

令和元年5月31日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05823

研究課題名(和文) SERS法による柑橘類用防カビ剤検出方法の基礎的検討

研究課題名(英文) Feasibility study on detection of fungicides on agricultural produces with SERS

研究代表者

竹井 弘之 (Takei, Hiroyuki)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：40520789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：農作物表面上の残留農薬を簡便、迅速に同定するSERS手法の開発を行なった。柔軟性な基板表面に形成されたナノ構造体を対象物に直接圧着し、転写された残留農薬の測定を目指した。圧着時の衝撃を緩和するための構造として、卑金属のナノシードを硝酸銀溶液に曝露し、置換反応により銀ナノ構造を作製した。シード形状、厚さ、卑金属の元素種をパラメータとして作製条件を変え、R6GおよびBPEをモデル分子として、最適化された銀ナノ構造を作製した。柔軟のテープ基板の上に高密度に形成された銀ナノ構造を、1000 ppmのフェルバムで処理されたオレンジに圧着して、551および1368 cm<sup>-1</sup>固有ピークを検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食の安全は永遠の課題である。輸入される柑橘類等の農作物は、輸送中の劣化を抑制するために、収穫後に防カビ剤で処理されている。関連法案が遵守されていれば健康上の問題はないとされる。しかし、残留基準値(MRL)を越える農薬の使用、使用が認められなくなった農薬、さらに非合法の農薬の使用を防ぐことは急務である。今後、TPP等の条約を通して輸入作物量が増加することが予想されるので、簡便なスクリーニング手法が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a SERS system for in situ, simple and rapid detection of residual fungicides on agricultural produces by producing a flexible surface decorated by noble metal nano structures and transferring the fungicides by pressing the flexible surface onto the produce. To produce nano structures that can withstand the pressure during the transfer process, we used a galvanic displacement reaction of surface-adsorbed base metal nanoparticles upon exposure to AgNO<sub>3</sub> solution. By controlling the size and thickness of the base metal, metal species and reaction temperature, we optimized the silver nano structure on basis of evaluation of SERS spectra of model compounds R6G and BPE. The optimized nano structure was grown on an adhesive tape, which was pressed against an orange treated with 1000 ppm ferbam. Two characteristic peaks at 551 and 1368 cm<sup>-1</sup> were detected.

研究分野：分析化学 農作物 表面増強法

キーワード：ラマン分光 貴金属ナノ構造体 置換反応 残留農薬 プラズモニクス in-situ計測

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食の安全は永遠の課題である。輸入される柑橘類等の農作物は、輸送中の劣化を抑制するために収穫後に防カビ剤（ポストハーベスト農薬）で処理されている。関連法案が遵守されていれば健康上の問題はないとされる。しかし、残留基準値（MRL）を越える農薬の使用、使用が認められなくなった農薬（例：フェルパムの使用は、カナダにおいては移行期間を経て段階的に廃止されることが決定）さらに非合法の農薬の使用を防ぐことは急務である。今後、TPP等の条約を通して輸入作物量が増加することが予想されるので、残留農薬の簡便なスクリーニング手法が望まれる。

### 2. 研究の目的

化学物質を同定する手法は多岐に渡るが、簡便性を考慮するとサンプルを真空中ではなく大気中で測定できることが望ましいことから、振動分光法である赤外分光法もしくはラマン分光法は有力な候補である。前者は比較的高感度であるが、冷却が必要な特殊な光センサーを使用し、大気中の湿気や二酸化炭素等のガスの影響を排除する必要がある。後者は低感度であるが、表面増強効果を用いることにより高感度化が可能である。また、可視光を用いることから、安価なセンサーを利用することができる。

