

光導波路分光法を用いた電気化学測定イメージング

1. はじめに

界面の解析は重要な意味を持つ。多様なサンプルに応じて測定法も変貌しており、従来のスタティックな測定法のみならず、ダイナミックな測定も望まれるようになってきている。当然ながら、非破壊、in-situ測定が常識になりつつある。そういった社会の要請の変化に対応した装置の出現が望まれている。我々システムインストルメント(株)はエバネッセント波を利用する光導波路分光測定法を早くから開発しており、界面における微量・高感度測定を行うためのアプリケーションの開発に力を注いできた。ここでは、本法の概略と本法を用いて行われている解析について紹介する。

2. 光導波路分光測定法の原理

光導波路分光測定法は入射する白色光光源、光ファイバーに代表されるコアに相当する薄い(数ミクロンから数100ミクロンの厚み)高屈折率のスラブ状の透明固体層(スラブ型光導波路=SOWG)の測定部(セル部)そして分光器からなる。光導波路に全反射可能な角度で白色光を入射すると、繰り返し反射により光導波路界面にエバネッセント波が生じ、これを導波路上に置かれたサンプルが吸収する。従って、出射光を分光すれば、吸収スペクトル情報を高感度に測定することが可能となる(Figure 1.)。

光導波路分光測定装置の光学系

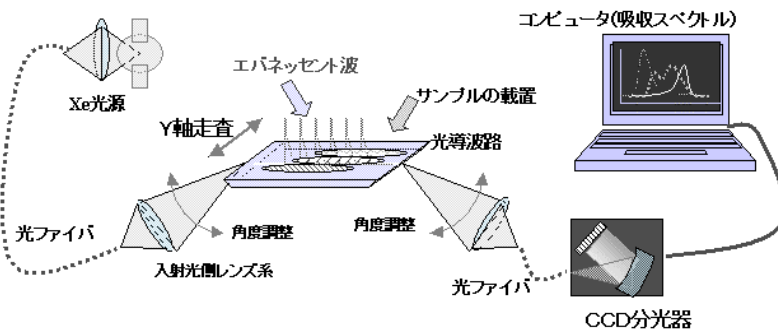


Figure 1. 光導波路分光測定装置の光学配置の模式図(既出の図¹⁾を参考にした)

導波路に用いられる材料は、それ自身が測定波長域に吸収がないことが望ましい。特に光導波路測定では長い導波路内を全反射しながら光が進むため、導波路自身の吸収特性は解析精度に大きく影響する。主に用いられる硝材としては紫外、可視域用としては石英(220 から 1000nm、 $n = 1.47$)、可視域用としては重フリントガラス(350 から 1000nm、 $n = 1.81$)などがある。ほかに、サファイアなどの結晶やPMMAなどの樹脂などを用いる場合もあるが、導波路としての精度や硝材として分散が大きいなどの理由により、使用例は制限されている。かつては、感度を稼ぐために繰り返し反射回数を多くするひとつの方法として、導波路を薄くすることに力が注がれていたが、プローブ光の強度があればスペクトルデータのS/Nの点で有利であるため、どんな場合でも導波路の厚みが薄ければ良いというわけではない。我々が標準的に用いている石英導波路は200 μm 厚で65mmの長さを持つ。LB膜を導波路全長を利用してディップコートした場合、導波路表面裏面合わせて200回程度の反射回数を得られる。

薄い導波路に外部から光をカップリングする方法はプリズム法、グレーティング法、端面入射法とその入射の組み合わせが知られている。それぞれ一長一短あり、カップリング効率と目的により選択されるが当時(1995 から 2000 年にかけて)多くの研究の現場ではカップリング効率の良いプリズム法を利用していた。装置化を目的としている我々はカップリングでは高効率ではないが、リニアに角度を変えられる長所を持ち、測定再現性も良く、セッティング、ハンドリングも容易な端面入射法を選択している。プローブ光の強度が十分得られればダイナミックレンジの点で有利であるが、分光器のA/D分解能が高くても(12bitより16bit)S/Nの改善に貢献するので弱い吸収帯もノイズに埋もれずに測定することが可能である。

