

表面増強ラマン散乱（SERS）－ 微量サンプルのラマン分析



表面増強ラマン散乱(SERS)は、金や銀等のナノ粒子に分子が吸着されたときにラマン強度が大きく増幅される現象で、その増幅量は 10^7 倍にもなるといわれています。通常のラマン測定では0.1%オーダーの検出にとどまりますが、SERSを使用することでppmオーダーやppbオーダーのごくわずかな濃度の検体を検出できることにあります。

メトロームラマン社はインクジェット技術を用いてナノ粒子を基材上に印刷することで、高い安定性と優れた感度を持つ安価なP-SERSキットを開発しました。このキットは特に犯罪科学分析と食品安全の二つの分野で有効です。

このホワイトペーパーでは、SERSのメカニズムとメトロームラマンのMiraシステムの使用例について紹介します。

Metrohm White Paper

はじめに

通常、微量分析には高価で時間を要します。その一方、迅速で簡単に制御できるハンドヘルドラマン分析は0.1%オーダーの溶液または肉眼で容易に見える固体サンプルに制限されています。ラマン分光法のオプションの一つであるSERSは、ppmやppbオーダーといった微量検体の測定・同定を可能にします。

高感度の検出が求められている業界：

- 違法薬物や爆発性残留物の検出などの犯罪科学のラボ分析
- 食品の異物混入、安全でない残留農薬レベルなどの食品品質検査
- 医薬品、食品等の偽造の判別

ppbオーダーのサンプルは一般的にGC-MSやLC-MSなどの機器で分析を行いますが、時間、スキル、コストにより、その使用や有効性が制限されるケースがあります。

SERSを用いた同定は迅速、簡単、安価な分析となります。このホワイトペーパーでは、ラマン分光法とSERS効果について簡単に説明した後、メトロームラマン社の新しいPrintable SERS (P-SERS) 基板について説明します。この革新的な基板は、高い感度、適応性、使いやすさから様々な用途で利用できます。

ラマン分光法

ラマン散乱はレーザーを物質に当てた際の分子の振動により、光子が発生する非弾性的な散乱を指します。このラマン散乱は弾性散乱であるレイリー散乱の100万分の1の弱い散乱です。この弱い散乱から情報を取り出すために、高感度の検出器と単一波長レーザーを用います。適切に設計されたラマン分光器は同定分析に非常に重要な手法となりました。

従来のラマン分光法は、高価で大きなラボ設備が必要であったため、使用用途が限定されていました。近年では効率的なダイオードレーザー、波長除去フィルター、高感度検出器が開発されたことにより、ハンドヘルドラマンとして使用できるようになり、現場における未知試料を非侵襲的に検出および同定が可能となりました。

ラマン分光法を用いて物質を同定する場合の利点：

- 物質固有の指紋領域を持つスペクトル
- 1回の測定で混合物の検出が可能
- 数秒で測定と検出、同定が完了
- 水分に対して低感度（NIRと補完的）

ラマン分光法の欠点

ラマン分光法の一つ目の欠点として、既に述べたように、ラマン散乱は弱い現象であり、最先端のラマン分光器でも中程度の検出レベルにしかなりません。Miraのアプリケーションについても、目に見える量の純物質や数パーセント以上の濃度の液体サンプルに限られます。

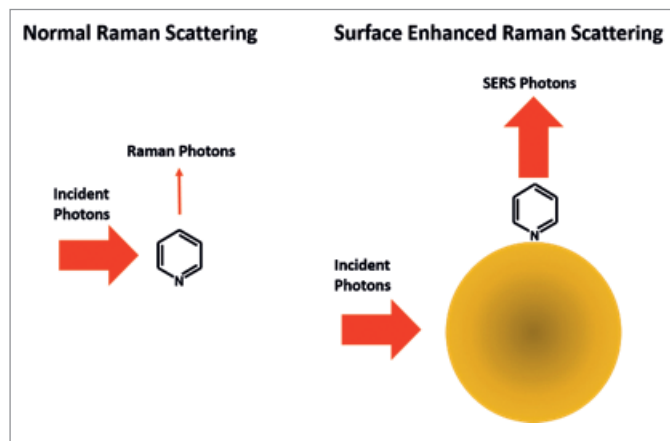


図1. 通常のラマンとSERS効果

図1は、ラマン散乱の非効率性を示しており、100万の入射光子に対しておおよそ1つのラマン散乱光子が生成されます。しかしながら、SERSを用いることではるかに強いシグナルをもたらす、微量分子の検出を可能にします。

