

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20550073

研究課題名（和文） ナノ粒子高分解能分離定量法の開発

研究課題名（英文） Development of high-resolution determination methods for nanoparticles

## 研究代表者

竹内 豊英 (TAKEUCHI TOYOHIDE)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：40135322

研究成果の概要（和文）：シリカコロイド（粒径5～78 nm）のハイドロダイナミッククロマトグラフィー（HDC）による分離条件について検討した。HDCでは充填剤間の空隙を利用して分離することが多い。本研究では、シリカコロイドのサイズを考慮し、粒子径が2～5  $\mu\text{m}$ 程度の無孔性シリカゲルを充填したカラムによるHDCを検討した。

溶離液について詳細に検討したところ、pHが7以上のリン酸緩衝溶液を用いると、サイズに基づいた溶出体積が観察されたことより、充填剤シリカの安定性も考慮し、溶離液として10 mMのリン酸緩衝溶液（pH 7.1）を主に用いた。また、充填剤粒子径について検討したところ、充填剤の粒子径が小さいほど分離が改善された。シリカコロイドは主にUV検出器を用い、濁度法に基づいて検出した。従って、シリカコロイドのサイズが大きいほど検出シグナルは増大した。

HDCにおけるシリカコロイドの溶出体積は、流量が減少するとわずかながら増大した。これは、流量の減少に伴いより狭い流路への拡散が促進されることが要因であると推定された。

充填カラムによるシリカコロイドのHDC分離を改善するためには、より小さな充填剤粒子を用いるか、あるいは長い分離カラムを用いる必要があるが、使用した装置の耐圧性とそのような分離カラムの調製が困難であったので、透過性の高いモノリス型キャピラリーカラムを調製し、ハイドロダイナミックキャピラリークロマトグラフィー（HDCC）によるナノ粒子の分離について検討し、高性能化を目指した。

内径50～200  $\mu\text{m}$ のモノリス型シリカキャピラリーカラムを調製し検討した結果、シリカコロイドについて粒子径が大きいほど溶出が早く、サイズに基づく分離を達成することができた。カラム外での試料成分の拡散を極力低減化させるため、試料注入体積は20 nL以下とし、オンカラム検出を採用した。用いたモノリスシリカには、10～15 nm程度のメソポアがあることが想定され、小さなナノ粒子についてはHDCモードの他にサイズ排除の効果も含まれることが予測された。また、検出器や連結部を含む流路における吸着やコロイド自身の凝集を避けるために溶離液の条件を検討した。シリカコロイドについてはリン酸緩衝溶液（pH 7）が有効であることがわかった。長さ50 cmのモノリスキャピラリーカラムによって25 cm充填カラムとほぼ同程度の分離能を達成できることが分かった。モノリス型キャピラリーカラムは透過性が高く、カラム長を増大させることにより分離能を改善できる可能性をもっている。

さらに、金コロイド（13～61 nm）についてHDC分離を適用したところ、ドデシル硫酸ナトリウムを添加することで良好なピーク形状がえられた。

研究成果の概要（英文）： Hydrodynamic chromatography (HDC) conditions have been examined for the separation of silica colloids with 5 – 78 nm diameters. Conventional HPLC columns with 25 cm×4.6 mm I.D. were prepared and employed for HDC.

Interstitial spaces among packing materials are usually employed in HDC. Considering the size of silica colloids, non-porous silica gel with 2 – 5  $\mu\text{m}$  was packed for the HDC separation of silica colloids. Eluents for HDC of silica colloids were examined in detail, and phosphate buffer solutions with pH larger than 7 gave reasonable elution volumes for silica colloids. A 10 mM phosphate buffer with pH 7.1 was the optimum eluent for silica colloids. The separation column with smaller particle diameter provided better resolution for silica

colloids. The silica colloids were detected with a UV detector based on turbidimetry, and the larger colloid gave larger signal intensity.

The elution volume of silica colloids slightly increased with decreasing flow rate. It was speculated that lower flow rate enhanced the diffusion of analytes into narrower channels.

It is required to use smaller particles or to use a longer column in order to improve the resolution. However, higher pressure drop over such separation columns are indispensable, and preparation of such columns is not easy. Since monolithic silica columns having higher permeability and better resolution will overcome these drawbacks, hydrodynamic capillary chromatography (HDCC) was examined for the separation of colloidal particles.

