

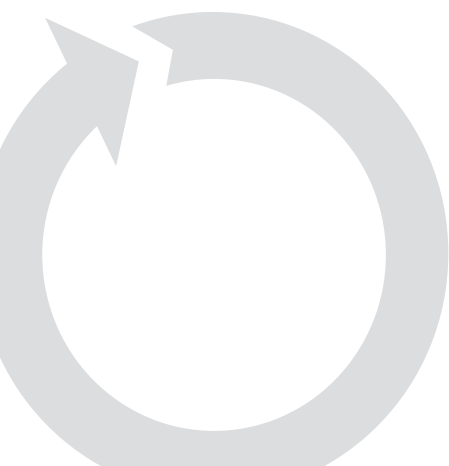


ベックマン・コールター

ナノテクノロジー

アプリケーションノート集

超遠心分離法 / 動的光散乱法による 顔料インクの分級と粒子径測定	3
超遠心法によりナノ粒子を分級して 正確な粒子径を求める方法	4
超遠心分離法による金属コロイド精製と濃縮	5
ナノ粒子複合材の粒子径測定	6
遠心機によるナノセルロースの分級	7
密度勾配遠心法による金ナノロッドの分離精製	8
超遠心機および自動分注装置を用いた カーボンナノチューブの調製・精製と 分析用超遠心システムによる解析	11
使用装置一覧	18



超遠心分離法 / 動的光散乱法による 顔料インクに分級と粒子径測定

卓上型超遠心機

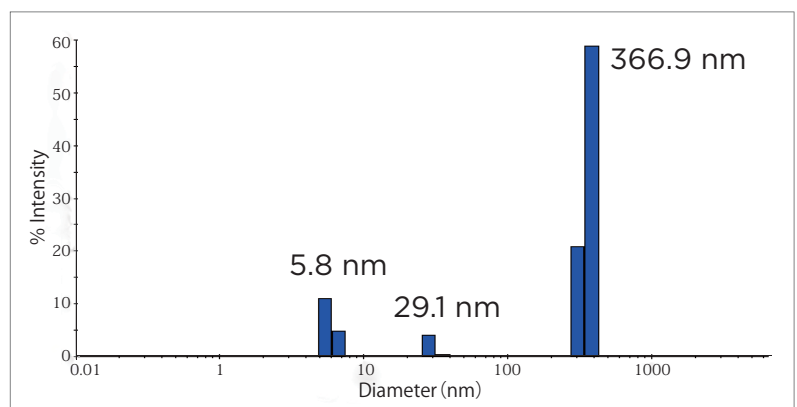
Optima MAX-XP

ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置

DelsaMax PRO

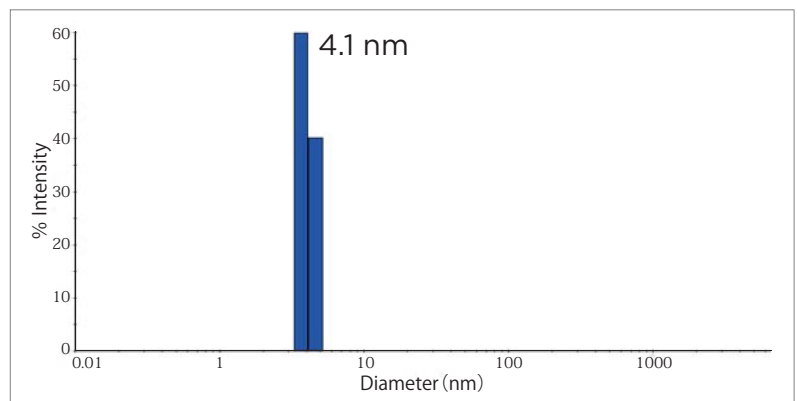
プリンタのインクには顔料インクと染料インクがあり、それぞれの利点を生かして使い分けされています。染料インクの染料は溶媒に溶けた状態で存在し、用紙にしみ込んで発色します。一方で顔料インクは用紙の表面に定着して発色するために、小さな粒子が溶媒に分散した状態で存在します。このため顔料を均一に分散させるための技術が重要な事は言うまでもありません。今回の実験ではマゼンタ (赤色) 顔料インクの粒子径とともに、顔料以外の安定化剤などの正確な粒子径測定を試みました。

遠心前サンプル



MLA-150 ロータで 150,000 rpm (1,003,000 xg) 0.5hr 遠心後に上清を DelsaMax Pro で動的光散乱法により粒子径測定

遠心後サンプル



考察

遠心前のサンプルでは 5.8 nm、29.1nm、366.9 nm の粒子径が測定されました。遠心後の上清は黄色みがかかった透明になっており顔料成分はほぼ沈降したと考えられることから、測定された 4.1 nm の粒子は溶媒を構成する顔料以外の粒子であり、また遠心前の 29.1 nm、366.9 nm が顔料の粒子径と考えられます。

遠心後の 4.1 nm が遠心前には 5.8 nm に測定されています。これは粒子が多分散している場合に小さい方の粒子径値は、大きい方の粒子径値に近づく傾向にあるためだと思われます。

大きい粒子 (366.9 nm) の測定値に近づく傾向にあるためだと思われます。

超遠心法によりナノ粒子を分級して 正確な粒子径を求める方法

卓上型超遠心機

Optima MAX-XP

ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置

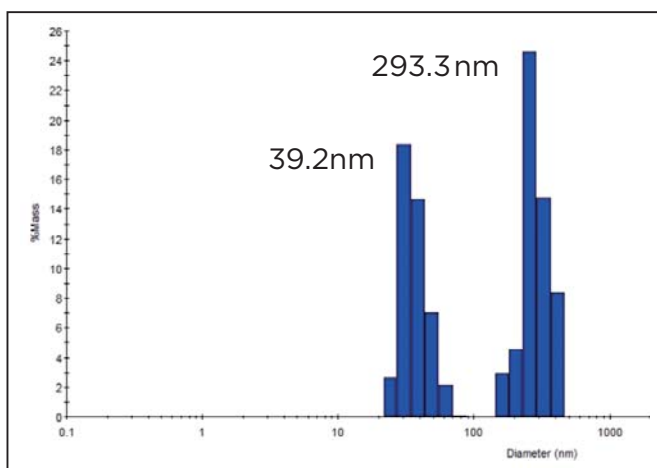
DelsaMax PRO

ナノテクノロジー分野の研究においては、金属コロイド、インク、シリカ、ラテックスなどの合成されたナノ粒子の正確なサイズを知ることが重要な鍵を握ります。

そのサイズの測定方法としては動的光散乱法がよく用いられます。

今回の実験では、超遠心分離法により大きなナノ粒子は沈降させ、より小さなナノ粒子のみを上清サンプルとして分級し、そのサンプルをゼータ電位 ナノ粒子径測定システム DelsaMax PRO で測定することにより、正確な粒子径を求めています。

遠心前の粒子径測定

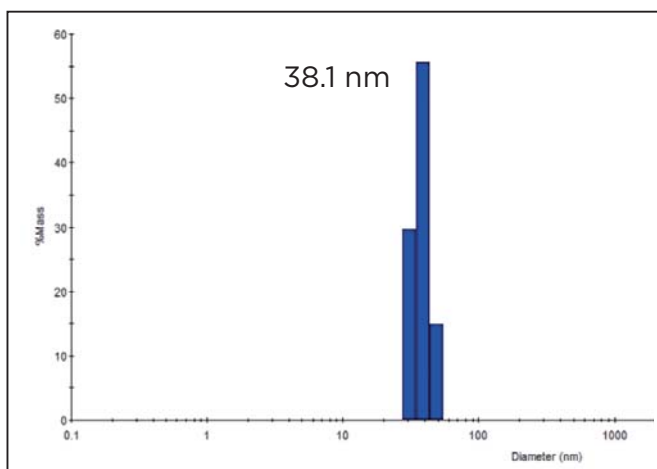


遠心前の測定手順と結果

超純水に 50 nm と 300 nm のラテックス標準粒子を加えて、DelsaMax PRO で粒子径を測定しました。

39.2 nm と 293.3 nm の 2 つピークが検出されています。

遠心後の粒子径測定



遠心後の測定手順と結果

上記のラテックス標準粒子溶液を 100,000 xg (42,000 rpm) で 10 分間遠心した後、その上清を採って粒子径を測定しました。

300nm の標準粒子は沈降して、小さい粒子のピークのみが検出されました。

考察

これらの測定結果により、超遠心分離法がナノ粒子の分級に有効な手段であることがわかりました。また、この実験では遠心前の多分散しているサンプルであっても、正確な粒子径が求められていますが、一般的には、単分散しているサンプルの方が正確な測定ができます。その場合にも超遠心法の分級は有効な手段になると思われます。

