

[原著論文]

## pH 応答性金ナノ粒子を用いたマルチチャンネル $\mu$ PAD の開発

浅野 比, 日村 彰伸, 白石 幸英

山陽小野田市立山口東京理科大学 共通教育センター

### Development of Multichannel $\mu$ PAD Using pH-responsive Gold Nanoparticles

Hitoshi ASANO, Akinobu HIMURA, and Yukihide SHIRAIISHI

Center for Liberal Arts and Sciences, Tokyo University of Science, Yamaguchi

#### Abstract

In our laboratory, gold nanoparticles protected by 3-mercaptopropionic acid (MPA-Au NPs) were previously prepared. The color of MPA-Au NPs changed from red to purple by addition of acid and returned from purple to red by addition of base. The pH response indicated many applications such as sensors and optical switches. Recently, paper has been modified as a substrate to create a microfluidic device for clinical diagnostics, environmental monitoring, and food safety assurance (i.e. microfluidic paper-based analytical devices,  $\mu$ PAD). We have developed  $\mu$ PADs using a photomask printed with a 3D printer for patterning of hydrophilic and hydrophobic zones by photolithography. Here, we demonstrate the pH sensor with multichannel  $\mu$ PAD using gold nanoparticles.

MPA-Au NPs with a diameter of  $1.7 \text{ nm} \pm 0.4 \text{ nm}$  were prepared by citrate-reduction of hydrogen tetrachloroaurate (III) in the presence of sodium 3-mercaptopropionate. Chromatography paper was immersed with the octadecyltrichlorosilane *n*-hexane solution and hydrophobized. To hydrophilize paper, hydrophobized paper was covered with photomask (printed with 3D printer), and exposed to the UV light. A drop of MPA-Au NPs was added to the detection zone on  $\mu$ PAD. The solutions with several pH were applied to the sample reservoir and the device images were captured with a digital camera. Blue and red intensities of collected digital images were analyzed using image software. The relationships between the ratio of blue intensity/red intensity and pH were linear.

**KEY WORDS** : Microfluidic paper-based analytical devices, Multichannel, Gold nanoparticles, pH,  
Photolithography

キーワード : マイクロ流体ペーパー分析デバイス, マルチチャンネル, 金ナノ粒子, pH, フォトリソグラフィー

## 1. はじめに

金属ナノ粒子は、量子サイズ効果や比表面積が極めて大きいなどバルク金属とは異なる性質を示し<sup>1, 2)</sup>、触媒<sup>3)</sup>、電子材料<sup>4)</sup>、光学材料<sup>5)</sup>、色材<sup>6)</sup>、分析<sup>7)</sup>など様々な分野で応用されている。Shiraishiら<sup>8)</sup>は3-メルカプトプロピオン酸で保護された金ナノ粒子 (Au NPs) が、pHの変化によって色調変化を生じることを見出した。この Au NPs は、酸の添加により赤色から紫色に変化し、アルカリの添加で再び赤色を呈する可逆性を持つ。このような pH 応答性を有する Au NPs は、センサーや光学スイッチへの応用が示唆された。

近年、マイクロ流体ペーパー分析デバイス ( $\mu$ PAD) が、分析の有効な手段として広く認識されている<sup>9)</sup>。 $\mu$ PAD は指先ほどの紙に、親水性・疎水性の修飾を施し、分析目的成分と反応する試薬をあらかじめ担持しておき、数10  $\mu$ L 程度の試料溶液を滴下することで、その色の変化から目的成分を分析することが可能な試験紙である。 $\mu$ PAD は紙を基板としていることから次のような利点を有する。(i) どこでも入手可能で安価 (高品質クロマトグラフィー紙でも約600円/ $m^2$ )、(ii) 水溶液が浸透するため、送液ポンプ不要、(iii) 薄く軽量 (約10 mg/ $cm^2$ ) で幅広い厚さ (0.07~1 mm) で使用でき、積み重ね、保管、輸送が容易、(iv) 白いため、比色試験に良好な媒体、(v) その場分析が可能、(vi) 分析後に簡便かつ安全に焼却処分可能。したがってこのような利点から、 $\mu$ PAD は医療診断、環境モニタリング、食品管理など幅広い分野で研究されている。これまで著者らはフォトリソグラフィーの手法によって  $\mu$ PAD を作成し、水試料中の鉄<sup>10)</sup> 及び6価クロム<sup>11)</sup> の定量に応用し、その有用性を示した。そこで本研究では、pH 応答性金ナノ粒子を用いたフォトリソグラフィー修飾法によるマルチチャンネル  $\mu$ PAD の開発を試みた。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