Monolithic silica capillary columns with 50 – 200  $\mu\text{m}$  were prepared and examined for the HDCC separation of colloidal silica and gold nanoparticles with 13 – 61 nm particle diameters. It was found that smaller elution volumes were observed for larger nanoparticles. In order to minimize the extra-column dispersion, the injection volume was reduced to 20 nL or less, and the on-column detection was carried out. It was expected that the monolithic silica capillary columns possessed mesopore with 10 – 15 nm and size-exclusion effect could be involved for the elution of smaller nanoparticles. Furthermore, eluents were examined in detail so as not to cause adsorption and coagulation of nanoparticles while passing through the separation column and connecting tubes. It was found that phosphate buffers with pH 7 were good for silica colloids, while aqueous sodium dodecylsulfate solutions were good for gold colloids. Monolithic silica capillary columns with 50 cm in length provided resolution comparable to 25-cm packed columns. It was expected that longer monolithic silica capillary columns would achieve better resolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：液体クロマトグラフィー・ハイドロダイナミッククロマトグラフィー・サイズ排除クロマトグラフィー・シリカコロイド・金コロイド

1. 研究開始当初の背景

本研究は、ナノ材料のキャラクタリゼーションにおいて基本的で重要な技術の1つである、粒子径測定法の開発を目標とするものである。ナノ粒子は、セラミックスのナノ構造改質材、光機能コーティング材、電磁波遮蔽材料などの高機能化を付与する新規材料として注目されているが、これら材料の開発においては従来のキャラクタリゼーションの技術が適用できないことがある。

申請者らは蛍光検出器を用い、二次光を利用することによりナノ粒子の光散乱検出が可能であること、さらに光散乱による検出シグナルは粒子サイズが大きいほど増大することを見出した。具体的には粒子サイズが 5

～78 nm のシリカコロイドの高感度検出が可能であることを実証した [T. Takeuchi, Z. Aspanut, T. Yamada, A. Inui, L. W. Lim: J. Chromatogr. A, 1147, 42-45 (2007).]。

申請者らは、上記研究においてサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)と光散乱検出を組み合わせることによりナノ粒子の粒子径を測定する新しい技術の可能性を確信した。これまで、シリカコロイドの測定を可能にした段階であり、今後他の有用なナノ材料にも適用できる装置・測定条件の最適化を行うことが本研究の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、光散乱に基づいた検出と、

SECまたはHDC<sup>1)</sup>分離を組み合わせることで、直径が1~100 nmの粒子粒度分布を決定できる分析システムを構築する。本研究で開発する技術は、ナノ粒子を応用する情報産業や生活関連産業に貢献し、新素材産業の創出の基盤となる。

SECとHDCの分離の原理図を下に示す。前者は、充填剤の孔への浸透・排除を利用したもの、また後者では、充填剤間隙の流速分布(細管の中央部が壁側と比較して線速度が大きい)を利用して分離を達成する。いずれもサイズの大きな粒子が先に溶出する。

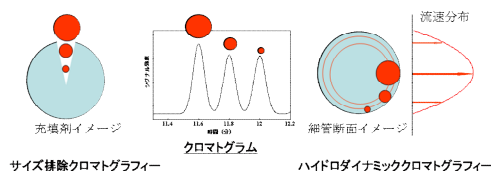


図1 分離原理の比較

より精確に粒子径を測定するためにはクロマトグラフィーの分離能を高める必要がある。ナノメートルサイズの粒子の分離にはSECとHDCが適するものと考えられる。本研究では、両クロマトグラフィーの高分離能の達成を目指した。

本研究の「クロマトグラフィーと光散乱に基づいた検出器を組み合わせた粒度分布測定法」は材料分析の分野で用いられている完成度の高い技術をナノ粒子に適するように改良し組み合わせるものである。

### 3. 研究の方法

本研究は、研究協力者(大学院生)の協力の下に研究代表者1名により平成20年度から22年度にかけて下記3項目について研究を実施した。測定実験や条件検討は大学院生が主に担当した。