超遠心分離法による 金属コロイド精製と濃縮

卓上型超遠心機

Optima MAX-XP

ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置

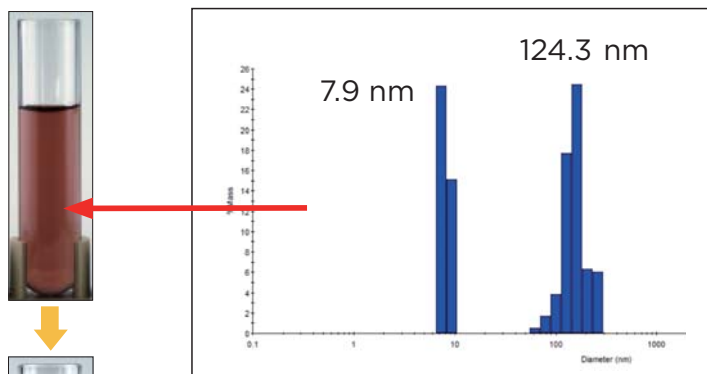
DelsaMax PRO

金属コロイドは金属ナノ粒子であり、インクジェットの配線技術、触媒、ライフサイエンス分野など、幅広く応用されています。金属コロイドナノ粒子は、主にアトマイズ法、化学還元法で合成されますが、その際、不純物や凝集粒子が存在します。

今回の実験では、合成された金属コロイドを超遠心分離により精製、濃縮する方法をご紹介します。

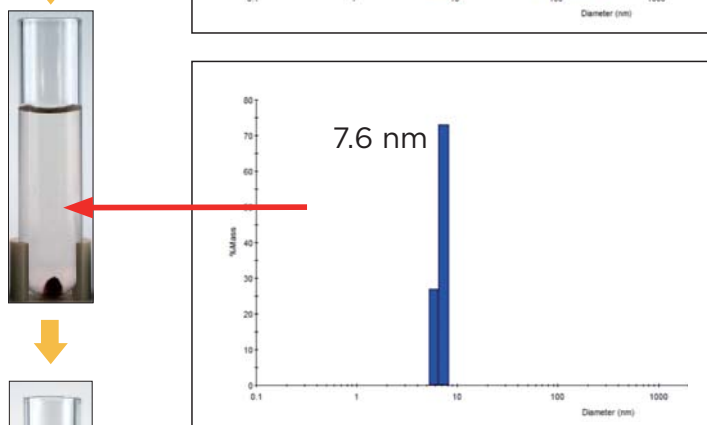
遠心前サンプル

遠心前の銀コロイド粒子。
不純物と凝集粒子が存在している粒子径分布になっています。



遠心 1 : 超遠心法による精製

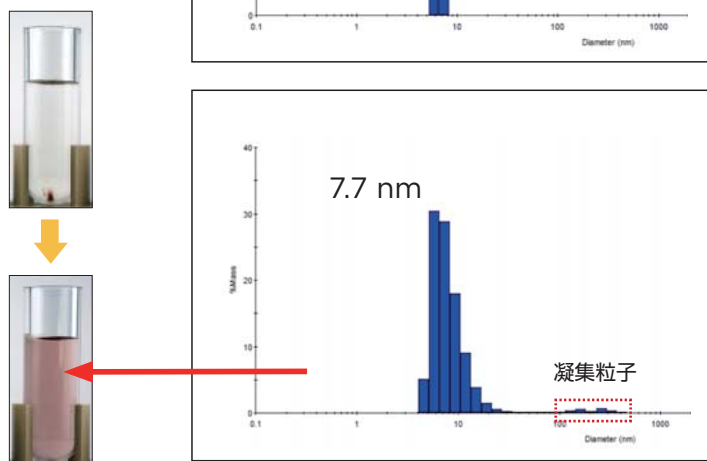
500,000 xg / 30 分間の遠心後、上清を採って粒子径を測定しました。
その結果から、溶液中に浮遊しているコロイド粒子が一次粒子と思われます。チューブの底に不純物と凝集粒子が沈降し、沈殿を形成しています。



遠心 2 : 超遠心法による濃縮

遠心 1 の上清を採って、さらに 1,000,000 xg / 60 分間遠心しました。
上清は無色透明となり、銀コロイド粒子は存在しなくなりました。形成した沈降物は、銀コロイドの一次粒子です。

上記の沈殿物を含む下層 1/3 程を採って再分散しました。この粒子径分布は、濃縮前とほぼ同じであり、銀コロイド粒子が濃縮されていることを確認しました。



考察

遠心処理前の銀コロイド粒子には、明らかに不純物と凝集粒子が存在しています。遠心 1 の 500,000 xg / 30 分間遠心後、不純物と凝集粒子が取り除かれ、精製されたことが DelsaMax PRO の測定結果から確認できました。さらに遠心 2 では、遠心 1 の上清をさらに 1,000,000 xg / 60 分間遠心することによって、高純度の銀コロイドを沈殿させています。また、その沈殿物を再分散することによって濃縮することもできました。また、この濃縮された銀コロイドの粒子径は、ほぼ一次粒子と同じになっています。

ナノ粒子複合材の粒子径測定

- 密度勾配超遠心法と動的光散乱法を用いて -

卓上型超遠心機

Optima MAX-XP

ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置

DelsaMax PRO

精密粒度分布測定装置

Multisizer 4

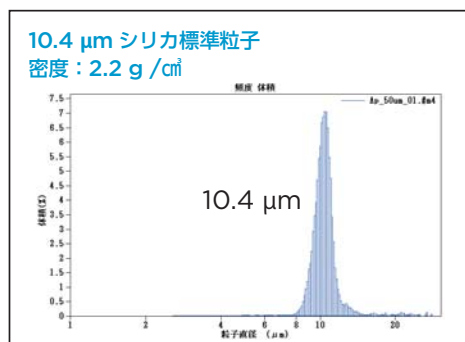
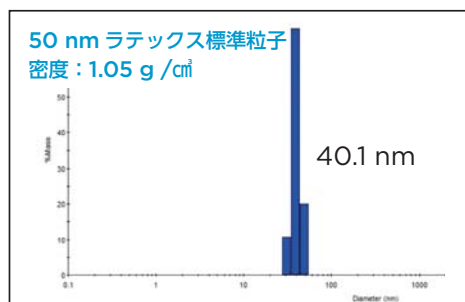
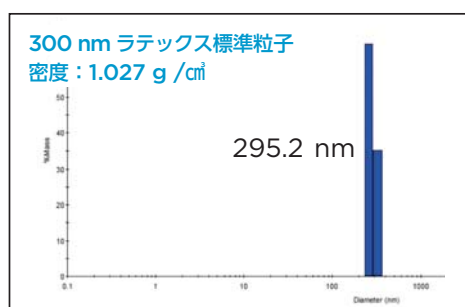
近年のナノテクノロジーの進歩により、ナノ粒子の正確な径を求めることがますます重要になってきています。

ナノ粒子の粒子径測定には、動的光散乱法（光子相関法）が最もよく使われますが、サンプルが複合材である場合は、それを単一材に分離できれば、より正確な粒子径測定が可能になります。今回の実験では、密度の異なる3成分からなる複合材を密度勾配超遠心法により分離し、粒子径測定した結果を報告します。

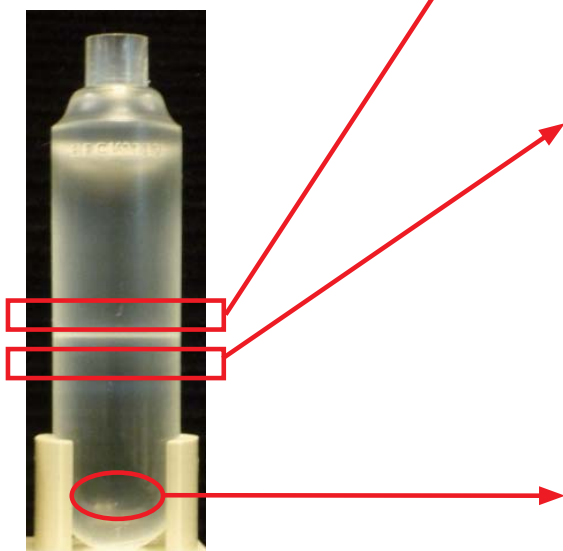
遠心条件

使用機器	: Optima MAX-XP
使用ロータ	: 固定角ロータ TLA-110
遠心力	: 543,000 xg (100,000 rpm)
遠心時間	: 8 時間
密度勾配液	: 5, 10, 15, 20, 25 (w/w%) ショ糖溶液
遠心サンプル	: 50 nm 標準粒子、300 nm 標準粒子、 10.4 μm 標準粒子の混合液

測定結果



遠心結果



考察

通常のペレットリングおよび密度勾配遠心・沈降速度法においては、粒子の大きさが最も大きな分離ファクタになって沈降しますが、この実験では密度が分離ファクタになる密度勾配・遠心沈降平衡法を行っています。固定角ロータを使用することで、より大きな遠心力が使えるので、スウィングロータを使用する場合と比べて時間も1/3程度で分離しています。チューブの中層にバンドを形成している成分の回収は、チューブ側面をシリンジで穿刺して採取し、DelsaMax PROで測定しました。底に沈殿している成分は、チューブをカットして採取し、Multisizer 4で測定しました。この実験結果から、ナノ粒子複合材サンプルの粒子径測定には、密度勾配超遠心・沈降平衡法は、非常に有効な手段と思われる。

