小特集 I. 固液界面における吸着物質のその場測定法の新展開

電気化学表面プラズモン共鳴法

岩崎 弦*, 堀内 勉*, 丹羽 修*

Electrochemical Surface Plasmon Resonance Measurement

Yuzuru IWASAKI*, Tsutomu HORIUCHI* and Osamu NIWA*

Key Words : Surface Plasmon Resonance, Electrochemistry, Gold, Methylene Blue, Fe(CN)₆.

表面プラズモン共鳴 (SPR) 法は、簡単な光学系で高感度に局所的屈折率の変化を測定できる。特に生体分子の特異的結合の検出に威力を発揮している。この報告では SPR 法を電気化学反応検出に用いた例を紹介する。

1. 緒 言

表面化学反応や吸着、電気化学反応などの検出には表面の状態を計測するセンサーが必要である。表面分析法には多くの種類がある。その中で装置が単純、液体中で測定できる、定量測定に向いている、感度が高いなどの特徴から、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定法は注目されている。SPR は基本的には金属表面の屈折率センサーである。SPR は局所的測定であり、金属面に化学修飾膜を付けて高機能化を図りやすいために化学センサーとして使われている。筆者らは SPR を用いる表面状態測定法と電気化学測定法を組み合わせ、電気化学反応と SPR の同時計測を行った。この結果、電極面での電子移動反応や、これに付随する反応によって引き起こされた状態の変化を SPR 法で追跡できた。本稿では、まず SPR の化学センサーとしての特徴を述べ、次に電気化学反応解析に用いた例について述べる。

2. SPR センサーの測定原理

表面プラズモン (SP) は金属の表面に立つ分極の振動の一種である。電子線で直接励起できるが、光でも Otto, Kretschmann の方法により励起できる¹⁾。いずれも全反射光学系で反射面の入射光と反対側に配置した金属に励起される (図 1)。入射光側に対し反射面の反対側

に漏れ出すエバネッセント波の波数と周波数が SP のものと一致すると、光のエネルギーが散乱され反射光が弱くなる。SP が励起される波数は金属に接する物質の屈折率の影響を受け、P 偏光入射光の入射角を変えることで SPR が起こる条件に合わせることができる。入射光が反射する面に直接金などの薄膜を着けた Kretschmann 方式では反射率の入射角度依存性を測定すると SPR の起こる入射角度で反射率にディップがみられる。屈折率分布が無い場合には、反射率が最小になる入射角度 (θ_{SPR}) から屈折率を求められる。

たとえば、図 1 のような構成で P 偏光反射率を測定すると、図 2 のような反射率の入射角度依存性が得られる。金属薄膜が無い場合には、反射率はブリュースター角 (A) で 0 になり、臨界角 (B) 以上の入射角度では反射率は 1 になる。一方、金薄膜が有る場合には金薄膜が接

図1 SPR測定装置

* NTT 生活環境研究所 (〒243-0198 神奈川県厚木市森の里 若宮 3-1)

NTT Life Style and Environmental Technology Laboratories (3-1, Morinosato Wakamiya Atsugi-shi, Kanagawa 243-0198)

図2 P偏光反射率の入射角度依存性

波線：金薄膜が無い場合，実線：金薄膜が有る場合。
A：ブリュースター角，B：臨界角，C：金薄膜が空気に接する時の θ_{SPR} ，D：水に接する時の θ_{SPR}

する環境によってC(空気，屈折率1)，D(水，屈折率約1.3)の角度で反射率が最小になる。原理的にエバネッセント波の影響のある範囲内の屈折率が測定される。近赤外光を用いると，測定範囲は金薄膜表面から数百nmになる。SPR法は共鳴点を追跡することによって得られる入射角度を指標とするために，光源の強度や，受光素子の感度の影響を受けにくい測定法になっている。また，SPの性質は複素屈折率としてフレネルの公式を用いて計算しても実験結果とよく一致し，屈折率と θ_{SPR} の関係は容易に計算できる。このために被測定物に吸収がない波長を選ぶと解析が単純化される。なお，SPの基本的な性質については文献1が，多様な測定法については文献2，3が詳しい。

