.3 nm: 赤) とF線 (486.1 nm: 青) の2色について色収差が完全に補正されており，コマ収差，球面収差，非点収差も補正されている．しかし，像面湾曲収差が補正されていないため，視野の中心部と周辺部において，同時に焦点を合わせることが難しいという欠点がある．モノクロ画像の場合には，緑色フィルタを用いることで，赤・青の残存色収差の影響を取り除くことができ，鮮明な画像を撮像することが可能である．

セミアポクロマート対物レンズ

通称フルオライト (fluorite: 蛍石) あるいはフルオライトと呼ばれており，アクロマートレンズより色収差の補正がよく，開口数を大とすることができる．アポクロマート対物レンズより経済的で解像度や像の鮮明さもアポクロマート対物レンズに匹敵する．

アポクロマート対物レンズ

球面収差，コマ収差，非点収差が補正されているほか，軸上色収差についても C 線 (656.3 nm: 赤)，F 線 (486.1 nm: 青)，D 線 (587.6 nm: 黄) の 3 色に対して補正され，可視光領域全般にわたって色収差が補正されている．アポクロマート対物レンズに比べて非常に大きな開口数が得られ，解像度も優れているが，非常に高価である．

プラン対物レンズ，プランアポクロマート対物レンズ

視野全体において鮮明にピントが合うように，像面湾曲収差と色収差とともに補正したレンズである．視野の隅々まで焦点の合った顕微鏡写真を撮像する際に最適なレンズである．色収差の補正能力の量によってプランアポクロマート，あるいはプランアポクロマート対物レンズに区別される．

◆ 対物レンズの開口数

対物レンズの開口数は，像の明るさ，解像度，被写界深度および計測深度に影響を与える重要な要因である．対物レンズの開口数 NA は次式で与えられる．

$$NA = n \times \sin \alpha \quad (\text{A.1})$$

このとき， n は対物レンズと標本間の媒質の屈折率である．空気の場合（乾燥系対物レンズ）は 1 で顕微鏡専用のイマージョンオイル（油浸オイル）で満たした場合は 1.515 である． α は開口角と呼ばれ，Figure A.1 に示すように，光軸の点 O から出た光が対物レンズの先玉レンズに入る光のうち，一番外側に入る光 OA が光軸 OO' となす角を表す． $\sin \alpha$ は， α が 90° のとき最大値をとるが，実際にはカバーガラスの厚さ，作動距離および対物レンズの直径等の制約を受け， α は最大でも 72° 程度である．現在，市販されている対物レンズの開口数は，乾燥系対物レンズで 0.05–0.95，油浸系対物レンズで 0.65–1.49 程度である．また，開口数は観察している像の明るさを決定し，その明るさは次式で表される．

$$I = I_0 \left(\frac{NA}{M_o} \right)^2 \quad (\text{A.2})$$

ここで， I は像の明るさ， I_0 は標本面の明るさ， M_o は対物レンズの倍率である．即ち，同じ倍率でも開口数が 2 倍大きな対物レンズを使用すると像は 4 倍明るくなり，微弱な蛍光を観察する際には，高い開口数をもつ対物レンズを用いる必要がある．

Appendix A.2 粒子追跡アルゴリズム

◆ 輝度差累積法

輝度差累積法は、参照窓画像 $h(X, Y)$ と探索画像 $h_0(X, Y)$ の各画素値の差 (輝度差) の絶対値の総和により、類似度を評価する方法である。窓画像の 2 時刻間での粒子群の移動量の算出には、最小の輝度差を有する参照窓画像の位置を探索する。輝度差の総和の移動量 $(\Delta X, \Delta Y)$ に対する分布 $S(\Delta X, \Delta Y)$ は式(A.3) によって表される。

$$S(\Delta X, \Delta Y) = \sum_{X=1}^m \sum_{Y=1}^n |h(X, Y) - h_0(X + \Delta X, Y + \Delta Y)| \quad (\text{A.3})$$

ただし、上式は窓画像 $m \times n$ [pixel] においての場合である。輝度差累積法は、窓画像の移動算出において計算量が少ないという特徴を持つ。しかし、1 ピクセル以下の精度 (サブピクセル精度) の正確な算出は困難であることから、精密な計測には不向きである。

◆ 相互相関法 (Kobayashi et al. 1991; Keane and Adrian 1994)

相互相関法は、参照窓画像 $h(X, Y)$ と探索画像 $h_0(X, Y)$ の間で、下記の式(A.4) に示す相関値より類似度の評価する方法である。窓画像の 2 時刻間での粒子群の移動量の算出には、2 画像間における粒子群の相関値を求め、最大の相関値を有する参照窓画像の位置を探索する。

$$C = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(X, Y) h_0(X, Y) dXdY \quad (\text{A.4})$$

ここで、 $h(X, Y)$ は参照窓画像の輝度値、 $h_0(X, Y)$ は探索窓画像の輝度値である。得られる画像は CCD カメラを用いているために探索窓画像、参照窓画像ともに離散的であり、窓画像の大きさは有限であることから、式(A.4) を離散化する必要がある。また、相関値 C は参照窓画像の輝度値の変動と探索窓画像の輝度値の変動が一致するとき大きな値を示す。そのため、各画素の値が輝度の変動を表していることが望ましい。従って、正確な各窓画像間の類似性を評価するためには、各窓画像の輝度値の値は窓画像の内における平均輝度値を減じて評価する必要がある。

