

報 文

2-アミノエタンチオール塩酸塩を用いるカチオン性 金ナノ粒子の調製法

河野 喬仁¹, 堀口 諭吉², 新留 康郎^{®2,3}, 新留 琢郎^{2,3}, 山田 淳^{2,3}

Preparation of Cationic Gold Nanoparticles in Aqueous Solutions of 2-Aminoethanethiol Hydrochloride

Takahito KAWANO¹, Yukichi HORIGUCHI², Yasuro NIIDOME^{2,3},
Takuro NIIDOME^{2,3} and Sunao YAMADA^{2,3}

¹ Department of Materials Science, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-cho, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

² Department of Materials Physics and Chemistry, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8581

³ Department of Applied Chemistry, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8581

(Received 24 December 2004, Accepted 28 February 2005)

Cationic gold nanoparticles were obtained by chemical reduction of tetrachloroaurate (AuCl_4^-) in the presence of the 2-aminoethanethiol (AET). Formation of colloidal gold nanoparticles was monitored by absorption spectroscopy, light scattering, and zeta potential measurements. Colloidal gold nanoparticles were obtained when the ratio of AuCl_4^- and AET was about 1 : 1.5. The mean size and the zeta potential of the nanoparticles was 34 ± 6 nm and $+44 \pm 24$ mV, respectively. The polyethyleneoxide compound terminated with a SH group (PEG-SH) increased the mean size of the nanoparticles (49 ± 18 nm), but decreased zeta potentials of the gold nanoparticles ($+16 \pm 7$ mV). The PEG-SH was effective to stabilize the colloidal dispersion of the gold nanoparticles.

Keywords : gold nanoparticles; aminoethanethiol; zeta potential; cationic nanoparticles.

1 緒 言

金ナノ粒子は可視域に表面プラズモン (SP) 吸収を持つ。この吸収のピーク波長は 520 nm 付近にあり、粒子の凝集状態あるいは表面状態による吸収スペクトルの変化を肉眼で観察するためにはたいへん都合がよい。また、金は化学的に安定であり、表面修飾が比較的容易であるために、生体物質のマーカーとしてあるいは透過型電子顕微鏡

用の染色材料として広く用いられてきた¹⁾²⁾。また、近年、これらの金ナノ粒子の特異な物性を利用した触媒³⁾、非線形光学材料⁴⁾、表面増強ラマンセンサー⁵⁾や DNA センサー⁶⁾⁷⁾などの分析化学分野での応用も注目されている。いずれの場合にも、金ナノ粒子のサイズ制御や表面状態の広範囲な制御技術の開発が重要な課題である。

金ナノ粒子と生体物質との相互作用は種々な方法で実現されてきた^{1)2)6)~9)}。チオールと金との強い相互作用を利用して DNA や抗体を金ナノ粒子に固定する方法はセンサーへの応用に関連して広く行われている。また、カチオン性の分散安定剤が表面に吸着したナノ粒子 (カチオン性ナノ粒子) はアニオン性の各種生体物質と静電的相互作用によって結合することが報告されている⁸⁾¹⁰⁾。粒子サイズや表

¹ 長崎大学大学院生産科学研究科物質工学専攻: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

² 九州大学大学院工学府材料物性工学専攻: 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

³ 九州大学大学院工学府応用化学部門: 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

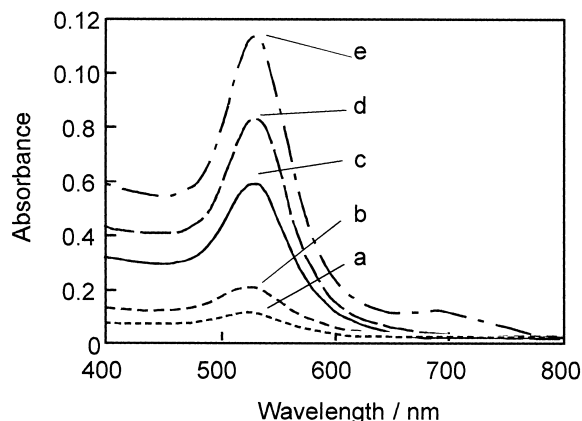


Fig. 1 Absorption spectra of gold nanoparticles prepared by NaBH_4 reduction of AuCl_4^- in the presence of AET

The ratio of AET and AuCl_4^- was 1.5. AuCl_4^- : AET (μmol) in 2 ml of reaction solutions; (a) 0.71 : 1.08, (b) 1.42 : 2.16, (c) 2.84 : 4.32, (d) 4.26 : 6.48, (e) 5.68 : 8.64; NaBH_4 : 0.1 mM, 50 μl , (5 nmol); The solutions were diluted ten times to obtain the absorption spectra.

