

酸化グラフェン被覆膜による金蒸着ガラス棒 SPR センサーの超高感度化

満塩 勝

鹿児島大学 学術研究院 理工学域 工学系

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

Tel: 099-285-8342

要旨

表面プラズモン共鳴(SPR)現象は、高屈折率の光伝達媒体、金属薄膜層、試料の三層構造を形成したときに、高屈折率光伝達媒体の内表面から全反射角以上で光を入射すると、金属薄膜と接触した試料の屈折率に対応した入射角または波長の光が減衰する現象である。SPR現象を利用したセンサーは小型で単純な光学系でシステムを構築でき、低価格で使いやすいセンサーとしての普及が期待されている。

酸化グラフェンは六員環を基本として二次元方向に広がった炭素のシートにアルコキシ基やカルボキシ基を導入したものである。ガスバリア性や高い熱伝導率、強い引っ張り強度など様々な特性を持った新素材であるが、この酸化グラフェン層を被覆することで、SPR センサーの感度を増感させるという報告がある。本申請課題は、新素材として注目を集めている酸化グラフェンを用いて金蒸着ガラス棒 SPR センサーの増感とその特性について調査を行い、バイオセンサーや食品分析、携帯型 SPR センサーシステムの開発のための超高感度化に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

1 緒言

六員環構造に規則正しく配列した sp^2 混成の炭素原子が二次元ハニカム構造のシート状になったものはグラフェンと呼ばれる。これはガスバリア性や光の吸収率の高さ、シリコンの 25 倍にもおよぶ熱伝導率、高い引っ張り強度などの物理的および化学的に特異な性質を持っており近年注目を浴びている¹⁾²⁾。しかし、純粋なグラフェンは水などに分散させることが難しいため、これを酸化させた酸化グラフェンを用いた研究が多くなされている。酸化グラフェンの化学的な構造についてはいくつかの説があるが、最も有力なものは Fig. 1 に示すような Lerf-Klinowski model と呼ばれるものである。

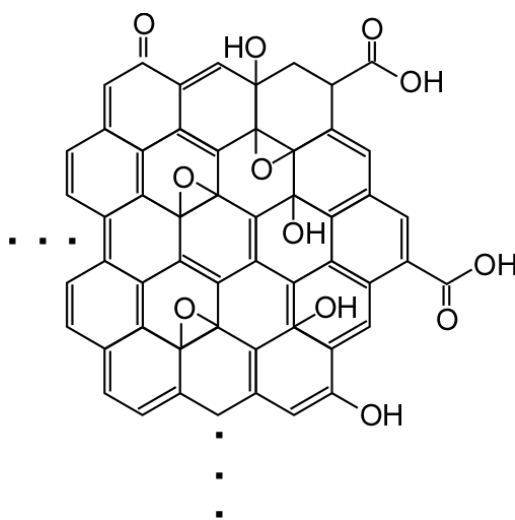


Fig. 1 Estimated chemical structure of the Graphene oxide

このモデルでは、グラフェンの基本構造にエポキシ基やヒドロキシ基が導入され、カルボキシ基やヒドロキシ基で終端されていると考えられ³⁾⁴⁾、酸化グラフェンの水などへの分散性が大きくなる理由も無理なく説明できるものとなっている。この物質を用いた様々な合成化学や分析化学的な研究が盛んになっている。

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)現象は、高屈折率の光伝達媒体、金属薄膜層、試料の三層構造を形成したときに、高屈折率光伝達媒体の内表面から全反射角以上で光を入射すると、金属薄膜と接触した試料の屈折率(誘電率)に対応した入射角または波長の光が減衰する現象である。これは金属表面に存在する自由電子と光との相互作用によるものであり、迅速な非破壊分析が可能なセンサーシステムを構築することが可能である⁵⁾。また、干渉や蛍光を使う光学機器と比較して単純な光学系でセンサーシステムを構築することも大きな利点であり、低価格で使いやすいセンサーとしての普及が期待されている。その一報で前述した干渉や蛍光を利用するシステムと比較して感度が劣るため、SPR センサーシステムの感度の向上が強く望まれている。