また、得られた相関値 C を探索窓画像および参照窓画像の二乗平均で除する (正規化) ことで、相関値は -1 から 1 までの値となり、 1 の時に二画像は完全に一致し、値が大きいほど窓画像間の類似度が大きいことを示す。正規化された相関値を相関係数 C_0 と称する。上式を離散化し、正規化すると $m \times n$ の参照窓画像と探索窓画像に対して相関係数 C_0 は以下のように示される。

$$C_0 = \frac{\sum_{Y=1}^n \sum_{X=1}^m h(X,Y)h_0(X,Y)}{\sqrt{\sum_{Y=1}^n \sum_{X=1}^m h^2(X,Y)} \sqrt{\sum_{Y=1}^n \sum_{X=1}^m h_0^2(X,Y)}} \quad (\text{A.5})$$

相関係数 C_0 は、参照窓画像と探索窓画像との類似性を示すため、類似位置を推定するにあたり、相関係数の分布を求める必要がある。移動量 $(\Delta X, \Delta Y)$ に対する相関係数分布 $C_0(\Delta X, \Delta Y)$ は次式のように表せる。

$$C_0(X,Y,\Delta X,\Delta Y) = \frac{\sum_{Y=1}^n \sum_{X=1}^m \{h(X,Y) - h_{0\text{avg}}\} \cdot \{h_0(X + \Delta X, Y + \Delta Y) - h_{0\text{avg}}\}}{\sqrt{\sum_{Y=1}^n \sum_{X=1}^m (h(X,Y) - h_{0\text{avg}})^2} \sqrt{\sum_{Y=1}^n \sum_{X=1}^m (h_0(X + \Delta X, Y + \Delta Y) - h_{0\text{avg}})^2}} \quad (\text{A.6})$$

移動量の推定は、相関関数分布 $C_0(\Delta X, \Delta Y)$ から最大の値を示す $(\Delta X, \Delta Y)$ の位置を探索することで可能となる。相互相関法による移動量推定の概念図を Figure A.2 に示す。参照画像を探索窓画像の中でシフトさせながら相互相関係数を算出し、その分布から移動量を算出する。

◆ 階層的探索法 (Huang et al. 1993)

本研究で採用した階層的探索法は、画像の解像度を階層的に低下させた場合においても、画像の平行移動の特徴が保たれることを用いた手法である。階層的探索法による階層構造と平行移動量の保存についての模式図を Figure A.3 に示す。相互相関法では、参照領域内に存在する粒子の数が多い場合には相関係数のピーク値は小さくなるが誤対応は少なくなり、粒子の数が少ない場合には相関係数のピーク値は大きくなるが大きいピーク値を持つ移動距離の候補が多くなり、誤対応を招きやすくなる。一般的に求められる空間分解能が高く、かつダイナミックレンジが広い状態では、粒子群窓画像の誤対応が起こる可能性が高くなる。そこで、参照領域・探索領域を広く取った低解像度での画像を用いてベクトル場を算出し、低解像度にて得られたベクトルを用いて高解像度での探索領域の位置にシフトして、小さい参照領域でかつ狭い探索領域にて相互相関演算を行う。小さい参照領域を用いても、狭い探索領域であれば速度ベクトルの算出における誤対応の可能性を極めて低くすることができる。これより階層的探索を行うことで、計算量の低減、過誤ベクトルの低減、ダイナミックレンジの増大につながる。

◆ サブピクセル移動量の評価 (Westerweel 1997)

CCD カメラによって取得された画像は空間的に離散化されたものであるため、PIV の相関演算で求める粒子群の移動量などは整数値であり、結果として ± 0.5 pixels の不

確かさを伴う。PIV で用いる二画像間における粒子の移動量が、通常 10 – 20 pixels 程度であるため 2.5 – 5 % の不確かさを伴い、真の移動量に対して偏りをもつことが知られている。そのため、正確な速度計測には、1 pixel 以下の精度 (サブピクセル精度) で粒子群の移動量を求めることが必要不可欠となる。

一般的に、サブピクセルの精度化には、粒子の輝度分布や相関値分布の最大値の周囲の値を用いて、粒子の輝度分布を 2 次曲線あるいは正規分布に近似することにより、真のピーク位置を推定する。本研究では、単一粒子の輝度分布および相関値分布を正規分布に近似できるため、ピーク位置推定には正規分布を利用したガウシアンピークフィッティングを用いる。粒子の輝度分布および相関値分布のピーク位置のサブピクセル精度化は、同様の処理を行うため、以後、相関値 C の分布に関するサブピクセル精度化について説明する。なお、粒子の輝度分布の場合は式の C を I に変えるだけである。

ピーク位置のサブピクセルにおける修正量の算出は、整数値で求めたピーク位置 (X_0, Y_0) の周囲 5 点の値を用いて行う。ただし、 x 方向、 y 方向はそれぞれ独立しており、それぞれの方向に 3 点の値から 1 次元に正規分布をするものとして別々に計算する。この計算から求まるピーク位置の修正量を $\Delta X_0, \Delta Y_0$ とすると次式で表される。

$$\Delta X_0 = \frac{\log R_0(X_0 - 1, Y_0) - \log R_0(X_0 + 1, Y_0)}{2(\log R_0(X_0 - 1, Y_0) + \log R_0(X_0 + 1, Y_0)) - 4\log R_0(X_0, Y_0)} \quad (\text{A.7})$$

$$\Delta Y_0 = \frac{\log R_0(X_0, Y_0 - 1) - \log R_0(X_0, Y_0 + 1)}{2(\log R_0(X_0, Y_0 - 1) + \log R_0(X_0, Y_0 + 1)) - 4\log R_0(X_0, Y_0)}$$