表面増強ラマン法 (Surface-enhanced Raman spectroscopy: SERS 法) において不可欠なものは、寸法が数百 nm より小さな貴金属ナノ構造体である。光が当たると内部の自由電子が共鳴的に振動することにより、ナノ構造体表面に近接場と呼ばれる強力な電場が発生する。電場中に測定対象物を配置することにより、ラマン散乱光強度が数桁以上も増強する現象が表面増強効果として用いられる。農作物表面に貴金ナノ構造体を分散させることにより、残留農薬の同定が可能となることが報告されている。但し、コロイド等のナノ構造体を確実かつ均一に農作物表面に吸着させることは容易でない。本研究の目的は、スタンプ状の構造物の表面に、貴金属ナノ構造体を高密度かつ強靱に形成し、農作物表面に押し付けることにより表面の残留農薬をスタンプ表面に転写し、さらにレーザー光をスタンプ表面に照射することにより、転写された物質を SERS 法によって同定することにある。さらなる目的は、信号増強効果を最大限に活用するために、最適化された貴金属ナノ構造体を作製し、近接場を FDTD 法として知られるシミュレーション方法を用いて、効果を理論的に確認することにある。

### 3. 研究の方法

SERS 用ナノ構造体は様々な手法により作製されているが、本研究において要求される特性としては、被検体に圧着されても損傷を受け難いことである。我々は二つのアプローチによって問題を解決することにした。一つは、基板として柔軟性に富んだ材質を用いること、二つめにはナノ構造体自体に柔軟性を持たせることにより、圧力を吸収できる構造を実現することである。ゴムシートの上にスチールウールを吸着したものをイメージすると分かり易い。

このような構造を形成するために次の方法を用いた。まずナノ構造の作製であるが、近年我々は“ナノ銀樹”と呼ばれる構造の作製を行なっている。通常の銀樹の作製においては、異なる卑金属のイオン化傾向の違いを用いる。硝酸銀の中に、銀よりもイオン化傾向の高い銅、鉄、アルミ等を浸漬すると、卑金属が溶解すると同時に銀が還元され固体表面に堆積して銀樹になる。我々が作製している“ナノ銀樹”においては、サイズが数百 nm 以下の帽子状卑金属ナノ粒子を用いることに特徴がある。ナノサイズのシードを用いることにより、これまでよりも多種多様な構造が作製可能となる。図 1 は、ナノ銀樹を柔軟性に富んだテープ表面に形成する方法を示す。まず、スライドガラス表面にシリカ粒子の単層を形成する (a)。次に、両面テープをシリカ粒子層に軽く押し付けることにより、シリカ粒子をテープ表面に転写する (b)。さらに、真空蒸着により、シリカ粒子表面に帽子状の卑金属シードを形成する (c)。最後に、硝酸銀水溶液に卑金属構造体を浸漬することにより、“ナノ銀樹”を成長させる。卑金属が完全に消費されると成長過程は自然と停止することから、反応時間の制御は不要であり数分以内に完了する。

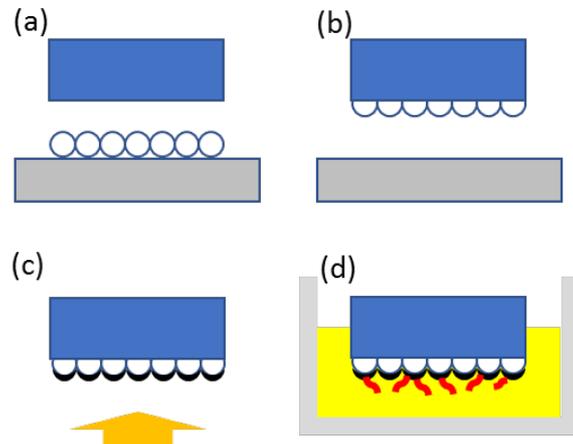


図 1 ナノ銀樹の成長方法

### 4. 研究成果

#### (1) ナノ銀樹の網羅的作製

粒径、元素種、蒸着厚、反応温度の四つのパラメータを効率良く最適化する必要があった。一枚のスライドガラスの表面に、三種類のシリカ粒子（粒径 100, 400, 700 nm）を吸着させ、部位ごとに厚さ 10, 30, 60 nm の銅を蒸着した、一回の真空蒸着で作業を終了させるために、蒸着の最中にシャッターを移動させた。同じ基板を 3 枚用意し、異なる温度（4 , 室温、50 ）

