

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様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 クエン酸還元法で形成した金及び銀ナノ粒子表面には、クエン酸アニオン、 α -カーボン、金属酸化物などの表面残留物が存在し、溶液中の分析対象の分子やイオンなどの化学種の吸着を、化学的に及び立体障害で妨害することが判明した。中性化した色素分子が、NaCl 処理した金表面にアミノ基で化学吸着し、巨大なラマン散乱を与えた。このとき、分子と金表面の電子的相互作用を観測することに成功した。

② 白金粒子／白金基板では SERS 活性は得られないが、銀粒子／白金基板は 10^8 - 10^9 のラマン増強度を与えることを計算及び実験により確かめた。

③ 銀ナノ粒子を NaCl 置換した後、AFM チップ先端に固定したプローブで、初めてチップ増強ラマンスペクトル測定に成功した。

④ DNA 塩基に適用し、アデニンとシトシンについて、金ナノ粒子の近接状態形成と巨大ラマン散乱測定に成功した。また、環境中の有害金属イオンを、表面修飾した金属ナノ粒子で高効率に捕捉し、環境水から除去する手法について、PMBA 単分子膜で修飾した銀ナノ粒子を用いて検討した。その結果、この PMBA-AgNP 孤立分散水溶液に、 Cs^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} などの金属イオンを添加すると、金属イオンとカルボキシレートアニオン間に静電的な引力相互作用が働き、AgNP は近接／凝集することが判明した。このとき、AgNP 間に存在する PMBA のラマンバンドが大きく増強された。同時に、AgNP に吸着した金属イオンを遠心分離や濾過により高効率で濃縮し、もとの試料溶液から除去することが可能であることを見いだした (1 Kg の AgNP で、溶液中の 1 mol の金属イオンを除去できる)。この手法により、金属イオンの水和状態の解析や重金属イオンの生体分子への影響について詳しい情報を得ることが可能である。

- 文献**
1. T. Yajima, Y. Yu, M. Futamata, Phys. Chem. Chem. Phys. 13, 12454-12462 (2011).
 2. T. Yajima, Y. Yu, M. Futamata, e-JSSNT, 受理済み、印刷中
 3. Y. Yu, T. Yajima, M. Futamata, Chemistry Letters, 投稿済み
 4. 二又 政之, 表面科学, 33, 216-222 (2012).

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・金属イオンなど

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ものである。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)」では、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。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、単一分子感度 SERS の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、巨大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を明らかにした。

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浸襲性診断用分析チップ開発のほか、河川や海水を含む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

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、以下のことが明らかになっている(申請書論文 1-28):溶液中に分散した金属ナノ粒子を扱う限り、目的分子や塩の添加等による凝集の効果が分離できないので詳細なメカニズムの議論はできていない。この問題点を解決するために、我々は Si 等の基板に APTMS(末端アミノ基の静電的相互作用により強く金属ナノ粒子を固定できるシランカップラ剤)を用いて金属、特に銀ナノ粒子を固定し、凝集やナノ粒子の拡散を完全に抑えた上で実験を行っている。その結果、以下の点が明らかになった。①単に基板上に固定した銀ナノ粒子に溶液中の目的色素を吸着させただけでは、小さなラマン信号しか得られない。②しかし、

塩化ナトリウムを溶液中から添加すると、銀ナノ粒子表面の残留物が塩化物イオンで置換され、銀表面は部分的に負電荷を持ち、ローダミンなどカチオン性色素は静電的に強く吸着できる。③このとき、銀表面と色素の間に強い電子的相互作用が誘起され、それが共鳴効果として働き、吸着色素のラマン散乱信号が付加的に 10^2 - 10^3 倍増強される。これにより近接銀ナノ粒子の局在プラズモンとあわせて 10^{10} の巨大な信号増強を与え、単一分子感度検出が可能になる。すなわち、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、銀や金のナノ粒子(10-50 nm 直径)や金属ナノ構造基板を構築し、

- ① 塩化ナトリウムの目的分子の吸着や、金属表面との電子的相互作用活性化における役割を解明する。
- ② 銀、金、銅に加えて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、解明した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