遠心機によるナノセルロースの分級

高速冷却遠心機

Avanti シリーズ

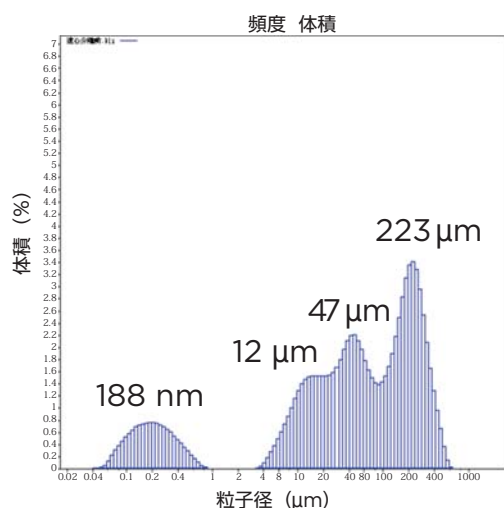
レーザー回折・散乱法 粒度分布測定装置

LS 13 320

セルロースやセルロース誘導体を湿式高圧分散粉碎したり、湿式摩砕粉碎したナノセルロースは、現在注目されているナノマテリアルです。セルロース誘導体の一つである低置換度ヒドロキシプロピルセルロースを湿式高圧分散粉碎処理したナノセルロースについてレーザー回折・散乱粒度分布測定装置 LS 13 320 を用いて粒度測定した結果ならびに、遠心機によってナノサイズ領域として計測される部分だけを分離することができた結果についてご紹介いたします。

信越化学工業株式会社製 L-HPC（低置換度ヒドロキシプロピルセルロース）LODICEL LDC-H 2 wt% 分散液をスギノマシン株式会社製スターバースト試験装置にて 150 MPa 圧力で 10 パスした分散液を使用しました。

遠心前の粒子分布



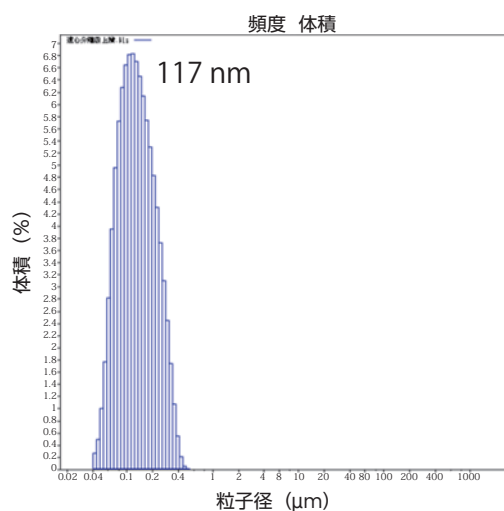
ナノ化調製した分散液を LS 13 320 で測定した結果を示しました。

ナノ化処理により生成したナノサイズの粒子が検出されると同時にナノ化されずに残ったマイクロサイズの粒子も検出されました。

この結果から、ナノ化処理後もマイクロサイズにとどまる粒子が数多く存在することが示唆されました。

LS 13 320 を使うことにより、マイクロとナノサイズの粒子を同時に測定でき、量的な比較検討ができるようになります。

遠心後の粒子分布



高速冷却遠心機 Avanti JXN - 26 と固定角ロータ JA - 14.50 を用いて、14,000 rpm (35,000 xg) で 1 時間遠心した後、その上清を採って粒子径を測定しました。

遠心処理により、ナノサイズの粒子である部分のみを分離回収することができました。遠心前の 188 nm が遠心後には 117 nm で測定されています。これは粒子が多分散している場合に小さい方の粒子径値は、大きい方の粒子径値に近づく傾向にあるためです。

密度勾配遠心法による 金ナノロッドの分離精製

要旨

金ナノ粒子は、バイオメディカルサインス分野、特に腫瘍イメージング¹、光熱がん療法^{2,3}、金属増強蛍光 (metal-enhanced fluorescence)⁴ において、ここ十年間で注目を集めるようになりました。サイズやアスペクト比の揃った単分散である高品質な金ナノ粒子が、これらのアプリケーションでは求められます。本アプリケーションノートにおいて、高速冷却遠心機の中でも高速タイプである Avanti JXN-30 を用いた密度勾配遠心法による、多分散のサンプルから単分散の金ナノロッドの精製する方法をご紹介します。

序論

金ナノロッド (Gold Nanorods, 以下 AuNR と略します) は、バイオメディカルイメージングにおいて大きな役割を果たしています。AuNR は、プラズモン効果により可視光と近赤外領域に非常に強い吸収を示し、AuNR のアスペクト比は直接この吸収波長のピークに影響することが知られています。このため、バイオメディカルイメージングにおいて、金ナノロッドの光学的な純度は、物理的な純度と同様に重要となります。しかしながら、通常、AuNR の合成過程において、長くならなかった球形の金ナノ粒子 (gold nanospheres, 以下 AuNS と略します) や僅かに異なるアスペクト比を持った最適でない AuNR が不純物として合成されます。AuNR と AuNS は同じ構成成分・表面コーティング (多くの場合は界面活性剤の CTAB) で同様のサイズのため、その分離が主な問題となっています。これらのナノ粒子は同じようなサイズだが、表面面積 / 体積比がわずかに異なるため密度が異なります。このような特性を持つナノ粒子の分離には、密度勾配遠心法が高い分離能力を発揮します。本アプリケーションノートでは、2種類の AuNR の標品サンプルを用いました。1つ目はアスペクト比 4.1 (10 nm x 41 nm) で吸収波長 808 nm、2つ目はアスペクト比 2.4 (25 nm x 60 nm) で吸収波長 650 nm の AuNR を用いました。2つのサンプルを混合し、Avanti JXN-30 とスウィングロータ JS-24.15 を用いて一回の密度勾配遠心により分離しました。分離した AuNR サンプルは、分光光度計により分析した結果、オリジナルサンプルと変わらない精製度を示しました。

密度がわずかにでも異なれば、
密度勾配遠心法は有効な分離手段となりえます。

プロトコール

直径 10 nm の AuNR (吸収波長ピーク 808 nm、以下 AuNR 10 nm と表記) と直径 25 nm の AuNR (650 nm、以下 AuNR 25 nm と表記) の密度勾配遠心用のサンプル調整のために、それぞれのサンプル 3 mL を Microfuge 16 (ベックマン・コールター) で 10,000 xg, 5 分間遠心し、得られたペレットを 0.01M CTAB 水溶液 0.05 mL に再懸濁し、濃縮しました。密度勾配は、15 mL ポリアロマー (PA) チューブ (製品番号 361707、¥31,000) 内に、下記の表のようにマニュアルで作製しました。

濃度勾配順	組成	容量 (mL)
1	0.01M CTAB, 10% ショ糖	2
2	0.01M CTAB, 15% ショ糖	4
3	0.01M CTAB, 20% ショ糖	4
4	0.01M CTAB, 25% ショ糖	4

2つの濃縮した AuNR サンプルを 5 分間超音波処理し (Branson M1800 sonicator)、その後混和し、作製した密度勾配の上に重層しました。これらのサンプルを、高速冷却遠心機 Avanti JXN-30 とスウィングロータ JS-24.15 (ベックマン・コールター) を用いて 25°C、10,750 xg で 15 分間遠心処理しました。この際に加速と減速の設定を 3 にセットしました。遠心後、300 μ L ずつフラクションに分けました。各フラクションをマイクロプレートリーダーにより吸光度を測定し、808 nm または 650 nm にピークを持つフラクションをそれぞれに集めました。溶媒置換するために、それぞれの集めたフラクションを Microfuge 16 により 10,000 xg, 5 分間遠心し、AuNR をペレットングさせ、0.01M CTAB で再懸濁させました。このステップを 3 回行い、ペレットを洗浄し、最終的に 0.01M CTAB 250 μ L に懸濁させました。分光光度計 (DU 800, ベックマン・コールター) を用いて、標品、混合したサンプル、精製後のサンプルの吸収スペクトルを測定しました。

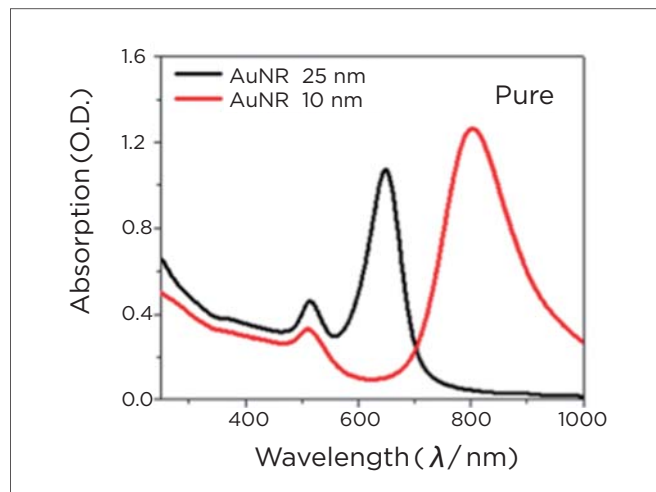
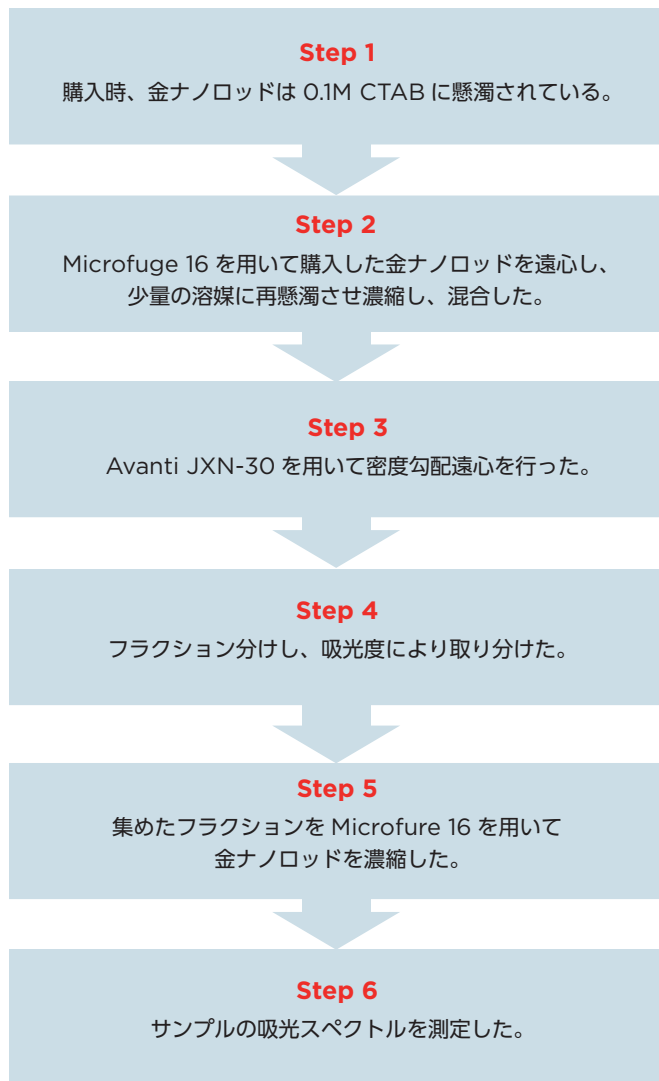