ラマン分光法の一つ目の欠点は蛍光です。蛍光はレーザーを照射したサンプルから再放出された光です。蛍光は非常に強く、より弱いラマンシグナルと競合した結果、検出されたスペクトル情報のほとんどが蛍光となります。この蛍光はサンプル由来、不純物由来のどちらの可能性もありますが、ラマン散乱と区別する方法はありません。その結果、サンプルの情報を判別できないスペクトルが得られてしまいます。

SERSとは?

サンプルが金または銀のナノ粒子と相互作用すると、構造体の間に極めて強い電磁場が得られます。この増強された電磁場は、金属表面に吸着された分子に対するラマン散乱の著しい増強をもたらす、

(図1.右) ラマン散乱を1000万倍にも増強するため、吸着された分子の微量分析を可能にします。

SERS基板

SERSはナノ粒子のコロイド溶液、ナノ粒子を堆積させた基板表面、または、ナノ構造化表面を用いることで実施可能となります。それぞれの特徴として、コロイド溶液は不安定であり保存条件が厳しく、ナノ構造化表面は大きなラマン散乱の強化をもたらしますが製造にはコストがかかります。ナノ粒子を堆積させた基板表面はしばしば堆積プロセス中に凝集することでラマン散乱を強化する上に、比較的安価での製造が可能です。

SERSはラマン分光器と組み合わせて使用することで、ラマン分光法の潜在的なアプリケーションが劇的に広がります。

ナノ粒子と相互作用するサンプルであれば、100万分の1 (ppm) オーダーでの検出が容易に可能となります。

****注意**** SERSは全てのサンプルに使用できるわけではなく、銀または金と親和性を持つ物質に限られます。SERSは違法薬物、食品添加物、および農薬などの分析が代表的なアプリケーションとなります。

SERSはラマン分光法のハンディタイプの機器、混合物分析、迅速測定といった特徴をそのまま活かすことができるため非常に有効な分析手法です。

メトロームラマンのMiraおよびP-SERSソリューション

Miraシステムは迅速なラマン分光分析を提供します：

- 10,000点以上のライブラリ
- 小型で軽量
- ORS（水平走査）テクノロジー
- ソフトウェアの混合物分析機能



図2. P-SERS基板とMira

P-SERS基板： 低コストで高増強効果のSERSソリューション

メトロームのP-SERS基板はインクジェット印刷によってナノ粒子を堆積させる特許取得済みの革新的なプロセスで製造されます。このため、従来のナノ加工基板とは異なり、均一性と性能を維持しながら大幅にコストを低減できます。このインクジェットプロセスには更に利点があり、それはP-SERS基板をガラスやシリコンウェハだけでなく、様々な材料上に印刷可能なことです。通常はセルロース紙が使用されますが、この手法は特定の用途に合わせて変更できるため、仕様に最適化させる新しい方法となります。

- サンプルを基板にピペットで滴下する（従来の基板と同様）
- サンプルを基板に吸着させるために浸漬する
- 微量な残渣を集めるために表面を拭く
- 基板上のクロマトグラフィー試料の清掃し検出する

P-SERSによる分析は非常に簡単です。サンプルをSERS基板に塗布後、基板をMiraに挿入します。その後、画面をタッチして測定するだけでサンプルがソフトウェアによって自動的に同定されます。

SERSアプリケーション

ヘロイン

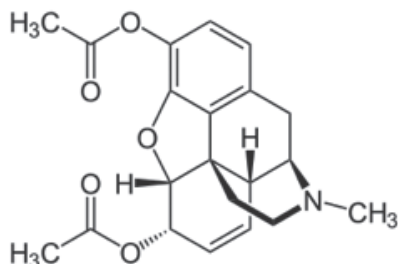


図3. ヘロイン

ヘロインは他のどの物質を検出するよりも重要な位置付けとされています。米国では2016年に15,466人のヘロインによる死亡が確認されています。しかしながら、ストリートドラッグサンプル中のヘロイン測定は困難な状況であり、迅速で信頼性の高い検出方法がありません。犯罪科学のラボではヘロインを含むストリートサンプルの洗浄から分析を行います。この分析には膨大な時間、費用、高度な技術を必要とするため、多くのラボでは多くの未処理サンプルがあります。そのため迅速で簡単なスクリーニングは重宝される技術となります。このアプリケーションではストリートサンプル中のヘロイン検出を最小限のサンプル前処理で分析するSERSを紹介します。ラマン分光法によるヘロイン分析は独自の課題が生じます。試薬グレードのヘロインは測定時に蛍光を発生しませんが、ストリートサンプルに含まれるヘロインは純品には程遠い混合物であり、高レベルの蛍光を発生します。(図4)