#### (1) 散乱に基づく検出条件の最適化

- 1- 蛍光検出器を利用した検出
- 2- UV検出器を利用した検出
- 3- 粒子径とシグナル強度との関係の明確化

#### (2) サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の高分解能化

- 1- 溶離液の最適化
- 2- 充填剤孔径(浸透限界・排除限界)の最適化
- 3- 高性能化

#### (3) ハイドロダイナミッククロマトグラフィー(HDC)の高分解能化

- 1- 溶離液の最適化
  - 2- 充填剤粒子径の最適化
  - 3- 微粒子充填カラムの調製法の開発
  - 4- モノリス型キャピラリーカラムの開発
- (4) 金ナノ粒子への適用

### 4. 研究成果

#### (1) 散乱に基づく検出条件の最適化

-1- 蛍光検出器を利用した検出  
粒子径が5 nm以上のシリカコロイドについては通常の蛍光検出器を用いることにより、蛍光波長を励起波長に2倍に設定することにより、励起光のレーリー散乱光を測定することができた。検出シグナルは、シリカコロイドの粒子径が大きいほど大きなシグナルを与えることを確認した。

#### -2- UV検出器を利用した検出

コロイド粒子の光散乱による入射光強度の減少に基づいてシリカコロイドの検出が可能であった(濁度法)。この場合、低波長ほど大きなシグナルを与えた。S/Nの観点から210~220 nmでの測定が適すると判断された。

金コロイドについても、濁度法により検出が可能であったが、表面プラズモン共鳴に基づく吸収検出も可能であった。表面プラズモン共鳴による吸収検出では、粒子径が大きな金コロイドがより長波長側で極大吸収を示す傾向が示された。

#### -3- 粒子径とシグナル強度との関係の明確化

上述のように、蛍光検出器を使用した光散乱光の検出および濁度法に基づく吸収検出ではコロイド粒子が大きいほど大きなシグナルを与えることが確認された。

#### (2) サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の高分解能化

##### -1- 溶離液の最適化

キャピラリーLCを用いた検討の結果、先の研究で最適とされたリン酸緩衝溶液を用いたときは、シリカコロイドが検出器や連結部を含む流路に吸着するためにピーク形状が良くないことが明らかとなり、ピークをよりシャープにするために、移動相の検討を詳細に行う必要があった。その結果、陽イオン界面活性剤であるヘキサデシルアンモニウムクロリドを使用した際に連結部等への吸着を防ぐことができ、最もシャープな溶出パターンを得ることができ、5 nmと78 nmのシリカコロイドの分離を改善することができた。

##### -2- 充填剤孔径(浸透限界・排除限界)の最適化

SECにおいて、分析対象となる成分のサイズを考慮して充填剤の孔径を選択しなければならない。たとえば、平均孔径100 nm(1,000 Å)の充填カラムを使用した際に、78 nmのシリカコロイドはほぼ排除限界(exclusion limit)に溶出され、一方低分子量のトルエンは浸透限界(permeation limit)付近に溶出される(図2)。SECではこの間が分離領域となる。検討の結果、充填剤の平均

孔径が 100 nm の場合、5~78 nm のシリカコロイドはほとんど排除限界付近に溶出され、分離に利用できる領域が狭いことが分かった。このことは更に大きな孔径を有する充填剤の利用が必要であるが、目的に合致するものが入手できなかった。

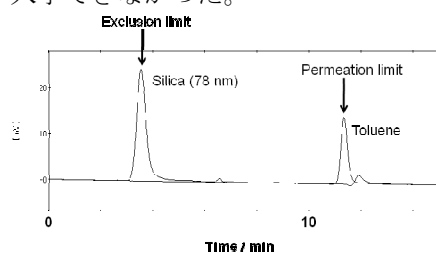


図2 トルエンおよびシリカコロイド (78nm) の溶出状況

カラム：SEC SRT-1000 (300 x 0.53 mm I. D.)  
 移動相：メタノール. 流量：4.0  $\mu$ L/min.  
 サンプル：2.0% 78 nm シリカコロイド, 0.1%  
 トルエン (0.02  $\mu$ L). 検出波長：210 nm.