よって、サブピクセル精度を含んだ真のピーク位置 (X^*, Y^*) は、 $X^* = X_0 + \Delta X, Y^* = Y_0 + \Delta Y$ で与えられる。式(A.7) による近似は、前述のように x, y の方向に独立な修正量として算出しているため、求められる修正量 $\Delta X, \Delta Y$ は回転ガウス分布のピーク位置とは異なる。すなわち、 $\Delta X, \Delta Y$ のそれぞれは独立ではなく互いに影響を受ける。このため、PIV においては真の移動量に対してサブピクセル移動量が 0.02 pixels 程度の偏り誤差を生じることが知られている (Huang et al. 1997)。本研究ではこれを修正するために、相関値分布のピーク位置の周囲の相関値 C から補正係数 γ を算出する方法を採用し実装した。

$$C_n \in \{C(X_0 + 1, Y_0), C(X_0 - 1, Y_0), C(X_0, Y_0 + 1), C(X_0, Y_0 - 1)\}$$

$$\gamma = 1 + \delta \frac{C(X_0, Y_0) - C_{n \max}}{C(X_0, Y_0)} \quad (\text{A.8})$$

$$C_n^* = \gamma C_n (\gamma > 1)$$

ここで、 $\delta = 0.143$ である (Adrian 1988). 式(A.8) の補正された相関係数 C_n^* を式(A.7) に用いることにより、サブピクセル精度における偏り誤差は 0.002 pixels に抑制することが可能となる.

Appendix A.3 ブラウン運動による粒子の移動量

◆ ブラウン運動の特性

ブラウン運動とは、媒質中に浮遊する微粒子が不規則に運動する現象のことである (米沢 1986). これは 1827 年にイギリスの植物学者ブラウン (Robert Brown) によって発見されたものであり、以下にブラウン運動の性質をまとめる.

1. ブラウン運動は、並進と回転の組み合わせから成り立ち、全く不規則で粒子の軌道の曲線を描くことはできない.
2. 2 つのブラウン運動する粒子は、それぞれの直径より短い距離にまで接近しても、互いに全く独立な運動をする.
3. 粒子が小さいほど運動は活発である.
4. ブラウン運動は粒子の濃度や組成によって振る舞いが変わることはない.
5. 粒子を浮かべる流体の種類に関係なく、ブラウン運動は見られる. ただし、流体の粘性が小さいほどブラウン運動は活発になる.
6. 温度が高いほどブラウン運動は激しくなる. (温度が上昇すると、流体の粘性率が著しく減少することによる 2 次的な効果も大きい)
7. ブラウン運動は時間を経ても弱まることや止まることはない.
8. 微粒子が 1 個しか水中に存在しない場合でも、微粒子はブラウン運動をする.

◆ ブラウン運動による粒子の移動量

時刻 $t=0$ で水中のある位置 $x=0$ に無数の微小な粒子を置くと、ブラウン運動によって拡散が始まる. 時刻 t , 位置 x におけるブラウン運動する微小粒子の存在確率密度を $f(x,t)$ で表すと、拡散係数 D を用いて、拡散の微分方程式で表される.

$$\frac{\partial f(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 f(x,t)}{\partial x^2} \quad (\text{A.9})$$

この微分方程式を、次のような境界条件の下で解くことを考える.

- (a) 時刻ゼロでは、原点以外の場所で存在確率がゼロであるという条件
 $t=0, x \neq 0, f(x,t)=0$

(b) 任意の時刻で、全領域の積分値は1に規格化されているという条件

$$\int_{-\infty}^{+\infty} f(x, t) dx = 1$$

すると、この数学的問題は次のように表される。

$$f(x, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{1/2}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (\text{A.10})$$

ここで、 σ を式(A.11) のように定義すると、

$$2Dt = \sigma^2 \quad (\text{A.11})$$

式(A.10) は次式のようにガウス関数で表される。

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{A.12})$$

σ はブラウン運動により時間と共に増大し $f(x)$ の曲線は広がるが、いかなる場合でも原点から σ , 2σ , 3σ の距離内に粒子が存在する確率は 68.3%, 95.5%, 99.7% となる。ある時間内に粒子がブラウン運動により移動した距離は、 x^2 の平均値の平方根である。 x^2 の平均値は σ^2 と等しく、これを平均二乗変位と呼ぶ。よって、任意の時間 Δt において、ブラウン運動による粒子の移動量 s_B の二乗平均は次式で表される、

$$\begin{aligned} \langle s_B^2 \rangle &= 2D\Delta t \\ D &= \frac{k_B T}{3\pi\mu d_p} \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

ここで、 d_p は粒子径、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 Δt は時間間隔、 μ は粘性係数である。式(A.13) より、粒子径が小さくなるとブラウン運動による移動量が大きくなることがわかる。マイクロ PIV では、参照窓画像内の粒子群の配置形状によって速度検出しているため、トレーサ粒子のブラウン運動の移動量が大きくなると2時刻の画像間における粒子群の配置形状が変形する。その影響が、流体速度計測に誤差を与えることとなる。

Appendix A.4 レーザ誘起蛍光法の特徴および注意点

◆ LIF の特徴

1. 高感度計測法

蛍光法は試料の蛍光を直接測定するので、励起光の強度を強め、微弱な発光を検知可能なように受光部の感度を高めれば、システムの感度を容易に向上できる。これに対し吸光法では、吸光度が入射光と透過光の強度比に基づくため、感度が入射光強度に依存しない。このような理由から、吸光法による定量下限が 10^{-6} mol/l 程度であるのに対し、蛍光法では 10^{-9} mol/l 程度まで定量可能である。

2. 高時空間分解能

蛍光は $10^{-9} - 10^{-6}$ sec 程度の現象であり、レーザーのパルス発振は $10^{-9} - 10^{-8}$ sec 程度であるから時間分解能は受光系システムに依存する。また、空間分解能も受光系の分解能に依存する。