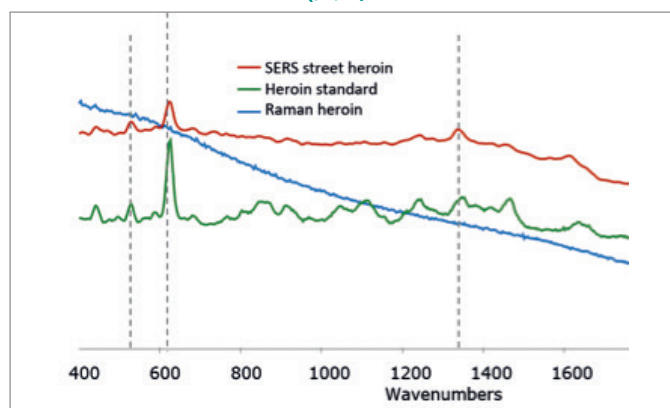


図4. ヘロインのラマンおよびSERSスペクトル

図4の青のスペクトルはストリートヘロインのラマンスペクトルです。蛍光が強く出ていて、ヘロインの情報が得られていません。緑のスペクトルは純ヘロインのラマンスペクトルであり、 531cm^{-1} 、 625cm^{-1} 、 1336cm^{-1} に特徴的なピークが観察されます。赤のスペクトルはストリートヘロインのSERSスペクトルであり、純ヘロインと同様の波数にピークが存在します。

方法

18個のヘロインを含むストリートサンプルを測定しました。それぞれ1~5 mgの褐色粉末または結晶性の粉末でした。この粉末を付属の溶液に入れ、固形物が沈降するのを待ちました。その後、上澄み液をP-SERS基板に滴下して乾燥させ、Miraにセットし測定しました。

取得パラメータ:

- ORS機能オフ
- レーザーパワー: 4
- 露光時間: 0.25秒
- 積算回数: 2回



図5. メトロームラマンのヘロイン検出用IDキット

結果

18個のストリートサンプル全てでヘロインを検出しました:

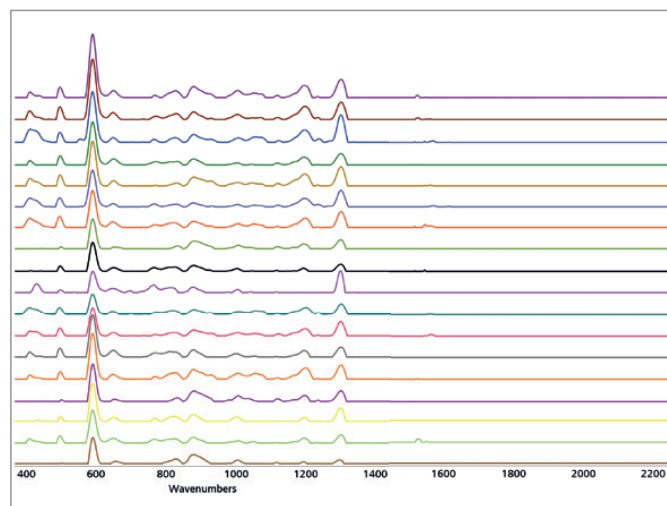


図6. ヘロインを含むストリートサンプルのP-SERSスペクトル

牛乳中のメラミン

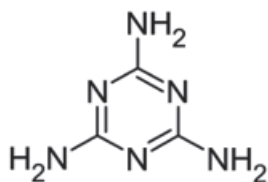


図7. メラミン

メラミンは窒素を多く含む化合物で、見かけ上のタンパク質量を増やすために食品に添加されることがあります。

2008年に中国で牛乳や乳児用ミルクを含む乳製品に腎臓障害の原因となるメラミンが多量に含まれていた事件が起きました。この事件では6人の乳児が死亡し、50,000人以上が入院しました。2006年の時点で食品中のメラミンの有害性は認められていて、FDAは食品中のメラミン濃度の基準を2.5ppm以下と設定していました。しかし、この2008年の事件を受けて基準が修正され、食品中のメラミン含有は許容されなくなりました。