### -3- 高性能化

SEC における高性能化を図るためには、充填剤粒子の微小化、カラム長の増大、リサイクル分離などの方法が考えられる。ナノサイズの試料成分のサイズ排除モードによる分離を考えると、充填剤の微粒子化には限界があり、カラム長の増大が有利であると考え、充填剤粒子径が 5  $\mu$ m について長いカラムを調製し分離能の改善を試みた。たとえば、30 cm および 90 cm のカラムを作製し、トルエンを試料として理論段数を測定すると、流量が 1  $\mu$ L/min において、それぞれ 8,800 段、35,000 段が達成された。ただし、シリカコロイドを試料とした際には吸着と拡散速度の低減により期待した理論段数を達成することはできなかった。

リサイクル分離についてはコンベンショナルサイズのカラムで検討したが、期待通りには分離度が改善されなかった。

### (3) ハイドロダイナミッククロマトグラフィー(HDC)の高分解能化

#### -1- 溶離液の最適化

溶離液について詳細に検討したところ、pH が 7 以上のリン酸緩衝溶液で、サイズに基づいた溶出パターンが観察されたので、溶離液には 10 mM のリン酸緩衝溶液 (pH 7.13) を主に用いた。5~78 nm のコロイドに対して充填剤の粒子径が小さいほど分離が改善された。

#### -2- 充填剤粒子径の最適化

シリカコロイド (粒径 5~78 nm) の HDC における分離条件について検討した。用いた分離カラムのサイズは長さ 25 cm、内径 4.6 mm であり、通常の HPLC システムを使用した。ただし、カラム外における試料成分の拡散を抑えるために、UV 検出器のセルにはセミミク

ロ LC 用 (光路長 5 mm, セル体積 2.6  $\mu$ L) のものを装着し、試料注入体積は 2  $\mu$ L とした。連結部には可能な限り内径 0.13 mm の PEEK チューブを用いた。

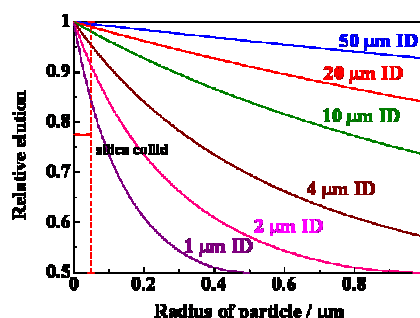


図3 HDC で必要な流路径

対象とするシリカコロイドのサイズを考慮し、粒子径が 2~5  $\mu$ m 程度のシリカゲルを充填したカラムによる HDC を検討した。モデル予測 (図 3) から、流路径は、1  $\mu$ m 以下であることが望ましいことがわかった。仮に球状粒子が最密充填されているとすると、流路を通り抜けることのできる最大粒子径は、充填剤粒子径の約 0.16 倍である。たとえば、粒子径 2  $\mu$ m の充填剤の隙間を通り抜けることのできる最大粒子径は 320 nm となる。すなわち、対象とするシリカコロイドのサイズ (粒径 5~78 nm) を考えるとより粒子径の小さな充填カラムを用いた方がより高い分離度を達成できることが予測できる。ただし、実際には、充填カラムの隙間は非常に複雑な形状をしているので注意が必要である。

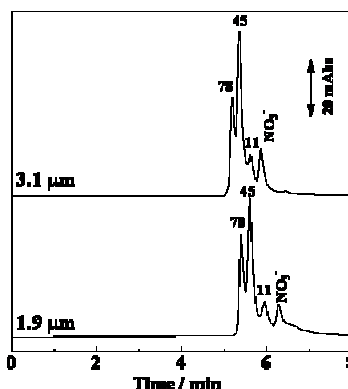


図4 充填カラムによるシリカコロイドの HDC 分離

カラム：無孔性シリカ (250 x 4.6 mm I. D.).  
 移動相：10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.13).  
 流量：0.3 mL/min. サンプル：0.05% 78 nm,  
 0.1% 45 nm, 0.2% 11 nm, 0.02 mM 硝酸イ  
 オン (2  $\mu$ L). 検出波長：210 nm.