金ナノ粒子を調製するためのテトラクロロ金 (III) 酸四水和物 ( $HAuCl_4$ )、クエン酸三ナトリウム二水和物及び3-メルカプトプロピオン酸ナトリウム (MPA) は和光純薬工業製のものを用いた。 $\mu$ PAD の基板には、クロマトグラフィー用ろ紙 (No.51B, Advantec) を用いた。ろ紙の疎水化には、トリクロロオクタデシルシラン (OTS, 東京化成工業) 及び *n*-ヘキサン

(和光純薬工業) を用いた。pH 調製用の塩酸及び水酸化ナトリウムは和光純薬工業製の特級試薬を使用した。

### 2.2 装置

調製した金ナノ粒子の評価には、紫外可視分光光度計 (UV-2500PC, 島津製作所)、透過型電子顕微鏡 (TEM1230, 日本電子) 及び pH メーター (D-71TW, 堀場製作所) を使用した。フォトリソグラフィーによる  $\mu$ PAD 修飾のためのフォトマスクの作製には3D プリンター (Objet30 Pro, Stratasys) を用いた。疎水化したろ紙の親水化には、UV- $O_3$  クリーナー (UV253, Filgen) を用いた。接触角計 (DM-300, 協和界面科学) を用い、 $\mu$ PAD の親水性及び疎水性を評価した。

### 2.3 メルカプトプロピオン酸保護金ナノ粒子の調製 (MPA-AuNPs の調製)

MPA-Au NPs は既報<sup>8)</sup> に従い調製した。簡単には、0.5 M  $HAuCl_4$  水溶液に還元剤として0.025 mmol クエン酸三ナトリウム二水和物及び保護剤として25 mM MPA を加え、加熱還流によって調製した。

### 2.4 マイクロ流体ペーパーデバイス ( $\mu$ PAD) の修飾

$\mu$ PAD は既報<sup>10)</sup> に従い修飾した (Fig.1)。適当な大きさに切断したクロマトグラフィーろ紙を0.1% (v/v) OTS-*n*-ヘキサン溶液に12時間浸漬させ疎水化処理を行った。乾燥後、疎水化したろ紙を3D プリンターにより作製したフォトマスクで被覆し、紫外線照射によって親水化を行った。中心の円は試料滴下部、4隅の円は目的成分と反応して発色する試薬が担持してあ

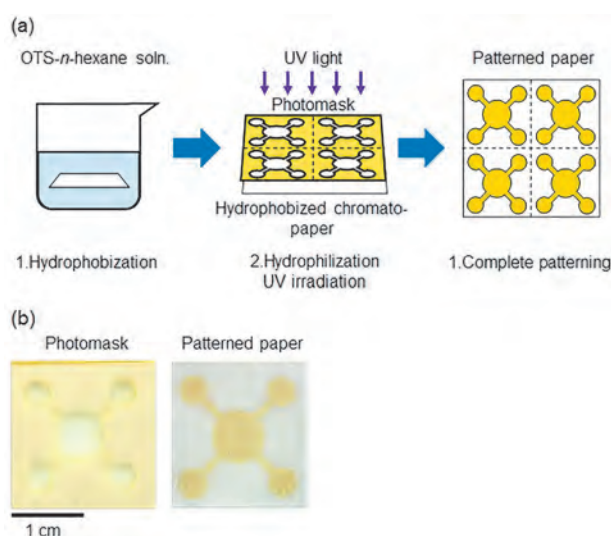


Fig. 1 (a) Schematic of the method for fabricating  $\mu$ PADs and (b) images of photomask and patterned paper.

