

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710109

研究課題名(和文) フローセル式 SAXS 法によるナノ粒子のサイズ・分子量・形状の分布付き同時測定

研究課題名(英文) Development of Size Exclusion Chromatography coupled with Small Angle X-ray Scattering (SEC-SAXS) for simultaneous measurement of size, molar mass, and shape of nano-particles

研究代表者

武政 誠 (TAKEMASA MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：30318795

研究成果の概要(和文):

ナノ粒子や高分子の分子特性は、基礎と応用のいずれにおいても重要となるが、数十 nm 以下の粒径の分子に関しては、サイズ評価、特に回転半径の評価は従来困難であった。フローセルを利用した X 線小角散乱を利用して、本研究でこれまで測定が困難であった領域のサイズ評価を可能にし、さらにサイズや形状が異なる一連の分子の混合物に対しても、各分子種毎にサイズや形状等のキャラクタリゼーションを迅速に行う事が可能な SEC-SAXS 法を開発した。

研究成果の概要(英文):

Radius of gyration can be estimated only for molecules or particles with sizes larger than 10~20nm using widely used light scattering instruments, although the characterization of nano-sized particles and polymers is quite essential both for fundamental science and application. We developed SEC-SAXS (Size Exclusion Chromatography coupled with Small Angle X-ray Scattering) using a flow cell, and investigate dilute solution properties of water soluble polymers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：希薄溶液物性

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：希薄溶液物性、回転半径、X 線小角散乱、放射光、HPLC、SEC-MALLS

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノサイエンスに注目が集まっており、溶液中での分子の自己組織化を利用して、各種機能を有する新しいナノ粒子の創成も進んでいる。しかし、溶液中のナノ粒子(または集合体)の形状はおろか、サイズ分布の測定ですら、一般には容易ではな

く(表 1)、物性に基づいた分子設計には測定手法の革新が求められている。

例えば、X 線小角散乱法(SAXS)を用いた評価は、様々な形状、剛直性、トポロジー構造を有する分子(図 1a~d)それぞれ単独系に関しては可能であるが、図 1a~d の混合系である(e)に対しては不可能で、一意性を

	分布がないサンプル			分布があるサンプル(各物性の分布を測定できるか?)		
	分子量	内部構造(形状)	サイズ	分子量	内部構造(形状)	サイズ
静的光散乱(SLS)	○	△	○(R_g)	×	×	×
動的光散乱(DLS)	×	×	○(R_h)	×	×	△(注1)
磁場勾配NMR法	×	×	○(R_h)	×	×	△(注1)
透過型電子顕微鏡(TEM)	×	△	△(注2)	×	△	△(注3)
X線小角散乱(SAXS)	○	○	○(R_g)	×	×	×
GPC (or GFC, SEC)	△(相対値のみ)	×	△(R_h)	△(相対値のみ)	×	△(R_h)
SEC-MALLS(注4)	○	△	○($R_g > 10nm$)	○	△	○($R_g > 10nm$)
SEC-SAXS(注5)	○	○	○($R_g < 10nm$)	○	○	○($R_g < 10nm$)

表 1 液中ナノ粒子を対象とした既存の測定法と、本研究で開発する SEC-SAXS 法それぞれで可能、不可能な物性計測一覧。(注) R_g : radius of gyration, R_h : hydrodynamic radius. (注 1) 逆ラプラス変換に一意性がないため、分布解析の信頼性は低い。(注 2) サンプル作製時制約でサイズ及び形状への影響が大きい。(注 3) 狭い視野内の限定された数の分子に限定される。(注 4) Size Exclusion Chromatography (SEC) coupled with Multi Angle Laser Light Scattering. (注 5) SEC coupled with Small Angle X-ray Scattering.

欠くフィッティングに基づいた、不確かさを残す解析しかできなかった。しかし、機能発現には、同一分子量の分子であっても、微細な構造の違いが重要であり、逆に同じ構造の分子であっても、分子量の分布の広さが、高次構造、さらには機能を支配するケースが多々報告されている。

このように、「サイズ、分子量、形状」(分布を含む)は、機能に直結しており、自己組織化の鍵を握る、「ナノサイエンスの最も基本的な情報」と言える。それ故、分子の「長さやサイズ」等の分布付き精密測定には、ナノサイエンス分野一般で根強い必要がある状況であった。