面状態を適切に制御することで、生体物質の周囲にカチオン性ナノ粒子を結合させることができる。例えば、DNAにカチオン性ナノ粒子を結合させると1次元のナノ粒子凝集体が得られることが報告されている⁸⁾¹⁰⁾。

一般に知られている金ナノ粒子調製法の多くはアニオン性粒子を作製する方法である¹⁾。一方、カチオン性金ナノ粒子を1ステップ化学還元によって作製する方法は限られている。米澤らの方法がその例である⁸⁾。著者らは、以前、2-アミノエタンチオール塩酸塩 (AET) を用いてカチオン性金ナノ粒子の作製が可能であり、この粒子が培養細胞に対する遺伝子キャリアーとして機能することを明らかにした¹¹⁾。このカチオン粒子は、市販のカチオン性化合物である AET 共存下で塩化金酸を化学還元することによって得られる。この反応は1ステップ・1ポットの化学還元反応であり、簡便性が高い。本研究では AET を用いたカチオン性金ナノ粒子の作製条件を幅広く検索し、粒子が生成可能な条件を明らかにする。

2 実験

金ナノ粒子の調製は前述の論文と基本的には同一である¹¹⁾。塩化金酸 (0.71~5.68 μmol) と AET (和光純薬製, 1.08~5.68 μmol) を含む溶液 (2 ml) を、濃度条件を変えて 24 穴プレートに入れた。それぞれのウェルに NaBH_4 水溶液 {0.1 mM, 50 μl (5 nmol)} を加え、シェーカーでプレートごと振とうすることで金ナノ粒子を調製した。更に、末端に SH 基を有するポリオキシエチレン誘導体を共存 (Nektar 製, Mw: 5000, 0.432 μmol) させて、金

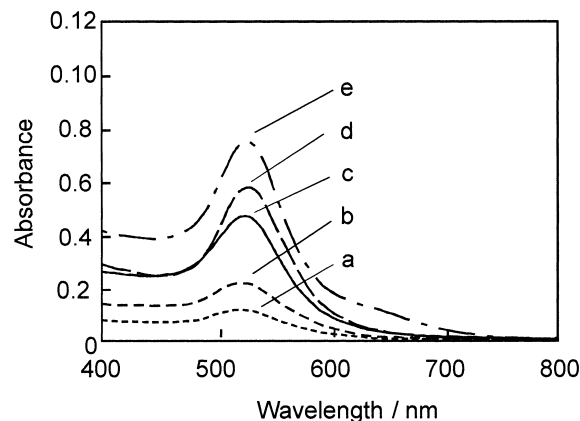


Fig. 2 Absorption spectra of gold nanoparticles prepared by NaBH_4 reduction of AuCl_4^- in the presence of AET and PEG-SH

The experimental conditions were same with those of Fig. 1 other than the presence of PEG-SH.

ナノ粒子の生成にどのような影響を与えるかを検討した。吸収スペクトル測定は溶液をセミマイクロセルに移して吸光度計 (Shimadzu 製, UV-2550) を用いて行った。生成した金ナノ粒子の粒径及びゼータ電位は光散乱測定によって行った (Malvern 製, Zetasizer Nano-ZS)。

3 結果と考察

Fig. 1 は、化学還元後の反応溶液の吸収スペクトルである。溶液中の塩化金酸と AET の量比を一定 (1 : 1.5) に保ちながら、両者の総量を変えた場合のスペクトル変化を示している。520 nm 付近に典型的な金ナノ粒子の表面プラズモンバンドが見られ、金ナノ粒子の生成を確認することができる。吸収バンドの大きさは塩化金酸の量に依存して大きくなるが、ピーク位置とバンド幅はおおよそ同じである。すなわち、この濃度範囲では分光特性に現れるような大きな粒径変化や凝集状態変化は起きなかったことが分かる。Fig. 2 は Fig. 1 で用いた溶液にチオール末端ポリエチレングリコール化合物 (PEG-SH) を添加 (0.432 μmol) し、同様の化学還元処理を行った場合の吸収スペクトルを示す。スペクトル変化の傾向は Fig. 1 と基本的には同一であるが、塩化金酸の濃度の高い場合 (4.26, 5.68 μmol) には PEG-SH の共存によって金ナノ粒子の生成量が減少していることが分かる。PEG-SH は NaBH_4 添加によって生じる微小な金クラスターにも吸着し、金クラスターの安定化によってナノ粒子の生成を抑制すると考えられる。