り、検出部の役割を果たす。中心の円に試料を滴下すると流路を伝わり、4隅の円に試料が到達し、呈色反応を示すマルチチャンネル型の  $\mu$ PAD である。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 調製した MPA-Au NPs のキャラクタリゼーション

調製した MPA-Au NPs 分散液の吸収スペクトルを Fig.2a に示す。これより 523 nm 付近に MPA-Au NPs 由来の表面プラズモン吸収ピークがみられ、MPA-Au NPs の生成が確認された。また、pH 3.0 の溶液との反応により合成した MPA-Au NPs のプラズモン吸収シフトも見られ、合成した Au NPs は pH に応答することが明らかとなった。

TEM 観察の結果 (Fig.2b 及び c), 調製した MPA-Au NPs の平均粒径は 1.7 nm となり、粒径分布も 2 nm をピークとして標準偏差 0.4 nm とばらつきの小さい均一な粒径のナノ粒子が得られた。以前報告した MPA-Au NPs の平均粒径は  $2.0 \pm 0.7$  nm<sup>8)</sup> であり、ほ

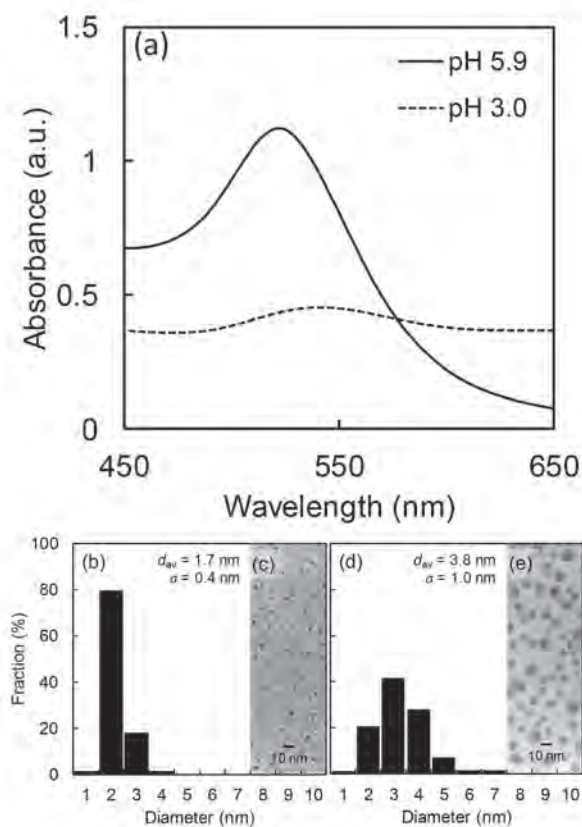


Fig. 2 Absorption spectra (a), particle size distribution histograms (b and d), and TEM images (c and e) of MPA-Au nanoparticles. (b) and (c): pH 5.9. (d) and (e): pH 3.0.  $d_{av}$ : average diameter.  $\sigma$ : standard deviation.

ぼ同程度の粒径を持つ Au NPs が得られたことを確認した。調製した MPA-Au NPs 分散液に塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH を調整し、吸収スペクトルの測定及び MPA-Au NPs の色調の変化を観察した。その結果、塩酸を加え pH を 5.9 から 3.0 に段階的に変化させた場合、赤色から紫色に色調が変化した。また、吸収スペクトルの測定から、プラズモン吸収ピークの長波長側へのシフト (Fig.2a) 及び粒径の変化 (Fig.2d 及び e) が観察され、スペクトルがブロードとなり、粒子の凝集が確認された。一方、水酸化ナトリウム水溶液により pH を 3.0 から 9.8 に調整したところ、再び色調が紫色から赤色に変化した。また、スペクトル測定からも塩酸を添加する前と同様のスペクトルが観察され、調製した MPA-Au NPs が pH に対して可逆性の応答を示すことが確認された。

#### 3.2 $\mu$ PAD 修飾条件 (OTS-*n*-ヘキサン濃度, 紫外線照射時間) の最適化

ろ紙の疎水性及び親水性は、試験液を水とし、表面の接触角を測定することにより評価した。Fig.3 にクロマトグラフィーろ紙の疎水化処理のための OTS-*n*-ヘキサン溶液の濃度について検討した結果を示す。これより、OTS-*n*-ヘキサン溶液濃度は、検討したいずれの濃度においても接触角は概ね 120° となり、十分な疎水性が得られることが明らかとなった。したがって、結果から OTS-*n*-ヘキサン溶液濃度は、最も大きな接触角が得られた 0.1% (v/v) を選択した。

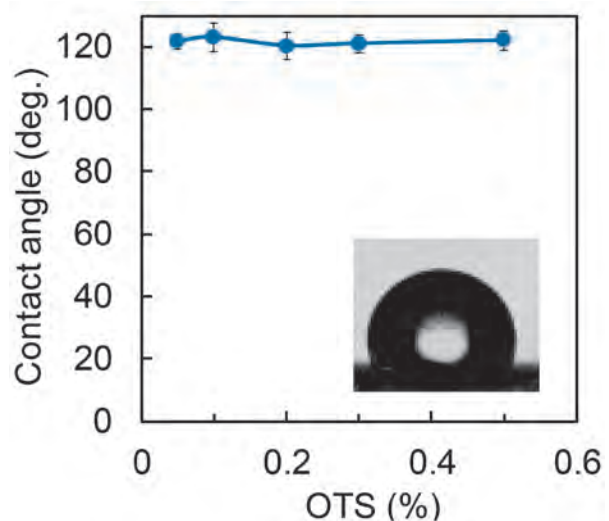


Fig. 3 Effect of the OTS-*n*-hexane concentration on the contact angles. Test liquid was water. Each datum is the mean of five measurements; error bars represent the relative standard deviations of these measurements.

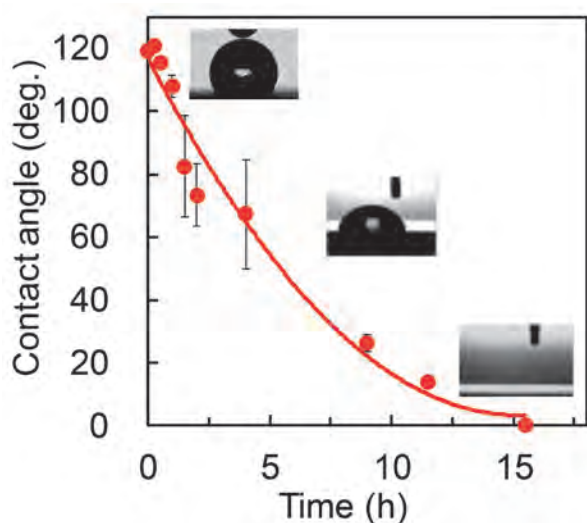


Fig. 4 Effect of the UV exposing time of paper on the contact angles. The paper was immersed in 0.1% (v/v) OTS-*n*-hexane solution. Test liquid was water. Each datum is the mean of five measurements; error bars represent the relative standard deviations of these measurements.

次に表面の親水化のためのUVの照射時間に関して検討を行った。結果をFig.4に示す。これより接触角はUVの照射時間に伴い、指数関数的に減少し、親水化が進行することが明らかとなった。16時間の照射で接触角がほぼ $0^{\circ}$ となったため、UV照射時間は16時間を選択した。

### 3.3 $\mu$ PADのpHセンサーへの応用

調製したpH応答性MPA-Au NPs分散液を $\mu$ PADに応用することを試みた。初めに分散液の検出部への滴下量について検討した。MPA-Au NPs分散液の滴下量を1, 2, 3, 4, 5及び6  $\mu$ Lの範囲で変化させて滴下を行い、検出部の観察を行った。滴下量6  $\mu$ Lの場合、検出部から試料滴下部へのMPA-Au NPs分散液の流出がみられた。一方、1~5  $\mu$ Lの滴下量の範囲では、滴下量の増加とともに色調はやや強くなったが、滴下量の増加に伴い乾燥時間が長くなった。そこで、1  $\mu$ Lの分散液を1~5回に分けて滴下を行った。数回の滴下の場合、滴下した分散液の乾燥を待ってから次の滴下を行った。その結果、滴下量が同じでも、塗布を繰り返した方が早く乾燥することが明らかとなった。ここでは、滴下と乾燥の操作及び時間を考慮し、1  $\mu$ Lを2回に分けて滴下することとした。

次にpHの検出方法について検討した。色調変化を目視でとらえる場合、人による誤差等が考えられるため、ここでは画像解析による色調の数値化を行った。

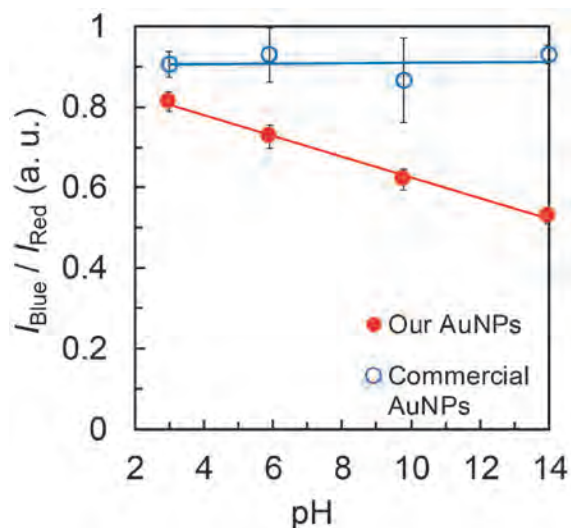


Fig. 5 Blue/red intensity ratio as a function of pH. Our AuNPs (closed circles) and commercial AuNPs (open circles). Each datum is the mean of four measurements; error bars represent the relative standard deviations of these measurements.

種々のpHに調整した試料溶液を $\mu$ PADに滴下し、画像をデジタルカメラで撮影した。撮影した画像をPCに取り込み、画像処理ソフト、ImageJ<sup>12)</sup> (National Institute of Health) を用い、検出部の赤色の強度 ( $I_{Red}$ ) 及び青色の強度 ( $I_{Blue}$ ) を測定した。 $I_{Red}$  と pH の関係をプロットしたところ、pHの上昇に伴い  $I_{Red}$  は直線的に増加した。 $I_{Red}$  と pH の関係から最小二乗法により算出した回帰線及び決定係数  $R^2$  はそれぞれ  $I_{Red} = 0.57\text{pH} + 170$  及び  $0.59$  となった。一方、 $I_{Blue}$  について解析を行ったところ、 $I_{Red}$  の場合とは異なり、pHの上昇に伴い  $I_{Blue}$  は直線的に減少する結果となった。得られた直線関係及び  $R^2$  はそれぞれ  $I_{Blue} = -4.1\text{pH} + 150$  及び  $1.00$  となり、傾き及び  $R^2$  は  $I_{Red}$  の場合と比較して大きくなり、感度だけでなく相関においても良好な結果が得られた。一方、検量線法ではしばしば内部標準法<sup>13)</sup> が用いられる。これは、試料中に存在する目的成分と他の成分の信号強度比を解析することで、分析時の不規則な変化を相殺し、分析精度の向上を図る解析手法である。本手法では $\mu$ PADによる色調の変化をデジタルカメラで撮影し、画像解析によって分析しているため、外部からの光の影響を受ける可能性がある。そこで、分析時の影響を相殺する内部標準法のように、 $I_{Blue}/I_{Red}$  比を用いた解析を試みた。その結果、Fig.5に示すように、 $I_{Blue}$  を解析した時と同様に  $I_{Blue}/I_{Red}$  比も pH の増加に伴い直線的に減少していることがわかる。この際の直線関係及び  $R^2$  はそれぞれ

$I_{\text{Blue}}/I_{\text{Red}} = -2.6 \times 10^{-2} \text{pH} + 0.88$  及び 1.00 となり良好な相関が得られた。一方, 比較として市販の Au NPs を用い同様の検討を行ったが, 色調に変化が見られず, 画像解析による  $I_{\text{Blue}}/I_{\text{Red}}$  比も pH による変化は見られなかった。これより, 本研究室で合成した MPA-Au NPs を  $\mu$ PAD に担持することで, pH 応答センサーとして応用可能であることが示唆された。