2. 研究の目的

ナノ粒子の「サイズ、分子量、形状(構造)」を、分布を含めて精密に測定する手法を開発する事が、本研究の目的である。これらは基礎的な性質であるが、液中での測定は従来不可能であった。本研究で、放射光(SPring-8)を利用した「フローセル式 SAXS 法」を応用して実現する。フローセルの利用により、放射光での測定時に生じやすい「照射の影響(サンプルの変質)が大きい問題」等も解決可能、と期待できる。本手法を新規手法として確立するべく、従来法と比較可能な試料で、

精度や検出限界濃度の決定を行う。各種測定条件の最適化によって、従来測定が困難であった分子群の分子特性、具体的には図 1 に示したような剛直性やトポロジー構造が異なる分子の混合物を対象として、各分子種及びサイズ毎に、分子特

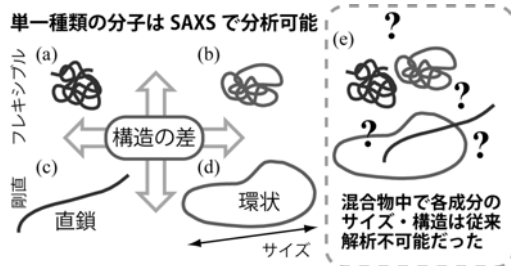


図 1 SAXS (X線小角散乱法)で識別可能な分子形状の例。分子のトポロジー構造が(a)直鎖状(b)環状構造の場合、(c)(d)は、(a)(b)と同様のトポロジー構造を有するが、より剛直な場合を示す。(a)~(d)は単離した後であれば、SAXS法でサイズや構造を個別に測定可能であるが、(e)のように(a)~(d)が混合している場合、通常の(バッチ)SAXS法では測定不可能であった。事前の分離精製を経て個別に測定すれば可能だが、長い時間を要し、また不安定なサンプルでは不可能であった。これらを解決する測定手法を本研究で開発する。

性を逐次得る測定系を構築して実証実験を行う事、例えば数 nm ~ 数十 nm の回転半径の分子量依存性を行う事を本研究計画における目標とした。

3. 研究の方法

ナノ粒子の、(a)サイズ、(b)分子量、

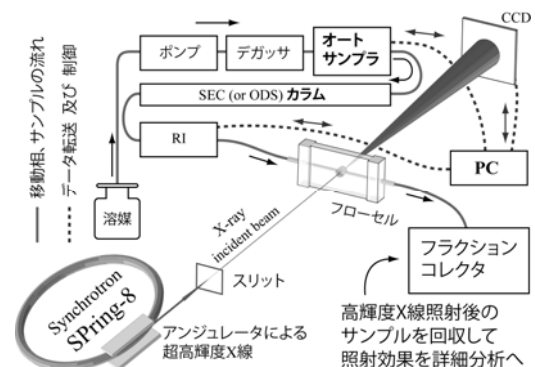


図 2 クロマトグラフィーカラム(図中では SEC(or ODS)カラム)で、混合物をサイズや、構造の差で分離し、RI(示差屈折率計)で濃度を検出したのち、フローセルで SAXS 測定を行う。双方向矢印は、データ転送/制御を表す。

(c)構造、それぞれに分布がある混合サンプルを対象として、前述の(a)~(c)を分布付きで同時測定可能な新規手法「フローセル式 SAXS 法」を開発した。そのために、フローセルを用いて、溶液に対する X 線小角散乱(SAXS)測定を連続的に行う装置系(図 2)を構築した。X 線小角度散乱は、通常散乱強度が非常に弱いため、強力な X 線源が必要となる。本研究では、大型放射光施設 SPring-8 の中でも特に高輝度な X 線源を利用した。

放射光の実験は、実験時間が限られており、効率的な実験の実施が要求される。従来法、つまりバッチ測定によって多数サンプルを測定する際には、測定時間の大半を占めるのは、X 線の遮蔽用の「実験ハッチの開閉」と、サンプル交換に要する時間であり、X 線を利用していない時間である。本測定手法の開発により、多数サンプルを連続自動測定する事が可能となるため、放射光の利用効率向上の観点からも有益である。利用効率の向上により、より多くの試料や測定条件での研究にビームタイムを費やすことが可能となる。

本研究では、放射光実験施設 Spring-8 のビームライン BL-45XU 利用した。波長 $\lambda=1.0$ 、カメラ距離は 1~3m、X 線の検出器はイメージンテンシファイアと CCD を組み合わせた装置か、または X 線

