

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	凍結表面増強ラマン散乱。高感度で定量的なSERS 測定へのアプローチ
Title(English)	Freeze Surface Enhanced Raman Scattering. An Approach to Highly Sensitive and Quantitative SERS Measurements
著者(和文)	福永悠
Author(English)	Yu Fukunaga
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12646号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:福原 学,岡田 哲男,火原 彰秀,河野 正規,大島 康裕,西野 智昭
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12646号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

学生氏名：福永 悠

博士論文題目

Freeze Surface Enhanced Raman Scattering.

An Approach to Highly Sensitive and Quantitative SERS Measurements

【緒言】

ラマン分光は分子の構造や配向、相互作用などの多岐に及ぶ情報を与え、環境、生体分析など多様な分野で重要な役割を果たしている。しかし、検出感度が低く、適用できる試料や測定系が限定的である。ラマン分光を高感度化する手法として表面増強ラマン散乱(SERS)が知られている。SERS は金属の表面プラズモン共鳴(SPR)による電場を利用することでラマン信号を 10^4 - 10^{12} 倍増強できる。SERS 計測には金属表面の粗さや金属ナノ粒子の凝集が必要である。これまでに高度に制御された基板やナノ粒子が提案されているが、複雑で調製困難なものが多い。また、金属表面間の距離などに依存して計測毎に SERS 強度が変動するため、定量性が低いという課題がある。これらの理由から SERS の汎用性は低く、有用な実用例は限られている。

本研究は簡便で高感度な SERS 計測を行う手法として、凍結に着目した。塩や糖、アルコールなど凍結保護剤の水溶液を凍結すると溶質は氷結晶から排除され、氷結晶粒界に液相(FCS)として濃縮される。凍結によりナノ粒子を FCS に濃縮し凝集を促すことで、簡便に SERS に適した状況を作り出せると考え、(1)凍結による銀ナノ粒子(AgNP)の凝集制御と高感度な SERS 計測を試みた。その結果、凍結により SERS の試料調製を簡便化し、ラマン分光を高感度化できることを明らかにした。一方、凍結は課題の一つである定量性の低さを改善できなかった。そこで、内部標準を利用した(2)凍結 SERS による核酸塩基のレシオメトリーや(3)SERS 強度分布の統計解析を行った。これにより、定量的な SERS 計測が可能であることを示した。このように、SERS の課題を克服したため、これまでラマン分光が適用できなかった場面に本研究の適用が可能になった。その例として、本アプローチを(4)薄層クロマトグラフィーの検出、(5)不凍金属ナノ粒子の機構評価に適用することに成功した。ここでは、主に(1), (2), (3), (4)について述べる。

【凍結による AgNP の凝集制御と高感度な SERS 計測】

凍結前後の AgNP の凝集状態を評価するために、凍結融解前後の AgNP の UV-Vis スペクトルを測定した。凍結保護剤に NaCl を用いて凍結すると濃度に依らず AgNP は凝集した。これは凍結濃縮によって FCS 内のイオン強度が極端に増加し、粒子間の反発が弱まったためであると考えられる。一方、中性凍結保護剤であるグリセリンやショ糖を用いて凍結する

とその初期濃度が低いほど AgNP は顕著に凝集した。FCS 内の AgNP 濃度を AgNP の凝集率に対してプロットした結果、中性凍結保護剤を用いた場合、その種類や温度に依らず FCS 内の AgNP 濃度が 20 nM 以下のときには凝集はほとんど起こらず、30 nM より高くなったときに AgNP が凝集することがわかった。これらの結果から AgNP は凍結濃縮により臨界凝集濃度に達したときに凝集すると考えられる。この系の臨界凝集濃度は 35 nM であった。

凍結により AgNP の凝集を制御できることがわかったため、次に 10 nM のクリスタルバイオレット(CV)を試料に用いて高感度化原理の実証を行った。図 1(a)に凍結保護剤グリセリン、ショ糖、NaCl を加えて凍結した際の凍結保護剤ごとの CV の SERS スペクトルを示す。未凍結時には SERS スペクトルは確認できなかったが、凍結により十分なシグナル強度が得られた。次に、FCS 内の AgNP 濃度と増強度(EF)の関係を(b)に示す。EF は CV のラマン強度 I_{Raman} と SERS 強度 I_{SERS} および計測時の濃度から算出した。中性凍結保護剤を加えて凍結した場合、凍結保護剤の種類に依らず FCS 内の AgNP 濃度に対して同様の変化を示した。FCS 内の AgNP 濃度が臨界凝集濃度に近づくほど SERS 強度は高くなり、38 nM のときに感度は極大となった。このとき、EF は 1.3×10^6 であった。また、FCS 内の AgNP 濃度が 38 nM を超えると AgNP が自己凝集し、また、SPR 特性が変化するため感度はむしろ低くなった。NaCl を凍結保護剤に用いたときも、AgNP が同様に凝集するため SERS 強度は低くなった。これらの結果から凍結によるラマン分光の高感度化において、塩よりも中性凍結保護剤が有用であり、また凍結濃縮により SERS に適する凝集状態を実現できることが明らかになった。