図4は、3.1  $\mu$ m および 1.9  $\mu$ m 無孔性シリカゲルカラムによるシリカコロイドの分

離例を示す。図中の数字はコロイド粒子径 (nm)を示す。図4からわかるように 1.9  $\mu\text{m}$  カラムの方が 3.1  $\mu\text{m}$  カラムよりも若干良い分離度を達成している。

シリカコロイドの溶出体積は、流量が減少するとわずかながら増大した(図5)。これは、流量の減少に伴いより狭い流路への拡散が促進されることが要因であると推定された。

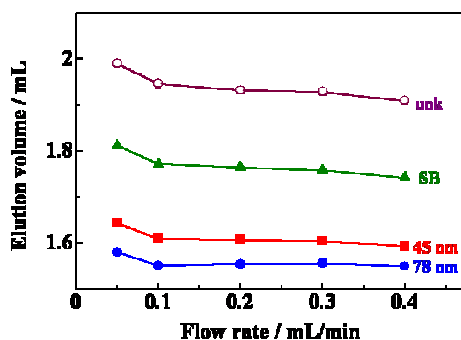


図5 溶出体積に与える流量の影響  
カラム:無孔性シリカ (3.1  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm ID). 移動相: 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.13). 流量: 0.3 mL/min. 検出波長: 210 nm. サンプル: 0.05% 78 nm, 0.1% 45 nm, 1ppm 安息香酸ナトリウム (SB), unk=未特定ピーク.

シリカコロイドは UV 検出器を用い、濁度法に基づいて検出された。従って、シリカコロイドのサイズが大きいほど検出シグナルは増大した。

### -3- 微粒子充填カラムの調製法の開発

微粒子充填剤の充填方法を確立するために、充填溶媒およびスラリー溶媒の検討ならびに充填圧について最適化を図った。

種々検討した結果、充填溶媒ならびにスラリー溶媒にメタノールを用い、スラリー溶媒をマグネチックスターラーで攪拌しながら加圧充填 (~20 MPa) することで良好な性能を持つカラムの調製が可能であることがわかった。

### -4- モノリス型キャピラリーカラムの開発

既報に従って内径 50~100  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリー内にモノリス型シリカを調製した。また、内径 200  $\mu\text{m}$  のモノリスシリカカラムについては市販品を入手した。

シリカコロイドを HDC 分離するにあたり、リン酸緩衝溶液の、濃度、pH および有機溶媒の添加について検討した。種々検討した結果、10 mM のリン酸緩衝溶液 (pH 7.2) に 20%メタノールを加えた溶液が最適であることが分かった。その溶液を移動相とした場合、長さ 50 cm, 内径 0.2 mm のキャピラリーカラムを流量 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で操作したところ、5.8 MPa

の圧力損失があった。

調製したモノリスキャピラリーカラムは、10~15 nm 程度のメソポアがあり、小さなナノ粒子については、HDC 以外にサイズ排除の効果が加わることが想定された。

図6にモノリスキャピラリーカラムによるシリカコロイドの分離例を示す。図6からわかるように充填カラムと比較してほぼ同程度の分離度が達成されていることがわかる

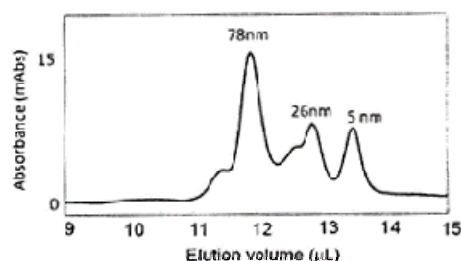


図6 モノリスシリカキャピラリーカラムによるシリカコロイドの分離

カラム:モノリスシリカ (500 x 0.2 mm I.D.). 移動相: 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.2):メタノール (20:80). 流量:1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 検出波長: 210 nm. サンプル: 1% 78 nm, 2.8% 26 nm, 10% 5 nm, (0.01  $\mu\text{L}$ ). 検出波長: 210 nm.

### (4) 金ナノ粒子への適用

HDCC による金ナノ粒子の分離について研究した。これまで、充填カラムによる HDC によるシリカコロイド分離について検討したが、達成される分離度が充分ではなく、それを改善するためにはより小さな充填剤粒子を用いるか、あるいは長い分離カラムを用いる必要があった。そこで、透過性の高いモノリス型キャピラリーによる HDCC に注目し、シリカ系キャピラリーモノリスカラムを用いた HDCC による直径 13~61 nm の金ナノ粒子の分離測定法の高性能化を目指した。金コロイドは、加熱下クエン酸ナトリウム水溶液中で調製した。