3. 非接触計測

レーザーを用いた測定法であるため流動場に外乱を与えず、かつ直接的な計測が可能である。

4. 選択的な計測

多成分の濃度計測では、それぞれの物質の発光スペクトルが異なる場合において、選択的に物質ごとの濃度計測が可能である。

◆ LIF の注意点

1. 盲蛍光

レーザー誘起蛍光法は高感度測定法であるため、微量不純物による盲蛍光が高くなりやすく、計測値の変動や誤差の要因となり得る。そのため、溶液はイオン交換水により作製する必要がある。

2. 消蛍光 (クエンチング)

励起状態にある蛍光分子は、基底状態の分子と比べて周囲の溶媒分子とより強く相互作用する。これにより蛍光が弱まる現象を消蛍光 (クエンチング) と呼ぶ。この現象は、蛍光分子を脱励起させる分子と蛍光分子の衝突確率に比例する。主な消蛍光は、濃度消光、温度消光、粘性消光、酸素消光および溶媒消光が挙げられるが、特に注意すべきものは濃度消光である。これは、濃度が濃くなると、励起分子が未励起分子に衝突してエネルギーを失い、量子収率が減少し、蛍光が弱まる現象である。そのため、蛍光色素を含む作動流体を作製する際には、イオン交換水を用いて

濃度調整を行う必要がある。

3. 散乱光と二次光

励起光のレイリー散乱 (Reyleigh scattering) およびミー散乱 (Mie scattering) とその二次光は、計測に大きな誤差を与える。これらは、励起光が溶液中の微粒子などにより反射される光であり、励起光と同一波長であるため、受光系に吸収フィルタを用いることによって蛍光と容易に区別できる。

4. 顕微鏡を用いた際の注意点

蛍光顕微鏡および LIF を併用した場合、対物レンズより照射される光は、流路全域を励起する。これより、CCD カメラには深さ方向に積算された蛍光強度が撮像されるため、深さ方向に濃度分布が形成される流動場の計測は困難となる。3.2.1 節に示す共焦点顕微鏡と LIF を併用することで、この問題は解決される。

Appendix A.5 数値解析手法

◆ 物質輸送方程式の離散化

定常状態の流動場におけるイオン輸送現象は、次式で表される三次元の物質輸送方程式に依存している。なお、化学反応による物質の生成はないものとする。

$$U \frac{\partial c}{\partial x} + V \frac{\partial c}{\partial y} + W \frac{\partial c}{\partial z} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (\text{A.14})$$

数値シミュレーションを行う際には、式(A.14) を連続的に解くことが困難であるため、離散化を行う必要がある。そこで、Figure A.4 に示すようなスタッガード格子と呼ばれるコントロールボリュームを設定し、中心差分法による離散化を行った。各速度成分はコントロールボリュームの検査面で定義され、中心部にスカラー格子点 P が配置される。ここで、各格子点間の距離を座標軸ごとにそれぞれ、 δx 、 δy 、 δz とする。また、コントロールボリュームの各辺を Δx 、 Δy 、 Δz とする。式(A.14) をコントロールボリュームにわたり積分する。

$$\int_b^t \int_s^e \int_w^e \left\{ \frac{\partial}{\partial x} \left(U c - D \frac{\partial c}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(V c - D \frac{\partial c}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(W c - D \frac{\partial c}{\partial z} \right) \right\} dx dy dz = 0 \quad (\text{A.15a})$$

ここで、左辺について、

$$\begin{aligned}
 & \int_b^t \int_s^n \int_w^e \left\{ \frac{\partial}{\partial x} \left(U_c - D \frac{\partial c}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(V_c - D \frac{\partial c}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(W_c - D \frac{\partial c}{\partial z} \right) \right\} dx dy dz \\
 &= \Delta y \Delta z \left\{ U_e \frac{c_E + c_P}{2} - \frac{D(c_E - c_P)}{(\delta x)_e} - U_w \frac{c_W + c_P}{2} + \frac{D(c_P - c_W)}{(\delta x)_w} \right\} \\
 &+ \Delta x \Delta z \left\{ V_n \frac{c_N + c_P}{2} - \frac{D(c_N - c_P)}{(\delta y)_n} - V_s \frac{c_S + c_P}{2} + \frac{D(c_P - c_S)}{(\delta x)_s} \right\} \\
 &+ \Delta x \Delta y \left\{ W_t \frac{c_T + c_P}{2} - \frac{D(c_T - c_P)}{(\delta z)_t} - W_b \frac{c_B + c_P}{2} + \frac{D(c_P - c_B)}{(\delta z)_b} \right\}
 \end{aligned} \tag{A.15b}$$

式(A.15) を式(A.14) に代入して整理すると、次式が得られる.

$$a_P c_P = a_E c_E + a_W c_W + a_N c_N + a_S c_S + a_T c_T + a_B c_B \tag{A.16}$$

ここで、

$$\begin{aligned}
 a_E &= -\frac{1}{2} F_e + \frac{D \Delta y \Delta z}{(\delta x)_e} & a_W &= \frac{1}{2} F_w + \frac{D \Delta y \Delta z}{(\delta x)_w} \\
 a_N &= -\frac{1}{2} F_n + \frac{D \Delta x \Delta z}{(\delta y)_n} & a_S &= \frac{1}{2} F_s + \frac{D \Delta x \Delta z}{(\delta y)_s} \\
 a_T &= -\frac{1}{2} F_t + \frac{D \Delta x \Delta y}{(\delta z)_t} & a_B &= \frac{1}{2} F_b + \frac{D \Delta x \Delta y}{(\delta z)_b}
 \end{aligned} \tag{A.17}$$

$$\begin{aligned}
 F_e &= U_e \Delta y \Delta z & F_w &= U_w \Delta y \Delta z \\
 F_n &= V_n \Delta x \Delta z & F_s &= V_s \Delta x \Delta z \\
 F_t &= W_t \Delta x \Delta y & F_b &= W_b \Delta x \Delta y
 \end{aligned} \tag{A.18}$$

$$a_P = a_E + a_W + a_N + a_S + a_T + a_B + F_e - F_w + F_n - F_s + F_t - F_b \tag{A.19}$$

以上の離散化方程式を用いることにより、流動場におけるイオン濃度の算出が可能となる. ここで、式(A.19) の $(F_e - F_w + F_n - F_s + F_t - F_b)$ はコントロールボリューム内での質量の生成を表しており、質量保存則から 0 となる.