このニーズに対する新しいアプローチとして、グラフェンや酸化グラフェンを用いた SPR の増感が提案されている。グラフェンや酸化グラフェンを金や銀の上に吸着させると、金属との界面において電子の分布状態に変化が起こり、金属表面の自由電子を利用する SPR 現象を利用

したセンサーにおいてその感度が飛躍的に向上することが見いだされた⁶⁾。また、酸化グラフェンを数層積層させた場合、その層内に侵入した分子が π - π スタッキング効果によって吸着することで濃縮されて SPR センサーの応答が強くなることも示唆されている⁷⁾。

本研究室では、これまで安価で量産可能な SPR センサーシステムの完成を目指し、可能な限り単純な光学系でセンサーシステムを構築する研究を行ってきた。従来の SPR センサーシステムでは、SPR 吸収に基づく波長か入射角の共鳴吸収のピークのシフトを利用するが、本研究においては反射時の光強度の総量を用いることで、分光光度計やゴニオメーター等の光学部品を不要とし、極めて単純な構成でセンサーシステムを構築することができる。しかし、本法は感度の点で波長や入射角を用いる SPR センサーよりも劣るため、センサーの感度の向上は極めてプライオリティの高い開発項目となっている。

そこで本申請課題では酸化グラフェンを用いた SPR センサーの作成を試み、感度の向上に関する研究、酸化グラフェンを用いた場合の選択性の有無やその原理についての検討を行い、小型、軽量、かつ単純な構造を持った構成の SPR センサーシステムを開発するための知見を得ることを目的とした。

2 理論

Fig. 2 に金薄膜を用い、波長を固定して共鳴角を走査するタイプの SPR センサーの模式図を示す。光がプリズムや石英棒などの高屈折率媒体の内表面で全反射したとき、その反射点にエバネッセント波と呼ばれる波が発生する。これは Z 軸方向に向かって減衰して行く性質を持っている。適切な膜厚の金薄膜を反射点の外表面に形成すると、その表面の自由電子とエバネッセント波が相互作用を起こし、金属薄膜と接触している試料の屈折率に対応した入射角の光が吸収される。この角度をゴニオメーターやライン CCD で測定することで、試料の屈折率を知ることができる。

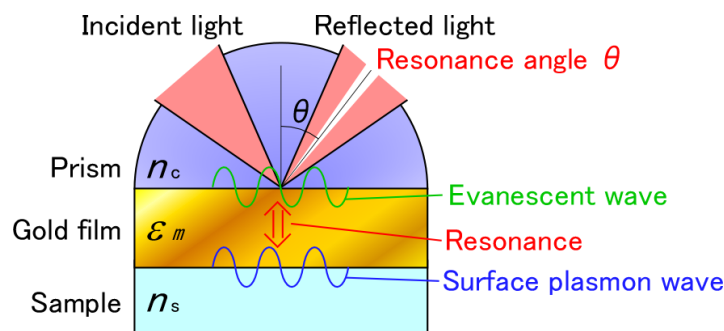


Fig. 2 Principle of an angular interrogated SPR sensor

本研究では、この SPR 吸収の発生時に反射率が矩形波的に 0 になるのではなく、入射角に対して二次関数的な吸収強度の分布を取ることと、屈折率によってこの形が変わることを利用することで、角度の掃引を行わずに反射光の全光強度を測定することで屈折率を測定することができる。したがって、ゴニオメーターのような動的な部分が存在せず、また受光部もライン CCD や分光光度計ではなくフォトダイオードでシステムを構築することが可能である。

3 実験

3.1 センサーおよびシステムの構成

センサー部は直径 2 mm、長さ 15 cm の石英棒の側面の 15 cm の範囲に 45 nm の膜厚の金薄膜層を真空蒸着法で形成したものを用いた (Fig. 3)。必要に応じて後述する酸化グラフェン被覆処理を行った後、これをガラス管内に試料導入・排出用のテフロンチューブと共に樹脂を用いて固定してフローセルとした。

