

塩化ナトリウムおよび関連する塩を用いた超高感度定量状態分析法の開発

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: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(SERS)分光の開発を目的とする。

(2)研究内容:塩化ナトリウムや関連する塩による色々な金属ナノ粒子系での SERS 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の確立を図る。

(3)得られた結果と考察

①目的分子の吸着や金属表面との電子的相互作用における塩化ナトリウムの役割:近接状態形成に伴い、銀ナノ粒子表面に吸着した色素の蛍光ピーク波長が、吸着分子の構造に依存してシフトすることを見いだした(発表論文 1)。このピーク波長シフトは、吸着分子と金属表面の電子的な相互作用による。②銀以外の金、銅、白金等の遷移金属系での塩化ナトリウムによる SERS 活性化:塩化ナトリウムは上記の銀ナノ粒子表面だけでなく、クエン酸還元法で形成した金ナノ粒子表面にも吸着し、表面残留物であるクエン酸及びその分解物を置換し、金表面に負電荷を与える。そのため、正の電荷を有する色素との静電的相互作用により、近接安定化することを初めて見出した。このとき近接金粒子のナノギャップに吸着した色素のラマン散乱が 10^8 - 10^9 倍増強する。この増強度は単一分子ラマン感度に相当するもので、NaCl を用いた超高感度状態分析法確立のために重要な発見である(発表論文 1-2, 学会発表 14 件)。③近接場分光装置を用いて、ナノ粒子表面での場所によるラマン増強度、吸着分子の電子状態の違いを測定:手法確立のために、従来の 10 倍高い効率の集光系を有する近接場ラマン顕微鏡を構築した。AFM 用カンチレバー先端に、銀薄膜を蒸着して試料基板側の金属ナノ構造の局在プラズモンとのカップリングを利用するギャップモードについて検討を進めた。その結果、局所電場計算で予測したとおり、p-偏光でのみ巨大ラマン増強度を得ることに成功した。この手法を近接場ラマン分光で利用するために、カンチレバー先端に溶液に分散した金属ナノ粒子を固定する方法について予備的に検討し、成功した。④幅広い化学種を超高感度検出する定量・状態分析法として確立:生体分子への適用を進め、4つの DNA 塩基を用いて金ナノ粒子を近接化し、 10^6 - 10^7 の巨大ラマン増強度を得ることができた。

文献

1. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115, 5271-5278.
2. T. Yajima, Y. Yu and M. Futamata, Physical Chemistry and Chemical Physics, 掲載確定、印刷中 (DOI:10.1039/c1cp00046b)

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、目的化学種—例えばカチオン性色素などが静電的に強く吸着するとともに、金属と吸着分子との間の電子的相互作用が活性化され、付加的な増強を与えることを見出した。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、超高感度で、定量的に状態分析できる手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侵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を期待される。

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。我々のこれまでの研究により、SERSの増強メカニズムに関して、局在プラズモンを制御するだけでは単一分子感度は実現できず、塩化ナトリウムの添加による電子的相互作用の活性化で初めて可能になることが判明した。この活性化のメカニズムを解明することは、SERSを超高感度分析法として確立するために極めて重要かつ必須の課題である。

そこで、本研究ではこの塩化ナトリウムによる表面増強ラマンの活性化メカニズムを詳しく解明する。具体的には、金属ナノ粒子やナノ構造基板を構築し、

- ①目的分子の吸着や、金属表面との電子的相互作用における塩化ナトリウムの役割を解明する。
- ②銀に加えて、金、銅、白金等の遷移金属系に適用し、

塩化ナトリウムによる SERS 活性化を確かめる。

- ③近接場分光装置を用いて、ナノ粒子表面での場所によるラマン増強度、吸着分子の電子状態の違いを測定する。これにより、局所的な塩化ナトリウムの働きの違いや活性化メカニズムを直接を解明する。
- ④この方法を、幅広い化学種を超高感度検出する定量・状態分析法として確立するために、増強メカニズムに基づいて超高感度 SERS 活性基板を形成する。さらに、基板表面電荷の制御により、DNA やタンパクなど幅広い目的分子を強く吸着させ、定量分析能を確かめる。

3. 得られた結果と考察

この研究では、まず 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、以下のように詳細に明らかにした。

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きわめて強い 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 3000 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—AgX₂-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 AgCl₂⁻ 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 $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ 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。