で反応させた。さらに銅以外の元素としてアルミおよびニッケルを用いて上記の実験を繰り返した。

## (2) 形態観察

### SEM 観察

調製した全てのサンプルの形態を簡易 SEM (Miniscope TM3000, Hitachi) で観察した。一部の例を図 2 に示す。粒径 100 nm のシリカ粒子を用いた場合、ナノ銀樹の成長は限られていたが、粒径 400 および 700 nm の粒子の場合には、ナノ銀樹が得られた。(A)、(B)、(C) は粒径 400 nm の実験結果であり、蒸着厚はそれぞれ 10, 30, 60 nm である。(D)、(E)、(F) は、粒径 700 nm の粒子を用いた実験の結果であり、蒸着厚は上の場合と同じである。

蒸着厚を 60 nm とした場合に、ナノ銀樹の構造が最も密になったが、この値を超えると、形成されたナノ銀樹が基板表面から容易に剥離してしまったので、60 nm を上限値とした。選択した銅、アルミ、ニッケルの中で、銅が最も適していた。但し、蒸着後 30 分以内に処理する必要があると考えられたので、フッ化水素酸を硝酸銀溶液に添加したところ、大幅な改善が見られた。過去の文献によると反応温度への依存性が予期されたが、今回の実験においては確認されなかった。今後の実験においては室温での反応が相応しいと思われる。また、今回の実験では検討対象とはしなかったが、硝酸銀溶液の濃度も影響を及ぼすと考えられる。

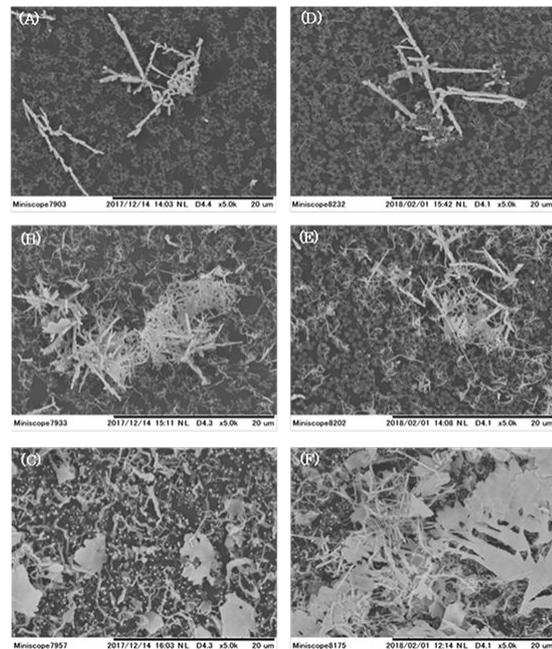


図 2 簡易 SEM により取得した形態像

### HIM 観察

一部のサンプルは、共同研究先であるドイツのビーレフェルト大学の Gölzhäuser 研に送り、ヘリウムイオン顕微鏡 (HIM) での観察を依頼した。HIM を用いる利点としては、潜在的により高分解能の像が取得可能であることに加え、絶縁性のサンプルでも観察可能であるといった点 (電子ビームの同時照射による電気的中和) を挙げられる。本研究における測定対象物は導電体の銀であるが、基板とは必ずしも電気的に接触していないため、HIM は有効な観察手段であった。一部の例を図 3 に示す。作製条件は次の通りである。左

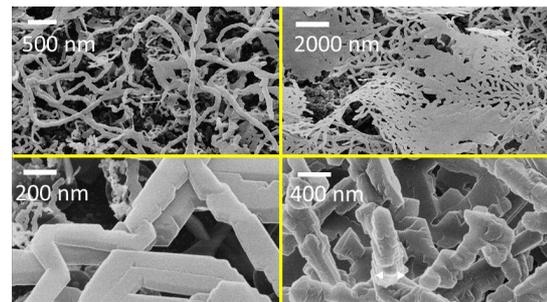


図 3 HIM により取得した詳細像

上: 蒸着厚 10 nm-粒径 100 nm、右上: 蒸着厚 60 nm-粒径 300 nm、下 (左および右): 蒸着厚 60 nm-粒径 100 nm。卑金属は銅、反応温度は室温である。同じ作製条件であってもサンプルの領域によって異なる形態のナノ銀樹が形成されることが分かる。