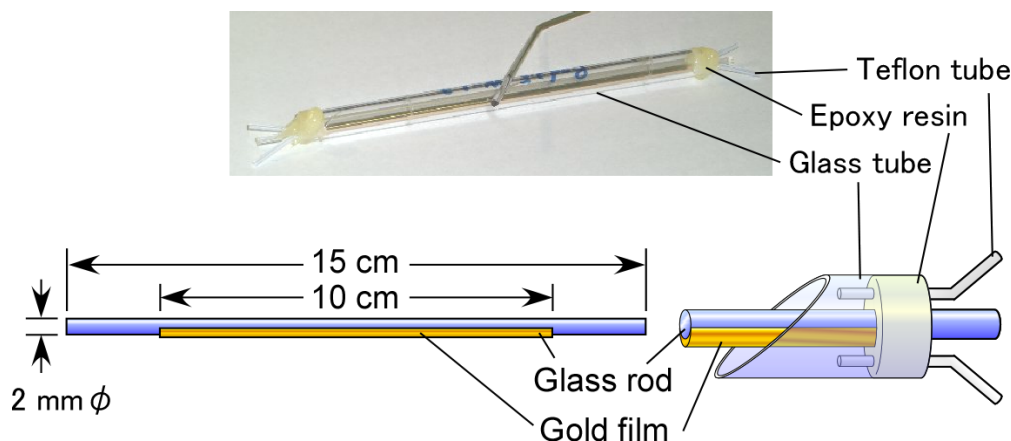


Fig. 3 Schematic representation of a gold-deposited quartz-rod SPR sensor

光源には発光ダイオード (Light Emitting Diode; LED)、受光部にはフォトダイオード (Photodiode; PD) を用いた。これらの光学素子を 3D プリンタで作製した治具を用いてガラス棒の両端に直接接触するように固定して SPR センサーとした。電源として直流安定化電源を用い、LED の定格電圧である 2.6 V で点灯させた。センサーを透過してきた LED 光の強度は、PD で電流に変換された後、これと並列に接続した抵抗器を利用してデジタルマルチメーターで電圧として検出され、RS-232C 経由でコンピュータに光強度の情報を送り、毎秒 1 点のサンプリング速度で記録した。

3.2 酸化グラフェンによるセンサーの被覆

酸化グラフェンは合成も可能であるが、本研究では市販の酸化グラフェン水分散液 (10 mg/mL) を用いた。この原液を蒸留水で希釈して 0.5 および 5 mg/mL の濃度に調整したものを被覆用溶液とした。これを試験管にとり、金を蒸着したガラス棒を浸漬させてから取り出して乾燥させることで被覆を行った。Fig. 4 は被覆後のセンサーの例として、5 mg/mL の酸化グラフェン水分散液による被覆回数とセンサーの状態の写真である。回数が増えると明確に黒くなっていくが、その付着は不均一であった。これは金が疎水性であるためで、水分散液が金表面に均一に吸着しないためである。これは金表面に親水性の化合物を吸着させて分散液を均一に付着させることで防ぐことは可能であるが、本研究では不確定要素を増やさないために採用しなかった。また、この方法でセンサー表面に堆積した酸化グラフェン層は、数時間の測定時間に

においては再度水に分散することは観測されず、センサーの応答にもその兆候は見られなかった。



Fig. 4 Number of immersions in 5 mg/mL graphene oxide aqueous dispersion and appearance of the sensor