Fig. 1a AuNR 25 nm と AuNR 10 nm の標品の吸光スペクトル

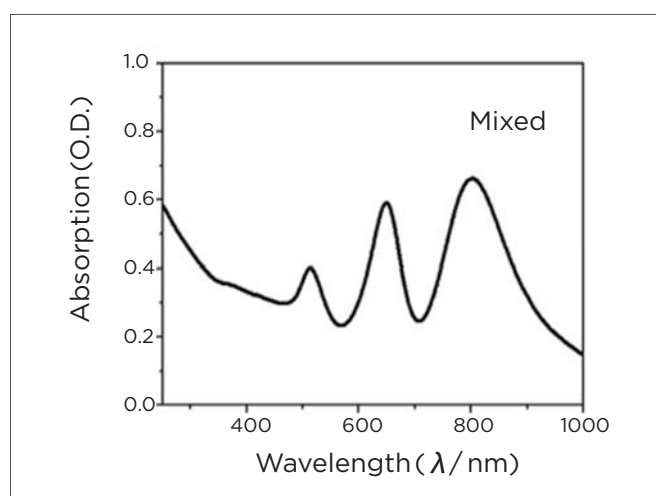


Fig. 1b AuNR 25 nm と 10 nm を混合したサンプルの吸光スペクトル

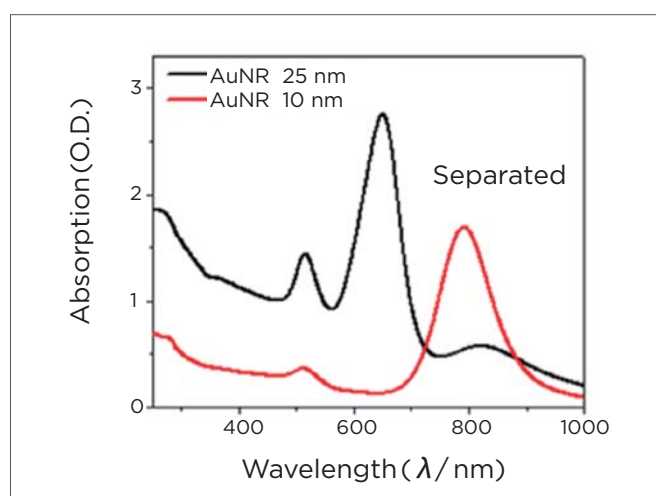


Fig. 2 密度勾配遠心法で精製したサンプルの吸光スペクトル

AuNR 25 nm と 10 nm の混合サンプルを密度勾配遠心法で分離し、精製後の各 AuNR のフラクションの吸光スペクトルを測定しました。

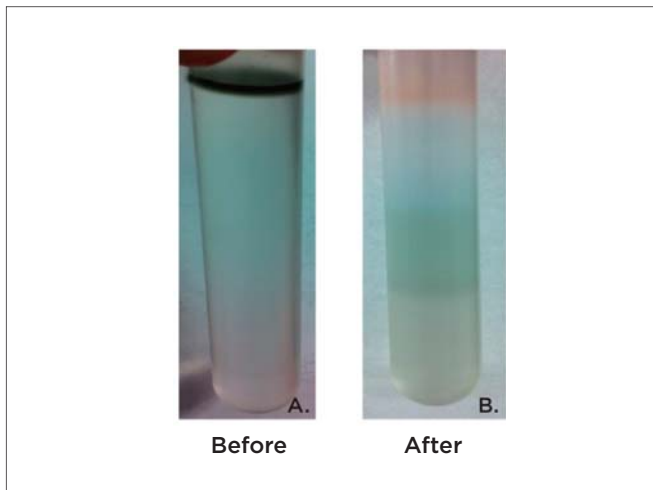


Fig.3 密度勾配遠心前後の写真

AuNR 25 nm と 10 nm の混合サンプルの A) 密度勾配遠心前、
B) 密度勾配遠心後の写真

結果・考察

Fig. 1a には標品の吸収スペクトル、Fig. 1b には混合したサンプルの吸収スペクトルを示しました。AuNR 10 nm は、理論通りにメインピークは 800 nm、セカンドピークは 515 nm に吸収を示しました。また、AuNR 25 nm は、それぞれ理論通りの 650 nm, 515 nm を示しました。AuNR 10 nm の 800 nm と 515 nm のピーク比は、3.85 であり、AuNR 25 nm の 650 nm と 515 nm のピーク比は 2.32 でした。Fig. 2 には、密度勾配遠心により精製し、光学的に同一のフラクションを集め濃縮したサンプルの吸収スペクトルを示しました。650 nm に吸収があったフラクションから濃縮したサンプルの 650 nm/515 nm 比は 1.91 で、標品とほぼ同じ値でした。また、興味深いことに 800 nm に吸収があったフラクションから濃縮したサンプルの 800 nm/515 nm 比は 4.54 で、標品よりも高い値を示しました。これは、標品とした AuNR サンプルの中にも不純物が含まれており、密度勾配遠心後より精製されたことを示しています。

試薬

試薬	メーカー	製品番号
Gold nanorods, 10 nm	Sigma	716820
Gold nanorods, 25 nm	Sigma	771686
Sucrose	Sigma	84097
CTAB	Sigma	H9151

参考文献

1. Popovtzer R *et al.* Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer. *Nano Letters*. 8.12; 4593-4596: (2008).
2. Huang X *et al.* Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*. 23.3; 217-228: (2008).
3. O'Neal D P *et al.* Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Letters*. 209.2; 171-176 (2004).
4. Hong G *et al.* Near-Infrared-Fluorescence-Enhanced Molecular Imaging of Live Cells on Gold Substrates. *Angewandte Chemie International Edition*. 50.20; 4644-4648: (2011).

超遠心機および自動分注装置を用いた カーボンナノチューブの調製・精製と 分析用超遠心システムによる解析

超遠心機

Optima MAX-XP / XPN

分析用超遠心システム

ProteomeLab XL-A

ラボラトリーオートメーション

Biomek 4000

単層および2層カーボンナノチューブを定量的に評価するための効果的な方法

要旨

本アプリケーションノートでは、ナノ粒子の精製スケールアップ時の迅速で確実な方法について、また存在する粒子種の濃度の定量分析、というナノ粒子に関する2つの難しい分野に焦点を当ててご紹介します。

ラボラトリーオートメーションシステムである自動分注装置 Biomek 4000 ワークステーションを使用すれば、オペレーターによる人為差を抑え、安定的に再現性良く密度勾配を大量調製することができます。分離用超遠心 (Preparative Ultracentrifugation) は安定した超遠心性能により極めて再現性の高い分離手法です。分析用超遠心 (Analytical Ultracentrifugation : AUC) は低濃度・少サンプル量で測定ができ、ナノチューブ、量子ドット、グラフェンといったナノ粒子の解析に最適です。また溶液中のナノ粒子の物性について様々な有用な情報が得られる分析装置です。

序論

単層カーボンナノチューブ (SWCNT) はここ15年間、半導体¹、燃料電池²、および生物医学的応用³の面から関心を集めている素材です。しかしながら、どの分野においても2つの大きな課題に直面しています。1つめは、合成したSWCNTには、たくさんの炭素質不純物と多層カーボンナノチューブ (MWCNT) が混入している可能性がある点です。加えて、SWCNT以外のカーボンナノチューブの比率を定量するための確実な手法が存在しない点です⁴。2つめは、SWCNTはその炭素原子の並び方 [カイラリティ