近接場のシミュレーションにおけるモデル構造の抽出が主たる目的であった。注目した部位としては、フィラメント構造のキック、複数のフィラメントの交差部位、菱形状のポイドが挙げられる。この構造に基づいて、消光スペクトルを求めたところ、現時点で得られているナノ銀樹においては、近赤外領域でピークが見られたことから、より細かい構造体の作製条件の探索が必要であることが判明した。

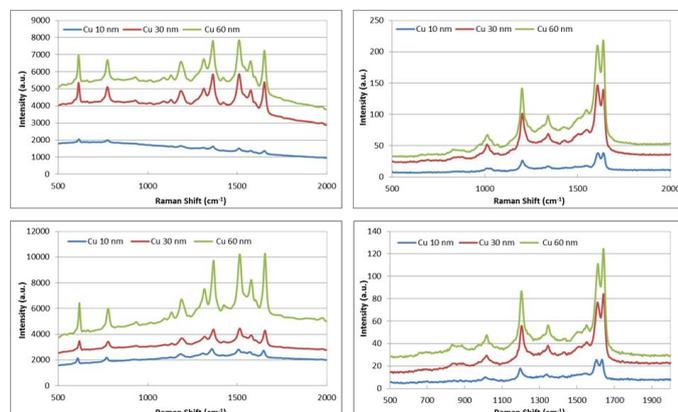


図 4 ナノ銀樹より得られたスペクトル

## (3) 表面増強効果による評価

### モデル分子による評価

作製されたナノ構造体を 0.1 mM R6G エタノール溶液および BPE 水溶液に浸漬し、それぞれのスペクトルを取得した。Thermo Fisher 社の Nicolet Almega を用い、励起波長と

しては 532 nm と 633 nm を選択した。露光時間は 1 秒、対物レンズの倍率は 10 倍、16 スキャンの結果を平均化した。図 4 に測定例を示す。左は R6G、右は BPE による結果であり、上は粒径 400nm、下は粒径 700 nm に対応する。それぞれのグラフは、蒸着厚を 10 nm、30 nm、60 nm とした際のスペクトルを示している。どの場合においても、蒸着厚 60 nm においてピーク強度が最も顕著となる。

励起波長 532 nm の結果を表としてまとめた(表 1)。信号強度の評価方法として、R6G および BPE のそれぞれ 1365  $\text{cm}^{-1}$  と 1630  $\text{cm}^{-1}$  のピーク強度を参照し、×、△、○、● の記号を用いて半定量的に示した。今回用いた元素としては、銅の結果が最も良かったが、アルミの場合でも弗化水素酸(HF)を添加して不動態を除去することにより、大幅な改善が可能であることを括弧内に示す。

R6G (0.1 mM)		Cu			Al			Ni		
励起波長 532 nm		硝酸銀処理温度 (°C)								
シリカ粒径 (nm)	金属膜厚 (nm)	4	20	50	4	20 (HF)	50	4	20	50
100	10	×	×	×	○	○(●)	×	△	△	△
	30	○	○	○	○	○(○)	○	△	△	△
	60	◎	◎	◎	○	○(○)	△	△	△	△
400	10	○	○	○	○	○(○)	◎	△	△	△
	30	◎	◎	○	○	○(◎)	○	△	△	△
	60	◎	◎	◎	○	○(◎)	○	×	×	△
700	10	○	○	○	○	○(●)	△	△	△	△
	30	◎	○	○	△	○(◎)	○	△	△	△
	60	○	◎	◎	○	◎(○)	○	×	×	△