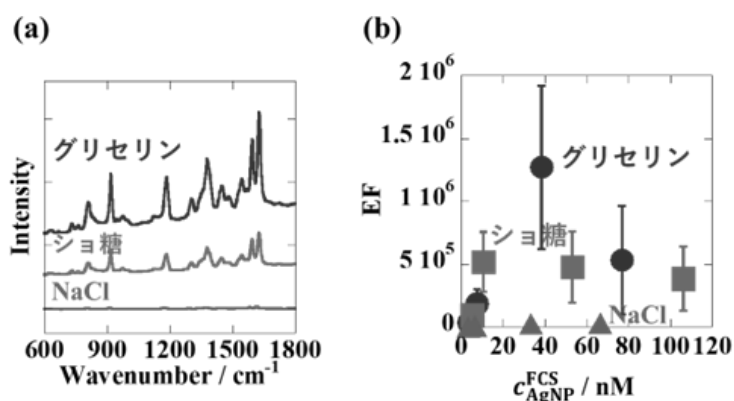


図 1 (a) CV の凍結 SERS スペクトル、(b) FCS 内 AgNP 濃度と EF の関係

【凍結 SERS による核酸塩基のレシオメトリー】

凍結によるラマン分光の高感度を実現したが、図 1(b)のエラーバーに示すように、凍結 SERS 強度の再現性は低く(相対標準偏差 30-50%)、再現性に課題が残った。そこで、DNA 核酸塩基 4 種類を同時計測し、それらを相互に内部標準として利用したレシオメトリーを行った。これによって、SERS 強度の再現性を改善し、凍結 SERS の定量性を向上させることを目的とした。

4 種類の DNA 核酸塩基混合試料はスペクトル分離後の SERS 強度の相対標準偏差が 50 % を越える場合もあり、計測毎に大きく強度変動した。しかし、スペクトル分離後、チミンを

内部標準と見なして他の3種類の塩基について相対強度を求めた結果、相対標準偏差は10-20%程度に減少した。よって、SERSの相対強度を取ることでSERSに伴う強度変動を改善できることが示唆された。図2に得られた相対強度と相対濃度の関係を丸プロットで示す。いずれもプロットは散乱し、線形性は確認できなかった。核酸塩基混合系では核酸塩基が互いに相互作用し、競争的な吸着の促進や阻害が起こるため、各塩基の濃度によりSERS強度が変動したと考えられる。そこで、重回帰分析を行い、吸着に対する核酸塩基間の影響の補正を行った。図2における三角のプロットに重回帰分析の結果を示す。全ての核酸塩基に関して、チミンを標準とした相対濃度と相対強度に良好な線形関係が得られた。以上のように、相互内部標準物質を利用するレシオメトリーにより、SERS強度の再現性を改善し、凍結SERSの定量的利用が可能であることを示した。