内径 50~100  $\mu\text{m}$  のモノリス型シリカキャピラリーカラムについて検討した結果、金ナノ粒子のサイズが大きいほど溶出が早く、サイズによる分離を達成することができた。用いたモノリスシリカには、10~15 nm 程度のメソポアがあることが想定され、小さなナノ粒子については HDC モードの他にサイズ排除の効果も含まれることが予測された。また、検出器や連結部を含む流路における吸着やコロイド自身の凝集を避けるために溶離液の条件を検討した。金コロイドについてはドデシル硫酸ナトリウムを移動相に添加することが有効であることがわかった。

図7にモノリスシリカキャピラリーカラムによる金コロイドの HDCC 分離を示す。サ

サイズの異なる金コロイドについては研究室で調製し、その分散度は動的光散乱法および透過型電子顕微鏡観察により評価した(表1)。

長さ 30 cm のモノリスキャピラリーカラムによって完全ではないがこれらの金コロイドをサイズ別に識別できることがわかった。モノリス型キャピラリーカラムは透過性が高く、より長いカラムを利用することにより分離能を更に改善できる可能性がある。

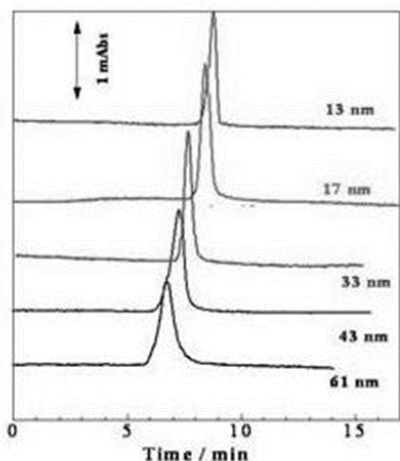


図7 モノリスシリカキャピラリーカラムによる金コロイドの分離

カラム: モノリスシリカ (300 x 0.05 mm ID). 移動相: 8 mM ドデシル硫酸ナトリウム水溶液. 流量: 0.1  $\mu$ L/min. 検出波長: 530 nm. サンプル: 0.02  $\mu$ L.

表1 調製した金コロイドの平均粒子径

H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> 添加体積 ( ml )	平均粒子径 ( nm )
0.05	13 $\pm$ 7
0.1	17 $\pm$ 8
0.2	33 $\pm$ 11
0.3	43 $\pm$ 13
0.4	61 $\pm$ 14

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① T. Takeuchi, Siswoyo, Z. Aspanut and L. W. Lim, Hydrodynamic chromatography of silica colloids on small spherical nonporous silica particles, Anal.

Sci., 査読有, Vol. 25, 2009, pp. 301-306.

[学会発表] (計7件)

① Siswoyo・Lim Lee Wah・竹内豊英, Separation of nano colloidal silica by hydrodynamic chromatography, 日本分析化学会第57年会, 2008年9月10日, 福岡大学

② 竹内豊英・Siswoyo・リムリーワ, ハイドロダイナミッククロマトグラフィーによるシリカコロイドの分離定量, Separation Sciences 2008, 2008年11月13日, 東京理科大学薬学部

③ 竹内豊英・Siswoyo・リムリーワ, シリカコロイドのハイドロダイナミッククロマトグラフィー, 第19回クロマトグラフィー科学会議, 2008年12月1日, 京都大学桂キャンパス

④ 西川周二・リムリーワ・竹内豊英, 高分解能キャピラリーサイズ排除クロマトグラフィーによるシリカコロイドの分離検出, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月24日, 北海道大学

⑤ シスウオヨ・リムリーワ・竹内豊英, Separation of colloidal species by hydrodynamic chromatography, 第40回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2009年11月8日, 岐阜大学

⑥ Siswoyo, Lim Lee Wah, 竹内豊英, Synthesis of gold nano colloids and their separation by hydrodynamic chromatography, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月17日, 東北大学

⑦ 加藤くみ子・斎藤栄子・竹内豊英・川西徹, モノリス型キャピラリーカラムを用いたナノ粒子のサイズ分離手法の開発, 第21回クロマトグラフィー科学会議, 2010年10月23日, 武庫川女子大学

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 豊英 (TAKEUCHI TOYOHIDE)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号: 40135322

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし