

助成番号 0812

## 塩化ナトリウムおよび関連する塩を利用した超高感度分光法の研究

二又 政之

埼玉大学大学院理工学研究科基礎化学コース

**概要** (1)研究目的 本研究は、塩化ナトリウムや関連する塩を利用して、溶液中に極微量含まれる色素や生体分子などの幅広い化学種を、 $10^4$ 分子程度から1分子感度までの超高感度で定量分析する表面増強ラマン散乱分光に関するものである。

(2)研究内容 塩化ナトリウムや関連する塩による活性化メカニズムの詳細や、最大増強を与える塩濃度、効果的な塩の種類などを明らかにし、超高感度状態分析法としての確立を図る。

(3)得られた結果と考察

1)クエン酸還元法で形成されたAgナノ粒子は、クエン酸やアモルファスカーボンにより強く吸着されている。しかし、塩化ナトリウム添加で、塩化物イオンで完全に置換される。

2)塩化ナトリウム添加しないとき、R6Gはアモルファスカーボンの外側に物理吸着し、ごく弱いSERS信号を与える。このR6Gは、純水への浸漬により容易に大部分が脱離する。

3)R6Gが物理吸着したAgナノ粒子を10mM NaCl水溶液に浸漬したとき、R6Gの極めて強いSERSスペクトルが得られる。このとき、まずR6Gとともに、アモルファスカーボンが脱離し、塩化物イオンが吸着する。そのあとで、溶解したR6Gが再び塩化物イオン近傍に静電的に吸い寄せられ、吸着する。このとき、R6Gの発光スペクトルが物理吸着していたときの550nmから620nmに大きく長波長シフトした。また、塩化物イオン添加で活性化されるのはすべて接合粒子であった。全く同様の活性化効果が、チオシアン酸ナトリウムや臭化ナトリウム等で観測された。

4)チオ硫酸イオン添加により、Agナノ粒子の形状・サイズ・集合状態が変化せず、SERSが失活することが確かめられた。同様のSERS活性の失活が、シアン化ナトリウムやチオ硫酸ナトリウム、ヨウ化カリウムの添加により観測された。これらの種々の塩のAgナノ粒子のSERS活性に対する寄与の違いは、Agとアニオンとの相互作用の違いにより説明できる。

5)局在プラズモンの共鳴ピークが600 - 700nmから、塩化ナトリウム及び関連する活性化塩の添加により、500 - 600nmに100nm以上短波長シフトした。この原因は、塩化物イオンがごくわずかにAgナノ粒子を溶解するためである。これは、Ag粒子のNaClへの溶解に基づく220nmの吸収の出現と、局所電場計算によるナノギャップの増大に伴うLSPピークシフトとして説明できる。

6)全く同様の結果が、マラカイトグリーンやクリスタルバイオレット色素について観測された。ここで得られた増強メカニズムが、幅広い吸着色素に適用できる可能性を示唆している。

## 1. 研究目的

本研究は、塩化ナトリウムや関連する塩を利用して、溶液中に極微量含まれる色素や生体分子などの幅広い化学種を、 $10^4$ 分子程度から1分子感度までの超高感度で

定量分析する手法に関する研究である。30年ほど前から知られている「表面増強ラマン散乱(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)」は、金属コロイド粒子などに吸着した分子のラマン散乱(赤外吸収とともに分子内の結合

について情報を与える汎用的な分光法)が、 $10^4 - 10^5$ 倍増強されるものである。最近、金属ナノ構造を自在に制御し、局在プラズモンによる電場を利用して、増強度をさらに上げようという試みが行われている。我々は、増強メカニズムに関して、① 近接ナノ粒子接合部に分子が吸着すると、局在プラズモンがカップルして、より大きな増強が得られることや、② 銀ナノ粒子に塩化ナトリウムを溶液中から添加すると、表面の残留物が除去され、吸着色素のラマン散乱信号強度が付加的に増強されることを見出した。このとき、吸着色素のラマン散乱増強度は  $10^{10}$  にも達し、単一分子の検出が可能であることが明らかになった。本研究の目的は、特に塩化ナトリウムや関連する塩による上記の表面増強ラマン散乱の活性化について、より詳しく検討を行い、吸着種と金属の電子移動相互作用を含む活性化のメカニズムや、最大増強を与える塩濃度、効果的な塩の種類、適用できる吸着分子・イオンや金属の種類を明らかにし、超高感度状態分析法としての確立を図ることである。それにより、将来テーラメイド医療や低浸襲性診断用分析チップのほか環境計測など幅広い分析分野で、塩化ナトリウム及び関連する塩が、効果的に利用されるようになることが期待される。

## 2. 研究内容

本研究では、塩化ナトリウムや類似塩による巨大ラマン散乱の活性化のメカニズムの解明を進め、汎用性の高い超高感度状態分析法としての確立を図る。

具体的には、化学還元法により形成した金属ナノ粒子をシリコン等の基板に固定し、

① 溶液中から添加する塩化ナトリウムの濃度とラマン増強度、局在プラズモン共鳴波長、吸着分子の発光スペクトルの関係を明らかにする。

これまでの我々の検討から、約 10 mM の塩化ナトリウムが、カチオン性色素のラマン散乱信号強度を大きく活性化することがわかっている、ここでは、その詳細なメカニズムを解明するために、塩濃度と SERS 増強度の関係、表面残留物の置換効率、異なる塩の添加効果、吸着分子と金属ナノ粒子との電子移動相互作用との詳細な関係を明らかにすることで、塩化ナトリウムによる SERS 信号の活性化メカニズム(化学的増強効果)を解明する。得られた局在プラズモン共鳴スペクトルの解析は、これまでと同様に

FDTD 数値計算法により求めた理論計算の結果を用いて行う。購入予定の遠心分離機は、化学還元で形成した金属ナノ粒子のサイズ分別や、溶液相との分離及び濃縮に用いる。

② 増強度と吸着分子の電子状態の関係を明らかにするために、いくつかの異なる電子吸収波長を持つ分子種を用いて、ラマン増強度を測定し解析する。

## 3. 得られた結果と考察

この研究では、Ag ナノ粒子表面に吸着した R6G の化学的増強に関する塩化ナトリウム及び関連する塩の役割を詳細に明らかにした。最初に要約すると、

1) クエン酸還元法で形成された Ag ナノ粒子は、クエン酸残留物及びその分解物であるアモルファスカーボンにより強く吸着されている。これは、純水に浸漬しただけでは脱離しない化学吸着している。しかし、塩化ナトリウム添加で、このアモルファスカーボンは完全に置換され、Ag ナノ粒子表面は塩化物イオンに吸着される。

2) R6G のみを as-prepared Ag ナノ粒子に添加したとき、R6G はアモルファスカーボンの外側に物理吸着し、ごく弱い SERS 信号を与える。この R6G は、純水への浸漬により容易に大部分が脱離する。

3) 一方で、R6G の物理吸着した Ag ナノ粒子を 10 mM NaCl 水溶液に浸漬したとき、R6G の極めて強い SERS スペクトルが得られる。このとき、もともと物理吸着していた R6G のうち、大部分は脱離し、水溶液中に溶けてしまうことが、Ag ナノ粒子のない基板表面で強い R6G の蛍光スペクトルが観測されることから確かめられた。塩化物イオンによる活性化は次のようにして起きるものと考えられる。まず R6G とともに、アモルファスカーボンが脱離し、塩化物イオンが吸着する。そのあとで、一旦溶液中に溶解した R6G が再び塩化物イオン近傍に静電的に吸い寄せられ、吸着する。この R6G の被覆率は、当初の物理吸着したときに比べて著しく小さいにもかかわらず極めて強い SERS が観測された。このとき、R6G の発光スペクトルが物理吸着していたときのバルク状態のピーク位置 550 nm とは大きく異なり、620 nm に長波長シフトした。同時に非弾性散乱による 570 nm (488 nm 励起のときの  $3,000 \text{ cm}^{-1}$ ) に観測された。この結果はすでに報告した結果とよく対応している。また、塩化物イオン添加で活性化されるのはすべ

て接合粒子であった。全く同様の活性化効果が、チオシアン酸ナトリウムや臭化ナトリウム等で観測された。

4) チオ硫酸イオン添加により、Ag ナノ粒子の形状・サイズ・集合状態が変化せず、SERS が失活することが確かめられた。すなわちチオ硫酸イオンは、Ag 接合体の電磁気学的増強効果を変えないで、Ag-Cl-R6G 錯体の化学的増強効果のみをクエンチする。このことから、R6G の塩化物イオンを通しての化学的増強のためには、Ag カチオンの存在が重要な寄与をしていることが明らかになった。同様の SERS 活性の失活が、シアン化ナトリウムやチオ硫酸ナトリウム、ヨウ化カリウムの添加により観測された。これらの種々の塩の Ag ナノ粒子の SERS 活性に対する寄与の違いは、Ag とアニオンとの相互作用の違い—AgX<sub>2</sub>-イオンの錯形成定数の違いにより説明できる。

5) 局在プラズモンの共鳴ピークが 600 - 700 nm から、塩化ナトリウム及び関連する活性化塩の添加により、500 - 600 nm に 100 nm 以上短波長シフトした。この原因は、銀が塩化物イオンと強く相互作用し、Ag ナノ粒子表面に AgCl 及び AgCl<sub>2</sub><sup>-</sup> アニオンを形成するときに、ごくわずかに Ag ナノ粒子を溶解するためであることを見出した。これは、Ag 粒子の NaCl への溶解に基づく 220 nm の吸収の出現とともに、局所電場計算によるナノギャップの増大に伴う LSP ピークシフトとして、明快に説明できる。

6) 全く同様の結果が、R6G 色素だけではなく、マラカイトグリーン(MG)やクリスタルバイオレット(CV)色素について、観測された。ここで得られた増強メカニズムが、幅広い吸着色素に適用できる可能性を示唆している。

7) さらに、溶液中に分散した銀ナノ粒子について、10 mM 塩化ナトリウム添加後に、R6G を約  $4 \times 10^{-8}$  M 以上加えると、孤立した銀ナノ粒子の局在プラズモンの共鳴ピーク 400 nm に加えて、600 - 700 nm に付加的なピークが出現する。これは、塩化ナトリウムにより生成した銀表面の負電荷が、R6G カチオンにより静電的に引き寄せあい、数個程度の近接銀ナノ粒子が形成されたためと考えられる。FDTD 法による共鳴波長の計算結果はそれを支持する。興味深いことに、ここで形成された溶液中の近接銀ナノ粒子は極めて安定であり、1 日以上静置しても、凝集も沈降もせず、ほぼ一定の局在プラズモンスペクトルを与えた。これは一般に知られている 40 mM 以上の高濃度の塩化ナトリウムを添加したときに、銀ナノ粒子が凝集・塩析し、

ほとんどすべての銀案の粒子が沈殿することとは本質的に異なっている。さらに興味深いことに、この溶液中で見出された近接銀ナノ粒子は、孤立粒子に物理吸着した R6G に比べて、ずっと大きなラマン信号強度と、銀と R6G との電子移動相互作用によるバルク状態の 550 nm から 620 nm にシフトした蛍光を与えた。これらの結果は、塩化ナトリウム添加により負電荷を帯びた銀ナノ粒子が、静電引力により、R6G カチオンを中間にはさんだナノギャップ構造をとり、安定化し、かつギャップの色素の巨大ラマン効果と電子移動相互作用を与えるという、我々の提案している基板上的ナノギャップモデルを強く支持する結果である。

詳細な研究成果は以下のとおりである。

### 3. 1 NaClなどの塩添加による SERS 及び発光スペクトル変化

#### 1) Ag ナノ粒子表面残留物の塩化ナトリウムによる置換

化学量論的に過剰なクエン酸で硝酸銀から還元生成された Ag 表面はクエン酸残留物またはその分解物であるアモルファスカーボンにより覆われている。このことは、特長的な  $1,380 \text{ cm}^{-1}$ 、及び  $1,580 \text{ cm}^{-1}$  のブロードなピークで確かめられた。このアモルファスカーボンは、Ag 表面に十分強く吸着しており、純水に浸漬しただけでは全く脱離しない。また、レーザ光照射に対してきわめて敏感であり、 $10 \text{ nW}/\mu\text{m}^2$  のパワー密度でも経時変化を与える。これとは大きく異なり、塩化ナトリウム水溶液を添加したとき、このアモルファスカーボンは完全に除去されることが SERS スペクトルの変化から確かめられた。このとき Ag 表面は強く吸着した塩化物イオンで覆われるものと考えられる。Ag 表面がクエン酸分解物で覆われる理由は、直接分析されたわけではないが、多分過剰なクエン酸アニオンの中性銀表面への化学吸着(結果的に銀カチオンを与える)か、あるいは窒素置換された状態でも残留する酸素により銀表面が部分的に酸化され、クエン酸と静電的に結合したものである。そのあと、銀イオンとより強い静電的相互作用を持つ塩化物イオンを添加すると、クエン酸やアモルファスカーボンが塩化物イオンにより容易に置換される。

#### 2) As-prepared Ag 表面への R6G の吸着(塩化物イオンが共存しない条件下で)

Hildebrandt の報告するように、ハロゲン化物イオンが吸着しないとき、R6G は共存するときに比べてずっと多くの

分子数が Ag ナノ粒子表面に吸着する。例えば、溶液中で R6G 分子数 : Ag 粒子数 = 2,000 : 1 の濃度比で混合した系では、検出可能な R6G の SERS が得られた。このとき顕微鏡の対物レンズ下の測定領域には数 100 個程度の Ag ナノ粒子が存在する(それはカバーガラスに固定するときの溶液の Ag 粒子濃度で制御しうる)。それにもかかわらず、観測された R6G の SERS は、R6G の強い蛍光バックグラウンドに重なっており、ごく弱い。さらに、この R6G/Ag 試料を固定した溶液セルに純水 100  $\mu$ l を添加すると、これらの強い蛍光及び modest な強度の SERS は、ほぼ完全に失われてしまい、純水を取り去り乾燥後、測定したところアモルファスカーボンの強い SERS が観測された。これらの結果をまとめると、次のようになる

① ハロゲン化物イオンなしで、Ag ナノ粒子に直接吸着させた R6G は、ごく弱く物理吸着しており、純水にさらすと容易に脱離する。これに伴い、物理吸着した R6G からのバルク状態と同一の蛍光 (549 nm にピーク) が、失われる。

② もともと表面に吸着していたクエン酸由来のアモルファスカーボンは、上記に示したとおり R6G に比べてより強く吸着しており、純水浸漬によって、脱離しない。

3) As-prepared Ag に2)と同様に R6G を吸着させた後、NaCl 水溶液を加えた

R6G を as-prepared Ag に溶液中で吸着させ(濃度比 20,000 : 1)、SERS 及び発光スペクトルを観測した。この結果は 2) の試料と同じく、物理吸着した R6G の強いバルク的な蛍光の上に、modest な SERS が観測される。このあと、溶液セルに 10 mM NaCl 水溶液(加えた溶液中には新たな R6G は含まれない。100  $\mu$ l)を加えたとき、3分程度のごく短時間劇的なスペクトル変化が観測された:すなわち、バルク的な蛍光バックグラウンドが消失するとともに、巨大な SERS 信号が検出された。このとき、①蛍光バックグラウンドの大幅な減少から明らかのように、水溶液添加により大部分の R6G は Ag 表面から脱離する。②加えた NaCl 水溶液中には R6G が含まれていないので、Ag 表面の R6G 吸着量は、NaCl 添加前に比べて著しく少ない。③それにもかかわらず、巨大な SERS 信号が観測された。④同時に、発光スペクトルも物理吸着時の 550 nm の蛍光ピークが消失し、571 nm、618 nm にピークが観測されるなど大きな変化を示した。この新たな 2 本の発光ピークは、以

前我々が最初から R6G と NaCl を含む水溶液に As-prepared Ag ナノ粒子を浸漬して吸着させたときに観測した 2 本の発光ピークとよく一致している。すなわち、短波長側の 571 nm のピークは励起波長によらずストークスシフトが変化しない金属表面電子の非弾性散乱ピーク(電子ラマン)であり、長波長側の 618 nm のピークはピーク位置が吸着量や色素の種類に依存して変化する色素の増強蛍光である。この後者のピークは Ag 表面と R6G の電子的相互作用を反映して、バルクの 550 nm から大きくシフトしたものと考えられる。

この塩化物イオンによる活性化メカニズムは次のような手順で起きているものと考えられる:① Ag 表面から物理吸着していた R6G が、水溶液との接触で脱離する。② 塩化物イオンが、Ag 表面のクエン酸残留物を置換し吸着する。③ R6G カチオンが静電的に吸着した塩化物に引き寄せられて吸着する。この Ag-Cl-R6G 錯体において、R6G は単独で物理吸着したときとは異なる電子状態を有し、SERS 活性が生じる。この錯体については、SERS 及び発光スペクトルで確認したのは初めてである。その電子状態の詳細を明らかにすることは今後の課題である。

最初に Ag 表面に物理吸着していた R6G が、NaCl 水溶液添加により大部分脱離していることは、基板表面の Ag ナノ粒子の存在しない場所でも、R6G のバルク的な発光スペクトルが強く観測されることでも支持された。同時に、弾性散乱イメージの時間依存性から、活性化の過程で負に帯電した銀ナノ粒子は、カバーガラス上に APTMS のアミノ基により強く固定されており、粒子の大きな拡散や凝集は起きないことが確かめられた。初期の R6G 吸着量を 1/10(濃度比 R6G : Ag = 2,000 : 1)、1/100(濃度比 200 : 1)でも、本質的に同じ結果が得られた。すなわち、R6G を含まない 10 mM NaCl 水溶液 100  $\mu$ l 添加により、巨大な SERS 活性が得られるとともに、発光スペクトルはバルク的な 550 nm のピークが、570 nm、619 nm の新しいピークに置き換わる。観測された SERS や発光スペクトルの強度の R6G 初期吸着量に対する依存性から、用いた実験条件では、少なくとも 200 : 1 や 2,000 : 1 の初期吸着量では、活性点を完全には埋められないことが判明した。より詳細な活性点の特性については現在検討中である。

この NaCl 添加による R6G の SERS 活性化の過程について、SERS イメージ及び弾性散乱イメージの測定を行っ

た。物理吸着した状態では、R6G 吸着量は極めて多いにも関わらず、約  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  視野の中で SERS 活性点に対応する bright spot はごく数えられるほどである。そこに NaCl 水溶液を添加したとき、3 分程度で極めて多数の bright spot が現れた。しかも、時間とともに異なる bright spot が現れ、20 - 30 分後にはほぼ安定なスポット数と位置が得られるようになった。すなわち NaCl による活性化の過程で、数分以上の長期的な blinking 的な強度揺動が観測された。このとき比較的多くの R6G 分子が吸着しており、この結果はたぶん、NaCl の置換は 3 分以内に完了するので、一旦脱離した R6G 分子の溶液から銀ナノ粒子表面への拡散(分子数  $10^{-5} \text{ M} \times 100 \mu\text{l}$  として、ほぼ 1 分子/1 nm の間隔で溶液中に分子が並んでいるので、この拡散は無視できる。拡散係数  $D$  はイオン・分子とも  $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  のオーダーなので、平均拡散距離として、 $100 \text{ s}$  あたり、 $\sqrt{(D \times 100)} = 30 \mu\text{m}$  であり、測定領域中を端から端まで十分に動ける。)よりは、むしろ表面での拡散?の時間が律速と考えられる。すなわち、分子は直径約 32 nm の球状銀ナノ粒子表面で Cl<sup>-</sup> イオンの吸着した、かつ錯体が特別な電子状態を持ちうるサイトを求めて拡散している。(このとき、特別なエネルギー的安定性があるとしても、Blinking が観測されることから、十分大きなものではない。)ただし、20 - 30 分後にはほぼ bright spot 位置は一定になり、時間的な spot 位置の変化や強度変化はなくなるので、活性サイトが R6G によりほぼ完全に充填されたものと考えられる。Ag-Cl-R6G 錯体のエネルギー的な安定性は、この意味では有意である。

さらに活性化された粒子の形状を AFM 観測したところ 2 粒子が接合したものであることが判明した。この測定では、個々の粒子からの SERS、発光スペクトルを区別して測定するために、カバーガラス基板上の粒子数密度を 20 - 40 粒子/ $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  に制限しているが、SERS 活性化された粒子は極めてまれで、視野の中にはせいぜい 1 個の SERS 活性粒子が存在するに過ぎない。この接合体の接合軸は、ほぼ入射光偏光の方向と対応しており、junction model とよく一致して、接合部に吸着した Ag-Cl-R6G 錯体により SERS 活性が得られたものと考えられる。全く同様の結果が、別のバッチ試料でも得られており、孤立した粒子では全く SERS 活性が得られず、2 粒子以上の接合体あるいは近接粒子でのみ SERS が活性化することは極めて興

味深い。

#### 4) チオ硫酸イオン添加による SERS の失活

Doering & Nie は、チオ硫酸イオン添加により、R6G の SERS 活性が非可逆的に失活すると報告している。ここでは、3) で活性化された Ag-Cl-R6G の SERS 活性粒子について、チオ硫酸添加直後からの SERS の時間変化に加えて、これまでに報告のない発光スペクトルや弾性散乱、AFM 観察などを行い、より詳しく失活メカニズムを解析した。

アモルファスカーボンの SERS スペクトルを与える as-prepared Ag ナノ粒子を溶液セルに固定し、10 nM R6G、10 mM NaCl 水溶液をセルに注入すると、巨大な SERS 活性が出現した。この場合、当所から添加した R6G の実験結果に比べて、一旦現れた SERS 活性が、時間とともにやや弱くなるが(おそらく添加した R6G 濃度が不十分なためすべての活性サイトが R6G で占有されないで、時間とともに吸着/脱離をしている。)、チオ硫酸を加えるまでは明確な SERS スペクトルを与える。しかし、チオ硫酸を添加した直後に劇的に SERS 活性が失われることが、スペクトル変化から明らかになった。このとき、発光スペクトルも、Ag-Cl-R6G 錯体の 606 nm の非弾性散乱ピーク ( $514.5 \text{ nm}$  励起のストークスシフト  $3,000 \text{ cm}^{-1}$ ) を明瞭に示していたが、チオ硫酸イオン添加によりほぼ完全に失われる。このあとチオ硫酸ナトリウム水溶液を除去し、純水でセルをリンスした後、再び当初と同じ濃度の 10 nM R6G + 10 mM NaCl 水溶液を添加しても、R6G の SERS 活性は回復しなかった。すなわちチオ硫酸イオンによる SERS の失活は非可逆的に起こることが判明した。

チオ硫酸イオンは、写真の定着に用いられる試薬である。写真フィルムにおいて、光照射による還元で形成された潜像 (Ag 核) が、現像液で還元成長されたのち、光照射されない AgBr 膜の Ag カチオンは、チオ硫酸イオンの添加により溶解し、安定な  $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_3]^{2-}$  錯イオンを形成することが知られている。したがって、ここでもおそらく Ag ナノ粒子表面に存在する Ag カチオンが Cl<sup>-</sup> アニオンと静電的に引き合い、その近傍にさらに R6G カチオンが吸着するものと考えられる。チオ硫酸イオン添加により、Ag カチオンが溶解するために、同時に塩化物イオンや R6G カチオンも溶解し、SERS 活性が失われると考えられる。この場合、Ag ナノ粒子の形状や集合状態は変化せずに、Ag

表面の(一部に存在する)Ag カチオンが Cl<sup>-</sup> 及び R6G とともに脱離するものと推測される。実際にこの過程を AFM 測定で追った結果、物理吸着した R6G/Ag に NaCl 溶液を添加したとき、さらにチオ硫酸ナトリウムを添加したとき、銀ナノ粒子接合体の形状・サイズ・凝集状態は、ほとんど変化しない。すなわち、銀ナノ粒子が溶解したり、基板上を拡散したりすることはなく、元の位置に安定に存在する。この結果は、銀ナノ粒子接合体の LSP 励起による電磁気学的増強がほとんど変化せず、Cl<sup>-</sup> を介する化学的増強がチオ硫酸添加により失活することを示している。これを支持するように、溶液中でほぼ孤立した as-prepared 銀ナノ粒子に NaCl を添加し、その後でチオ硫酸イオンを添加したとき、400 nm 付近にピークを持つ LSP 共鳴吸収バンドは、わずかに強度を低下するのみで、ピーク位置はほとんど変化しないし、凝集体形成を示すような、長波長側のカップルした LSP バンドも出現しない。また、塩化物イオンによる SERS 活性化の後、チオ硫酸イオンによる失活に伴う、散乱スペクトル変化を測定した。粒子ごとの形状が異なるので、別々のバッチ試料についての詳細な比較は単純にはできないが、共通してチオ硫酸添加により、LSP 及び吸着種による付加的な散乱ピーク位置を大きく変えないが、強度がかなり大きく減少することが確かめられた。これは、チオ硫酸を加えないとき、時間とともに吸着分子の熱拡散や脱離により SERS 活性が1時間ほどの測定に継続により失われる場合では、ほぼ付加的なピークが失われるのみであることと、対照的である。この結果は、AFM 測定の結果を合わせて考えると、Ag ナノ粒子の形状・集合状態は変化せず、Ag 表面から Ag<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> 及び R6G が失われることによるものとして理解される。

上記のチオ硫酸イオン添加に伴う、Ag<sup>+</sup> カチオンの溶解は、上記のとおり少なくとも希薄溶液ではもつともである。その点を明らかにするために、これらの SERS 活性化/失活にかかわるハロゲン化物イオン、チオ硫酸イオンの Ag 表面への吸着に関して、XPS 測定により直接検討した。クエン酸法で化学還元により形成した Ag ナノ粒子は、Ag 金属原子のほかに、表面に吸着したクエン酸、a-carbon、Ag<sub>2</sub>O によると思われる酸素、炭素が検出される。この Ag ナノ粒子分散溶液に、臭化物イオン(NaBr) 10 mM を添加し、しばらくおいた後、純水でリンスして XPS 測定を行った。酸素の一部、炭素の一部が消失し、代わりに臭素原子が

吸着することが判明した。このとき、Ag 原子のスペクトルは、光電子の脱離深さが 10 - 20 nm であることから、ナノ粒子表面のみならず深部の Ag 原子の影響のために、ほぼ変化がなかった。これらの結果は、ハロゲン化物イオン添加により残留するクエン酸、a-carbon などが、置換されるという SERS スペクトルの測定結果とよく一致する。ハロゲン化物イオンは、おそらくクエン酸アニオンと相互作用していた Ag<sup>+</sup> や Ag<sub>2</sub>O 中の酸化された Ag と相互作用している。その上で、R6G を静電的にひきつけ、その SERS を活性化する。

さらに、チオ硫酸イオンを添加したとき、吸着していたハロゲン化物イオンが脱離するとともに、チオ硫酸イオンが吸着することが判明した。すなわちチオ硫酸イオンは、Ag<sup>+</sup> イオンを溶解するだけでなく、Ag 表面に吸着するハロゲン化物イオンを脱離させ、同時に R6G を脱離させる。

この結果は、チオ硫酸イオンの吸着がハロゲンに比べてずっと強いために、ハロゲン化物イオン自身もチオ硫酸イオンに置換されること、またチオ硫酸と R6G の相互作用は小さく、R6G が吸着できなくなることを示している。この結果は、カチオン性色素や他の吸着種の SERS 活性を議論する場合に重要な点を示唆している。すなわち、吸着力の弱い(カチオンまたは)分子は、こうしたハロゲン化物イオンなどにより吸着を促進されて活性化する場合に加えて、Ag と吸着種間の電子的相互作用により活性化する場合があると考えられる。

塩化ナトリウムに加えて、種々の塩の吸着色素のラマン散乱信号強度への影響を検討した結果、活性化を与える塩として、臭化ナトリウム(NaBr)、チオシアン酸カリウム(KSCN)が見出された。また失活する塩として、ヨウ化ナトリウム、シアン化ナトリウムが見出された。これらの塩特にアニオンの活性の違いは、銀との錯イオン形成定数  $\beta_2 = \log([AgX_2]/[Ag^+][X]^{-2})$  の違いによって、 $\beta_2 \approx 0$  (活性化なし)、 $0 < \beta_2 < 10$  (活性化)、失活 ( $10 \ll \beta_2$ ) として、明確に区別できることが判明した。

5) 局在プラズモンの共鳴ピークが 600 - 700 nm から、塩化ナトリウム及び関連する活性化塩の添加により、500 - 600 nm に 100 nm 以上短波長シフトした。

この原因は、銀が塩化物イオンと強く相互作用し、Ag ナノ粒子表面に AgCl 及び AgCl<sub>2</sub><sup>-</sup> アニオンを形成すると

きに、ごくわずかに Ag ナノ粒子を溶解するためと考えられる。実際に、Ag 粒子のごくわずかな溶解は、Ag 粒子の NaCl 水溶液への浸漬で、220 - 230 nm に  $\text{AgCl}_2^-$  による吸収が出現することで確かめられた。また、FDTD 局所電場計算により、基板上の近接銀ナノ粒子(直径 30 nm)のナノギャップが 1 nm から 2 nm に増大するのに伴い、カップルした LSP の共鳴ピークが 600 - 700 nm から 500 - 600 nm (数字の幅は、近接粒子数 2-4 個の違いによる)に 100 nm 以上シフトすることが確かめられた。すなわち、実測された LSP 共鳴ピークの大きなシフトは、銀ナノ粒子の表面残留物の塩化ナトリウムによる置換の際に、少し表面が溶解し、近接銀ナノ粒子間距離がわずかに増大するためとして、明快に説明できる。

6) 全く同様の塩化ナトリウム及び関連する塩の添加に対する結果が、R6G 色素だけではなく、マラカイトグリーン (MG) やクリスタルバイオレット (CV) 色素について、観測された。ここで得られた増強メカニズムが、幅広い吸着色素に適用できる可能性を示唆している。

7) 溶液中の測定で、塩化ナトリウムで表面を清浄化された銀ナノ粒子が、カチオン性色素により、安定な数個からなる近接粒子が形成されることを見出した。

孤立した銀ナノ粒子分散水溶液に、まず塩化ナトリウム (10 mM) を添加した。このとき塩化ナトリウム濃度は十分低く凝集は起きていないことを、吸収スペクトル測定で 400 nm 付近に 1 本のピークが観測されることで確かめた。この溶液に、R6G を約  $4 \times 10^{-8}$  M 以上加えたとき、孤立した銀ナノ粒子の局在プラズモンの共鳴ピーク (400 nm) はほとんど変化せず、600 - 700 nm に、近接粒子間のカップル下 LSP による付加的なピークが出現した。これは、塩化ナトリウム添加により生成した負の表面電荷を有する銀ナノ粒子が、R6G カチオンにより静電的に引き寄せられ、数個の近接銀ナノ粒子が形成されたためと考えられる。FDTD 法による共鳴波長の計算結果はそれとよく一致した。興味深いことに、ここで形成された溶液中の近接銀ナノ粒子は極めて安定であり、1 日以上静置しても、凝集も沈降もせず、ほぼ一定の局在プラズモンスペクトルを与えた。これは一般に知られている 40 mM 以上の高濃度の塩化ナトリウムを添加したときに、銀ナノ粒子が凝集・塩析し、ほとんどすべての銀ナノ粒子が沈殿することとは本質的に異なっている。

さらに興味深いことに、溶液中で見出された近接銀ナノ粒子は、孤立粒子に物理吸着した R6G に比べて、ずっと大きなラマン信号強度と、銀と R6G との電子移動相互作用によるバルク状態の 550 nm から 620 nm にシフトした蛍光を与えた。これらの結果は、塩化ナトリウム添加により負電荷を帯びた銀ナノ粒子が、静電引力により、R6G カチオンを中間にはさんだナノギャップ構造をとり、安定化し、かつギャップの色素の巨大ラマン効果と電子移動相互作用を与えるという、我々の提案している基板上のナノギャップモデルを強く支持する結果である。

また、R6G 以外の MG や CV では、R6G よりも高い濃度添加してもこの付加的なピークは表われない。同じカチオン性色素でありながら、これらの色素の分子構造の違いを反映したものと考えられる。すなわち、キサントゲン色素の R6G とトリフェニルメタン系色素の MG や CV とでは、カチオンであるアミノ基の周りの構造が異なり (R6G が、 $-\text{MH}(\text{C}_2\text{H}_5)$  であり、MG、CV がともに  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )、R6G の方が、他に比べて立体障害が小さいことや、メチル基 (MG、CV) とエチル基 (R6G) の電子供与性に違いがある。また、両者ともに平面分子であるが、分子全体の共役二重結合の広がりやアミノ基のカチオンの非局在性の違いが予想される。結果的に R6G でのみ近接銀ナノ粒子の安定化が観測されたことは、銀ナノ粒子表面へのカチオン性色素の近接のために、立体障害効果がより小さいことが重要であると考えられる (この点はアミノ基の周りの置換基のちがう色素を用いて、現在より詳しく検討している)。

#### 4. 今後の課題

1. 塩化ナトリウム及び関連する塩の添加による単一分子感度ラマン分光を分析手法として確立するために、アニオン及びカチオンの Ag ナノ粒子表面との相互作用を、さらに幅広い塩を用い、またカチオン性色素だけでなく、電荷を持たない生体分子などへの適用性を広げる必要がある。そのために、金属ナノ粒子の表面電荷を電気化学的に制御する方法について検討を開始した。また化学的により安定で、生体分子に親和性の高い金表面について解析する必要がある。

2. こうした超高感度分光法を確立するとともに、空間分解能を従来の顕微分光の限界である 1/2 波長を超えて、ナノメートルスケールを実現することで、生体分子や触媒な

どのナノ構造体と溶液の界面への適用を図る必要がある。そのためには、ここで確立を進めている単一分子ラマン分光と、近接場分光の複合が必要である。そこで、単一分子ラマン検出感度を与える金属ナノ粒子を、近接場ラマン用プローブ先端に固定し、基板金属表面との間のナノギャップに形成される巨大電場を利用して、超高感度化とナノスケール分解能の実現を進めている。

## 文献

1. M. Futamata, Y. Maruyama, *Applied Physics B*, 93 (2008) 117-130.
2. M. Futamata, Y. Maruyama, *J. Phys. Chem. C*, submitted.
3. S. Takahashi, M. Futamata, *Chem. Lett.*, submitted.

## 学会発表

1. ナノ学会第6回大会(九州大学)2008年5月8日、PS2-057, 丸山芳弘(浜ホト)、二又政之(埼玉大院理工)、“アニオン添加による銀ナノ粒子表面とSERS 活性の変化”
2. ICORS XXI (London), 2008.08.21-26. P-391, M. Futamata, Y. Maruyama, “Anion-induced activation or quenching of SERS signal from R6G on immobilized Ag nanoparticles”

3. ICORS XXI (London), 2008.08.21-26. P-393, M. Futamata, D-G. Kim, Y. Maruyama, “Fabrication of SERS substrates using EBL or nanosphere overlayer method”
4. 分光学会表面・界面高感度分光部会第1回シンポジウム(産総研つくばセンター)、丸山芳弘(浜ホト)、二又政之(埼玉大院理工)、“SERS:化学的増強機構におけるアニオンによる活性化”, 2009.12.05.
5. 文科省科研費特定領域「光一分子強結合場」第4回公開シンポジウム, 2009.1.24-25.(名古屋大学), P-54、丸山芳弘(浜ホト)、二又政之(埼玉大院理工)、“SERS 化学的増強におけるアニオン効果”
6. 第7回プラズモニクス研究会(平成21年3月6-7日、徳島大学)、二又政之(埼玉大学院理工)、丸山芳弘(浜ホト)、“SERS 化学的増強におけるアニオンの役割”
7. 2009年春季第56回応用物理学関係連合講演会(筑波大学)、3月30日、30a-ZE-3 丸山芳弘(浜ホト)、二又政之(埼玉大院理工)、“表面増強ラマン散乱:アニオンによる電子移動相互作用の活性化”
8. 2009年春季第56回応用物理学関係連合講演会(筑波大学)、3月30日、30a-ZE-4 高橋賢(産総研)、二又政之(埼玉大院理工)、“固液界面のチップ増強ラマン散乱(TERS)”

No. 0812

## Highly-Sensitive Raman Spectroscopy Using Sodium Chloride and Related Salts

Masayuki Futamata

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

### Summary

To establish an ultimate Raman spectroscopy with single molecule sensitivity, we have studied the effect of sodium chloride salt, in particular the effect of various anion addition to silver nanoparticles, on which we recently found SERS and LSP resonances of cationic dye adsorbed Ag particles were activated by the particular anions. Among various anions, the  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  and  $\text{SCN}^-$  anions activated SERS of the coadsorbed dye while substituting residual a-carbon. It also caused notable redshift of the fluorescence peak of dye suggesting electronic interaction between adsorbates and Ag surfaces. In contrast,  $\text{CN}^-$  and  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  anions quenched the SERS according to their exclusive adsorption as evidenced by the CN (SERS) bands and XPS data. Furthermore, the activating anions provoked a marked blueshift of the coupled plasmon peak from 650 - 700 nm to 500 - 550 nm for a few closely -adjacent Ag particles, as well as for densely packed particles. This was expounded by slight increase of the gap size between the Ag particles by only 1nm on the basis of the theoretical simulations. It was ensured by the slight dissolution, oxidative etching, of the Ag particles. Consequently, negative charges on the Ag surface by partially remaining anions, and a slight increase of the gap size facilitated cationic dye molecules to adsorb on the nanoparticles, especially at the junction, providing pronounced SERS activity. We also found that specifically intense interaction between negatively charged Ag and R6G cationic dye evidenced by the formation of quite stable adjacent Ag nanoparticles in solution.