局在プラズモンを利用した単一分子ラマン観察

二又 政之¹, 丸山 芳弘²

¹産業技術総合研究所 (〒305-8562 茨城県つくば市東1-1-1中央4)

²浜松ホトニクス(株) 筑波研究所 (〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-9-2)

Single Molecule Characterization with Raman Scattering Using Localized Surface Plasmon

Masayuki FUTAMATA¹ and Yoshihiro MARUYAMA²

¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 4, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8562

²Tsukuba Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K., 5-9-2 Tokodai, Tsukuba, Ibaraki 300-2635

(Received September 5, 2005)

Enormous SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) signal from dye on hot or blinking silver nanoparticles is extinguished by duration of measurement possibly due to thermal diffusion or desorption of adsorbed molecules. Simultaneously, elastic scattering peak at ca. 630 nm disappeared. Three-dimensional Finite Difference Time Domain (FDTD-3D) method manifests this scattering peak originates from enhanced coupling of localized surface plasmon (LSP) on adjacent Ag particles through absorption of adspecies located at their junction. Distinct emission peaks were observed at 550-600 nm and 600-750 nm. Based on the spectral variations for different surface coverage and for different dye species, the shorter and longer wavelength peaks were attributed to excited electron on metal, and from fluorescence of molecules, respectively. Furthermore, we found the shorter wavelength peak shows invariant Stokes shift irrespective of excitation wavelengths, indicating it arises from inelastic scattering of excited electron by surface roughness or by adsorbed molecules.

Key Words: Localized surface plasmon, Surface enhanced Raman scattering, Single molecule detection

1. はじめに

固液界面にin situで適用できるラマン分光法では、分子の存在状態(構造・配向性・周囲の化学種との相互作用)についての情報が得られる。このため、ナノ材料分析、触媒反応解析、グルコースセンサなどバイオ系の高感度分析などに幅広く適用されている。しかし、もともと単一分子感度を有する蛍光分光と比べて、古典的なラマン分光法では散乱断面積はおおよそ 10^{-14} も小さく、微量分析は一般に困難である。そのために30年ほど前から知られている「粗い金属表面に吸着した化学種のラマン散乱が 10^4 - 10^6 倍増強する」という表面増強ラマン効果(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)^{1,2)}が利用されている。増強メカニズムとしては、①金属の局在表面プラズモン(Localized Surface Plasmon, LSP)が入射光により励起されたときに形成される巨大な電場(電磁気学的増強)、及び②金属表面と吸着種との間の電子移動相互作用による共鳴効果(化学的増強)が指摘されている。どちらのメカニズムでも、金属表面形状にラマン散乱の増強度が大きく依存する。従来は、いろいろな形状やサイズの粗さを持つ金属表面や金属粒子からの信号を統計平均として検出していたが、最近の走査型プローブ顕微鏡やCCDなどの高感度光検出器

の発達により、最適な形状を有する粒子のみからの信号を検出することで、単一分子検出が現実的になってきた³⁻⁷⁾。ただし、逆説的であるが単一分子感度ラマン分光法の確立は、①金属ナノ構造表面に1個の分子が吸着していることを直接証明する方法がないこと、あるいは②実験的な不安定さ、繰り返し測定の困難さなどから容易な仕事ではない。ここでは、我々のグループで最近得られた結果を中心に将来展望を含めて解説する⁷⁻¹⁴⁾。

2. 単一分子感度ラマンのための接合部の重要性

2.1 Blinkingとそのオリジン

Fig. 1に単一分子感度ラマン分光のための顕微鏡・レーザー・白色光源・CCDカメラ・ポリクロメータからなる測定装置を示す。一般に化学還元法で調製された種々の形状・サイズを持つ金属ナノ粒子が、ガラスやシリコン表面に固定され、SERS基板として用いられている。形成された粒子は塩化物イオンで表面を置換したのち、カチオン性色素などを静電的に吸着させて試料とする。色素分子がよく用いられる理由は、可視部に電子吸収を持つために励起光による共鳴効果を利用することで、他の一般的な分子に比べて 10^4 程度の付加的な増強が得られるか

Fig. 1 Facility for single molecule Raman spectroscopy. Elastic scattering image or spectra of the R6G/Ag nanoparticles were measured with a Xe lamp, CCD camera and polychromator. Raman images and spectra were measured using Ar⁺ laser under external or back scattering geometries.