さらに、以下の結果を見いだした。

① 目的分子の吸着や金属表面との電子的相互作用における塩化ナトリウムの役割

近接状態形成に伴い、銀ナノ粒子表面に吸着した色素の蛍光ピーク波長が、トリフェニルメタン(TPM)系平面分子では 50-100 nm 長波長シフトするというように、吸着分子の構造に依存してシフトすることが判明した(発表論文 1)。詳細は解析中であるが、このピーク波長シフトは、吸着分子のアミノ基の非結合電子対と金属表面の配位結合形成の仕方・強さが異なることで、電子的な相互作用が異なるためと考えられる。このような蛍光シフトを分子構造や励起波長を変えて、詳しく解析することで、吸着分子の電子状態が、溶液中の自由な色素分子との違いを定量的に解析できるものと考えられる。

② 銀以外の金、銅、白金等の遷移金属系での塩化ナトリウムによる SERS 活性化

塩化ナトリウムは上記の銀ナノ粒子表面だけでなく、クエン酸還元法で形成した金ナノ粒子表面にも吸着し、表面残留物であるクエン酸及びその分解物を置換し、金表面に負電荷を与える。そのため、正の電荷を有するローダミンなどのキサントレン(Xanthene)系色素やクリスタルバイオレットなどのトリフェニルメタン(TPM)系色素との静電的相互作用により、近接安定化することを初めて見出した。金ナノ粒子の近接状態形成は、ナノ粒子の局在プラズモンのカップリングモードが 600-800 nm に観測されることで

証明した。しかも、このとき近接金粒子のナノギャップに吸着した色素のラマン散乱が 10^8 - 10^9 倍増強することを見いだした。この増強度は単一分子ラマン感度に相当するもので、NaCl を用いた超高感度状態分析法確立のために重要な発見である (Figs. 1-3, 外部発表論文 1-2, 学会発表 1-14)。

③近接場分光装置を用いて、ナノ粒子表面での場所によるラマン増強度、吸着分子の電子状態の違いを測定手法確立のために、倒立型顕微鏡、AFM (原子間力顕微鏡)、集光系、分光器からなる近接場ラマン顕微鏡を構築した。顕微鏡から分光器への効率的な集光系を構築した。近接場プローブで散乱された極微弱信号の 80-90% が分光器スリット (幅 $100 \mu\text{m}$) を通過し、検出器に到達することを確かめた。従来の 10 倍以上の高効率化を実現した。AFM 用カンチレバー先端に、銀薄膜を蒸着して試料基板側の金属ナノ構造の局在プラズモンとのカップリングを利用するギャップモードについて検討を進めた。その結果、局所電場計算で予測したとおり、p-偏光でのみ巨大ラマン増強度を得ることに成功した。この手法を近接場ラマン分光で利用するために、カンチレバー先端に溶液に分散した金属ナノ粒子を固定する方法について予備的に検

討し、成功した。

④幅広い化学種を超高感度検出する定量・状態分析法として確立

生体分子への適用を進めた。4つの DNA 塩基を用いて金ナノ粒子を近接化し、 10^6 - 10^7 の巨大ラマン増強度を得ることができた。これにより溶液中の 10^{-7} - 10^{-8} M の DNA 塩基を検出できた。4つの塩基のラマンスペクトルは、 700 - 750 cm^{-1} の ring breathing mode などのマーカーバンドにより、明瞭に区別できることを確かめた。

また、シリカナノ粒子 (直径 500 nm) をガラス基板上に単粒子層並べて、その上方から金属を真空蒸着して、金属ナノシェル構造のプラズモンを利用して高感度化を実現する金属オーバーレイ法について検討した。この時、金属薄膜の厚さ・表面粗さを制御することで 10^7 - 10^8 のラマン増強を得た。このオーバーレイ構造に、直径 20 - 30 nm の金及び銀ナノ粒子を添加することで、曲面上のギャップモードに利用により、付加的に 10 - 100 倍の増強を得た。このような SERS 基板形成により、基板上的場所に依らず、かつ再現性よく、幅広い化学種の巨大ラマン信号を得ることが可能になった。