4 結果と考察

4. 1 酸化グラフェン水分散液 1 回被覆センサーの応答

金を蒸着したガラス棒を 15 分間、0.5 mg/mL および 5 mg/mL の酸化グラフェン水分散液に浸漬乾燥させたセンサーを用いて、0～50 体積%のエタノール水溶液を測定した結果を Fig. 5A に、各試料の測定における 0% で規格化した透過光強度をプロットした検量線を Fig. 5B に示す。(a)が無修飾、(b)が 0.5 mg/mL、(c)が 5 mg/mL の酸化グラフェンで被覆したものである。B の検量線は各濃度のエタノール水溶液に対して、2 ロットのセンサーでそれぞれ 2 回ずつ測定を行った時の標準偏差をエラーバーとして示している。

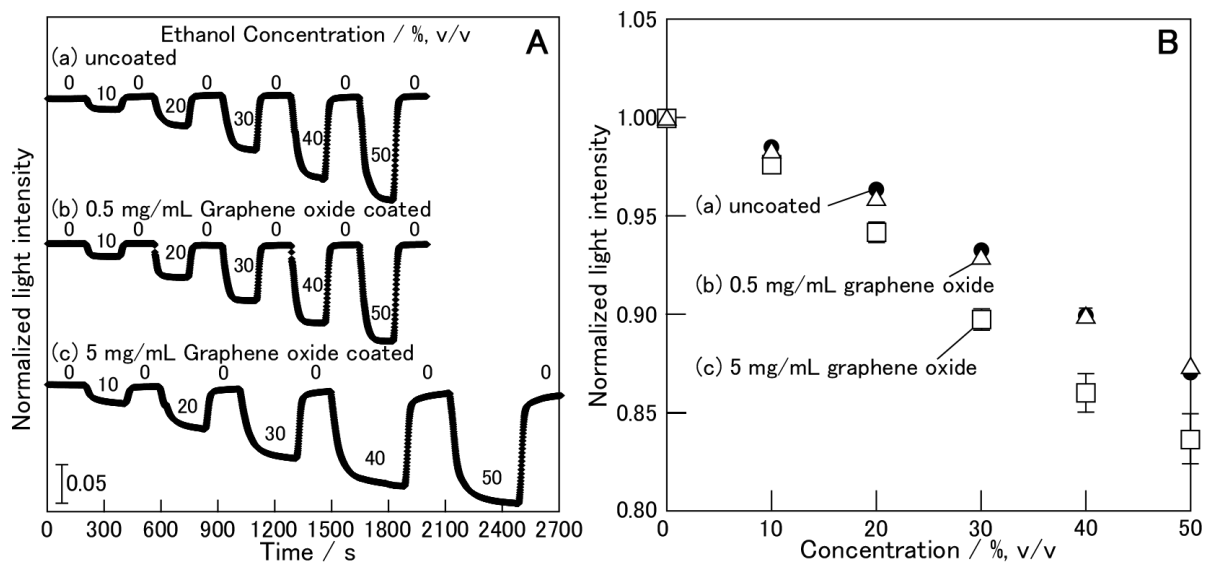


Fig. 5 Response curves (A) and calibration plots (B) of the uncoated, 0.5 mg/mL graphene oxide coated, and 5 mg/mL graphene oxide coated gold deposited glass rod SPR sensor

酸化グラフェン水分散液は、粘度が高く、5 mg/mL よりも大きな濃度になるとセンサー表面に均一に成膜することが難しくなった。各試料の測定時間は、(a)と(b)が 180 秒、(c)は 30 秒間のセンサーの応答の相対標準偏差が 0.03% 以下になるまで 180～350 秒の範囲で調整した。

(b)の 0.5 mg/mL 被覆は、Fig. 5A、Fig. 5B 共に(a)の無修飾とほとんど変化がなく、効果があるとはいえなかった。しかし、(c)の 5 mg/mL 被覆は、Fig. 5A から明らかに応答が大きくなり、

また Fig. 5B で検量線の傾きが大きくなっていることが確認でき、酸化グラフェンによる感度の増強が確認できた。しかし、応答が安定化するまでにかかる時間が大きくなる傾向が見られることから、この SPR センサーの増感は、酸化グラフェン表面だけではなく、酸化グラフェン層内部への測定分子の拡散も影響していることが示唆された。