らである。レーザー光は、外部反射 (Fig. 1②) または対物レンズを通した後方散乱配置 (同③) で試料に照射され、顕微鏡上の CCD カメラによりラマンイメージ、または分光器 (Polychromator) を通してラマンスペクトルが測定される。同様にして Xe ランプなどの白色光の暗視野照明 (①) により弾性散乱イメージ及びそのスペクトルが得られる。試料基板上的のマーカを利用して、個々の金属ナノ粒子の分光特性と AFM (原子間力顕微鏡) によるナノスケールの構造とが対応づけられる。このとき、金属ナノ粒子 1 個あたりの吸着色素分子数を下げていくと、多くの粒子のうちごく一部が強い SERS 信号を与えることがわかる (Fig. 2 (b) 及び 2 (a), (c), (d) の矢印)。これらの hot particle は、いずれも金属ナノ粒子接合体であり、接合軸に平行な偏光を照射したときのみ巨大な SERS 信号を与える。また、被覆率が数 10 分子/ナノ粒子以下になると、信号強度が時間的に揺動する現象 (Blinking) が観測される³⁻⁷。これは、①完全な ON/OFF 特性を示すこと³、②強度が Poisson 分布 (一定強度とその整数倍の信号が Poisson 分布を持ってあらわれる) を示すことなどから⁴、単一分子現象

Fig. 2 Optical image (a), Raman image (b) and AFM images (c, d) of Ag nanoparticles. Hot particles providing enormous SERS signal are denoted by the arrow.

の証拠と考えられている。この Blinking のオリジンとしては、光刺激脱離-再吸着といった特定の金属と吸着種の間でのみ可能な光励起メカニズムが挙げられた¹⁶。しかし、同様の現象が色素だけでなく可視部に吸収のない DNA 塩基でも観測されている^{7,13}。これに関して、我々は温度依存性の実験を行い Blinking が熱活性化過程であることを確かめた⁸。すなわち、室温で SERS 信号強度が揺動する粒子の温度を下げたとき、77 K では Blinking が抑制され、測定の間中つねに強い信号を与えるか、反対に全く信号を与えない場合が観測された。再び室温に戻すとこれらの粒子の Blinking は回復する (Fig. 3)。こうした銀ナノ粒子にレーザー光を照射したときに形成される局所電場を FDTD (Finite Difference Time Domain) 数値計算法¹⁷により解析した (銀の誘電率は実測値²⁰) を用い、銀ナノ粒子は半径 40 nm の無限円筒または一辺 80 × 80 nm の直角二等辺三角柱。半径 40 nm の球状粒子や有限高さの三角柱を用いた 3 次元計算でも、ほぼ同様の結果が得られた。その結果、近接銀ナノ粒子の in-phase LSP を軸に平行な偏光で励起することで、接合部に入射光の 10^5 - 10^6 倍もの巨大な電場 (これにより単一分子感度に相当する 10^{10} - 10^{11} のラマン増強が得られる) が形成されることが判明した (Fig. 4, 励起波長は最大強度を与える (a) 430 nm, (b) 480 nm)。接合部以外の銀ナノ粒子表面では、孤立粒子と同様にそれに比べて小さな 10^2 - 10^3 の電場増強しか得られない。このことから、一般的な吸着分子について、接合部とそうでないサイトの間での熱拡散メカニズムが SERS 信号の Blinking を与えているものと考えられる^{8,11,13}。

2.2 弾性散乱に現れる単一分子吸着の証拠

Fig. 5 (d) に示す銀ナノ粒子接合体は強いラマン信号 (増強度 10^8 - 10^9 , Fig. 5 (a)) を与える。同時に白色光を用いて弾性散乱を測定すると、LSP によるブロードな散乱ピーク

Fig. 3 Temperature dependence of blinking: (a) at room temperature, (b) at 77 K and (c) RT after warmed. All the images were obtained with a CCD camera at a video rate (33 flames/sec). (d) Schematic images of thermal diffusion of adsorbed molecules between junction and marginal region on touching Ag nanoparticles.