(1) 塩化ナトリウムの目的分子の吸着や、金属表面との電子的相互作用活性化における役割

クエン酸還元法で形成した金及び銀ナノ粒子表面には、クエン酸アニオン、 α -カーボン、金属酸化物などの表面残留物が存在し、溶液中の分析対象の分子やイオンなどの化学種の吸着を、化学的に及び立体障害で妨害すること

が判明した。実際に、銀ナノ粒子表面を塩化ナトリウムで処理しないとき、カチオン性色素も中性化色素も吸着しない。

また、中性化した色素分子も、NaCl 処理した金表面に、アミノ基の窒素で配位結合することで化学吸着し、巨大なラマン散乱を与えた。このとき、吸着色素分子のラマンスペクトルとは大きく異なり、分子と金表面の電子的相互作用を始めて明瞭に観測することに成功した(論文①, ②, ③)。分子軌道法による振動スペクトルの計算結果は、実測スペクトルとよく一致した。

(2) 銀、金、銅に加えて白金等の遷移金属系に適用したときの塩化ナトリウムによる SERS 活性化

白金ナノ粒子/白金基板系での SERS 活性はほぼ無視できるくらい小さいのに対して、銀ナノ粒子/白金基板系の SERS 活性は、金ナノ粒子/金基板系とほぼ同じ 10^8 - 10^9 のラマン増強度を与えることを、FDTD 計算及び実験により見いだした。このとき、銀基板表面は NaCl 置換することが、(1) で記したようにギャップモードによる SERS 活性化の必須条件である。この結果、白金のような減衰の大きな遷移金属系へのギャップモードラマン分光の適用性が確かめられた。

(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の測定

銀ナノ粒子を NaCl 置換した後、AFM チップ先端に 1 個固定し、近接場ラマン用プローブとして用いる手法について、詳細な実験的検討及び FDTD 法による最適構造設

計を行い、チップ増強ラマンスペクトル測定に成功した。今後さらに安定な固定法を確立し、サイズの決まった金または銀ナノ粒子を用いることで、ギャップモード共鳴条件を常に一定にすることができる。それにより、容易に巨大なラマン増強(10^8 - 10^9)と 4-5 nm の空間分解能を得ることが可能になると期待できる。これまでの蒸着膜プローブ性能を大幅に改善できる可能性が出てきた。

(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

DNA 塩基に適用し、アデニンとシトシンについて、金ナノ粒子の近接状態形成と巨大ラマン散乱測定に成功した(図 1)。また、環境中の有害金属イオン(例えば、 $^{137}\text{Cs}^+$ 、 $^{90}\text{Sr}^{2+}$ 等の半減期の長い放射性金属や Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} などの人体に悪影響を与える重金属イオン)を、表面修飾した金属ナノ粒子で高効率に捕捉し、環境水から除去する手法について検討した。ここでは、PMBA (p-メルカプト安息香酸) 単分子膜を銀ナノ粒子(AgNP) 表面に自己組織化的に形成し用いた。この PMBA 分子は、 HOOC-Ph-SH (Ph=フェニル基) の構造を持ち、-SH が解離し-S-Ag 共有結合形成することで、自己組織化的に AgNP、AuNP 表面に単分子膜を形成する。中性 pH 水溶液では、溶液側に向けた PMBA のカルボキシル基がプロトン解離し、カルボキシレートアニオン(-COO⁻)となる(図 2-1)。このため、AgNP 間には、負電荷同士の静電反発が働き、孤立分散している。この AgNP 分散水溶液に、上記の Cs^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} などの金属イオンを添加すると、正電荷をもつ金属イオンと負電荷のカルボキシレートアニオン間に静電的な引力相互作用が働き、AgNP は近接安定化ま