4. 2 平板状の分子に対する応答

酸化グラフェンは二次元状に広がる炭素シート同士が π - π スタッキングで重なり合う性質があると思われるため、SPR センサーの金表面には多分子が層状に吸着されているものと思われる。この層数は濃度が高いほど多くなることが予想され、そこに入り込む分子が増えることで前述した感度の向上が起こるものと期待できる。したがって π - π スタッキングに割り込める分子だと増感作用がさらに大きくなると考えられるため、平面状のプリン骨格を持つカフェインの測定を試みた。Fig. 6 に(a)無修飾、(b)0.5 mg/mL、および(c)5 mg/mL の酸化グラフェンで被覆したセンサーを用い、0.01 重量%、0.05 重量%、0.10 重量%のカフェイン水溶液の測定を行った結果を示す。

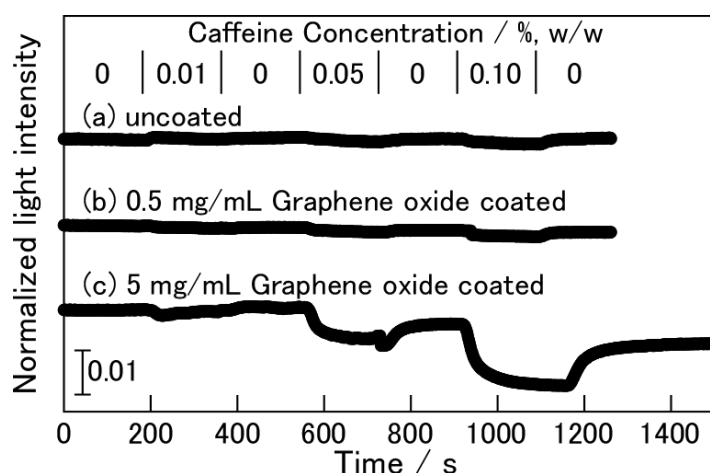


Fig. 6 Response curves of the (a) uncoated, (b) 0.5 mg/mL graphene oxide coated and (c) 5 mg/mL graphene oxide coated gold deposited glass rod SPR sensor

試料は 0 重量% (蒸留水) と 0.01, 0.05, 0.10 重量%のカフェインを交互に測定した。測定時間は、(a)、(b)は各濃度につき 180 秒、(c)は 240 秒とし、すべて測定開始後の 0 重量%カフェイン水溶液測定時の透過光強度を用いて規格化した。Fig. 5A と同様に(a)と(b)は全く応答を示さず、(c)は非常に大きな応答を示した。特に(c)の感度の増幅率は Fig. 5A よりもはるかに大きかった。0 重量%と 0.10 重量%のカフェイン水溶液の屈折率(25℃)は実測でそれぞれ 1.33248 と 1.33266 であり、その差は 0.00018 であった。本研究で用いているセンサーの検出限界が 0.00018⁸⁾であることから、(a)無修飾や増感作用がほとんど見られなかった(b) 0.5 mg/mL 被覆センサーでは 0.10 重量%以下のカフェインの検出は難しいことが確かめられた。これに対し、(c)の 5 mg/mL 被覆ではその半分の濃度の 0.05 重量%カフェイン水溶液でも大きな S/N 比で測定できており、感度だけでなく検出限界も大きく向上していることが分かった。

この現象は、 π - π スタッキングによる酸化グラフェン層内への分子の吸着で分子の蓄積が起こり、SPR 検知領域におけるカフェインの濃度が向上したためであり、酸化グラフェン層が金蒸着ガラス棒センサーの感度の増加に効果的であることが分かった。