BPE (0.1 mM)		Cu			Al			Ni		
励起波長 532 nm		硝酸銀処理温度 (°C)								
シリカ粒径 (nm)	金属膜厚 (nm)	4	20	50	4	20 (HF)	50	4	20	50
100	10	×	×	×	△	△(△)	△	×	×	×
	30	△	△	△	×	△(△)	△	×	×	×
	60	△	△	△	△	△(△)	△	×	×	×
400	10	△	△	△	△	△(×)	×	×	×	×
	30	△	△	△	△	△(△)	×	×	×	×
	60	○	○	○	△	△(△)	×	×	×	×
700	10	△	△	△	△	△(×)	×	×	×	×
	30	○	△	△	×	△(×)	×	×	×	×
	60	△	△	△	△	△(×)	△	×	×	×

信号強度の評価 ×<10、10<△<100、100<○<1000、1000<◎<5000、5000<●

表 1 SERS 基板としてのナノ銀樹の評価

#### フェルバムによる評価

モデル残留農薬としてフェルバムを用いた。1000 ppm の水溶液を調製し、予め洗浄したアメリカ産オレンジ表面に塗布し、5 分程度乾燥させた。図 5 に示す様にナノ銀樹で被覆されている円形状テープ(直径 3 mm)ピンを用いてオレンジ表面に圧着した。粒径は 100 nm、蒸着厚(銅)60 nm の条件を主に用いた。複数領域に圧着させた後に、顕微ラマンによりスペクトルを取得した。

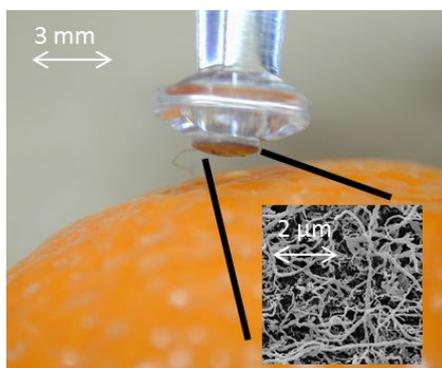


図 5 オレンジ表面のフェルバム計測

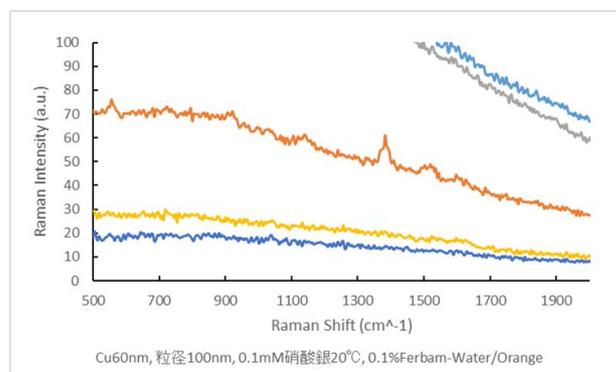


図 6 オレンジ表面のフェルバムスペクトル

例を図 6 に示す。フェルバムの固有ピークは、551、931、1138、1368  $\text{cm}^{-1}$  に存在する。現時点においては、551 および 1368  $\text{cm}^{-1}$  のピークが測定できることがあるが、圧着条件が最適されていないため、必ずしも毎回観察されない。再現性の向上が今後の課題である。圧力に関する条件検討としては、測定時以外にも、ナノ銀樹作製時にも考慮する必要がある。図 1 の (b) のステップにおいて、加える圧力および用いるテープによっては、粒子が埋没することが確認されている。FDTD 法でのシミュレーションによると金ナノ構造体の吸収および散乱スペクトルは、埋没率に大きく影響されることが判明した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

H. Haraguchi, N. Frese, A. Götzhäuser, and H. Takei, Protection of silver and gold LSPR biosensors in corrosive NaCl environment by short alkanethiol molecules; characterization by extinction spectrum, helium ion microscopy and SERS, RSC Advances, 9, 9565-9576 (2019) doi 10.1039/c8ra09778 査読あり