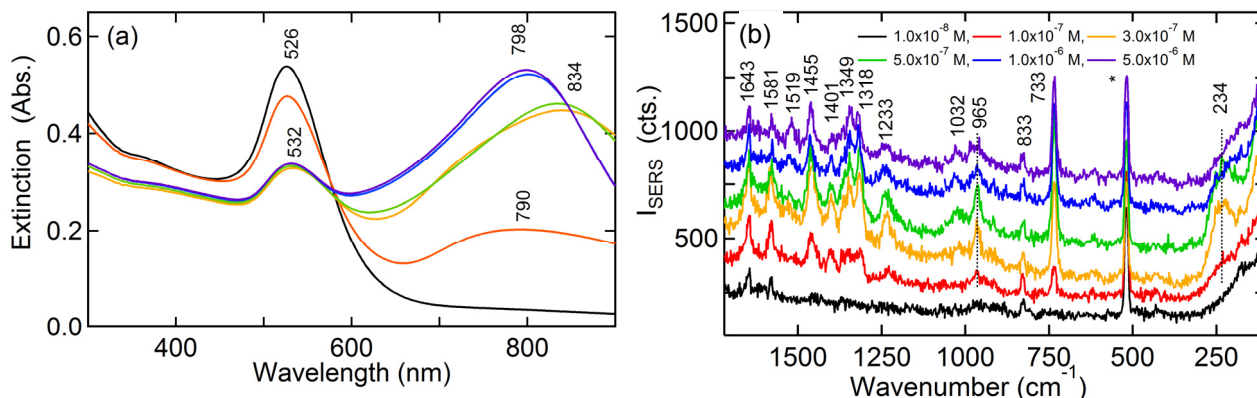


図 1. DNA 塩基添加による AuNP の近接状態形成(a)と SERS 活性化(b)

1. PMBA単分子層吸着したAgNPは溶液中で孤立分散
 $\text{pH} > \text{pKa}$ なのでプロトン解離した $-\text{COO}^-$ の負電荷のため

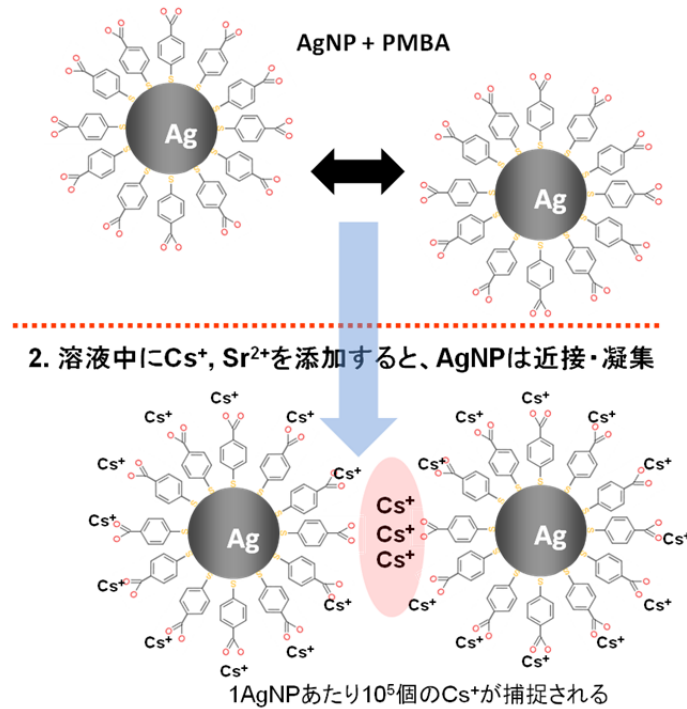


図 2. AgNP の PMBA 単分子膜形成による孤立分散(1)と Cs^+ など金属イオン添加による AgNP の近接状態形成(2)