4. 3 酸化グラフェン水分散液の被覆回数の影響

センサー表面への酸化グラフェンの付着量と感度の関係について、カフェイン水溶液を用いて調査を行った。Fig. 7 は(a)5 回、(b)7 回、(c)10 回 5 mg/mL の酸化グラフェン水分散液に浸漬乾燥させたセンサーの 0.01、0.05、0.10 重量%のカフェイン水溶液に対する応答である。(a)の浸漬回数 5 回が最も感度が高く、1 回浸漬の 5 倍以上の応答の大きさを示した。これに対し、(b)の 7 回、(c)の 10 回と回数が増えていくと応答が急激に小さくなっていくことが分かった。これは金薄膜を覆う酸化グラフェン層が厚くなりすぎて、試料が浸透する領域が SPR 現象のセンシング領域から外れてしまうためであると考えている。また、感度の大幅な増加は見られた代わりに、0 重量%に戻したときに透過光の強度が 1 に戻りきらないことが分かった。応答の形から推測して、もっと測定時間を延ばすことによってこの問題は解決できるが、それはセンサーの応答時間が長くなりすぎて使いにくくなることを意味している。したがって、酸化グラフェン層を SPR センサーの増感部分として用いるには、5 mg/mL 水分散液の場合は 5 回被覆が限界であることも分かった。

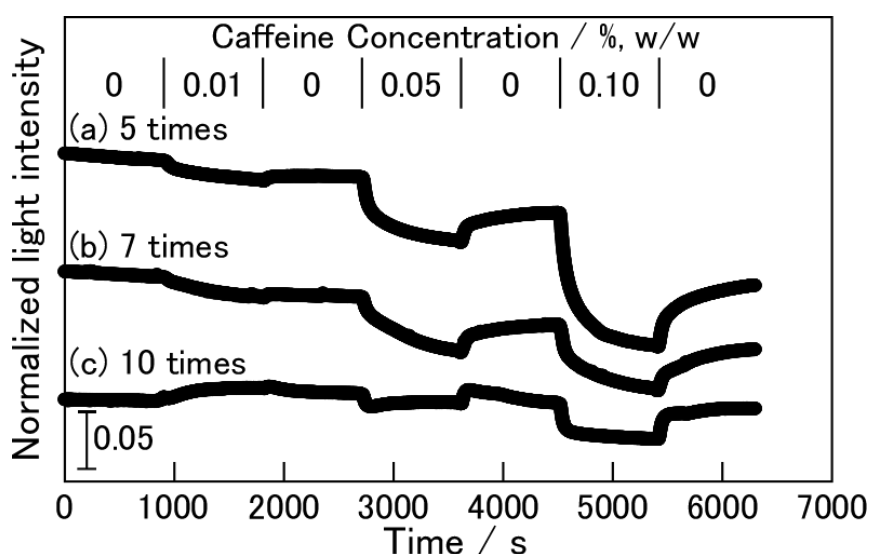


Fig. 7 Response curves of the (a) 5, (b) 7, (c) 10 times graphene oxide coated gold deposited glass rod SPR sensor

4. 4 酸化グラフェン水分散液 5 回被覆センサーによる様々な分子に対する応答

5mg/mL の酸化グラフェン水分散液の 5 回被覆のセンサーで大きな応答が得られることが分かったので、このセンサーを用いて分子形状にどのような影響を受けるのかを確認するために、低濃度のカフェイン、ラフィノース、カテキン水溶液を測定したときのセンサーの応答を Fig. 7 に示す。5 回被覆の場合はセンサーの安定化に時間がかかるため、評価は 15 分後の規格化透

過光強度で行った。つまり、応答が安定化後の酸化グラフェン層内に侵入した試料の総量ではなく、間接的に層への拡散速度を用いた評価とした。試料として、ポリフェノールの代表的な化合物の一つであるカテキン、天然オリゴ糖の代表としてラフィノース、平板状分子の代表としてカフェインをそれぞれ水溶液として用いた。また、プロットの横軸をアッペ屈折計で実測した25℃における試料の屈折率とした。