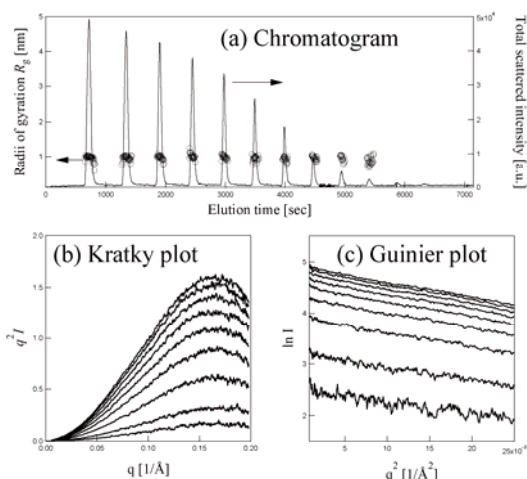


図 3 カラムを接続せずにフローセルにサンプルを注入して流しながら SAXS 測定を行った結果。(a)は RI(サンプル濃度を反映)及び、総散乱光強度の時間依存性。(b)解析例 1。Kratky plot。分子の形状を反映する。各サンプルでピークが出現しているが、これは環状構造を反映している。ピーク位置は環状分子のサイズを反映している。(c)解析例 2。Guinier plot。直線の傾きから回転半径が、切片から分子量が得られる。

光子計数型 2 次元検出器 Pilatus を利用して実験を行った。

各部位(セルの開発、制御及び測定用、解析用ソフトウェア等)の開発と最適化を行った。応用として、これまでのバッチ SAXS 法で、測定及び解析が不可能だった、精製過程で分解してしまう不安定な物質を分離直後に測定する事で解決する事や、混合物中の各物質のサイズ、分子量、構造の網羅的解析を試みた。

4. 研究成果

フローセルを用いた X 線小角度散乱の新測定系を構築した。それにより、高分子やナノ粒子を対象として、「分子量」「サイズ(回転半径)」「形状」の同時測定を可能にした。また、それらの物性が単一化(試料が精製)されていない、混合物に対して実施する事が可能な手法として、カラムクロマトグラフィーに接続した測定系を確立した。

はじめに、X 線遮蔽実験ハッチ内に、フロー測定システム(図 2)を構築した。X 線遮蔽用実験ハッチを閉じたまま、ハッチの外部から遠隔操作により、サンプルの注入や測定条件変更等の操作を可能にして効率的な実験を実現した。次に、フローセル式溶液 SAXS 計測システムの、基本性能確認を行った。具体的には、分子特性が既知のサンプルを利用して、フローセルによる SAXS 測定の特徴を確認した。

フローセルの性能を確認するために、各種分子特性が既知の試料で基本的な測定を行った。-cyclodextrin をフローセルに注入した際のデータを図 3 に示す。注入量や濃度を变化させて計測すると、濃度範囲で 0.5~100mg/ml と、二けたを超える広範囲な濃度範囲を自動測定で実施する事を可能にし

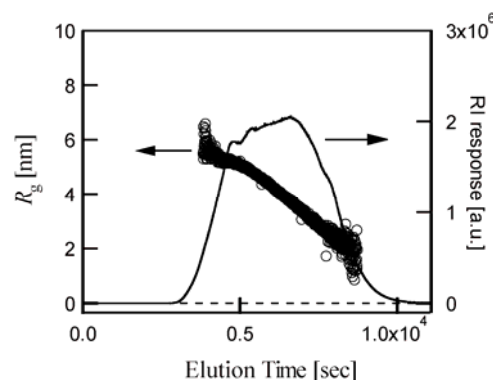


図 4 SEC-SAXS クロマトグラム。水溶性多糖類のプルランで測定。SEC カラムから溶出した溶質の SAXS 測定を逐次行い、回転半径を見積もった。示差屈折率検出器による濃度(通常の GPC クロマトグラムと同様)も同時に測定している。

た。低濃度においても、同一形状であることが、Kratky プロットから（ピーク形状及びピーク位置）確認され、加えて同種サンプルにおいては分子サイズが同一な事が確認された（c, Guinier 参照）。

フローセルにおける検出下限濃度の確認を行ったところ、通常のバッチ測定と同等か、一部サンプルではそれ以上の感度で測定が可能であった。一般に、検出限界は入射 X 線の強度や、検出器の感度だけでなく、露光時間等にも依存する。溶質濃度が低い場合や、分子量が小さい場合、検出される信号の S/N 比が低下するため、露光時間を増やして S/N 比を増加させる。一方、高輝度 X 線を入射すると溶質が変質し、時には会合するため、長時間露光時の測定では、変質サンプルからの散乱に注意しながら、照射 X 線強度を制限する必要があった。つまり、露光時間の増加にも限界があり、高輝度 X 線を利用しても測定が容易でない試料が多数存在した。