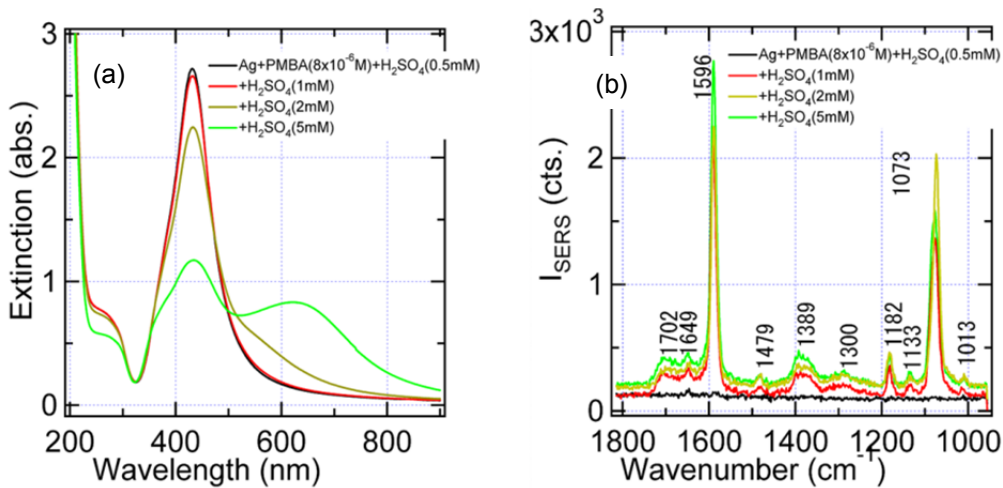


図 3. AgNP の PMBA 単分子膜形成による孤立分散(a)と Cs^+ など金属イオン添加による AgNP の近接状態形成 (a)及びそれに伴うラマン信号増強(b)

たは凝集することが判明した(図 2-2, 文献④)。このとき、AgNP 間に存在する PMBA のラマンバンドが大きく増強された(図 3)。この手法では、AgNP 表面に PMBA アニオンと同数の正電荷が集積する。厳密には熱運動と表面電荷の両方で決まる電気二重層を金属イオンが形成する。こ

の凝集した AgNP を、遠心分離することで、さらに AgNP と共に、金属イオンを濃縮し、もとの試料溶液から除去することが可能であることを見いだした(1 Kg の AgNP で、溶液中の 1 mol の金属イオンを除去できる)。さらに、この手法によると、 Li^+ , H^+ と Na^+ , K^+ , Cs^+ とでは、AgNP の近接状

1-1表面修飾分子

生体分子を含む色々な分子をチオール化することでAgNP, AuNPに共有結合形成

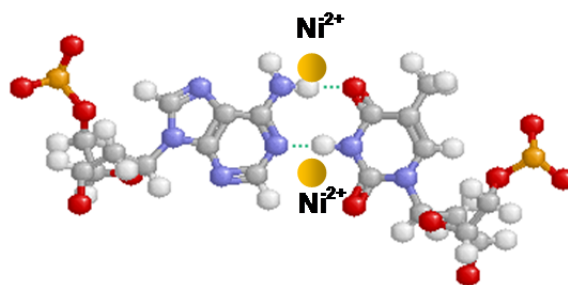
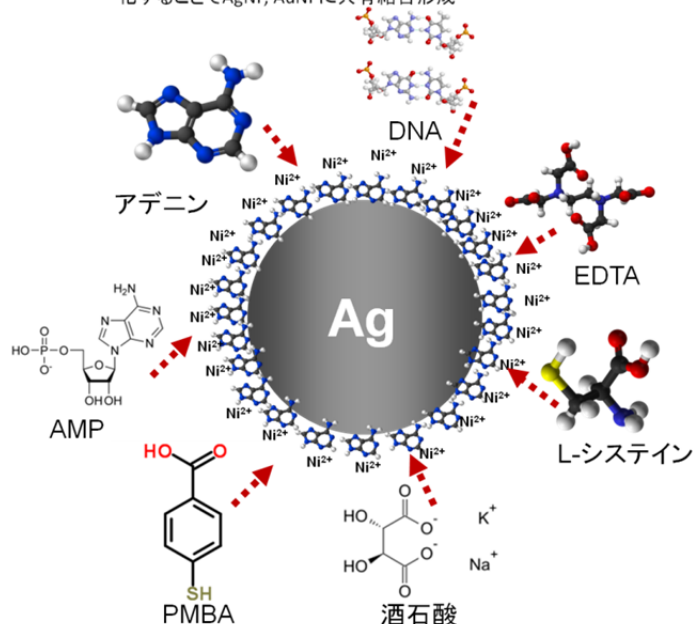


図4. AgNP 表面へのチオール化した生体分子固定と、重金属イオン添加(左)による AgNP の近接状態形成・および SERS 活性化による、相互作用解析(模式図, 右)