θ_{SPR} は機械的に入射角度を変えて反射率最小点を探るか，くさび形の光を入射し反射光を位置センサーや，カメラで観測して測定する(図1)。カメラで観測した場合には画面の角度方向に垂直な陰が見える。図2のように θ_{SPR} の前後で反射率の変化が急峻で， θ_{SPR} は0.001度程度の分解能を容易に得ることができ，屈折率のわずかな変化を検出できる。金薄膜を用いる場合には θ_{SPR} での最小値が小さく急峻な反射率変化が得られる50nmの膜厚が用いられる。またこの膜厚では電気化学実験に十分な電気伝導性が得られる。金薄膜を直接プリズムに付けると，金薄膜が劣化するたびにプリズムごと交換する必要がある。そこで金薄膜はプリズムと同じ材料の平板基板に付け，プリズムと同じ屈折率の屈折率整合液を介してプリズムに取り付けると便利である。また，金薄膜をスパッタ法で作るときはガラスと金の接着が悪く，薄膜が触れるだけではがれてしまうが，極薄くチタンを先にスパッタすると電気化学実験にも十分耐える強度になる。またこの金属膜では反射率最小値が浅くなるが

θ_{SPR} の測定には支障ない。

3. SPR センサーの適用例

SPR測定は金薄膜の基板側からの観測法で，液体試料を測定する場合に測定のための光路が液体のバルク部分を通さないために，バルクの吸収による影響が少ない。表面に直接接触する部分がない化学反応や積層膜を構築するような場合でも反応の進行状態を観測できる。

SPRで得られる情報は屈折率であり，全反射分光法で得られるような分子の状態変化を精密に追跡するのは異なる。むしろ，ポリマーや，生体高分子，たとえば抗体，タンパク質，DNAなどの反応を検出し，その反応速度を測定するのに向いている。このような用途には優れた装置がピアコア社から市販されている。たとえば，DNAの一本鎖が合成酵素によって2本鎖に伸びてゆく様子がリアルタイムで測定されている⁴⁾。

一方， θ_{SPR} 付近で急峻に反射率が変化することから，入射角度を θ_{SPR} 前後に固定し，反射率を観測すると屈折率の小さな変化が反射率の変化として測定できる。この方法では反射光をカメラで観察すると屈折率でマッピングされた2次元のデータを得ることができる⁵⁾。このSPR顕微鏡では化学的修飾することなくDNAの2本鎖生成の同時多点測定などが報告されている⁶⁾。

また，通常はプリズムを使った光学系を用いるが，光路を工夫することにより光学系は単純化する事ができ，比較的安価な装置もテキサスインスツルメント社から市販されている⁷⁾。その他，入射角度を変える代わりに，波長を変えてもSPRによる共鳴が起こる波長で反射率の低下がみられ，同様な測定ができる。また，光ファイバーのクラッド層を除いた面に金薄膜を付けセンサー化する^{8),9)}， θ_{SPR} の前後で位相の符号が反転するのを利用して感度を上げるなどが報告されている¹⁰⁾。

4. 電気化学SPR

SPRが表面の局所的測定法であることから，同様に表面で反応が進行する電気化学測定への応用が注目されていた^{11),12)}。SPRを起こす金薄膜上で電気化学反応を行えば，電気化学反応にともなう状態変化を観測できる。今まで述べてきたSPR測定法は多くが電気化学反応解析にも用いることができる。また電気化学反応をSPR測定と組み合わせてセンサー化され，たとえば光ファイバー型のSPRセンサーと析出反応を組み合わせる重金属を測定することが報告されている¹³⁾。

我々はこの方法を電気化学測定に用い，さまざまな電気化学反応でSPRを用いた解析法(電気化学SPR法)を検討してきた。特に電気化学測定法で一般的なサイクリックボルタメトリーとSPR測定を組み合わせた方法について述べる。