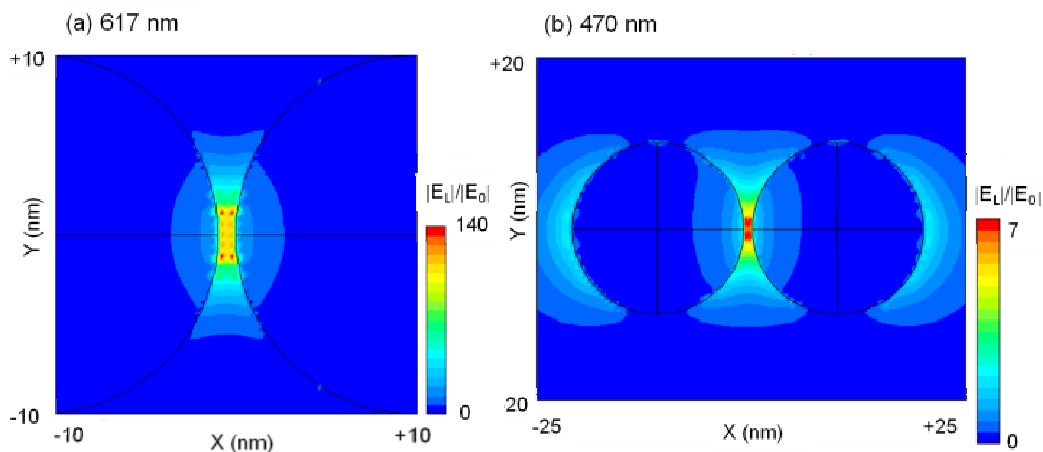


Fig. 1. Local electric field ($|E_L|/|E_0|$) distribution for closely adjacent AuNPs with a diameter of 20 nm and a gap size of 1 nm: (a) under the coupled LSP resonance at 617 nm and (b) at 470 nm (off-resonance). The plane wave at various wavelengths illuminated the AuNPs with polarization parallel to the interparticle axis. The amplitude enhancement of $|E_L|/|E_0|$, here $|E_L|$ and $|E_0|$ denote local electric field and incident field, is shown.

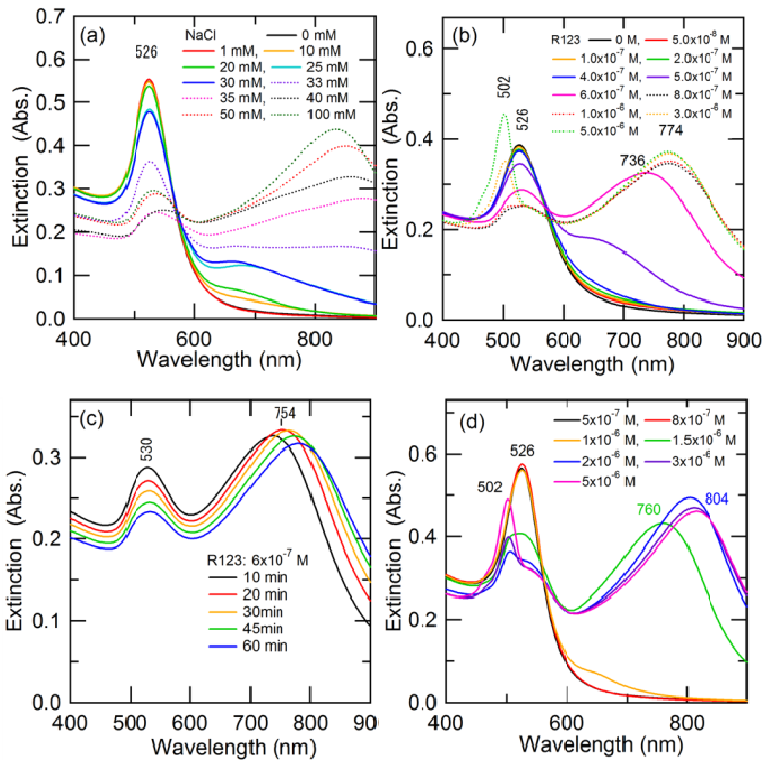


Fig. 2. Extinction spectra of mixed solutions: (a) of as-prepared AuNPs and NaCl (at different concentrations), (b) of as-prepared AuNPs, NaCl (8 mM) and R123⁺ cations (1×10^{-7} - 5×10^{-6} M), (c) time course of (b) at 6×10^{-7} M, (d) of as-prepared AuNPs and R123⁺ cations (5×10^{-7} - 5×10^{-6} M)