態形成に大きな違いがあり、 Li^+ 、 H^+ では近接状態を全く形成しない。これは、 Li^+ 、 H^+ のイオン半径が 0.06 nm 以下と極端に小さく、4 分子の緊密な第一層水和層を持つために、その外側第二層でアニオンと相互作用する時、自分自身(Li^+ 、 Cs^+)の正電荷の遮蔽が大きいため($<1/4$)、負電荷を持った AgNP を捕捉できないためと考えられる。従来の分析法では、こうした水和による電荷の遮蔽に関する直接測定は、困難であった。この結果は、金属イオンの水和状態の解析や、重金属と生体分子との相互作用解析に、NaCl 置換した金属ナノ粒子が利用できることを示唆している(図4)。

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の確立

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。DNA やタンパクと重金属イオンの相互作用の解析、放射性金属イオンなど有毒金属イオンの効率的捕捉について検討を進め、手法の実用性を確認

する。

(2) ナノラマンイメージングの確立

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。1 個の金属ナノ粒子の固定法、及びチップの化学的処理による蒸着膜の形状制御により、金属ナノ粒子形状を制御し、 10^8 - 10^9 のラマン増強度と、4-5 nm 以下の空間分解能の実現を図る。

文献等

(1) 論文発表

① 投稿雑誌(巻・号・頁)名: Phys. Chem. Chem. Phys. 13, 12454-12462 (2011).

題目: (和文) 中性化 R123 分子により近接した金ナノ粒子の巨大ラマン散乱

(英文) Closely adjacent gold nanoparticles linked by chemisorption of neutral rhodamine 123 molecules providing enormous SERS intensity

著者 T. Yajima, Y. Yingying, M. Futamata*

② 投稿雑誌(巻・号・頁)名:e-JSSNT(Electronic Journal of Surface Science and Nano Technology) 2012年1月31日投稿、受理済み、印刷中

題目:(和文)カチオン性及び中性化クレシルバイオレットを用いた金ナノ粒子の近接安定化と SERS 活性化
(英文) Flocculation and SERS activation of Au nanoparticles using cationic and neutral cresyl violet molecules

著者 T. Yajima, Y. Yingying, M. Futamata*

③ 投稿雑誌(巻・号・頁)名:表面科学, 33, 216-222 (2012).

題目:(和文)表面増強ラマン散乱
(英文) Surface Enhanced Raman Scattering

著者 二又 政之*

④ 投稿雑誌(巻・号・頁)名:Chemistry Letters 2012年3月31日投稿済み。

題目:(和文)プロトン付加及びプロトン解離した p-メルカプト安息香酸を用いた銀ナノ粒子の近接安定化と SERS 活性化
(英文) Flocculation of Ag nanoparticles for SERS activation using protonated and deprotonated p-mercaptobenzoic acid