(n,m)として知られています]が異なる様々なものが混合した状態で合成される点です (Fig. 1)⁵。カイラリティが異なるSWCNTは光学的性質および電気的性質が大きく異なります^{6,7}。SWCNTの物性は基本的に基礎となるグラフェンの物性から導かれるため、カイラル指数と呼ばれる2つの整数を用いて、グラフェン骨格からSWCNTの構造を定義します。SWNTはカイラル指数(n,m)により決定される幾何構造により、金属性あるいは半導体性となることが知られています。n-m=3の倍数の場合は金属性SWNTに、n-m=3の倍数でない場合は半導体性SWNTとなります。このため、合成後に単一で均一なカイラリティのSWCNTを大量に分離する手法が求められており、特に半導体 (金属性SWCNTが混入すると半導体的特性のon/off比は大幅に低下します⁸) および*in vivo*でのドラッグデリバリーおよびイメージングアプリケーション⁹⁻¹¹においては重要な課題となっています。溶液中のSWCNTの不純物を測定しようという初期の試みでは主に電子顕微鏡が利用されましたが、電子顕微鏡では統計的な有意性は得られず、観察者の主観による影響を受けることがあり、直径3nmの2層カーボンナノチューブ (DWCNT) と直径1nmのSWCNTを区別することは困難です。この不純物問題を解決する手段として、紫外可視吸光分光法、近赤外蛍光分光法、ラマン分光法が研究されてきましたが、残念ながらこれらの技術にはそれぞれ固有の欠点があるためSWCNT不純物を定量的に解析する手法としては十分とは言えません⁴。

SWCNTの単一のカイラリティ分離に関して、現在のところ最も有効な手法の一つが密度勾配超遠心分離法です

SWCNTの単一のカイラリティ分離に関して、現在のところ最も有効な手法の一つが密度勾配超遠心分離 (Density Gradient Ultracentrifugation ; DGU) 法です^{12,13}。DGU法では純度99%の(6,5)SWCNTを得ることができ、これは非常に望ましい純度と言えます。しかし、DGU法では溶媒のグラジェント作成は従来手作業で行われており、これがスケールアップ、つまり数十本という多検体を作成する際の大きな妨げとなっています。

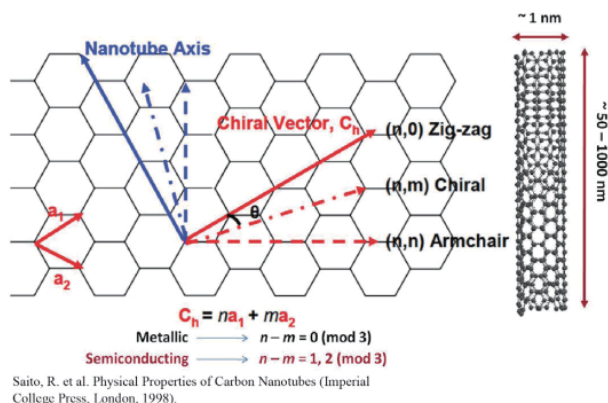
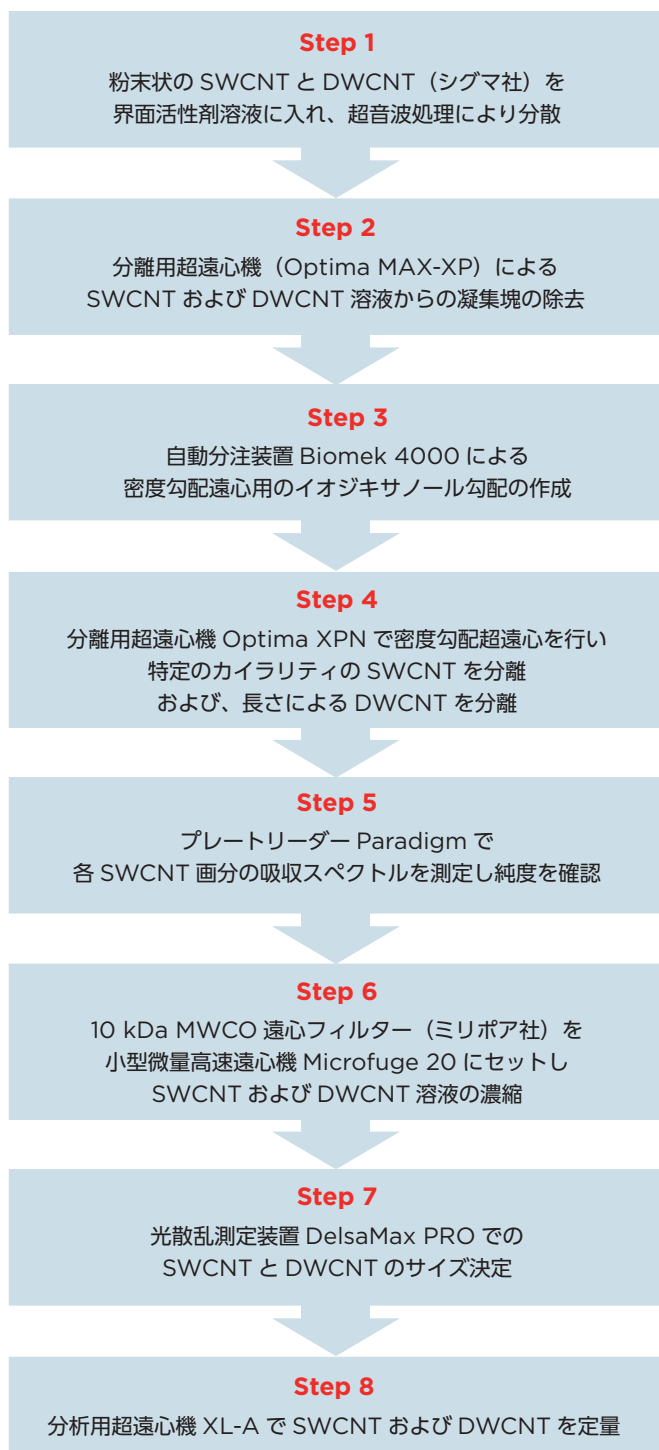


Fig. 1 単層カーボンナノチューブの模式図

本アプリケーションノートでは、不均一な大量の SWCNT を迅速かつ高い再現性で単一の (6,5) カイラリティに分離し、紫外可視分光法で確認するワークフローを提案します。本ワークフローの主な特徴として、3 分間の超遠心分離処理 (Optima MAX-XP) によりサイズの大きい凝集カーボンナノチューブを取り除き、自動分注装置 Biomek 4000 で密度勾配を調製後、超遠心機 Optima X シリーズを使用し、密度勾配超遠心分離法により SWCNT と DWCNT を精製します。密度勾配調製を自動化することで、手作業に比べて密度勾配の精度および再現性が向上します。SWCNT の分離では、スタート時の濃度勾配ステップが ± 1% g/mL 程度しか変わらないため、密度勾配用の溶媒調製の精度は重要になります。手作業の場合、勾配を乱してしまう可能性がありますが、自動化した場合その心配はありません。本アプリケー

AUC はナノマテリアル解析において電子顕微鏡や光学分光分析法では得られない情報をもたらしてくれます

ションノートの後半では、分析用超遠心システム (AUC) によって、SWCNT と長さで分離した DWCNT とを定量的に識別できる方法を示します。これまで AUC は主にタンパク質の解析に用いられてきましたが、AUC の解析性能はナノ粒子の特性解析に適しています。AUC は様々な溶媒条件下でナノ粒子の沈降係数、拡散係数、摩擦係数を求めることができるため、AUC はナノマテリアル解析において電子顕微鏡や光学分光分析法では得られない情報をもたらしてくれます^{14,15}。



実験手順

密度勾配のためのグラジエント作成

Biomek 4000 により、P-1000SL シングルピペッターツールおよび P1000 ワイドボアチップを使用し、密度勾配を作製しました。柔軟性の高いコントロールソフトウェアを採用しており、作製したいチューブの本数だけでなく、各勾配の容量を簡単に設定することができます。遠心チューブ (ベックマン・コールター、製品番号 331372) は、24 穴チューブラックにセットしたものを Biomek のデッキ上に配置しました。勾配作成時の界面の乱れを最小限に抑えるためにツールの液面検知機能を使い、非常に遅いスピードで溶液の分注を行いました。今回は table. 1 に示すような、勾配層を作成しました。

table. 1 単一カイラリティ分離のための密度勾配の構成

Layer in Gradient	Density (g/mL)	%OP	1st Iteration Volume (μL)	SC (% w/v)	SDS (% w/v)
1	1.160	30	900	0.75	0.175
2	1.147	27.5	756	0.75	0.175
3	1.133	25	972	0.75	0.175
4	1.120	22.5	1,188	0.75	0.175
5	1.107	20	1,188	0.75	0.175
6	1.093	17.5	1,305	0.75	0.175
SWCNT	1.133	25	1,800	2	0

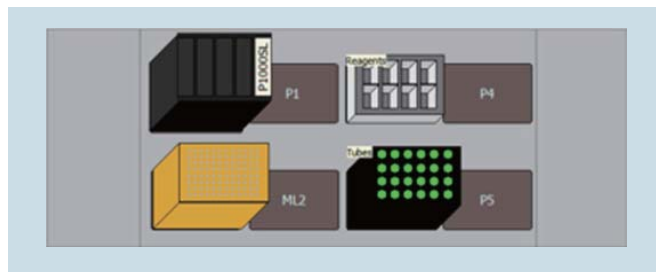


Fig. 2 Biomek 4000 ワークステーションのデッキレイアウト

密度勾配遠心用溶液の調製に必要なツールを示しました。(1) 24 ポジションチューブラック 1 個配置: 遠心管は既存の 24 ポジションチューブラックに配置しソフトウェア上で新規ソフトウェアを登録。(2) P1000 ワイドボアチップラック 1 個配置。(3) 液体搬送用の P1000SL シングルピペッターツール 1 個配置。(4) リザーバモジュール容器に分注元溶液を配置。

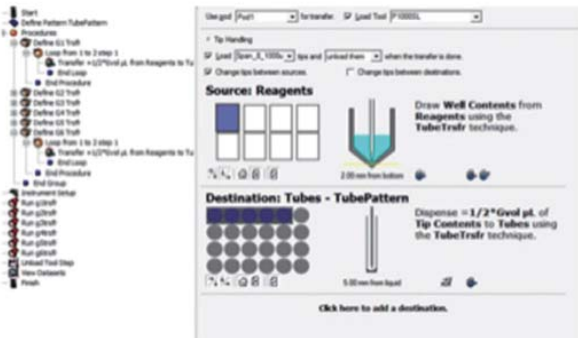


Fig. 3 密度勾配作成のためのメソッド画面

勾配作成時に界面の乱れを防ぐよう新規に分注テクニックを作成。遠心管への分注は 0.1mm 単位で高さを指定。

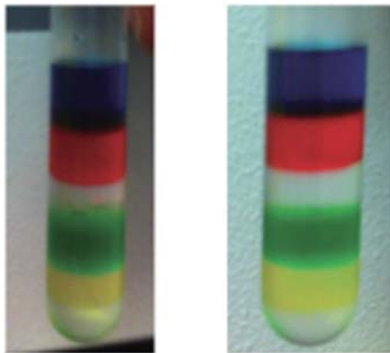


Fig. 4 食用色素で色づけたイオジキサノールによる勾配調製の確認

マニュアル作製 (左) と Biomek 4000 ワークステーションによる作製 (右) を比較しました。勾配の各層がはっきりと確認できました。

単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の精製¹⁶

20 mg の SWCNT を、2% コール酸ナトリウム (SC) 水溶液 (脱イオン水) の入った 20 mL のガラスバイアル中で、Branson M1800H 超音波洗浄機を用いて 1 時間超音波処理しました。この SWCNT 溶液から大きな凝集塊を沈殿して取り除くため、オープントップ肉厚ポリカーボネート遠心チューブ (ベックマン・コールター、製品番号 362305) に入れて、Optima MAX-XP 卓上型超遠心機で TLA 110 ロータを用いて 22°C、55,000 rpm (約 164,000 xg) で 3 分間遠心分離を行いました。ペレットを崩さないように 1,100 μ L の上清を注意深く回収し、密度勾配遠心に使用しました。2% SC + Optiprep (OP) で 1.13 g/mL (25%OP) の密度に調整した SWCNT 溶液 1.8 mL を、あらかじめ充填した密度勾配チューブの 27.5% と 25% の Optiprep 層 (AXIS-SHIELD 社、国内販売店: コスモバイオ社) の間に注入しました。これらの遠心チューブのバランスを合わせるため、Optiprep と同じ界面活性濃度の脱イオン水をチューブ上端から 2 ~ 3 mm 以内になるまで満たしました。その後、Optima XPN で SW 41 Ti ロータを用いて、22°C、41,000 rpm (約 288,000 xg) で 32 時間遠心しました。最低の加速度および減速度を用いて行いました。遠心後、下層を乱さないように注意しながら、シリンジを用いて最上部 2 mL を除去しました。(6,5) SWCNT を含む残りの部分は、150 μ L ほどのフラクションに分けました (Fig. 5)。

2 層カーボンナノチューブ (DWCNT) の精製

20 mg の DWCNT を、2% コール酸ナトリウム (SC) 水溶液 (脱イオン水) の入った 20 mL のガラスバイアルに入れ、Branson M1800H 超音波洗浄機を用いて 1 時間超音波処理しました。次に、この DWCNT 溶液から大きな凝集物を沈殿して取り除くため、オープントップ肉厚ポリカーボネート遠心チューブ (ベックマン・コールター、製品番号 362305) に入れて、Optima MAX-XP 超遠心機で TLA 110 ロータを用いて 22°C、27,000 rpm (約 40,000 xg) で 3 分間遠心分離を行いました。ペレットを崩さないように 1,300 μ L の上清を注意深く回収し、密度勾配遠心に使用しました。DWCNT を長さの違いで分画するため、table. 2 に示すような密度勾配をポリアロマー遠心チューブ (ベックマン・コールター、製品番号 331372) 中に作製しました。得られた勾配上に先に回収した DWCNT 溶液 1,300 μ L を重層しました。これらの遠心チューブのバランスを取るため、2% SC 水溶液 (脱イオン水) をチューブ上端から 2 ~ 3 mm 以内になるまで満たしました。その後、Optima XPN で SW 41 Ti ロータを用いて、2 ステッププログラムにより、まず 22°C で 15,000 rpm (約 38,500 xg) で 1 時間、次に 30,500 rpm (約 159,500 xg) で 1 時間遠心しました。ロータの加速および減速度は最小で行いました。遠心後、上から下まで各 600 μ L のフラクションを回収し、フラクション 4 ~ 6 を使用しました (Fig. 6)。

table. 2 2 層カーボンナノチューブ分離用密度勾配の構成

Layer in Gradient	Density (g/mL)	%OP	1st Iteration Volume (μ L)	SC (% w/v)
1	1,320	60	1,500	2
2	1,160	30	1,500	2
3	1,133	25	1,500	2
4	1,107	20	1,500	2
5	1,08	15	1,500	2
6	1,053	10	1,500	2
DWCNT	1	0	1,500	2

フラクション分析

各 SWCNT の画分について、紫外・可視・近赤外の吸収を確認するためにモレキュラーデバイス社 Paradigm プレートリーダーを用いて 400 ~ 1,000 nm の波長範囲を測定しました。570 nm および 990 nm の吸収ピークが最大で、その他の波長での吸収ピークが最小であったフラクションを以降の実験で用いることとしました。

透析

SWCNT : 分画後、分離された各 (6,5) カイラリティ SWCNT 分画を、SWCNT 溶液からイオジキサノール (Optiprep) およびドデシル硫酸ナトリウムを除き、SWCNT を界面活性剤で再度コーティングするために、1% SC 中でセルロース膜 (3.5 kDa MWCO) を用いて透析しました。外液は、4 時間以上の間隔で 8 回交換しました。透析後、得られた溶液を、小型微量高速遠心機 Microfuge 20 (ベックマン・コールター) で Amicon ウルトラ遠心式フィルター (ミリポア) を用いて濃縮しました。

DWCNT : 同じ手順を用いて、分画した DWCNT 溶液を処理しました。

沈降測定実験（超遠心分析）

SWCNT および DWCNT 溶液は分析用超遠心システム ProteomeLab XL-A で測定しました。濃縮した (6,5) カイラリティ SWCNT サンプルは 570 nm での吸光度が 0.85 あり、12 mm エポンチャコールフィルダブルセクターセンターピースおよび石英ウィンドウを持つ測定用セルにサンプルを注入しました。リファレンス溶液として 1% SC 水溶液（透析時の外液）を使用しました。サンプルの容量は 370 μL 、リファレンスの容量は 380 μL としました。2 つ目のセルには長さで分画した DWCNT サンプル (570 nm、吸光度 0.85) を注入し、3 つ目のセルには 570 nm で吸収がある SWCNT/DWCNT (50%/50%) 混合物のものを注入しました。遠心条件は 22° C、27,000 rpm、4 時間で 17、最初、濃度の依存性を確認するために 570 nm での吸光度が 0.6 のサンプルを用いて実験を行いました。

沈降測定解析（超遠心分析）

解析は Lamm の方程式に基づいたモデルフィッティングができる解析ソフトウェアである SEDFIT を用いて行いました。Arnold らの研究にもあるように、Lamm の方程式を用いた解析は拡散も考慮したうえでの成分評価が可能となります¹⁷。SWCNT と DWCNT の沈降係数を比較し、分析用超遠心によって溶液中の SWCNT と DWCNT が区別可能かについても確認しました。

動的光散乱法による粒度分布解析

ナノ粒子径測定システム DelsaMax CORE（動的光散乱法および静的光散乱法による同時測定システム）（ベックマン・コールター）を用いて、長さで分画した DWCNT および (6,5) カイラリティ SWCNT をそれぞれ解析しました。約 10 μL を石英キュベットに入れ、25°C で 1 回 5 秒の測定を 10 回行いました。