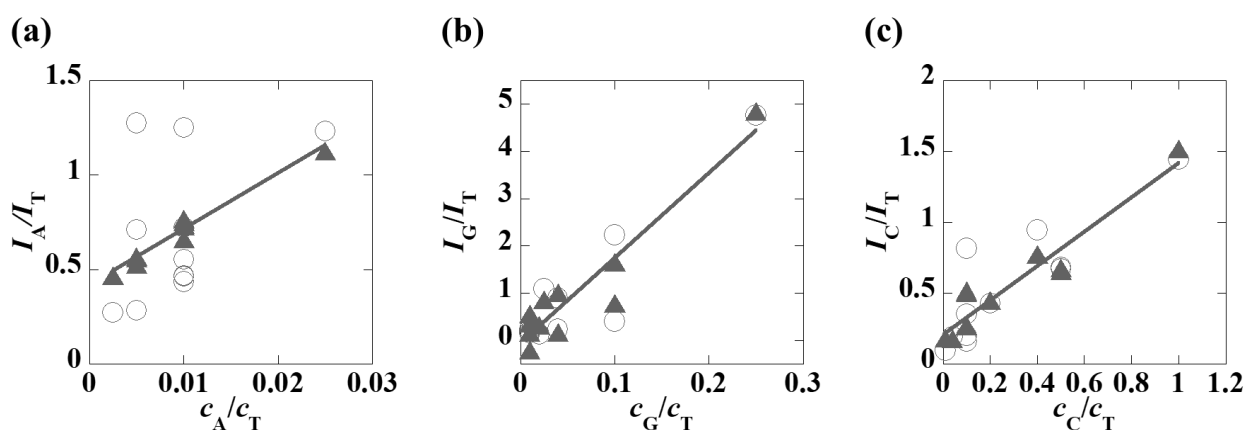


図2 チミンに対する(a)アデニン、(b)グアニン、(c)シトシンの相対濃度、相対 SERS 強度の関係

【SERS 強度の統計解析による定量計測】

0.5-500 μM のアデニンについて、各濃度 500-2000 の未凍結の SERS スペクトルを計測した。図 3(a)に 50 μM アデニンの SID を示す。SERS 強度は計測毎に変動(相対標準偏差 31.5%)し、SID は右側に広い分布を持つ歪んだガウス分布を示した。SERS 強度変動の要因として、増強電場内の標的分子数、金属ナノ粒子の粒子間距離やクラスターサイズ、プラズモン熱などが挙げられる。これら確率論的事象の中で、粒子間距離の減少やナノ粒子のクラスターサイズの増加は SERS 強度を指数関数的に増加させる。よって、SID は指数関数で畳み込んだガウス関数(EMGF)で表現できると考えた。SID を EMGF によりフィッティングした結果、元の分布とよく一致する曲線が得られた。このとき、(b)に示すように、フィッティングによって得られた SID の中央値(μ)は 10-75 μM までの濃度域でアデニン濃度に相関した。すなわち、SID を統計解析することにより、平均強度に基づく通常法に比べて SERS の定量性を大幅に向上できることがわかった。一方、0.5-7.5 μM の低濃度域では μ と濃度の間に相関は見られなかった。低濃度域の試料でも確率論的に検出できるイベントは出現するが、そのようなマイナーなイベントをフィッティングに反映することはできなかった。これらマイナーなイベントの検出確率と濃度を比較した結果を図 3(c)に示す。検出確率は 2.5 μM -15 μM の

領域で濃度に対して相関した。このアプローチにより低濃度域の定量は可能であるが、適用可能な濃度域は狭く、 $2.5\ \mu\text{M}$ 未満の濃度に関しては検出確率と濃度には相関が得られなかった。そこで、低濃度域でのマイナーイベントの頻度の変化を相補誤差関数により表すことで強調し、SID の標準偏差を補正した。その結果、(d)に示すように補正した標準偏差と濃度に相関が得られた。これらの結果から、確率論的に出現するマイナーイベントを種々の方法で拾い上げることで、定量範囲を低濃度領域に拡張できることを明らかにした。同様の統計解析を凍結 SERS に適用した結果、凍結により定量可能な濃度域を 1000 倍程度低くすることができ、nM 範囲でアデニンを定量できることが示された。

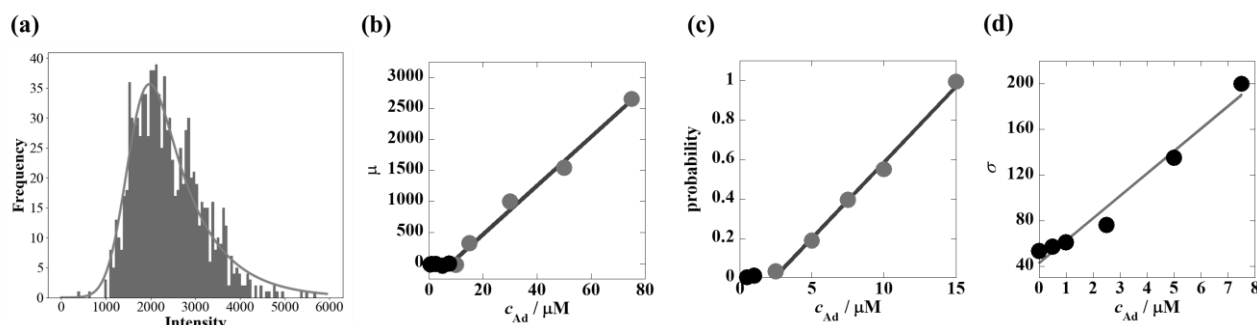


図 3 (a) $50\ \mu\text{M}$ アデニン 1000 スペクトルの SID、(b) μ とアデニン濃度の関係、(c) アデニンの検出確率と濃度の関係、(d) アデニン濃度と相補誤差関数により補正した σ の関係