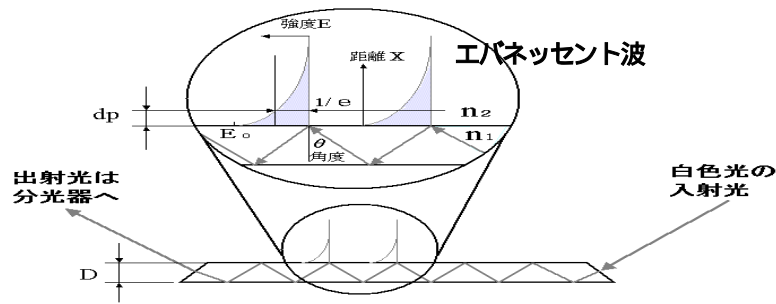


Figure 2. 光導波路の全反射とエバネッセント波の説明図

エバネッセント波の由来は「しだいに消える」ことを意味する英語の単語 *evanescent* が語源で、その名の通り全反射界面で界面の反対側に局在し、界面から離れるにしたがって指数関数的にその強度を弱める(Figure 2.)。

$$E = E_0 \exp(-X / d_p) \quad (1)$$

その到達距離 d_p はおよそ波長オーダーとされ、次式であらわされる。

$$d_p = \frac{1}{2} n_1 (\sin^2 \theta - (n_2 / n_1)^2)^{1/2} \quad (2)$$

実際に波長を 400 nm、導波路の硝材を石英ガラス $n_1 = 1.47$ 、被測定対象を水系で $n_2 = 1.33$ とすると、入射角度 70° (法線からで、導波路内では 66.8° この角度を用いる。) を用いて計算すると 270 nm となる。実際に、吸収に寄与するエバネッセント波の到達距離は $3 d_p$ までとされるので、810 nm までが測定可能範囲となる。光導波路測定が FTIR の ATR と比較されることがあるが、エバネッセント波の染み込み深さが波長オーダーであるため、赤外光では数ミクロンオーダーの情報が得られることになり、バルクの情報も含んだ結果が得られるため、表面の状態だけを見ていることにはならない。

また、測定感度は繰り返し反射回数(測定導波路長、導波路の厚みによる)エバネッセント波の染み込み深さ(波長、入射角度による)界面の状態(疎水、親水、)によって左右されるので、これらを入念にチェックすることが重要である。

3. 我が社における光導波路分光測定装置開発の歴史

「今まで何故、このような分光法がなかったのか?」と、よく聞かれる。エバネッセント波を用いる測定はニアフィールド光学の研究の歴史にほかならない。これは 1920 年代に予見され、1940 年代には理論構築がなされ、1970 年代にマイクロ波レベルで実証された。1980 年代に入ると国内外を問わず盛んに研究がなされるようになってきた。もちろん、レーザーのような単色光を用いたエバネッセント波測定系の構築は 1990 年代に入ってから行なわれるようになった²⁻⁸⁾。類似の手法である表面プラズモン共鳴の研究は Otto らにより 1968 年に報告され⁹⁾、1984 年からバイオセンサへの応用が拓け、盛んに研究されるようになっていった¹⁰⁻¹⁷⁾。

白色光入射の光導波路分光測定法の原形は、かつての通商産業省物質工学研究所の加藤健次博士らの手により 1994 年に誕生した^{1,18)}。我々は運良く共同研究を進める機会を得て、製品化を手がけることとなった。バブルが崩壊し、景気は低迷、奇しくも日本が産業復興の目玉に掲げたのが、IT、バイオテクノロジー、ナノテクノロジーである。我々はこれらの分野にこの光導波路分光法が活かせるのではないかと、漠然とではあるが感じた。

平成9年、装置もとりあえず形になり、その年の分析機器展に初めて出展した時、ユーザーではなく多くの分析メーカーの方が来てくださったのを覚えている。新技术説明会でも20人ほどが来られ、そのうちの1/4は関係者、あとは大手分析器メーカーの方ばかりだった。そもそも光導波路分光法というものになじみがないうえ、我々のPRの仕方が不十分であったためであろう。何よりも開発した当人が、何に使えるのかがよくわかっていなかった。