Fig. 3 は、還元剤を添加した後のプレートの写真である。安定な金ナノ粒子が生成する範囲は比較的狭く、塩化金酸と AET の量比がおおむね 1 : 1.5 の場合 (表の対角線) に生成することが分かる。塩化金酸濃度が相対的に高い場

合 (右上のエリア) では凝集体が生成し, 沈殿が生じた. AET 濃度が相対的に高い場合はナノ粒子の形成が抑制された. Table 1 は, 光散乱測定による平均粒径とゼータ電位を示している. ナノ粒子が全く生成しなかったウエルは (—), 凝集体が生成して粒径とゼータ電位を測定できなかったウエルは (×) と表記した. ナノ粒子が生成したウエルすべての粒径の平均は 34 ± 6 nm であり, ゼータ電位の平均は $+44 \pm 24$ mV である. 塩化金酸と AET の濃度比が 1:1.5 程度であれば, 生成する金ナノ粒子のサイズとゼータ電位はおおむね一定であることが分かった. もちろん

Table 1 にも示されているとおり, 生成する金ナノ粒子の物性は溶液条件に完全に独立ではない. 溶液条件依存して生じる金ナノ粒子の物性の細かな違いは, PEG-SH 添加の効果と併せて後ほど議論する.

Fig. 4 は, PEG-SH 共存下で化学還元を行った場合のプレートの写真である. Fig. 3 とほぼ同様に, 塩化金酸と AET の量比がおおむね 1:1.5 の場合 (対角線) に金ナノ粒子が生成した. 塩化金酸の量が相対的に多い場合 (右上のエリア) は Fig. 3 と同様に凝集体が生成したが, すぐ

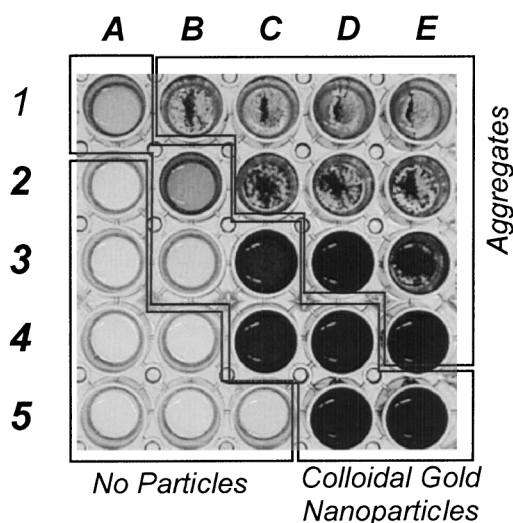


Fig. 3 The photograph of the 24 well plate The NaBH_4 reduction gave colloidal gold nanoparticles in the wells that locate in diagonal positions (A1, B2, B3, C3, C4, D4, D5, E5). The characters and the numbers on and beside the photograph correspond to the experimental conditions of Table 1.

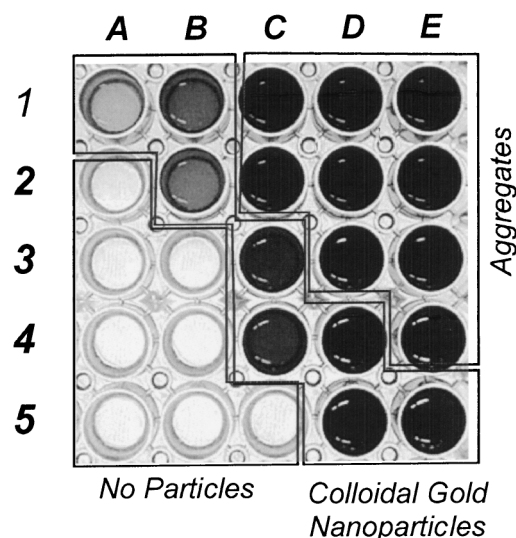


Fig. 4 The photograph of the 24 well plate in the presence of PEG-SH

The NaBH_4 reduction gave colloidal gold nanoparticles in the wells that locate in diagonal positions (A1, B1, B2, C3, C4, D4, D5, E5). The characters and the numbers on and beside the photograph correspond to the experimental conditions of Table 2.