Fig. 4 Local field intensity obtained with FDTD numerical simulations: (a) at the sharp edge, (b) junction of touching Ag nanoparticles (spheres with a radii of 40 nm). Single molecule sensitivity is predicted at these positions.

(525 nm, 730 nm)とともに、630 nmに付加的なピークが観測される (Fig. 5 (b), (d)). しかも630 nmの散乱は、SERS活性と強い相関があり、時間が経過して吸着分子の拡散などにより、ラマン信号が失われるとともに消失する。このような現象は、ごく微量の色素やDNA塩基のアデニンが吸着した銀ナノ粒子接合体に共通して観測される。付加的な散乱ピークは、近接する銀ナノ粒子のLSPが接合部に吸着する微量分子の電子遷移と相互作用することにより生じたものであることが、FDTD-3D数値計算により明らかになった^{9,12)}。Fig. 6に示すように、球状銀粒子 (半径40 nm, ギャップ4 nm) の接合部に吸着分子 (4 × 4 × 4 nm³, ローダミンの実測吸収スペクトル減衰振動子モデルで表したときの誘電率を使用) を配置し、接合軸に平行な偏光を入射したとき、散乱スペクトル370 nm (2粒子のLSPのout-of-phaseモード) と470 nm (in-phaseモード) の2つのLSPピークとともに、長波長側 (750 nm) にそれらよりは弱い明確なピークを与える。この付加的な散乱ピークは、①吸収のない化学種 (水分子やガラス基板など) を接合部においても現れないこと、②吸着種の吸収波長を650 nmから260 nmに変えたとき、対応して散乱ピーク波長が750 nmから420 nmにシフトすること (Fig. 7(a)-(b))、③吸着種の振動子強度を変えたとき、それに対応してピーク強度が変化すること (Fig. 7(c)) などから、明らかに吸着種の吸収に起因するものである¹⁴⁾。詳細な波長依存性から、LSPと吸着種の吸収の間で電磁気学的相互作用が存在することが確かめられた。

さらに興味深いことに、このような相互作用が存在す

Fig. 5 Correlation between SERS and elastic scattering from R6G/Ag nanoparticles: (a) SERS, (b) elastic scattering spectra, (c) AFM image and (d) difference spectra between SERS active and inactive state. The additional elastic scattering peak is obtained only for SERS-active state.

Fig. 6 Elastic scattering spectra calculated for adjacent Ag nanoparticles (radii of 40 nm) with FDTD method: (a) for various gap sizes filled with R6G, (b) for different polarization of incident laser and for different positions of adsorbates (with the fixed gap size of 4 nm), (c) local electric field for the same sample system as in (b) with different absorption peak.

るとき420 nm付近のLSP共鳴とは別に、弾性散乱のピーク波長において、接合部に付加的に増強された電場が形成される (Fig. 6(c)) の450, 520, 660, 760 nmのピーク, Fig. 8)。これまでの単一分子感度に関する金属ナノ粒子系の電場計算では、吸着分子をおかずに局所電場強度を計算し、散乱過程であることから、その二乗によりラマン増強強度が見積もられてきた。しかし、実際の系では、特に励起波長に近い電子遷移を持つ分子系では、増強電場は吸収のために大きく減衰する。例えば、Fig. 8(a)に示すように、LSP共鳴波長でも、接合部に存在する吸着分子内部の電場は、近接する外側に比べて著しく小さい。すなわち、吸着種を置かない金属ナノ粒子系での電場増強の見積もりは大きすぎる。ところが、同じ試料系でも、付加的な散乱ピークや増強吸収ピーク波長では、吸着分子内部に大きな増強電場が形成されることが判明した (Fig. 8 (b))。おそらくこれは、近接する銀ナノ粒子のLSPがこの

Fig. 7 Elastic scattering spectra calculated for adjacent Ag nanoparticles (radii of 40 nm) with FDTD method: (a) correlation between peak wavelengths of absorption of dye and additional elastic scattering, (b) summary of (a), (c) peak intensity vs. oscillator strength of absorption of dye at 350 nm.

波長で分子を通して大きなカップリングを持つためであろうと考えられる¹⁹⁾.

2.3 特異的な発光スペクトル

SERS研究の初期から、強いSERS信号のバックグラウンドとして非弾性散乱が観測されることが知られている^{1,2)}. このオリジンとしては、吸着種の発光、LSPの輻射

Fig. 8 Local field distribution for R6G/Ag nanoparticles with radii of 40 nm and gap of 4 nm: (a) I_{ex} = 410 nm (LSP resonance), (b) I_{ex} = 760 nm (additional peak position).

緩和、金属酸化物の励起子、金属ナノクラスタの発光、金属表面の電子ラマン散乱などが挙げられているが、明確な結論には至っていない^{1,2,10,14,15)}. 最近の研究により、形状やサイズ・集合状態を特定した個々の金属ナノ粒子からのスペクトル測定が行われ、より詳細な議論が可能となってきた。我々は、吸着色素の種類と被覆率を変えることで、色素の発光と金属表面からの非弾性散乱を区別することに成功した^{10,14,15)}. 例えば、Fig. 9は異なる被覆率のR6G(ローダミン6G, a: 3分子/粒子, b: 30分子/粒子), 異なる色素CV(クリスタルバイオレット, c: 30分子/粒子), MG(マラカイトグリーン, d: 300分子/粒子)のSERSと同時に観測される発光スペクトルである(励起波長488 nm). ここで、長波長側の620-710 nmにピークを持つ発光は、①色素の種類によりピーク波長が変化し、かつ吸着量とともに発光強度が増加すること、及び②ガラス基板に直接調製した色素の吸収及び蛍光スペクトルとよく一致することから、銀ナノ粒子表面で増強された色素の蛍光と帰属される。一方、短波長側に観測される550-600 nmのピーク波長・強度は色素に依存せず、ほぼ一定の波長と強度を示すことから、金属表面の電子状態に由来する発光と考えられる¹⁰⁾.

興味深いことに、励起波長を514.5 nmに変えたとき、R6G/銀ナノ粒子について観測された短波長側のピークは、488 nm励起のときと同じ3000 cm⁻¹のストークスシフト(励起波長からの波数シフト)を示すことが判明した(Fig. 10)¹⁵⁾. これは、同じ粒子について励起波長のみを変えた実験で得られた結果であり、かつ別の粒子についても同様の発光特性が得られた¹⁴⁾. 対照的に、(当然であるが)長波長側の発光は、上記と同様に励起波長によらず一定のピーク波長を与える。また、短波長側のストークスシフトは、色素をCV, MGと変えたときR6Gとほぼ同様に2625 cm⁻¹, 2850 cm⁻¹付近に観測される。この金属表面に由来する非弾性散乱は、励起波長によらず一定のストークスシフトを示す。

Fig. 9 Emission spectra: (a) R6G (3 molecules/Ag particle), (b) R6G (30 molecules/Ag particle), (c) CV (30 molecules/Ag particle), (d) MG (300 molecules/Ag particle).

Fig. 10 SERS and emission spectra measured for the same Ag nanoparticles/R6G with different excitation wavelength (488 nm and 514.5 nm): (a) in Stokes shift, (b) in wavelength.

クスシフトを持つことから、LSPの輻射緩和や金属酸化物の励起緩和、金属クラスター、色素の蛍光のいずれでもない。これらの場合、ずっと大きなエネルギーを持った発光が、一定のピーク波長を持って放射されるはずである。唯一可能性として考えられるのは、金属表面の電子ラマン散乱によるものである。これは以前Ottoらが超高真空下、低温で蒸着した銅や銀表面で吸着種なしでも観測した非弾性散乱によく類似している¹⁸⁾。彼らは、それを金属表面で励起された電子が原子レベルの粗さのために非弾性的な散乱を受けることで、結果的に基底状態のフェルミ面付近に電子-格子対が形成されるものとして説明した。同時に、金属薄膜を加熱したときに観測されるスペクトル変化を、表面電子の分散曲線が変化するとして再現した。これに対して、我々の非弾性散乱は、色素などの分子を吸着した巨大SERS活性を有する銀ナノ粒子についてのみ観測されるものであり、SERS活性のない粒子や、吸着種のない粒子では全く観測されない。このことは、金属電子が表面粗さや欠陥と同様に、吸着分子によって非弾性的に散乱されることを示唆している。ここで用いた銀ナノ粒子は、化学還元法で調製する際に100℃で約1時間アニールしているために、原子レベルの粗さは存在せず、(111)facet面が独占的に形成されており⁶⁾、吸着種の存在により初めて非弾性散乱が起こるものと考えられる。さらに、通常の共鳴ラマン散乱とは異なり、3000 cm⁻¹領域にR6Gの高次モード(結合音や倍音)が極めて強く観測されている(Fig. 11)。非弾性散乱とこれらの高次項の強度の相関について現在検討中である。