一方、フローセルを用いる場合には、これらの問題が回避できる利点があった。仮にセル内でサンプルが変性、あるいは会合した場合においても、それらの試料は、セルから逐次排出され、新しい溶質が次々に流入する。つまり常に新しい溶質で低濃度測定が可能であり、長時間の露光も可能となるため、測定時間を長くしてシグナル積算時間を増加させて S/N 比率を向上させる事も可能になった。特に X 線照射によるサンプルのダメージが大きいサンプルや、それによって会合しやすいサンプル等で、フローセルの利点が今後活用されると期待される。

フローセルでも、長時間露光する際には別の問題が発生する。溶質がセルの石英窓の内側に吸着してしまうケース等である。検討の結果、溶質濃度が低い場合ではこの問題は発生しない事が分かった。つまり、局所濃度が高い際にだけ変質したサンプルが会合、さらには石英窓に吸着するものと考えられた。この問題は、試料注入濃度の調整で回避する事が可能であった。また、この問題が生じたかどうかは、SEC-SAXS 測定から得たクロマトグラムのベースライン変動で確認する事が可能であり、いずれの場合でも対策が可能であった。

SEC カラムで分離されたサンプルを、接続されたフローセルに入れて SAXS 測定を連続的に行った。サイズ排除クロマトグラフィーカラムを用いた場合（図 4）では、回転半径の小さな分子ほど遅れて溶出された事を回転半径から確認可能となった。この測定は、従来 SEC-MALLS 法では測定が不可能であった領域のサイズであり、回転半径の分子量依存性などから希薄溶液物性の研究への展開が可能であった。また、バッチ測定で長期間かけて実施していた測定が数時間程度で自

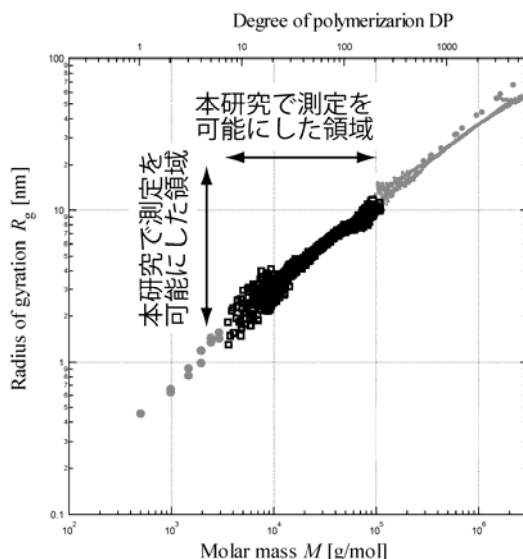


図 5 回転半径の分子量依存性の測定例（プルラン）。従来、数 nm ~ 数十 nm の範囲における回転半径の評価は、光散乱が利用できず、また SAXS のバッチ測定も一部の試料に限定されていたが、本研究により、それらの中間を対象とした測定が可能となった。中央付近の黒く表示されたデータが、SEC-SAXS で取得したデータで、他は従来法で計測されたデータ（文献値）

動測定できる事を実証した。

各溶出位置におけるサンプルの絶対モル質量を確認するために、図 4 の各溶出位置における溶液を回収し、異なる手法で確認を行った。具体的には SEC-MALLS を利用し（Wyatt Dawn HELIOS 8, $\lambda=658\text{nm}$ ）、 R_g のモル質量依存性を評価した。サンプルとして、GPC の基準試料としても使われる水溶性高分子のプルランやデキストランを対象に測定を行った。低分子化プルランを SEC-SAXS で測定を行った。各溶出時間で CCD により散乱強度の角度依存性を得て、Guinier プロットから R_g を見積もった。また、SEC-SAXS では 10nm 以下の R_g の評価も可能であることが確認できた（図 5）。 R_g のモル質量依存性から、従来法では評価が困難であった分子量（及びサイズの）希薄溶液物性についても検討が可能になった。

このように、フローセル式 SAXS 法の開発により、従来不可能であった回転半径、分子形状の連続測定が、20nm 以下のナノ粒子及び高分子などを対象として可能となり、高分子の分子特性の迅速かつ精密評価が可能となった。

5 . 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 0 件)

〔学会発表〕(計1件)

・SEC-SAXS法による高分子の特性解析, 第59回高分子討論会, 2010年9月16日, 北海道大学, 武政 誠, 藤田 雅弘, 前田 瑞夫

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武政 誠 (TAKEMASA MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学

研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号: 30318795