Table 1 Mean diameters and zeta potentials of the colloidal gold nanoparticles prepared by the NaBH_4 reduction of the AuCl_4^- in the presence of AET

| $\text{AuCl}_4^-/\mu\text{mol}$ | A | B | C | D | E | in 2 ml |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| AET/ μmol | 0.71 | 1.42 | 2.84 | 4.26 | 5.68 | |
| 1 | 1.08 | × | × | × | × | |
| | 28 ± 4 ($+23 \pm 0.4$) | | | | | |
| 2 | 2.16 | 25 ± 2 (+28 ± 0.5) | × | × | × | |
| 3 | 4.32 | 32 ± 2 (+24 ± 2) | 41 ± 0.5 (+74 ± 2) | × | × | |
| 4 | 6.48 | — | 36 ± 5 (+29 ± 0.2) | 44 ± 0.5 (+84 ± 1) | × | |
| 5 | 8.64 | — | — | 35 ± 1 (+40 ± 0.2) | 34 ± 2 (+52 ± 0.2) | |
| in 2 ml | | | | | | |

Mean diameter (Zeta potential); Twenty-five different conditions of AET (1~5) and AuCl_4^- (A~E) were examined in the absence of PEG-SH. If aggregates of gold particles were generated in a well, "×" was put in the position of the well. The conditions of "—" did not generate any particles even after the addition of the NaBH_4 . Visible image of the solutions are shown in Fig. 3.

Table 2 Mean diameters and zeta potentials of the colloidal gold nanoparticles prepared by the NaBH_4 reduction of the AuCl_4^- in the presence of AET and PEG-SH (432 nmol)

| $\text{AuCl}_4^-/\mu\text{mol}$ | A 0.71 | B 1.42 | C 2.84 | D 4.26 | E 5.68 | in 2 ml |
|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------|
| AET/ μmol | | | | | | |
| 1 1.08 | 33 ± 0.4 ($+9.3 \pm 1.8$) | 29 ± 0.2 ($+11 \pm 3$) | × | × | × | |
| 2 2.16 | — | 45 ± 0.2 ($+13 \pm 1$) | × | × | × | |
| 3 4.32 | — | — | 46 ± 0.3 ($+17 \pm 2$) | × | × | |
| 4 6.48 | — | — | 37 ± 0.1 ($+7 \pm 1$) | 64 ± 0.2 ($+21 \pm 4$) | × | |
| 5 8.64 in 2 ml | — | — | — | 57 ± 0.1 ($+27 \pm 2$) | 84 ± 0.4 ($+23 \pm 4$) | |

PEG-SH: 432 nmol; Mean diameter (Zeta potential); Experimental conditions were same with those of Table 2 other than the presence of PEG-SH. Visible image of the solutions are shown in Fig. 4.

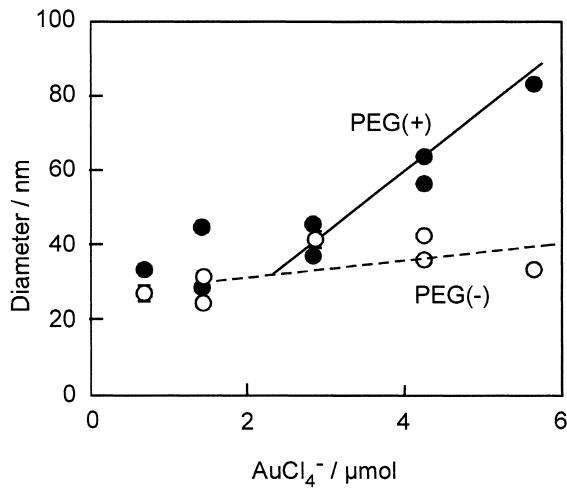


Fig. 5 Mean diameters of the colloidal gold nanoparticles as a function of the amount AuCl_4^- in a well in the absence [PEG(-): ○] and the presence [PEG(+): ●] of PEG-SH