3. 今後の展望

単一分子感度ラマン分光法が確立され、実用化されるためには、上記のような基本的な点の解明とともに、①形状とサイズの決まった金属ナノ粒子をAFMなどで操作し、それらのギャップサイズを制御した上で、励起波長・入射方向・偏光方向などを変えながら吸着種のSERS信号の詳細な測定及び吸着種を含めたFDTD法などによる電場強度の解析を行うこと、②空間分解能を極限まで上げた近接場分光法により、金属ナノ粒子表面の局所的な電子状態・SERSスペクトル測定することで、LSPによる電場の空間分布の解析を行い、理論計算との比較から最適形状を見出すこと、③色素やDNA塩基以外のさまざまな吸

Fig. 11 SERS, inelastic scattering and emission from SERS active particles (Ag/R6G). Background signal (inelastic scattering) is explicitly observed at around 3000 cm⁻¹ region as well as higher order modes of R6G, of which assignments are given in the inserted table.

着分子に適用し、表面被覆率を規定できる条件で単一分子感度を実証し、汎用性を確かめること、次の段階として④電子ビームや集束イオンビームなどにより、基板上あるいは近接場プローブ先端に単一分子SERS感度を有する金属ナノ構造を形成することが必要と考えられる。

参考文献

- 1) A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann: J. Phys. Condens. Matter **4** (1992) 1143.
- 2) M. Kerker: *Surface Enhanced Raman Scattering*, SPIE, Vol. MS10, 1990.
- 3) J. T. Krug, G. D. Wang, S. R. Emory, and S. Nie: J. Am. Chem. Soc. **121** (1999) 9208.
- 4) K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld: Chem. Rev. **99** (1999) 2957.
- 5) H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, and P. Apell: Phys. Rev. E **62** (2000) 4318.
- 6) M. Michaels, M. Nirmal, and L. E. Brus: J. Phys. Chem. B **104** (2000) 11965.
- 7) Y. Maruyama, M. Ishikawa, and M. Futamata: Chem. Lett. (2001) 834.
- 8) Y. Maruyama, M. Ishikawa, and M. Futamata: J. Phys. Chem. B **108** (2004) 673.
- 9) M. Futamata, Y. Maruyama, and M. Ishikawa: J. Phys. Chem. B **108** (2004) 13119.
- 10) Y. Maruyama and M. Futamata: J. Raman Spectrosc. **36** (2005) 581.
- 11) M. Futamata, Y. Maruyama, and M. Ishikawa: J. Phys. Chem. B **107**(2003) 7607.
- 12) M. Futamata, Y. Maruyama, and M. Ishikawa: J. Mol. Struct. **735-736** (2005) 75.
- 13) M. Futamata, Y. Maruyama, and M. Ishikawa: Vibrational Spectrosc. **35** (2004) 121.
- 14) M. Futamata: Faraday Discussions, in press.
- 15) Y. Maruyama and M. Futamata: Chem. Phys. Lett. **412** (2005) 65.
- 16) A. Weiss and G. Haran: J. Phys. Chem. B **105** (2001) 12348.
- 17) K. S. Kunz and R. J. Luebbers: *The Finite Difference Time Domain Method for Electromagnetics* (CRC Press, Boca Raton, 1992).
- 18) A. Otto: phys. Stat. Sol. (a) **188** (2001) 1455.
- 19) M. Futamata and Y. Maruyama: submitted.
- 20) D. Palik (ed.): *Handbook of Optical Constants of Solids* (Academic Press, 1998).