著者 Y. Yingying, M. Futamata*

(2) 学会発表

[学会発表] 計(14)件 うち招待講演 計(1)件

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”, The 3rd Asian Spectroscopy Conference, Xiamen (中国), 2011.11.28.
2. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Elucidation of electrostatic and chemical interaction between distinct adsorbates and Ag nanoparticles for enormous SERS enhancement”, The 3rd Asian Spectroscopy Conference, Xiamen (中国), 2011.11.28.
3. M. Futamata, Y. Yu, T. Yajima, “Closely adjacent silver and gold nanoparticles linked by chemisorption of neutral rhodamine 123 molecules providing enormous SERS intensity”, International Symposium on Surface Science (ISSS-6), 船堀タワーホール(東京), 2011.12.11.
4. 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”, 2011年コロイドおよび界面化学討論会, 京都大学(京都), 2011.09.07.
5. 二又 政之, “表面増強ラマン散乱 —単一分子感度検出の基礎と現状・将来展望—”, 平成 23 年度日本分光学会夏期セミナー(依頼講演), 幕張メッセ(東京), 2011.09.09.
6. 二又 政之, 谷島徹, ユ エイエイ, “金属ナノ粒子の近接安定化と巨大 SERS 活性”, 平成 23 年度日本分光学会年会, 東京工業大学(東京), 2011.12.02.
7. 谷島徹, ユ エイエイ, 二又 政之, “色素吸着を用いた金ナノ粒子の近接安定化と SERS 活性”, 平成23年度日本分光学会年会, 東京工業大学(東京), 2011.12.02.
8. ユ エイエイ, 谷島徹, 二又 政之, “銀ナノ粒子と色々な吸着分子との相互作用”, 平成 23 年度日本分光学会年会, 東京工業大学(東京), 2011.12.02.
9. 二又 政之, 谷島徹, ユ エイエイ, “金属ナノ粒子の近接安定化と巨大 SERS 活性”, 平成 23 年分子科学討論会, 北海道大学(札幌), 2011.09.19.
10. 谷島徹, ユ エイエイ, 二又 政之, “色素吸着を用いた金ナノ粒子の近接安定化と SERS 活性”, 平成23年分子科学討論会, 北海道大学(札幌), 2011.09.19.
11. ユ エイエイ, 谷島徹, 二又 政之, “銀ナノ粒子と色々な吸着分子との相互作用”, 平成 23 年分子科学討論会, 北海道大学(札幌), 2011.09.19.
12. 谷島徹, ユ エイエイ, 二又 政之, “DNA 塩基を用いた金属ナノ粒子の近接安定化と SERS 活性”, 日本化学会第 92 春季年会, 慶応大(神奈川), 2012.3.27.
13. ユ エイエイ, 谷島徹, 二又 政之, “共有結合を利用した AgNP の近接安定化と SERS 活性”, 日本化学会第 92 春季年会, 慶應義塾大学(神奈川), 2012.3.26.
14. 石橋孟士, 二又 政之, “近接場ラマン分光のためのギャップモードプラズモンによる電場増強”, 日本化学会第 92 春季年会, 慶應義塾大学(神奈川), 2012.3.28.

Highly-Sensitive Spectroscopic Analysis Using Sodium Chloride and Related Salts

Masayuki Futamata

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

Summary

Attainment of enormous enhancement with high reproducibility is crucial and challenging for the utilization of SERS in quantitative analysis. Concerning this, we have succeeded in linking AgNPs by cationic rhodamine molecules, which yields SERS enhancement of $\sim 10^9$. Here, the flocculation is applied to DNA bases in addition to cationic and neutral rhodamine molecules on AuNPs to characterize their adsorbed state. The adsorption of DNA bases as well as rhodamine 6G (R6G) molecules induced flocculates of Au nanoparticles (AuNPs), a few closely adjacent AuNPs providing enormously enhanced Raman scattering. DNA bases chemisorb on Au surfaces via lone pair electrons at amino groups as evidenced by $\nu_{\text{Au-N}}$ stretching mode at $\sim 220 \text{ cm}^{-1}$, whereas cationic R6G molecules physisorb using electrostatic interaction between positively charged amino groups and negatively charged Au surfaces.

The flocculation is also applied to PMBA molecules on AgNPs, which are often used in SERS study, to prove its relevance as a highly-sensitive analytical tool. We elucidate the dissociation of a carboxylic group in PMBA on AgNPs using SERS spectra as a function of pH and surface coverage of PMBA. The flocculates of Ag nanoparticles (AgNPs) were formed using p-mercaptobenzoic acid (PMBA) to utilize enhanced electric field in surface enhanced Raman scattering (SERS). Electrostatic interaction between dissociated PMBAs and hydrated counter ions like Na^+ and H^+ , as well as van der Waals force between protonated PMBAs on neighboring AgNPs plays a crucial role in the flocculation of AgNPs. Also dissociation of PMBA on Ag surfaces is determined not only by pH in the solutions but also by the surface coverage of PMBA. Indeed, SERS spectra from both dissociated and protonated PMBA molecules were observed even in quite acidic solutions. In all of these experiments, NaCl addition to AuNP and AgNP is crucial to replace surface residuals such as citrate, α -carbon and metal oxide for efficient adsorption of target molecules or ions in solution. Consequently, NaCl addition to metal nanoparticles is quite useful to establish single molecule SERS, which is promising to characterize distinct hydration of various metal ions or to elucidate interaction of metal ions with biomolecules.