に沈殿になるような大規模な凝集体は生成せず、青黒い溶液が得られた。PEG-SHの添加によって凝集体形成をある程度抑制できることが明らかになった。しかしながら、添加したPEG-SHの量(0.432 μmol)では凝集体形成そのものを抑制することはできず、右上の9つのウエルで生成した粒子の粒径とゼータ電位の測定は行えなかった。Table 2は生成した金ナノ粒子の粒径とゼータ電位の一覧表である。ナノ粒子が生成したウエルすべての粒径の平均は $49 \pm 18 \text{ nm}$ であり、ゼータ電位は $+16 \pm 7 \text{ mV}$ であった。PEG-SHの添加により平均粒径が若干大きく、ゼータ電位は劇的に小さくなることが分かった。

Fig. 5は、生成したナノ粒子の平均粒径をウエル内の塩化金酸の量に対してプロットしたグラフである。塩化金酸の量が同じサンプルは、AETの量にかかわらず、同じX

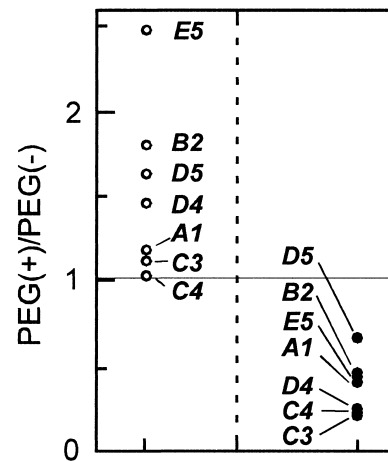


Fig. 6 Effects of the PEG-SH in the reaction solutions are shown as ratio of mean diameters (left column) and zeta potentials (right column) in the presence [PEG(+)] and the absence [PEG(-)] of the PEG-SH [PEG(+)/PEG(-)]

The characters beside the plots correspond to those of Table 1&2.

軸の位置にプロットされている。このため、ナノ粒子の生成状況によっては同じ塩化金酸濃度に対して複数の測定点が存在している。PEG-SHを含まない系(○)では粒径は塩化金酸の量にあまり依存しないように見えるが、PEG-SHを含む系(●)では明確な右肩上がりの傾向が見られる。PEG-SHの添加は塩化金酸濃度が比較的高い場合の粒径に影響を与えることが分かる。

Fig. 6の左カラムにPEG-SHの有無にかかわらずナノ粒子が生成した溶液条件(A1, B2, C3, C4, D4, D5, E5の7種類)での、PEG-SH共存下[PEG-SH(+)]の平均粒径をPEG-SH不在時[PEG-SH(-)]の平均粒径で割った値を示す。これはPEG-SH添加による粒径変化の傾向

を示すグラフである。プロットに付随する E5 等の表記は Table 1 と Table 2 の溶液条件に対応している。いずれの場合も PEG-SH(+)/PEG-SH(-) の値は 1 を超えており、PEG-SH の添加はナノ粒子の粒径増加につながっていることを明確に見てとれる。一方、ゼータ電位について同様に PEG-SH の効果をプロットすると、すべてのプロットが大きく 1 を下回る事が分かる。電荷を持たない分子である PEG-SH の吸着によって粒子表面の電荷密度が下がっていると考えられる。粒径の増加がどちらかと言えば塩化金酸濃度の高い溶液で大きい(例えば E5) のに対して、ゼータ電位の減少には塩化金酸濃度に対する依存性は明確ではない。

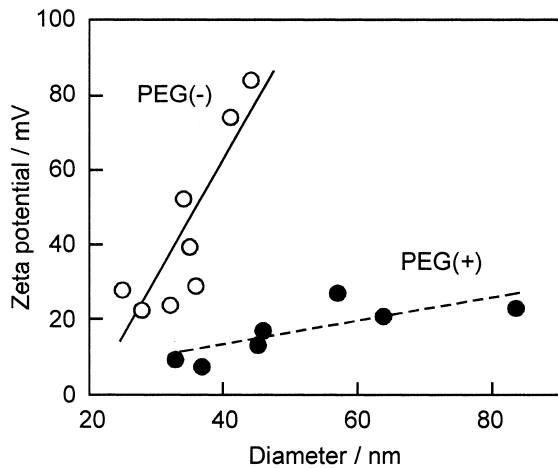


Fig. 7 Zeta potentials as a function of diameters of the colloidal gold nanoparticles in the absence (○, PEG(-)) and the presence (●, PEG(+)) of PEG-SH