結果

Fig. 5 から、DGU 法によって SWCNT の分離が容易に行えることがわかります。超遠心分離の前 (Fig. 5a) では、SWCNT は黒い溶液として確認されます。これは、可視範囲にわたり吸収ピークを持つ様々なカイラリティが混ざり合っているためです。超遠心分離後には、個々のカイラリティが色つきのバンド（帯状の縞）として出現しています (Fig. 5b)。トップの紫色のバンドは (6,5) SWCNT を含んでおり、AUC 分析用に回収しました。SWCNT には近赤外および可視領域にファン・ホーブ特異点があり、SC 溶液中の界面活性剤コーティングされた (6,5) SWCNT は理論上 570 ~ 580 nm および 980 ~ 990 nm にピークが生じます¹⁶。Fig. 7 の吸光度スペクトルは、1% SC 溶液中での (6,5) SWCNT の透析および濃縮後のサンプルを測定したものです。571 nm と 990 nm に大きなピークがあり、他の波長では強い吸収が見られないことから、(6,5) カイラリティが濃縮された SWCNT の純度を確認できます。DWCNT は、SWCNT と同様の手順で処理した後、長さで分画しました¹⁸。Fig. 6b の最上層のフラクションには、大部分が結束していない DWCNT が含まれていると考えられます。動的光散乱法のデータ (Fig. 8) より、DWCNT は、拡散係数が $2.1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ であることから、平均長が約 200 nm であることがわかります。

DelsaMax CORE で行った動的光散乱法では、単層カーボンナノチューブと二層カーボンナノチューブを区別することが難しいこともわかりました (Fig. 8)。DWCNT と SWCNT では、吸光 (Fig. 7) および蛍光などの光学特性は非常に異なりますが¹⁹、物理的な直径や密度は非常に似ています。どちらとも長さは 100 ~ 1,000 nm の間にあり、直径も近くなっています (SWCNT は約 1 nm、DWCNT は約 2 ~ 3.5 nm¹⁹)。このため、光散乱法のような技術では両者を識別することが難しくなっています。さらに、電子顕微鏡でも SWCNT と DWCNT を正確に識別するのに必要な高さ方向の分解能を得ることは困難であり、また 10^{18} 個を超えるナノチューブを含む溶液において数百個の粒子を計測しても代表値とはなりません。

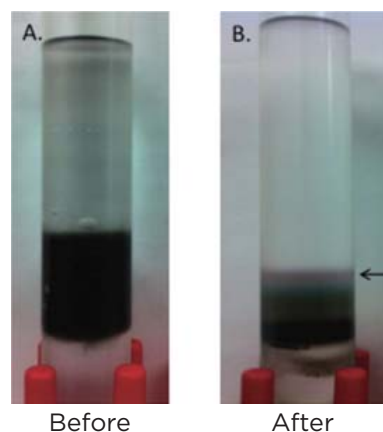


Fig. 5 カイラリティに基づく (6,5) SWCNT の分離

SWCNT サンプルの密度勾配超遠心分離前 (5A) および後 (5B) の写真。紫色の部分 (矢印) から 0.2 mL を回収し、吸光分析を行い、575 nm における吸光度ピークを持つことを確認しました。

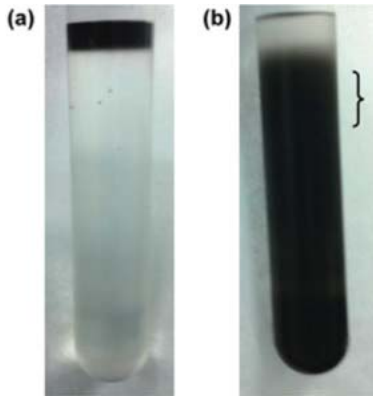


Fig. 6 DWCNT の長さによる分離

DWCNT サンプルの密度勾配超遠心分離前 (6a) および後 (6b) の写真。0.6 mL ずつのフラクションに分け、フラクション 4～6 を解析に使用しました。フラクション 4～6 のおおよその位置を波括弧 () で示しています。

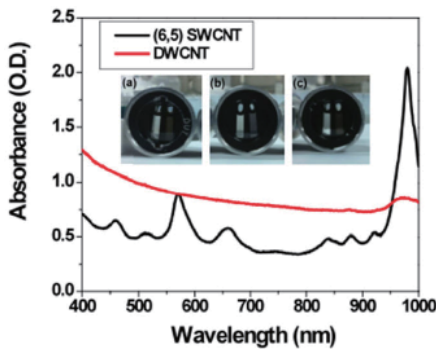


Fig. 7 長さで分画し濃縮した 2 層カーボンナノチューブ (DWCNT、赤色の曲線) とカイラリティ濃縮した単層カーボンナノチューブ (SWCNT、黒色の曲線) の吸収プロット

写真は AUC セルのもので、左側のセクターにリファレンス、右側のセクターにサンプル溶液が入っています。(a) は DWCNT のみが入っています。(b) は主に (6,5) SWCNT が入っており、これは 570 および 980 nm の高いピークにより示されています。(c) は DWCNT と SWCNT を 50%/50% で調整した混合溶液が入っています。

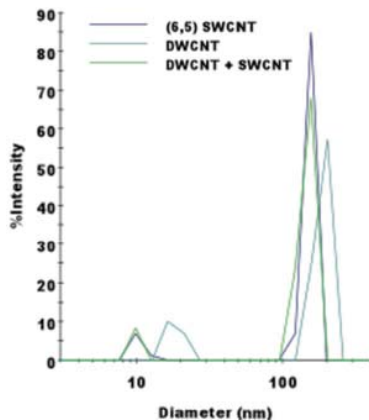


Fig. 8 DelsaMax CORE で得られた代表的な動的光散乱データ

直径 100 nm 超のあたりにはカーボンナノチューブによるピークがあり、直径 10 nm 近くのピークは界面活性剤ミセルのもので、動的光散乱法では SWCNT と DWCNT を区別することはできませんでした。

分析用超遠心法では、SWCNT と DWCNT を簡単に区別することができます

分析用超遠心法では、SWCNT と DWCNT を簡単に区別することができます (Fig. 9)。DWCNT は、コール酸ナトリウムによる界面活性剤でコーティングされにくいいため、SC 緩衝液中では超遠心分離中に非常に速く沈降し、沈降係数は 80.4 ± 25.6 S を示しました (Fig. 9b、10b)。対照的に、SWCNT は、過去に文献で報告されているように^{17,20}、ゆっくりと沈降し、沈降係数は 11.3 S を示しました (Fig. 9a、10a)。AUC の分解能力を確認するために、SWCNT と DWCNT の混合溶液を作製しそれぞれが分離できるかを試しました。570 nm で吸光度 0.894 の SWCNT 溶液と DWCNT 溶液を、各 175 μ L ずつを混合し、AUC で分析しました (Fig. 9c)。(6,5)SWCNT のみの場合は、沈降係数が 5～30 S であるのに対し (Fig. 10a)、長さで分画した DWCNT の沈降係数は 30～140 S でした (Fig. 10b)。このため 30 S をカットオフ値として沈降係数分布プロット (Fig. 10c) から、この 50%/50% で混合した溶液には 50.4% の SWCNT と 49.6% の DWCNT が含まれていることが定量的に示されました。SWCNT および DWCNT をこのように定量評価することが可能な分析技術は他にはありません。AUC の定量能力を確認するために、別の 2 種類の SWCNT と DWCNT の混合溶液を試しました。吸光度で 29% SWCNT/71% DWCNT の溶液は、沈降係数分布より 28.3%/71.7% の割合であることがわかりました (Fig. 10d)。同様に、吸光度で 71.4% SWCNT/28.6% DWCNT の溶液は、沈降係数分布より 64.7%/35.3% の割合であることがわかりました (データ未掲載)。

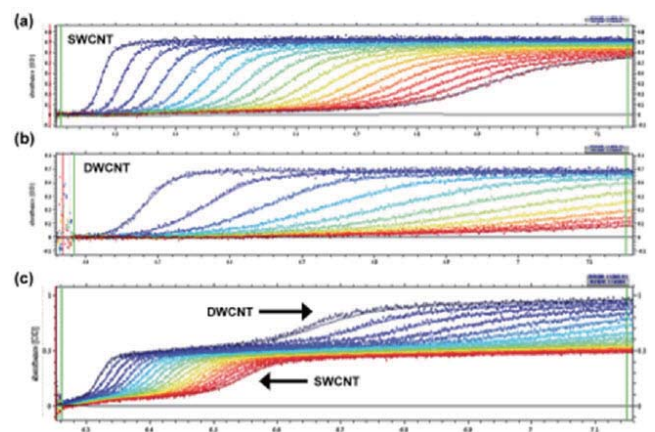


Fig. 9 SEDFIT による AUC 測定データの解析

(9a) (6,5) SWCNT の生データとフィッティング結果です。(9b) 長さで分画した DWCNT の生データとフィッティング結果です。(9c) (6,5) SWCNT と DWCNT の混合溶液の生データとフィッティング結果です。