図3 電気化学 SPR 実験セル

4. 1 実験方法と解析法

電気化学 SPR 法は、通常の SPR 測定用の金電極を電気化学測定用の作用電極に用いる。このために図3のような構造の電気化学測定部分を作った。セル容量は1.5 ml である。電極はカバーガラス (BK 7) 上にスパッタ法で金薄膜を付けた。薄膜の厚さは下地のチタンを含めて 50 nm に調整した。金の面にインジウムスズハンダでリード線を取り付けた。このガラスの面に BK 7 と同じ屈折率をもつ屈折率整合液を塗布しプリズムに密着させた。シート状ガスケットを介して電気化学セルをプリズムに固定し電気化学実験を行った。この図のように光路は金薄膜の裏面で反射され、電気化学セル内を横切らないために自由に電気化学セル形状を設計できる。図3の他にもフロー型の微小セルを用いている。電気化学測定はセルに対極、参照極を設置し3電極法を行った。SPR 測定ではこの電極の中央部分に光が照射されるように設計した。SPR 測定装置からは反射率最小入射角が一定の時間毎に得られる。また電位、電流などの電気化学データはポテンシオスタットからのデータをデジタルオシロスコープで記録し、測定終了後に SPR のデータと合成した。

SPR 測定で直接得られるデータは金電極表面から沖合方向の屈折率分布を反映する θ_{SPR} だが、この値は金薄膜の状態や膜厚、屈折率整合液層の厚さなどの影響を受ける。この場合には θ_{SPR} の時間微分 ($\Delta\theta_{\text{SPR}}/\Delta t$) を指標に用いた。電位を走査する電気化学実験環境下では

図4 1 M 過塩素酸中での金電極のサイクリックボルタモグラム (薄い線) と時間微分 SPR の電位依存性 (濃い線)

$\Delta\theta_{\text{SPR}}/\Delta t$ は電気化学反応の結果生じる屈折率変化率であり、電流と比較することができる。また、その関係は単位電荷あたりの屈折率変化効率と考えることができる。特に拡散による物質供給が少ない反応系でサイクリックボルタモグラム (CV) と比較する時に便利である。また、光学装置の精度が高く金の膜厚がコントロールされている場合には、 θ_{SPR} によって定量的な議論も可能になる。

4. 2 電気化学 SPR 法の測定例

4. 2. 1 金の電解質中での反応

金の表面では電気化学的に酸化膜が生成したり電解質の陰イオンの吸着が知られ、金の表面状態の電位依存性はさまざまな方法で解析されている。これらとの対応から電気化学 SPR 測定データの解析を行った。過塩素酸中でのサイクリックボルタメトリーによる通常の電気化学測定と同時に SPR 測定を行った結果を図4に示す。CV では -0.3 V 以下で、酸素の還元にもなう電流や、 1.2 V 以上では金の酸化膜の生成にもなう電流、 0.8 V では金の酸化膜の還元にもなう電流が得られる。図4では CV と SPR 測定曲線が同じ電位依存性を示し、電位分解能は CV と同等であり、SPR 測定で金の表面の情報を反映していると言える。また、図4では水の酸化還元が起こる電位領域で大きな電流が流れこの電位領域では電流による解析が困難になるが、SPR ではこの反応に対する感度が比較的低くなっている。このことは、電気化学的分析への応用に有利である。水の反応が起きない電位範囲では CV と SPR の時間微分データはよく比例する。さらに、通常の SPR 測定では定性分析ができないが、屈折率変化の電荷効率の違いから表面で反応に関与している物質を推定することができた¹⁴⁾。

4. 2. 2 フェリ/フェロシアンイオンの反応

フェリ/フェロシアンイオンは通常の CV では理想的挙動を示す水溶液電気化学反応系の代表的酸化還元物質である。電極の表面積を求めたり絶縁性修飾電極の電気化学反応性を調べるのに用いられる。また全体として陰イオンとしての性質から電気化学反応物質と電極面の分

図5 フェリシアンイオンのサイクリックボルタモグラムとSPR測定
フェリシアンイオン0.1M, 走査速度10mV/s, 矢印は変化の方向

子構造との相互作用を調べるレドックスマーカーとしても用いられる。SPR測定では図5のように低い電位で、 θ_{SPR} が大きくなった。電解質中では酸化還元物質の電荷の変化にともなう周りのカウンターイオンの濃度が変化する。フェリシアンイオンの場合は還元すると電荷の絶対値が大きくなるのでより多くのカウンターイオンを必要とし、フェロシアンイオンの θ_{SPR} が大きくなると考えられる。また電位走査を繰り返すと電子移動反応に関与しない層が生成する様子が測定された¹⁵⁾。