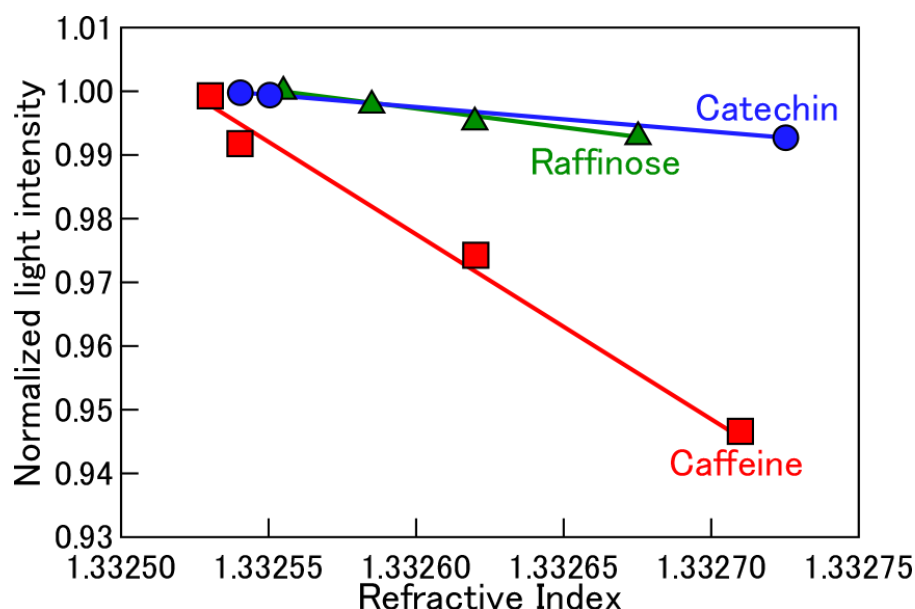


Fig. 7 Sensor responses to the refractive indices of caffeine, raffinose, and catechin aqueous solutions

この結果より、カテキン、ラフィノースはほぼ同一の検量線を示し、カフェインはこれらの5倍以上の傾きを示した。カテキン、ラフィノースは立体的な構造を持っており、特に分子の「厚さ」について、カフェインは概算で1.8 Åなのに対し、カテキンは3.1 Åと1.7倍もの差がある。ラフィノースは三糖類なのでさらに分子が大きくなるため、酸化グラフェンの分子層に入りにくくなり、カフェインのような増感作用を示さなくなったものと考えられる。このプロットの屈折率の範囲は前述したセンサーの検出限界とほぼ同等であるため、理論上は最も高屈折率側のプロットがかろうじて応答する程度であるが、本測定ではカフェインだけでなくラフィノースやカテキンも明確な応答を示している。したがって、酸化グラフェンで被覆した金蒸着ガラス棒 SPR センサーは、特定の形状の分子に対しては極めて高い感度を示すが、それ以外の分子に対しても感度が増加することが確認できた。

5 結論

本研究では、酸化グラフェン薄膜層で被覆した金蒸着ガラス棒 SPR センサーについて、感度の向上について研究を行った。蒸留水で希釈した酸化グラフェン水分散液に浸漬乾燥させるという簡便な方法にもかかわらず、エタノール水溶液に対して有意な感度の向上が見られた。また、プリン骨格を持つカフェインに対しては大幅な増感作用が確認され、センサーの検出限

界を大幅に向上させることが分かった。これは 5 mg/mL の水分散液を用いて被覆膜層を形成した場合に顕著に見られ、ある程度の量の酸化グラフェンが金表面に堆積して初めて効果が発揮されることが分かった。これは酸化グラフェン層内への π - π スタッキングによる蓄積効果が関係すると考えられ、これを効率的に利用するにはある程度の分子の薄さが必要であることも考察された。また、 π - π スタッキングを利用するためには、単に平板な分子ではなくプリン骨格のような長い共役を持つことも重要であることが考えられた。

また、被覆層の厚さも重要なことが被覆回数に関する実験によって明らかになった。酸化グラフェン層の厚さが厚すぎると SPR センサーの検知領域から外れてしまい、薄すぎると層間への試料の蓄積効果が小さくなるためであると考えられる。