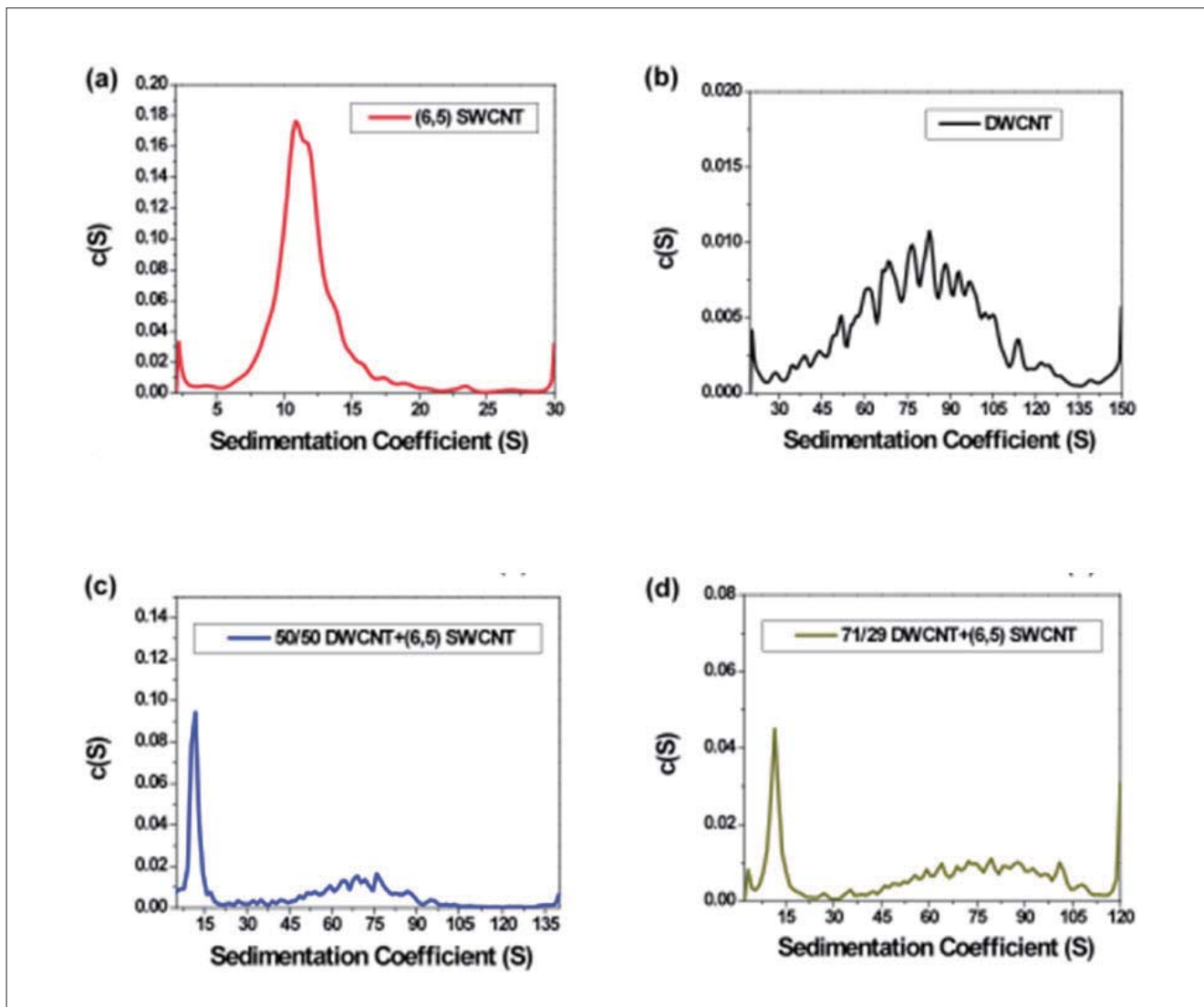


Fig. 10 沈降係数分布プロット

- (10a) (6,5) カイラリティ SWCNT: (6,5) カイラリティ SWCNT の沈降係数は 11.3 S で、文献値とよく一致しています。基本的に、(6,5) SWCNT 溶液に含まれる粒子の沈降係数は 30 S 未満でした。
- (10b) 長さで分画した DWCNT: 長さで分画した DWCNT の沈降係数は 80.4 ± 25.6 S でした。大きく広がっていることより一部の DWCNT はバンドルしている可能性が考えられます。DWCNT サンプル中のほぼすべての沈降した粒子の沈降係数は 30 S 以上でした。
- (10c) DWCNT および (6,5)SWCNT の 50/50 混合溶液: DWCNT 溶液と (6,5)SWCNT 溶液を、570 nm の吸光度が等しいものを等量で混合しました。沈降係数分布より、全体のうちの 50.4% は沈降係数が 5 ~ 30 S の間にあり平均値が 11.2 ± 5.2 S であり、49.6% は沈降係数が 30 ~ 140 S の間にあり平均値が 70.2 ± 21.3 S でした。
- (10d) DWCNT および (6,5)SWCNT の 71/29 混合溶液: DWCNT 溶液と (6,5) SWCNT 溶液は、570 nm の吸光度が等しい、DWCNT : (6,5)SWCNT を 71 : 29 の割合で混合しました。沈降係数分布より、全体のうちの 28.3% は、沈降係数が 2 ~ 30 S の間にあり平均値が 12.5 ± 3.9 S であり、71.7% は、沈降係数が 30 ~ 120 S の間にあり平均値が 80.0 ± 21.0 S でした。

References

1. Baughman R H, Zakhidov A A, and de Heer W A. Carbon nanotubes—the route toward applications. *Science*. 297.5582; 787-792: (2002).
2. Che G *et al.* Carbon nanotubule membranes for electrochemical energy storage and production. *Nature*. 393.6683; 346-349: (1998).
3. Liu Z *et al.* Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano research*. 2.2; 85-120: (2009).
4. Lopez-Lorente A I, Simonet B M and Valcarcel M. Qualitative detection and quantitative determination of single-walled carbon nanotubes in mixtures of carbon nanotubes with a portable Raman spectrometer. *Analyst*. 138.8; 2378-2385: (2013).
5. Saito R. Physical properties of carbon nanotubes: (1998).
6. O'Connell M J *et al.* Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes. *Science*. 297.5581; 593-596: (2002).
7. Liu H *et al.* Large-scale single-chirality separation of single-wall carbon nanotubes by simple gel chromatography. *Nature Communications*. 2; 309: (2011).
8. Zhang L *et al.* Assessment of chemically separated carbon nanotubes for nanoelectronics. *Journal of the American Chemical Society*. 130.8; 2686-2691: (2008).
9. Welsch K *et al.* A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice. *Nature nanotechnology*. 4.11; 773-780: (2009).
10. Liu Z *et al.* Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 48.41; 7668-7672: (2009).
11. Bhirde A A *et al.* Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery. *ACS nano*. 3.2; 307-316: (2009).
12. Green A A, Duch M C and Hersam M C. Isolation of single-walled carbon nanotube enantiomers by density differentiation. *Nano Research*. 2.1; 69-77: (2009).
13. Komatsu N and Wang F. A comprehensive review on separation methods and techniques for single-walled carbon nanotubes. *Materials*. 3.7; 3818-3844: (2010).
14. Carney R P *et al.* Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nature Communications*. 2; 335: (2011).
15. Falabella J B *et al.* Characterization of gold nanoparticles modified with single-stranded DNA using analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering. *Langmuir*. 26.15; 12740-12747: (2010).
16. Antaris A L *et al.* Ultra-Low Doses of Chirality Sorted (6, 5) Carbon Nanotubes for Simultaneous Tumor Imaging and Photothermal Therapy. *ACS nano*. 7.4; 3644-3652: (2013).
17. Arnold M S *et al.* Hydrodynamic characterization of surfactant encapsulated carbon nanotubes using an analytical ultracentrifuge. *ACS nano*. 2.11; 2291-2300: (2008).
18. Tabakman S M *et al.* Optical properties of single-walled carbon nanotubes separated in a density gradient: length, bundling, and aromatic stacking effects. *The Journal of Physical Chemistry C*. 114.46; 19569-19575: (2010).
19. Hertel T *et al.* Spectroscopy of single- and double-wall carbon nanotubes in different environments. *Nano letters*. 5.3; 511-514: (2005).
20. Fagan J A *et al.* Analyzing Surfactant Structures on Length and Chirality Resolved (6, 5) Single-Wall Carbon Nanotubes by Analytical Ultracentrifugation. *ACS nano*. 7.4; 3373-3387: (2013).

使用装置

卓上型超遠心機 Optima MAX-XP

最高回転数 : 150,000 rpm
最大遠心力 : 1,019,000xg



ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置 DelsaMax PRO

粒子径測定範囲 : 0.4 nm ~ 10 μm
測定原理 : 動的光散乱法
測定時間 : 1秒~
最少サンプル容量 : 45 μL



高速冷却遠心機 Avanti JXN-26

最高回転数 : 26,000 rpm
最大遠心力 : 81,770 xg
最大容量 : 6 x 1,000 mL



高速冷却遠心機 Avanti JXN-30

最高回転数 : 30,000 rpm
最大遠心力 : 110,500 xg
最大容量 : 4 x 1,000 mL



レーザー回折・散乱法 粒度分布測定装置 LS 13 320

粒度分布測定範囲 : 0.017 ~ 2,000 μm
ディテクタ数 : 133 個
(レーザー回折・散乱 + PIDS 用)
粒子径測定チャンネル数 : 116 チャンネル



小型微量高速遠心機 **Microfuge 16**

最高回転数	: 14,800 rpm
最大遠心力	: 16,163 xg
最大容量	: 24 x 1.5/2.0 mL



分析用超遠心システム **Optima AUC**

最高回転数	: 60,000 rpm
最大遠心力	: 290,000 xg
重量	: 508.5 kg



ラボラトリーオートメーションシステム **Biomek 4000**

寸法	: 1,225 (W) x 505 (D) x 675 (H) mm
重量	: 40 kg
電源	: 100V、50/60Hz、8A





詳細はベックマン・コールター Web サイトへ

ベックマン粒子

検索

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

本内容は予告なく変更する場合がありますのでご了承ください。