4. 2. 3 メチレンブルーの反応

電気化学的に酸化還元反応を起こす有機物の代表的な例としてメチレンブルーの反応を測定した(図6)。メチレンブルーはCVでも吸着や膜生成をともなう複雑な挙動を示し、多段階の反応が進行すると考えられる。図6では θ_{SPR} が電位に対してピークを示している。前述のフェリ/フェロシアンイオンの反応のように酸化と還元の状態だけの場合には θ_{SPR} が酸化還元電位の前後で、それぞれの状態に相当する2つの値の間で変化するだけであり、図6のように酸化還元電位付近でどちらの状態でもない値を取るの、メチレンブルーの電解質中での還元により θ_{SPR} が小さくなる、吸着や膜生成にともない θ_{SPR} が大きくなるなど、 θ_{SPR} 変化の電位依存性がそれぞれ異なり、それらが重なって測定されていると考えられる¹⁶⁾。これらの電位依存性は電位に対して $\Delta\theta_{\text{SPR}}/\Delta t$ をプロットすると定性的データが得られる。またメチレンブルーのように酸化還元状態で光吸収の波

図6 メチレンブルーのサイクリックボルタモグラムとSPR測定
メチレンブルー75.5 μ M, 走査速度10mV/s, 矢印は変化の方向

長が大きく異なる物質の測定でもSPR測定では近赤外光などに常に吸収のない波長を選ぶことによって、屈折率の測定を行うことができる。

5. 結 言

電気化学SPR測定によって一般的な電気化学反応の解析ができることがわかった。SPR測定の溶液側は極めて薄くできるなどの自由度を活かして極微量電気化学検出器などの組み合わせを検討している。また、光学的電気化学測定の中でも簡単な装置で測定でき、感度も高い。今後幅広い応用が期待される。

(2000-2-28 受理)

文 献

- 1) V. M. Agranovich, D. L. Mills; Surface Polaritons (North-Holland Pub., 1982).
- 2) 岡本隆之; 分光研究, 47, 19, (1998)
- 3) A. Brecht, G. Gauglitz; Biosensors & Bioelectronics, 10,

- 923 (1995)
- 4) M. Buckle, R. M. Williams, M. Negroni, H. Buc, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 889, (1996)
- 5) B. Rothenhäslar, W. Knoll ; *Nature* **332**, 615 (1988)
- 6) D. Piscevic, R. Lawall, M. Veith, M. Liley, Y. Okahata, W. Knoll ; *Appl. Surf. Sci.* **90**, 425 (1995)
- 7) J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, R. Woodbury ; *Sensors and Actuators B*, **35**, 212 (1996)
- 8) R. C. Jorgenson, S. S. Yee ; *Sensors and Actuators B*, **12**, 213 (1993)
- 9) L. De Maria, M. Martinelli, G. Vegetti ; *Sensors and Actuators B*, **12**, 221 (1993)
- 10) S. G. Nelson, K. S. Johnston, S. S. Yee ; *Sensors and Actuators B*, **35**, 187 (1996)
- 11) A. Tadjeddine, *Electrochim. Acta*, **34**, 29 (1989)
- 12) F. Abeles, T. Lopez-Rios, A. Tadjeddine, *Solid State Commun.* } **16**, 843 (1975)
- 13) C. C. Jung, S. B. Saban, S. S. Yee, R. B. Darling ; *Sensors and Actuators B*, **32**, 143 (1996)
- 14) Y. Iwasaki, T. Horiuchi, M. Morita, and O. Niwa ; *Electroanalysis* ; **9**, 1239 (1997)
- 15) Y. Iwasaki, T. Horiuchi, M. Morita, O. Niwa ; *Surface Science*, **427**, 195 (1999)
- 16) Y. Iwasaki, T. Horiuchi, M. Morita, and O. Niwa ; *Sens. Actuators, B* ; **B 50**, 145. (1998)
- ~~~~~