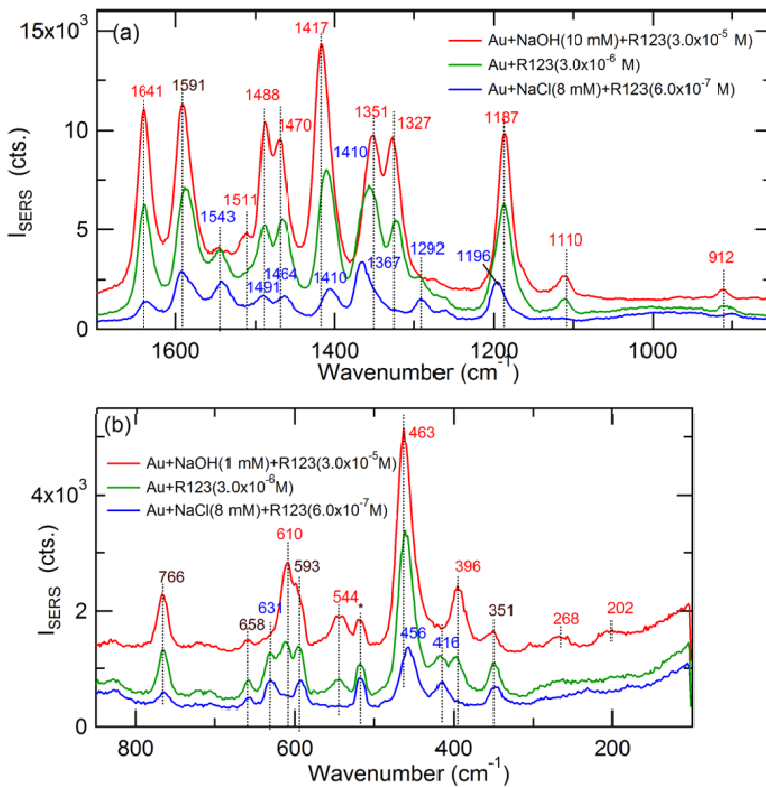


Fig. 3. Summary of SERS spectra of neutral R123 molecules on as-prepared AuNPs, cationic R123⁺ on as-prepared AuNPs, and cationic R123⁺ on Cl⁻-treated AuNPs. All the samples are in aqueous solutions. The wavenumbers in red and blue denote Raman bands from chemisorbed molecules and electrostatically adsorbed cations, respectively. Those in black are their overlapped peaks.

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、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進める。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、DNA 塩基以外のアミノ酸

やオリゴヌクレオチド、ペプチドへ適用し、性能を確認する必要がある。

2. ナノラマンイメージングを目指して、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る。

発表論文

1. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Elucidation of electrostatic interaction between cationic dyes and Ag nanoparticles generating enormous SERS enhancement in aqueous solution”, *Journal of Physical Chemistry C*, 2011, 115, 5271-5278.
2. T. Yajima, Y. Yu and M. Futamata, “Closely adjacent gold nanoparticles linked by chemisorption of neutral rhodamine 123 molecules providing enormous SERS intensity”, *Physical Chemistry and Chemical Physics*, 掲載確定、印刷中 (DOI:10.1039/c1cp00046b)

学会発表

1. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Closely adjacent silver and gold nanoparticles linked by chemisorption of neutral rhodamine 123 molecules providing enormous SERS intensity” (Invited), PACIFICHEM 2010, 2010.12.13., ホノルル(アメリカ合衆国)
2. M. Futamata, M. Danno, T. Yanatori, “Gap mode SERS towards analytical applications and near-field Raman Spectroscopy”, PACIFICHEM 2010, 2010.12.11., ホノルル(アメリカ合衆国)
3. M. Futamata, T. Kokubun, “Application of SERS using nanosphere overlayer method to biomolecules”, PACIFICHEM 2010, 2010.12.10., ホノルル(アメリカ合衆国)
4. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Closely adjacent Ag nanoparticles formed by cationic dyes yielding enormous SERS activity”, Gordon Research Conference, 2010.6.20., Colby College (U.S.A.)

5. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Closely adjacent Ag nanoparticles formed by cationic dyes yielding enormous SERS activity”, ASIANano2010, 2010.11.02., 日本科学未来館(東京)
6. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Closely adjacent Ag nanoparticles formed by cationic dyes yielding enormous SERS activity”, Nanophotonics 2010, 2010.06.04., つくば国際会議場(茨城)
7. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Closely adjacent Ag nanoparticles formed by cationic dyes yielding enormous SERS activity”, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010), 2010.09.22., 幕張メッセ国際会議場(千葉)
8. 二又政之、ユ エイエイ、谷島徹, “極微量カチオン性色素添加による金属ナノ粒子の近接安定化と SERS 活性”, ナノオプティクス研究グループ第 19 回研究討論会, 2010.7.15., 早稲田大学(東京)
9. 二又政之、ユ エイエイ、谷島徹, “金属ナノ粒子の静電的及び化学的相互作用による近接安定化と巨大ラマン散乱”, 日本分光学会顕微部会 2010 年シンポジウム, 2010.12.09., 東大理(東京)
10. 二又政之, “表面増強ラマン分光の基礎と現状・将来展望”(依頼講演), 日本学術振興会第 151 委員会平成 22 年度第 4 回研究会, 2011.1.31., 東大工(東京)
11. ユ エイエイ、谷島徹、二又政之, “銀ナノ粒子の色素分子による静電的相互作用による近接安定化と SERS 活性”, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.03.27., 神奈川大(神奈川)
12. 谷島徹、ユ エイエイ、二又政之, “金ナノ粒子の静電的および化学的相互作用による近接安定化と SERS 活性”, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.03.27., 神奈川大(神奈川)
13. 二又政之、谷島徹、ユ エイエイ, “金及び銀ナノ粒子の静電的及び化学的相互作用による近接安定化と SERS 活性化”, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.03.26., 神奈川大(神奈川)
14. 石橋孟士、團野真実、二又政之, “金属ナノ粒子を用いるチップ増強ラマン分光法”, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.03.28., 神奈川大(神奈川)

Highly-Sensitive Spectroscopic Analysis using Sodium Chloride and Related Salts

Masayuki Futamata

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

Summary

Addition of a trace quantity of cationic triphenyl methane (TPM⁺) dyes to isolated Ag nanoparticles in an aqueous solution yielded Ag flocculates composed of a few closely adjacent suspended nanoparticles. This change was evidenced by coupled LSP peaks emerged at 600-800 nm. However, neutral para-rosaniline molecules as well as neutral rhodamine 123 (R123) did not cause the Ag flocculation in contrast to their cations, indicating a crucial role of electrostatic interaction between cationic dyes and negatively charged Ag surfaces for the flocculation. Accordingly, cationic dye molecules are located in the nanogap between closely adjacent Ag nanoparticles which evoked enormous SERS intensity. The formation of the Ag flocculates was insensitive to steric hindrance by different amino groups in TPM dyes. This observation is consistent with dominant role of the electrostatic interaction. Nevertheless, distinct red shifts of fluorescence peaks were observed depending on the molecular structures such as coplanar and propeller phenyl rings, suggesting perturbed electronic states of TPM dyes upon adsorption through the amino groups.

Addition of neutral R123 molecules (10^{-7} M) to an as-prepared gold nanoparticles (AuNPs) suspension generated flocculates that are a small number of closely adjacent particles. Formation of AuNP flocculates were evidenced by the coupled localized plasmon peak at 720-750 nm. The AuNP flocculates provided pronounced SERS spectra of adsorbed neutral R123 molecules (SERS-A) as anticipated by FDTD (Finite Difference Time Domain) simulations. The observed SERS spectra are significantly different from those of cationic R123⁺ molecules (SERS-B), which electrostatically adsorbed on Cl⁻-treated AuNPs. The difference is not simply due to deprotonation but reflects a distinct difference in adsorption nature between neutral R123 and cationic R123⁺ molecules. Indeed neutral R123 molecules exclusively gave an Au-N stretching band at 202 cm⁻¹, showing the chemisorption on Au surfaces through lone pair electrons at the amino groups. The different adsorption nature is further evidenced by the observation that cationic R123⁺ molecules adsorbed on as-prepared AuNP flocculates gave both SERS-A and SERS-B spectra. Thus, the cationic R123⁺ molecules form the flocculates both by chemisorption and electrostatic adsorption owing to modest surface charge on as-prepared AuNPs.