◆ イオン輸送現象の数値解析

離散化方程式 (式(A.16)) は, Figure A.4 のコントロールボリューム内で濃度 c が直線状に分布することを仮定したものである. 従って, このような前提のもとに満足な計算結果を得るには, 拡散が支配的となるようにコントロールボリュームを充分小さく設定することが必要不可欠である. しかし, マイクロ PIV によって得られた既知の速度分布を用いるため, コントロールボリュームの大きさは速度ベクトルの間隔である $7.74 \mu\text{m}$ 以下には設定できず, 任意に変化させることができない. そこで, 対流が支配的な格子内においても物理現象に合致した現実的な解が得られるような計算手法として, ベキ乗法 (Patankar 1980) を採用した. ベキ乗法は厳密解に対して良好な近似が得られる手法であり, 式(A.17) の係数 a を次のように置き換えることによりなされる.

$$\begin{aligned}
 a_E &= \frac{D\Delta y\Delta z}{(\delta x)_e} \times \max\left[0, (1-0.5|Pe_e|)^5\right] + \max[-F_e, 0] \\
 a_W &= \frac{D\Delta y\Delta z}{(\delta x)_w} \times \max\left[0, (1-0.5|Pe_w|)^5\right] + \max[F_w, 0] \\
 a_N &= \frac{D\Delta x\Delta z}{(\delta y)_n} \times \max\left[0, (1-0.5|Pe_n|)^5\right] + \max[-F_n, 0] \\
 a_S &= \frac{D\Delta x\Delta z}{(\delta y)_s} \times \max\left[0, (1-0.5|Pe_s|)^5\right] + \max[F_s, 0] \\
 a_T &= \frac{D\Delta x\Delta y}{(\delta z)_t} \times \max\left[0, (1-0.5|Pe_t|)^5\right] + \max[-F_t, 0] \\
 a_B &= \frac{D\Delta x\Delta y}{(\delta z)_b} \times \max\left[0, (1-0.5|Pe_b|)^5\right] + \max[F_b, 0]
 \end{aligned} \tag{A.20}$$

Pe は, 対流と拡散の強さの比を示す無次元数であるペクレ数であり,

$$\begin{aligned}
 Pe_e &= \frac{U_e(\delta x)_e}{D} & Pe_w &= \frac{U_w(\delta x)_w}{D} \\
 Pe_n &= \frac{V_n(\delta y)_n}{D} & Pe_s &= \frac{V_s(\delta y)_s}{D} \\
 Pe_t &= \frac{W_t(\delta z)_t}{D} & Pe_b &= \frac{W_b(\delta z)_b}{D}
 \end{aligned} \tag{A.21}$$

となる. また, $\max[]$ はその中に含まれている量の内の最大値を表す. 式(A.20), 式(A.21) から, ベキ乗法においては, コントロールボリューム内での対流と拡散の比を考慮して係数 a を決定していることがわかる.

◆ 格子点の配置

べき乗法を適用した離散化方程式による数値解析は、式(A.16) および式(A.18) – (A.21) を用いて以下に示すように行われた。マイクロ PIV により得られた流れ方向および流路幅方向の速度分布から、注入口側および出口側の流量を評価したところ、両者がほぼ等しくなったため、深さ方向速度 w は $0 \mu\text{m/s}$ と見なせる。このとき、式(A.21) より Pe 数は 0 となり、 Z 方向の物質輸送は分子拡散のみによってなされる。また、マイクロ PIV より、 X, Y, Z 方向にそれぞれ $34 \times 49 \times 5$ の速度ベクトル ($7.74 \mu\text{m} \leq x \leq 263.16 \mu\text{m}$, $14.24 \mu\text{m} \leq y \leq 385.76 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m} \leq z \leq 25 \mu\text{m}$) が得られたため、ベクトルの位置にスカラー格子点を配置し、コントロールボリュームの X 軸および Y 軸の正方向の検査面にそれぞれ X 方向速度および Y 方向速度を与えた。以上より、各格子点間の距離は等間隔となるため、 $\Delta x = 7.74 \mu\text{m}$, $\Delta y = 7.74 \mu\text{m}$, $\Delta z = 5 \mu\text{m}$ となる。なお、各格子点間の midpoint に検査面を設定したため、コントロールボリュームの各辺の長さは、それぞれ $\Delta x = 7.74 \mu\text{m}$, $\Delta y = 7.74 \mu\text{m}$, $\Delta z = 5 \mu\text{m}$ となった。Figure A.5 に計算領域における格子点の配置とそれぞれの番地 (X 方向は i , Y 方向は j , Z 方向は k) を示す。Figure A.5 (a) の XY 平面には $(i, j) = (34, 49)$ の格子点を配置し、Figure A.5 (b) の Z 方向には $1 \leq k \leq 11$ ($z = 0 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $15 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$, $35 \mu\text{m}$, $40 \mu\text{m}$, $45 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$) の格子点を配置した。静圧駆動流の深さ方向 (Z 方向) における対称性を利用し、 $z = 30 \mu\text{m}$, $35 \mu\text{m}$, $40 \mu\text{m}$, $45 \mu\text{m}$ における XY 平面には、それぞれ $z = 20 \mu\text{m}$, $15 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ にて計測された速度分布を用いた。また、 $z = 0, 50 \mu\text{m}$ の壁面には前述と同様に半コントロールボリュームを配置した。なお、 $k = 1$ では $a_B = 0$ および $\Delta z = 2.5 \mu\text{m}$, $k = 11$ では $a_T = 0$ および $\Delta z = 2.5 \mu\text{m}$ となる。