Fig. 7 は、生成した金ナノ粒子のゼータ電位を粒径に対してプロットしたグラフである。PEG-SH の有無にかかわらず粒子のゼータ電位は粒径に依存してほぼ直線的に増加することが分かる。PEG-SH 共存下では増加率が PEG-SH 不在下に比べてかなり小さく、PEG-SH によるゼータ電位減少効果が粒径にかかわらず起こることを確認できた。PEG-SH 不在下でのゼータ電位の増加は 20 mV から 80 mV とかなり大きく、粒径の増加に従って粒子表面の電荷密度が増加していると考えられる。しかしながら、以下のような問題点のために、金ナノ粒子に吸着する AET の挙動を定量的に明らかにすることは、少なくとも現時点では困難であった。1: AET は 2 個のメチレン基を有する低分子化合物であり、自己組織的な吸着膜を形成できない。したがって、分子専有面積の推測が困難である。2: AET は、アンモニウム基が脱プロトン化してアミン基になることで、その両端で金ナノ粒子表面に吸着することが可能である。このことは、吸着分子の pK_a が大きく変化している可能性を示唆している。3: 塩を添加すると粒子が凝集する。このため、ゼータ電位測定の際にイオン強度一定の条件を得ることが困難である。いずれにしても、ゼータ電位の粒径依存性は、AET の吸着特性やプロトン化特性に大きく影響されていると考えられる。今後の重要な検討課題である。

Fig. 8 は、PEG-SH 不在下 [A] と共存下 [B] で作製した金ナノ粒子の溶液を暗所に保存したときの吸収スペクトル変化である。PEG-SH 不在下では時間とともに吸収ピークが大きくなる。動的光散乱 (DLS) 測定によってこのスペクトル変化は粒子のサイズの増大が原因であることが分かった。AET 修飾金ナノ粒子は粒子どうしの衝突と融

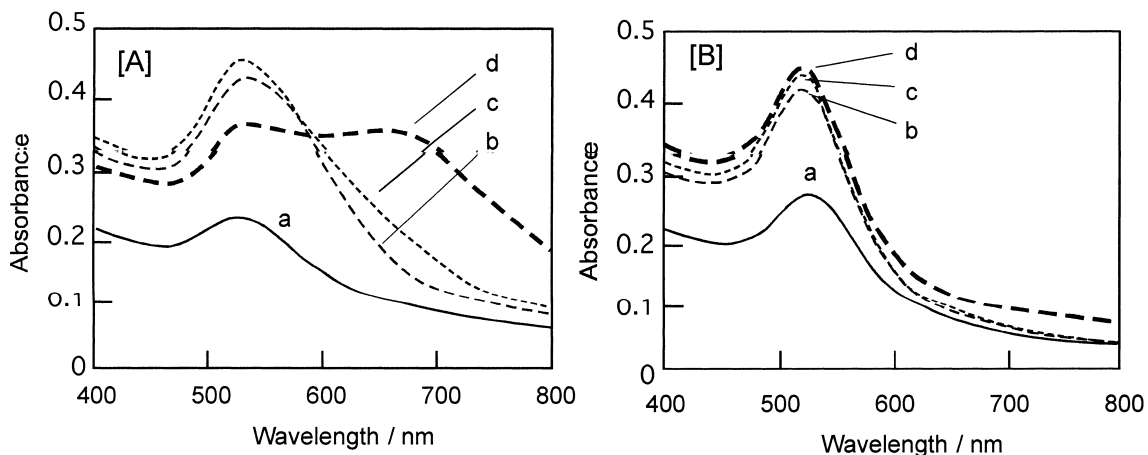


Fig. 8 Absorption spectra of colloidal gold nanoparticles kept in dark after the preparation in the absence [A] and presence [B] of PEG-SH

Preparation conditions— $AuCl_4^-$: 1.42 mM (28.4 nmol), AET: 2.13 mM (42.6 nmol) in 20 ml of reaction solutions ($AuCl_4^-$: AET = 1 : 1.5); $NaBH_4$: 26.4 mM, 0.5 ml (13.2 nmol); PEG-SH: 1 mM (20 nmol) in 20 ml of reaction solutions; Soon after the preparation (a), 2 (b), 3 (c), and 13 (d) days after the preparation