食品中のメラミン分析では正確で、ミルクに含まれる微量を検出できるほどの感度が要求されます。現在の手法ではHPLCやGC/MSを用いてのメラミン検出が一般的です。これらの感度は十分なものの分析に時間を要します。これに対してSERSはppbレベルの感度を持つ、SERS基板のナノ粒子と多くの官能基が十分な相互作用をすることといった二つの理由からメラミンの微量分析への適用が考えられます。

方法

希硝酸中の2000ppmのメラミン溶液を最終的に100ppm、1ppmになるようにミルクに加えました。

この調整したミルクをタンパク質の凝固がみられるpH3.5~4になるまで希硝酸を添加して、遠心分離機にて固体と液体を分離しました。その液体部分を直接、P-SERS基板 (Ag) に滴下して乾燥した。

SERSスペクトルの取得条件：

- ORS機能オフ*
- レーザーパワー：2
- 露光時間：2秒
- 積算回数：5回

*ORS機能はレーザーを一点に当てず、測定範囲を広げサンプルへのダメージを減らしますが、SERS測定はレーザーを集中させたほうがメリットを得られます。

結果

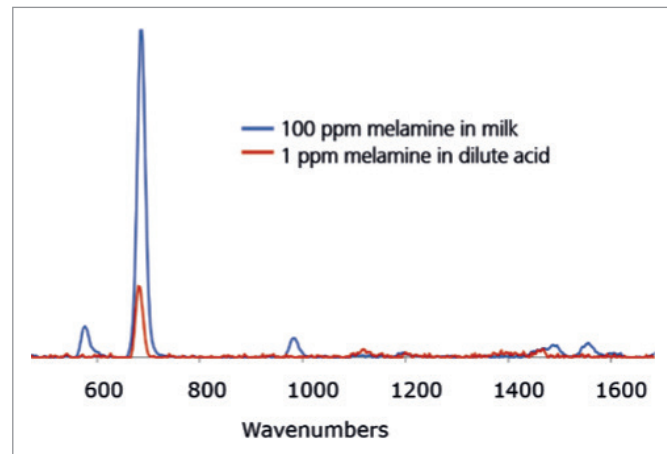


図8. ミルク中のメラミンのSERSスペクトル

図8は、100ppmのメラミン濃度のサンプルに明瞭なピークが現れていることを示しています。また、1ppmの濃度でもメラミンのピークが確認できます。

マラカイトグリーン

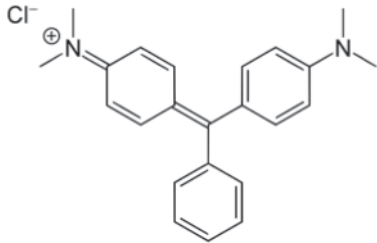


図9. マラカイトグリーン

マラカイトグリーンは合成染料で、養殖魚の殺菌剤としても使用されてきました。マラカイトグリーンは健康へのリスクは小さいとされていましたが、FDAは1983年に発がん性が疑われることから養殖魚への使用を禁止しました。この禁止されたマラカイトグリーンの微量分析を、SERSを用いることにより迅速・簡単に行います。

方法

1000ppmのマラカイトグリーン水溶液を希釈して、1ppm、100ppbになるように調整しました。それぞれの濃度の水溶液をP-SERS基板（Ag）に滴下して、乾燥しました。