### 〔学会発表〕(計13件)

H. Takei, S. Hoshino, T. Okamoto, A. Götzhäuser, Galvanically grown nanodendrites from cap-shaped base metals for surface-enhanced Raman spectroscopy, Symposium on Surface Science 2019, Baqueira, Spain 2019.3.14

H. Takei, Three types of noble metal nanostructures for three types of near-field spectroscopic techniques: how can plasmonics help advance life sciences” The 10<sup>th</sup> International Forum on Post-Genome Technologies and 11<sup>th</sup> International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nangjing, China 2018.10.22

S. Hoshino, S. Yoneda, Y. Ochiai, T. Okamoto, H. Takei, Silver nanostructures formed from base metal nanoparticles: optimization of the growth condition, Near-Field Optics 15, Troyes, France 2018.8.30

H. Takei, T. Okamoto, A. Götzhäuser, Three SERS platforms for detection of target molecules in a mixture, in a flow system, and on a surface, Near-Field Optics 15, Troyes, France 2018.8.30

星野 翔平、竹井 弘之、卑金属ナノ粒子から形成されたナノ銀樹：SERS 応用に対する形成条件の最適化、第 78 回分析化学討論会、山口大学、宇部 2018.5.26

竹井 弘之、岡本 隆之、アルミン・ゲルツホイザー、特定利用状況を考慮した SERS 基板：食品、農業、水産において、第 78 回分析化学討論会、山口大学、宇部 2018.5.26

竹井 弘之、渡辺 康介、藤木 啓、相原 凜花、岡本 隆之、固体表面吸着物質同定用の圧着型 SERS 基板、日本分析化学会第 66 年会 東京 2017.9.10

H. Takei, Three types of nanostructure platforms for plasmonics detection of target molecules on a solid surface or in a complex medium, The 7<sup>th</sup> Euro Biosensors and Bioelectronics, Berlin, Germany 2017.7.10

H. Takei, K. Nagata, J. Saito, K. Watanabe, S. Yoneda, T. Okamoto, N. Frese, H. Vieker, A. Beyer, and A. Götzhäuser, Three types of plasmonics nanostructures as bioanalytical SERS platforms, The 8<sup>th</sup> International Conference on Surface Plasmon Photonics, Taipei, Taiwan 2017.5. 25

H. Takei, J. Saito, K. Kato, K. Watanabe, T. Okamoto, and A. Götzhäuser, Application Specific SERS Substrates, Pittcon McCormick Place, Chicago 2017.3.8

H. Takei, K. Nagata, J. Saito, K. Kato, H. Takasawa, K. Watanabe, T. Fujiki, S. Yoneda, T. Okamoto, N. Frese, H. Vieker, A. Beyer, and A. Götzhäuser, SERS の実用化に向けた貴金属ナノ構造体作製の試み、第 14 回プラズモニクスシンポジウム 福井大学文京キャンパス、福井 2017.1.28

岡田 有貴、米田 真吾、竹井 弘之、岡本 隆之、Armin Götzhäuser、置換反応により作製した貴金属ナノ構造体を用いた表面増強ラマン分光法の検討、日本分析化学会第 65 年会、北海道大学、札幌 2016.9.16

竹井 弘之、貴金属ナノ構造体の分析応用における課題 第 76 回分析化学討論会、岐阜薬科大学、岐阜 2016.5.29

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況 (計1件)

名称：表面増強ラマン分光用基板およびその製造方法

発明者：竹井 弘之、藤木 啓

権利者：東洋大学

種類：特許

番号：特願 2017-024502

出願年：2017 年

国内外の別：国内

#### 取得状況 (計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：岡本 隆之

ローマ字氏名：(OKAMOTO, takayuki)

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：石橋極微デバイス工学研究室

職名：専任研究員

研究者番号：40185476

### (2) 研究協力者（国際共同研究）

Armin Götzhäuser

ビーレフェルト大学（ドイツ）物理学部・教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。