◆ 計算条件

Table 4.3 に実験条件を示す。これより、濃度場を計算する際の初期条件には、注入口 A および注入口 B に入る溶液が完全に混合された際の水素イオン濃度 c_i を与えた。また、濃度境界条件として、計算領域の左側 ($y = 7.74 \mu\text{m}$) に格子点列 $j = 0$ を配置し、注入口 A の水素イオン濃度を与えた。同様に、計算領域の右側 ($y = 393.5 \mu\text{m}$) にも格子点列 $j = 50$ を配置し、注入口 B の水素イオン濃度を与えた。以上の初期条件および境界条件下で、混合場および化学反応場において、離散化した物質輸送方程式 (式(A.16)) の解が収束するまで繰り返し計算を行った。ここで、拡散係数 D には、水素イオンの拡散係数 $8.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (Choi et al. 2001) を与えた。なお、数値計算の流れ図を Figure A.6 に示す。解の収束条件は、1 回の繰り返し計算における計算前の水素イオン濃度 c_{P0} と計算後の濃度 c_P を用いて次式で与えた。

$$\frac{|c_P - c_{P0}|}{c_i} \leq 10^{-5} \quad (\text{A.22})$$

式(A.22) の収束条件は, 対流を 0 として計算を行った場合の収束解が直線状の濃度分布となること (分子拡散が支配的であるため) を確かめることで妥当性の検証を行っている.

Table A.1 List of filter block

	Excitation filter [nm]	Dichroic mirror [nm]	Barrier filter [nm]
Ultraviolet	330–380	400	420
Violet	380–420	430	450
Blue violet	400–440	455	470
Blue	450–490	505	520
Green	510–560	575	590

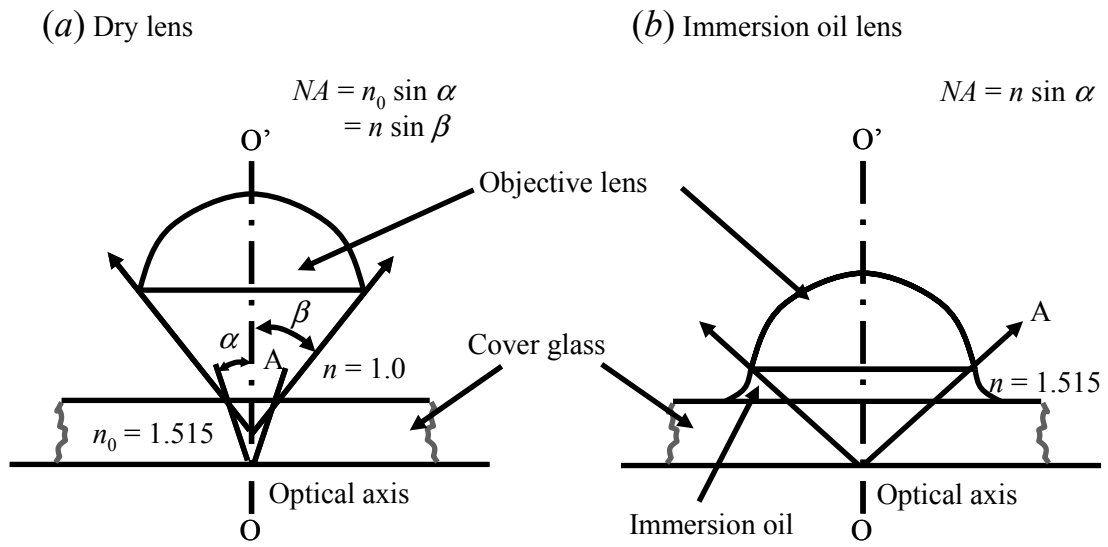


Figure A.1. Schematic of the objective lens with (a) dry lens and (b) immersion oil lens.

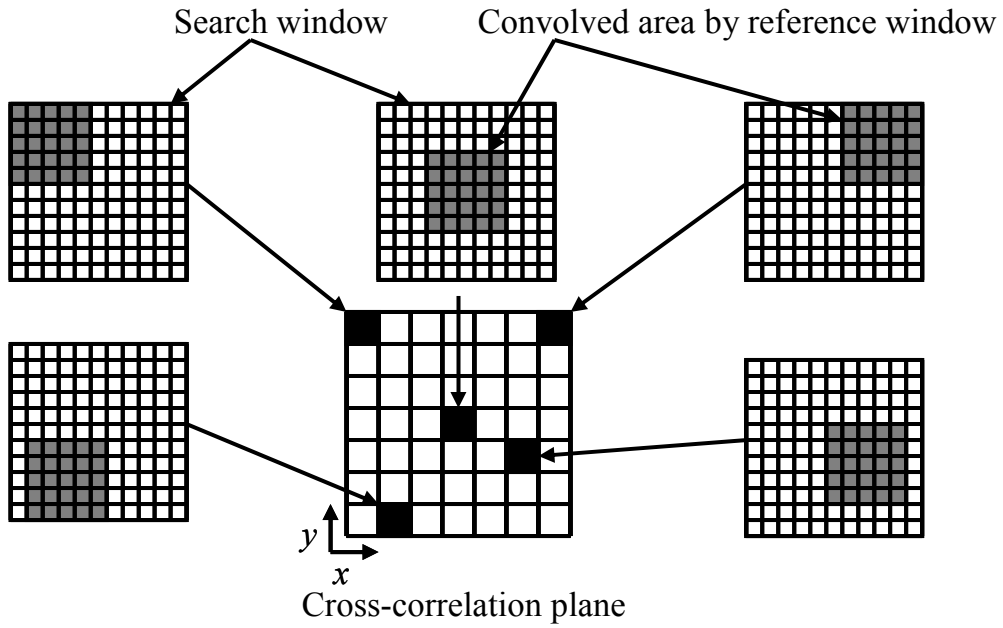


Figure A.2. Schematic of the cross-correlation PIV method.