## 結論

本研究では pH に対して可逆的な凝集・分散を行う MPA-Au NPs を合成し, MPA-Au NPs を担持した  $\mu$ PAD を用いた pH センサーを開発した。本デバイスに異なる pH の溶液を滴下し, 検出部の画像を解析したところ, 検出部の  $I_{\text{Blue}}/I_{\text{Red}}$  は pH に対して直線的に減少し, 本試験紙の有用性が確認され,  $\mu$ PAD への Au NPs の担持が可能であることが明らかとなった。Au NPs は凝集・分散による色調変化から視認性が高く, 金表面への修飾が容易なため, 分析目的成分に合わせた機能性を付与した Au NPs を担持した  $\mu$ PAD への応用が期待される。

## 引用文献

- 1) M. Valden, X. Lai, and D. W. Goodman: Onset of catalytic activity of gold clusters on titania with the appearance of nonmetallic properties, *Science*, 281, 1647-1650, (1998).
- 2) C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed: Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes, *Chem. Rev.*, 105, 1025–1102, (2005).
- 3) Y. Shiraishi, K. Kotani, and N. Toshima: Catalysis for Visible-Light-Induced Hydrogen Generation of Poly (cyclodextrin)-Stabilized Platinum Nanoparticles, *Proceedings of the 14th International Cyclodextrins Symposium*, 324-327, (2008).
- 4) N. Toshima, K. Oshima, H. Anno, T. Nishinaka, S. Ichikawa, A. Iwata, and Y. Shiraishi: Novel Hybrid Organic Thermoelectric Materials: Three-Component Hybrid Films Consisting of a Nanoparticle Polymer Complex, Carbon Nanotubes and Vinyl Polymer, *Adv. Mater.*, 27(13), 2246-2251, (2015).
- 5) Y. Shiraishi, H. Sawai, R. Tsujihata, S. Kobayashi, and N. Toshima: Effect of Particle Size on Electro-Optic Properties of Liquid Crystal Devices Doped with  $\gamma$ -Cyclodextrin Stabilized Barium Titanate Nanoparticles, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 611, 100-108, (2015).
- 6) Y. Nakao and K. Kaeriyama: J. Appl. Polym. Sci., 36, 269-277, (1988).
- 7) 長岡 勉, 椎木 弘, 床波志保: 金ナノ粒子を利用する増感化学センサー技術, *分析化学*, 56, 201-211, (2007).
- 8) Y. Shiraishi, D. Arakawa, and N. Toshima: pH-dependent color change of colloidal dispersions of gold nanoclusters: Effect of stabilizer, *Eur. Phys. J. E*, 8, 377-383, (2002).
- 9) a) L. Busa, S. Mohammadi, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, and M. Tokeshi: A competitive immunoassay system for microfluidic paper-based analytical detection of small size molecules, *Analyst*, 141, 6598-6603, (2016). b) Acid-Base Titrations Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, S. Karita and T. Kaneta: *Anal. Chem.*, 86, 12108-12114, (2014). c) K. Yamada, T. G. Henares, K. Suzuki, and D. Citterio: Distance-Based Tear Lactoferrin Assay on Microfluidic Paper Device Using Interfacial Interactions on Surface-Modified Cellulose, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 24864-24875, (2015).
- 10) H. Asano and Y. Shiraishi: Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography, *Anal. Chim. Acta*, 883, 55-60, (2015).
- 11) H. Asano and Y. Shiraishi: Microfluidic Paper-Based Analytical Device for the Determination of Hexavalent Chromium by Photolithographic Fabrication Using a Photomask Printed with 3D Printer, *Anal. Sci.*, 34, 71-74, (2018).
- 12) W. S. Rasband: ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2017.
- 13) Y. Hasegawa, Y. Suzuki, and S. Kawakubo: On-site Determination of Trace Arsenic by Reflection-Absorption Colorimetry of Molybdenum Blue Collected on a Membrane Filter, *Anal. Sci.*, 33, 859-862, (2017).