測定条件：

- ORS機能オフ
- レーザーパワー：3
- 露光時間：1秒
- 積算回数：10回

結果

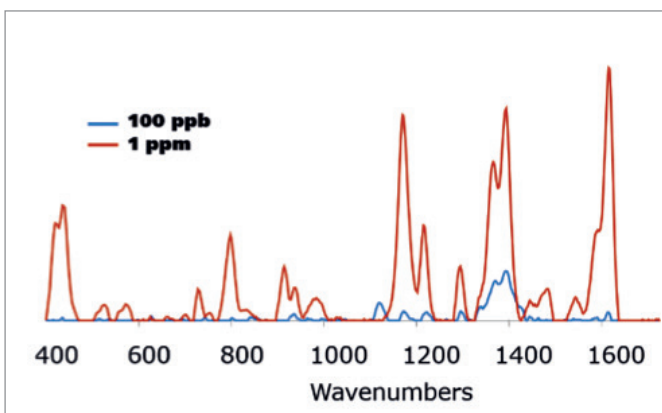


図10. SERSによる10ppmマラチオンの検出

図10のようにマラカイトグリーンはP-SERS測定によるppbオーダーの検出が可能でした。

マラチオン

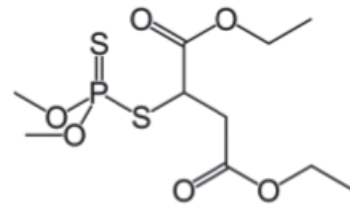


図11. マラチオン

マラチオンは有機リン系の農薬で農業や蚊の駆除に使用されます。マラチオン自体の毒性は低いことが知られていますが、体内でマロオクソンへと変化して、毒性も強くなります。また水の塩素処理においてもマロオクソンへと変化します。これらの理由からフルーツや野菜、飲用の水でマラチオンを検出する方法が必要であり、SERSを用いることで簡単に微量分析が可能となります。

方法

10ppmのマラチオン水溶液を調整した後、P-SERS基板（Ag）に滴下して乾燥しました。

測定条件：

- ORS機能オフ
- レーザーパワー：3
- 露光時間：1秒
- 積算回数：10回

結果

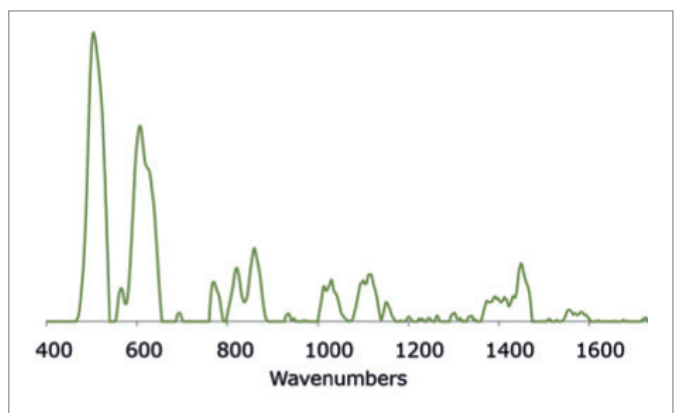


図12. SERSによる10ppmマラチオンの検出

図12はメトロームのP-SERS基板を使用して、10ppm以下の検出が可能であることを示しています。

Metrohm White Paper

まとめ

SERSは麻薬、食品添加物、農薬の微量検出等の多くのアプリケーションとして有用な分析技術です。Miraと組み合わせることにより、この技術は犯罪科学のラボでの迅速に検出することができるため、未処理検体を処理できるようになります。

現場では、簡単に質の高いデータが取得でき、安全なルーチン測定となるため大きなメリットがあります。メトロームラマンの革新的な低コストで好感度のP-SERS基板と携帯型ラマンMiraを組み合わせるとラボや現場でのアプリケーションが大幅に広がります。

参考資料

E. P. Hoppmann, W. W. Yu, and I. M. White, «Highly sensitive and flexible inkjet printed SERS sensors on paper,» Methods, vol. 63, no. 3, pp. 219–224, 2013.

W. W. Yu and I. M. White, «Inkjet-printed paper-based SERS dipsticks and swabs for trace chemical detection,» Analyst, vol. 138, no. 4, pp. 1020–5, Feb. 2013.

W. W. Yu and I. M. White, «Chromatographic separation and detection of target analytes from complex samples using inkjet printed SERS substrates,» Analyst, vol. 138, no. 13, pp. 3679–86, Jul. 2013.

NIH Publication No. 04-446

FDA IA 99-30

EPA-HQ-OPP-2009-0317 Docket

CDC Wonder



本社 〒143-0006
東京都大田区平和島 6-1-1
東京流通センター アネックス 9F
TEL 03-4571-1745 (スペクトロスコープ部)
FAX 03-3766-2080
大阪支店 〒541-0047
大阪市中央区淡路町 3-1-9
淡路町ダイビル 5 階 502C
TEL 050-4561-3140 FAX 06-6232-2312
e-mail metrohm.jp@metrohm.jp

 www.metrohm.jp