【凍結 SERS 検出薄層クロマトグラフィー】

簡便で汎用性が高い分離法として薄層クロマトグラフィー(TLC)が有機合成の反応経過観察や医薬品の純度試験など様々な分野で定性分析に用いられる。しかし、分離後試料は保持係数(R_f 値)に基づいて同定されるため、構造情報は皆無である。そのため、詳細な構造評価には試料を TLC から抽出し、NMR や質量分析などによるさらなる分析が必要である。ラマン分光は試料の構造情報を与えるが、感度が TLC の検出に求められるものより低いため適用が困難である。そこで、凍結 SERS を TLC の検出に用いることで、試料の分離と簡便な高感度検出・構造解析を行った。

微量分析の需要の高い農薬チアベンダゾールとイミダクロプミド混合試料を TLC により分離した。分離後の各スポットの凍結 SERS スペクトルを計測した結果を図 4(a)に示す。各スポットにおいて明確な SERS スペクトルが得られ、 $R_f=0.83$ と 0.73 のスポットは、それぞれチアベンダゾール、イミダクロプミドと識別された。凍結 SERS により $100\ \text{nM}$ チアベンダゾールの検出が可能であり、凍結により TLC 上の試料の検出可能濃度域を 1000 倍程度向上できた。しかし、凍結 SERS の強度再現性は低く、定量性に課題が残った。(b)にチアベンダゾールの濃度と強度の関係を示す。プロットは散乱しており、線形性は確認できなかった。そこで、内部標準物質にアデニンを加え、チアベンダゾールの強度をアデニンの強度で補正した。その結果、(c)に示すように、濃度とアデニンに対する相対強度間に良好な線形関係が得られ、本手法の定量的利用が可能になった。実試料への応用例として、4 つの重要な有機合成の反応追跡に本手法を適用した。類似した構造を持つ副生成物が存在する場合でも、目的物を明確に同定できた。また、反応を速度解析し、反応終了時間を定量的に決定できる

ことが示された。

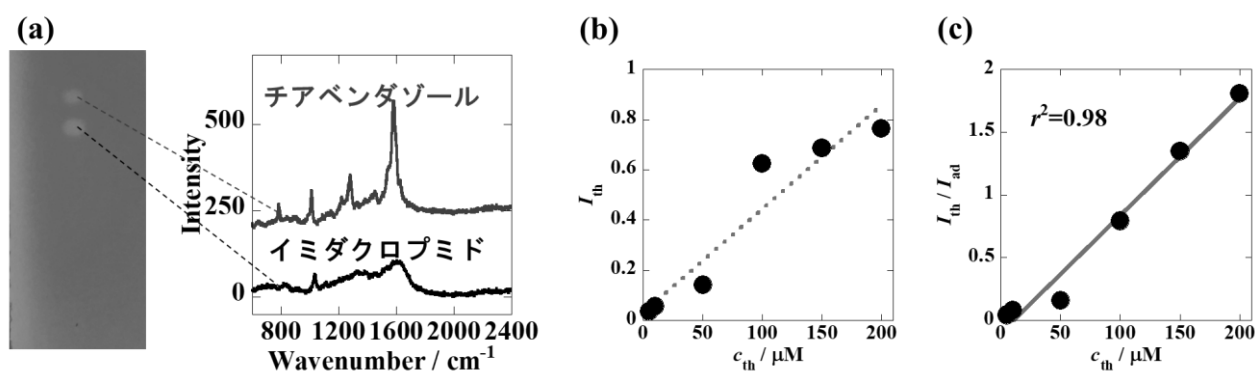


図 4 (a) 1 mM 農薬混合試料分離後の TLC プレートと各スポットにおける凍結 SERS スペクトル、(b) チアベンダゾール濃度と強度の関係、(c) チアベンダゾール濃度とアデニンを内部標準としたときの強度の関係