合・凝集を完全には抑制できないと考えられる。調製後 13 日には 700 nm 付近にも吸収ピークが見られるようになり、粒子の凝集体が生成していることが明らかになった。一方、PEG-SH 共存下で作製したナノ粒子では、調製後数日間はスペクトルが変化するものの、13 日後のスペクトルは 3 日後とほぼ同じである。PEG-SH の添加はゼータ電位を低下させ、静電的な反発力を減少させるものの、ナノ粒子の分散安定性は劇的に向上することが分かった。粒子に吸着した PEG 鎖の立体的な効果が粒子の分散安定性に大きく寄与することが分かった。

4 結 言

塩化金酸を AET 共存下で還元すると、その濃度比がおおむね 1 : 1.5 の場合に安定な金ナノ粒子が生成した。また、PEG-SH を添加することによって凝集体形成が抑制され、ゼータ電位が減少した。PEG-SH が分散安定剤として寄与し、AET 修飾金ナノ粒子の分散安定性を向上させた。

本研究によって、AET と PEG-SH を分散安定剤に用いたカチオン性金ナノ粒子は、非常に簡便に作製でき、高い分散安定性と粒径制御性を有していることを明らかにできた。今後、類似化合物による粒子生成の解析などを通して、アンモニウム基とチオール基を両端に持つ化合物を分散安定剤に用いた場合の金ナノ粒子生成プロセスを定量的に明らかにするとともに、信頼性と制御性の高いカチオン

性金ナノ粒子調製法の確立を図りたい。

本研究の一部は NEDO 平成 16 年度産業技術研究助成と基盤研究 C(2) (No. 14550802) によって行われた。

文 献

- 1) H. A. Hayat (Ed.): "Colloidal Gold", (1989), (Academic Press, INC., San Diego).
- 2) M.-C. Daniel, D. Astruc: *Chem. Rev.*, **104**, 293 (2004).
- 3) P. L. Freund, M. Spiro: *J. Phys. Chem.*, **89**, 1074 (1985).
- 4) J. P. Novak, I. Louis C. Brousseau, F. W. Vance, R. C. Johnson, B. I. Lemon, J. T. Hupp, D. L. Feldheim: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12029 (2000).
- 5) L. J. Yao, G. P. Pan, K. H. Xue, D. Y. Wu, B. Ren, D. M. Sun, J. Tang, X. Xu, Z. Q. Tian: *Pure Appl. Chem.*, **72**, 221 (2000).
- 6) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhuff: *Nature*, **382**, 607 (1996).
- 7) K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102 (2003).
- 8) T. Yonezawa, S. Onoue, N. Kimizuka: *Chem. Lett.*, **2002**, 1172.
- 9) A. N. Shipway, E. Katz, I. Willner: *Chem. Phys. Chem.*, **1**, 18 (2000).
- 10) T. Torimoto, M. Yamashita, S. Kuwabata, T. Sakata, H. Mori, H. Yoneyama: *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8799 (1999).
- 11) T. Niidome, K. Nakashima, H. Takahashi, Y. Niidome: *Chem. Commun.*, **2004**, 1978.

要 旨

アミノエタンチオール塩酸塩 (AET) 共存下で塩化金酸を還元することにより、金ナノ粒子が得られることが分かった。塩化金酸と AET の濃度を変化させて、金ナノ粒子が生成する条件を検索した。塩化金酸と AET の濃度比がおおよそ 1 : 1.5 の場合に安定な金ナノ粒子が生成することが明らかになった。生成した金ナノ粒子はプラスのゼータ電位 (+23 ~ +84 mV) を示すことから、粒子表面に AET 由来のアンモニウム塩を有するカチオン性金ナノ粒子であることを確認できた。チオール末端ポリエチレングリコール化合物 (PEG-SH) を共存させた反応溶液を用いても、粒子が生成する濃度比範囲はあまり変化しなかったが、沈殿に至るような大規模な凝集体形成は抑制された。また、PEG-SH の添加によって、生成する粒子の平均粒径が大きくなること、ゼータ電位が小さくなること (+7 ~ 23 mV) が分かった。PEG-SH は AET と競争的に金ナノ粒子に吸着し金ナノ粒子の分散安定剤として機能することが明らかになった。