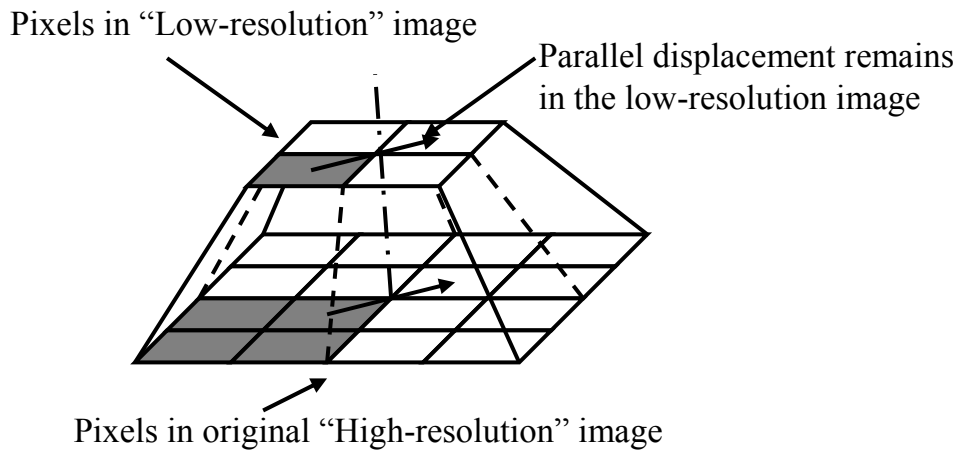


Figure A.3. Schematic of hierarchical PIV method.

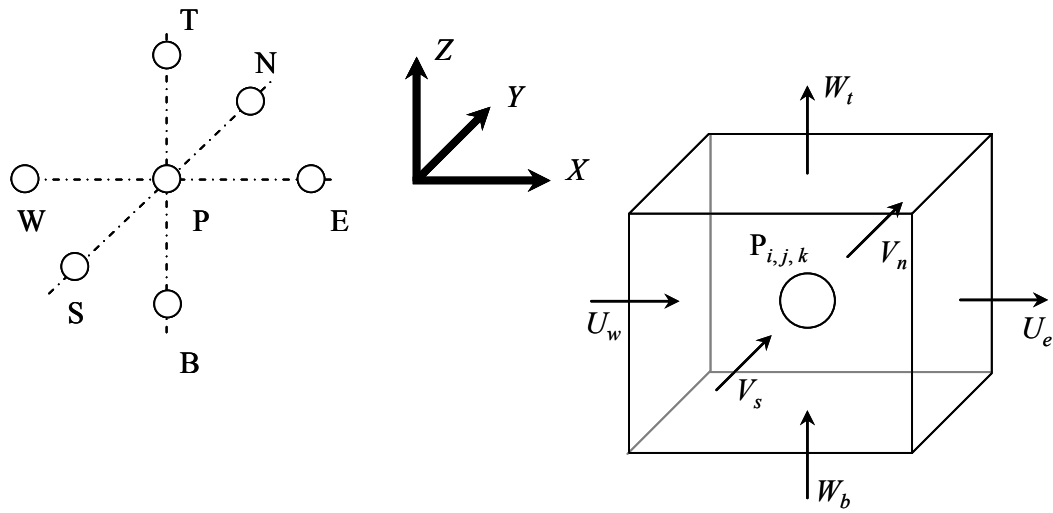
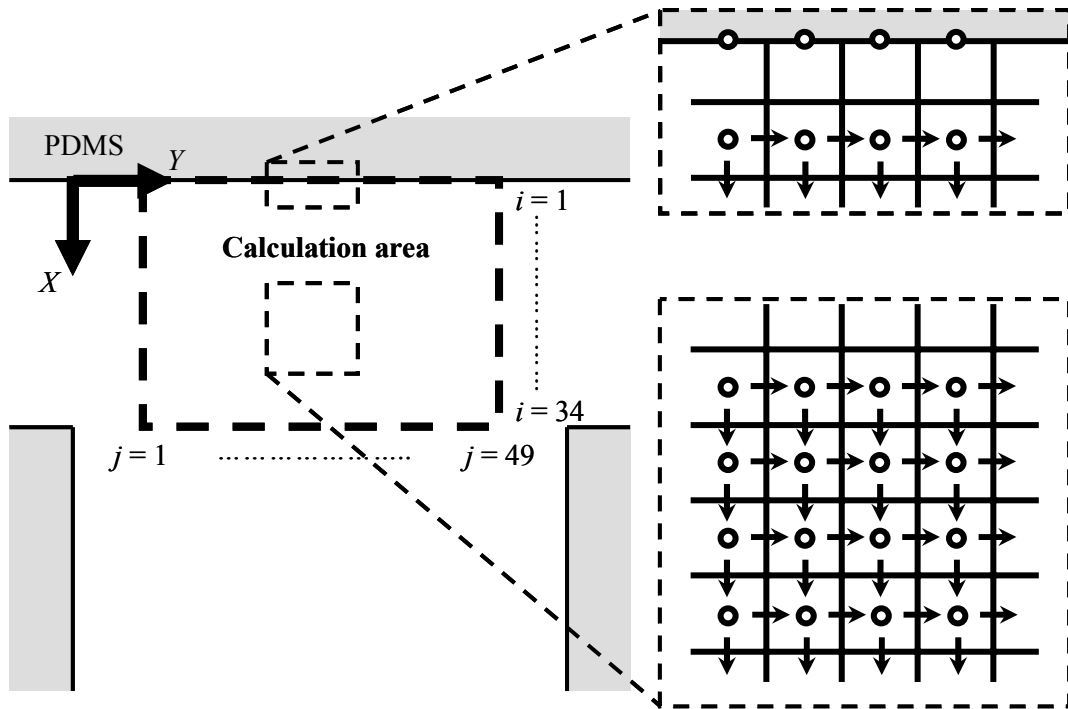