これらの成果から、酸化グラフェン被覆膜は金蒸着ガラス棒 SPR センサーの感度を向上させることが可能であり、カフェインなどの特定の分子に対しては感度を飛躍的に向上させることが明らかになった。また、プリン骨格はカフェインだけでなく核酸などの基本構造にもなっており、一部の生体関連分子に対しても高感度で測定が可能なセンサーが構築できることが期待できる。

6 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、令和元年～4 年度文部科学省科学研究費補助金 (No.19K05547)、令和 4 年度 九州・大学発ベンチャー振興シーズ資金 (ギャップ資金) 制度、および令和 5 年度サンケイ科学振興財団研究助成金の支援を受けて遂行されたことを付記し、ここに謝意を表します。

7 引用文献

- 1) 榎木 敏明, *化学と教育*, **62**, 120 (2014)
- 2) 満塩 勝, 吉留 俊史, *分析化学*, **73**, 23 (2023).
- 3) A. Siklitskaya, E. Gacka, D. Larowska, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, A. Malolepszy, L. Stobiński, B. Marciniak, A. Lewandowska-Andrałojć, A. Kubas, *Scientific Reports*, **11**, 7977 (2021).
- 4) A. Jiricková, O. Jankovský, Z. Sofer, D. Sedmidubský, *Materials*, **15**, 920 (2022).
- 5) J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B*, **54**, 3 (1999).
- 6) K. Chung, J. S. Lee, E. Kim, K. Lee, K. Kim, J. Lee, D. Kim, S. O. Kim, S. Jeon, H. Park, D. Kim, D. H. Kim, *Adv. Mater.*, **5**, 1800433 (2018).
- 7) P. O. Patil, G. R. Pandey, A. G. Patil, V. B. Borse, P. K. Deshmukh, D. R. Patil, R. S. Tade, S. N. Nangar, Z. G. Khan, A. M. Patil, M. P. More, M. Veerapandian, S. B. Bari, *Biosens. Bioelectron.*, **139**, 111324 (2019).
- 8) M. Mitsushio, M. Higo, *Opt. Commun.*, **285**, 3714 (2012).

Development of a sensing element for measurement of nutrient concentration

Masaru Mitsushio

Research Field in Engineering, Science and Engineering Area,
Kagoshima University,
1-21-40, Korimoto, Kagoshima, 890-0065
Tel 099-285-8342

Abstract

The surface plasmon resonance (SPR) phenomenon occurs when light enters from the inner surface of the high refractive index medium, which has a thin metal film on its surface. This is a phenomenon in which light at an incident angle corresponding to the refractive index of the sample in contact with a thin metal film is attenuated. The SPR sensor can be incorporated into systems due to their small size and simple optical system, and are expected to become popular as low-cost, easy-to-use sensor.

Graphene oxide is a carbon sheet with alkoxy or carboxyl groups based on six-membered rings structure. It has various properties such as a high gas-barrier, thermal conductivity, and a physical strength. It has been reported that a graphene oxide overlayer on the SPR sensing element enhanced the sensitivity of the sensor.

In this study, we have aimed to obtain the knowledge to fabricate an ultra-high sensitive gold-deposited glass rod SPR sensor coated with a graphene oxide overlayer for a development of biosensing, food analysis, and mobile sensing system

Despite the simple coating procedure of immersing the SPR sensor into the graphene oxide aqueous dispersive solution and drying in air, the enhancement in the sensitivity was observed for aqueous solutions of ethanol, caffeine, raffinose, and catechin. Particularly remarkable significant enhancement was observed in the caffeine aqueous solution. It is thought that the caffeine molecule having a planar structure diffuse into the graphene oxide layers.

The gold-deposited glass rod SPR sensor coated with the graphene oxide overlayer showed high sensitivity to caffeine. It is found that that this sensor has a potential as a new sensing system.