Figure A.4. Schematic of unit of staggered mesh.

(a)



(b)

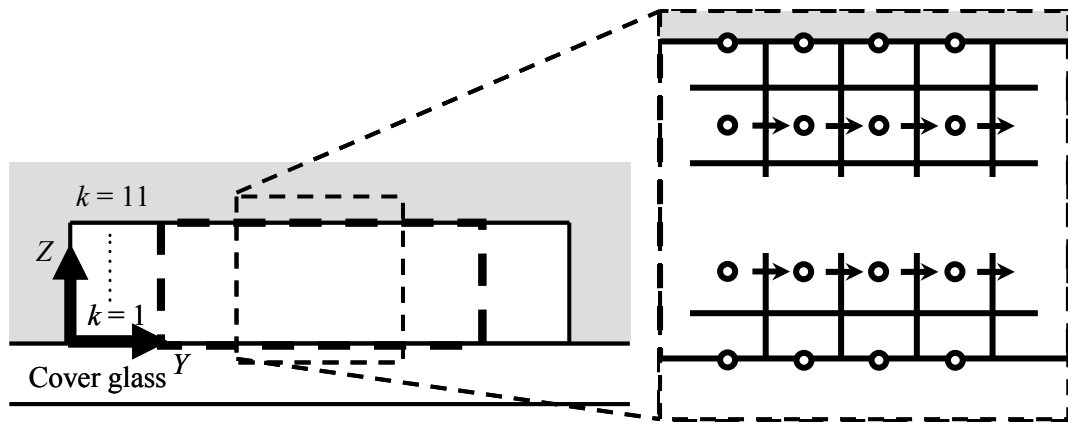


Figure A.5. Schematic of calculation area in (a) XY plane and (b) YZ plane.

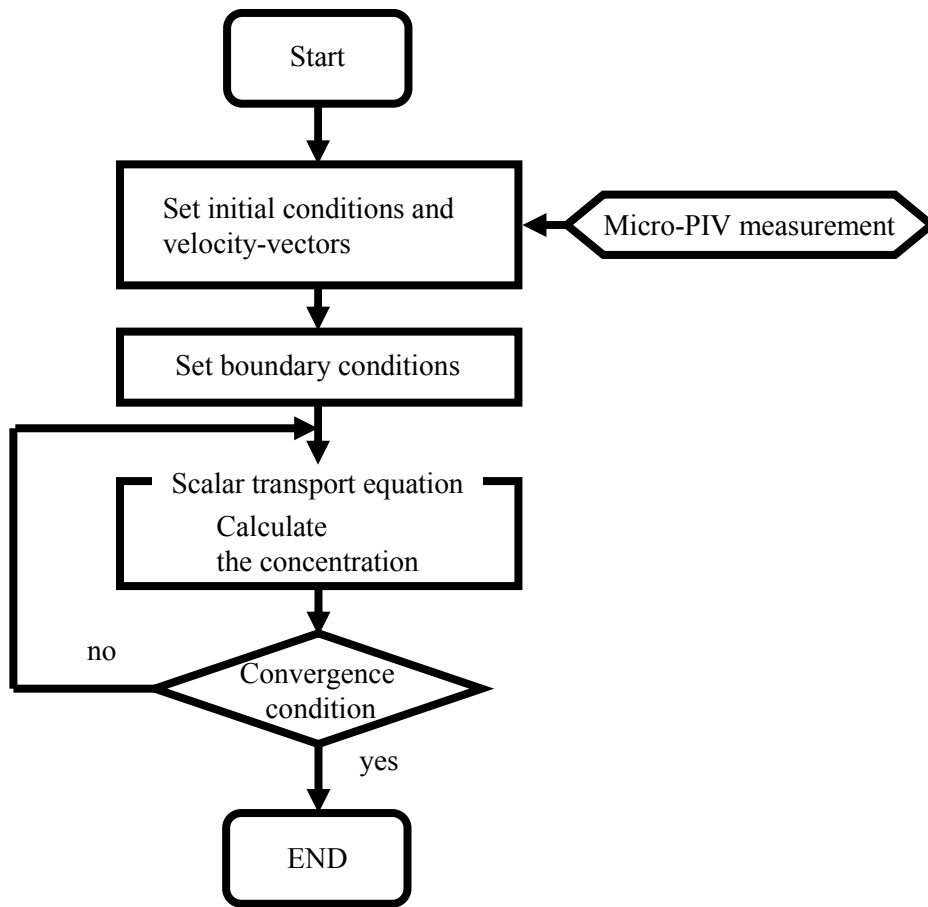


Figure A.6. Flow chart of numerical simulation of proton concentration using velocity-vector maps obtained by micro-PIV measurements.