当時一生懸命に測っていたのは、PET やポリイミドなどの樹脂フィルム系と、メチレンブルーなどの色素類であった。表面とバルクでは構造や存在する分子の状態が異なることに気づきはじめていた。装置は売れなくても毎日毎日測定に明け暮れ、本来屈折率が1.5くらいあるような樹脂であっても、エアーや水を導波路と試料との間に挟むと測定できることを経験していた。どうやら、エバネッセン波が届けば導波路に試料を密着させなくてもスペクトルが測定できることなどや、屈折率が1.47程度の石英でも十分測定に使えることなどがわかった。しかし、新規アプリケーションの方向も定まらず、装置も一台も売れず、このまま開発を続けるか否か決断を迫られようという頃、東京農工大学工学部の大野弘幸教授から電話が掛かってきた。「電極表面のたんぱく質のスペクトルを測定できるか？」とお問合せだった。当時、知りえた知識を総動員して絵を書いてファックスしたり、一生懸命説明させて頂いた。それでは実際に測ってみたいということになり、大野教授と大学院の博士後期課程に在学中の来栖史代氏(当時D1、現在は産総研の研究員)が弊社に来られることになった。

1998年4月28日、大野教授はその時ポテンシostatを持ってこられており、へムたんぱく質の一種であるチトクロム c (cyt.c) の溶液を導波路上に滴下、導波路分光測定によりスペクトルが確認できると、すぐさまITO透明電極とPt、Ag電極を手にし導波路上に電極を組んでいった。ポテンシostatに電極類が接続され、cyt.c溶液に電位がかけられた。我々が息をのんで見守る中 cyt.c のソーレバンドのピーク(412nm)が長波長側(417nm)にみるみる動いていくではないか！電極還元を導波路分光で動的に観測した瞬間であった(Figure 3.)。さらには電位に応じて cyt.c が酸化と還元を繰り返すことも追跡できた¹⁹⁾。私はこのときの光景を今も忘れない。この出会いがなかったら私はこの仕事を続けていけなかったと思っている。

4. 電気化学測定に用いる光導波路分光測定法

電気化学測定における光導波路分光測定法は主に電極界面、電極界面近傍に存在する分子における電子の受け渡しのイメージングに用いられることが多い。実際のCV測定では、微小電流を再現性良く測定するのは容易ではない。しかしスペクトルからは電子移動に伴う変化を追

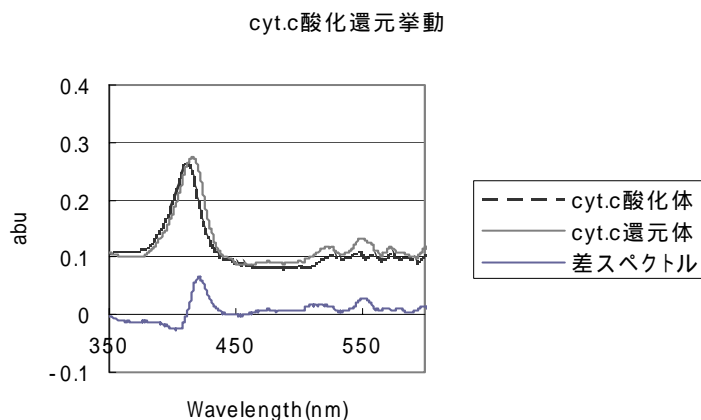


Figure 3. 当時記録された cyt.c の酸化、還元挙動

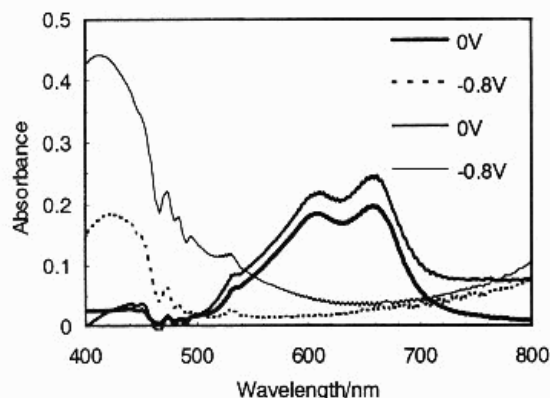
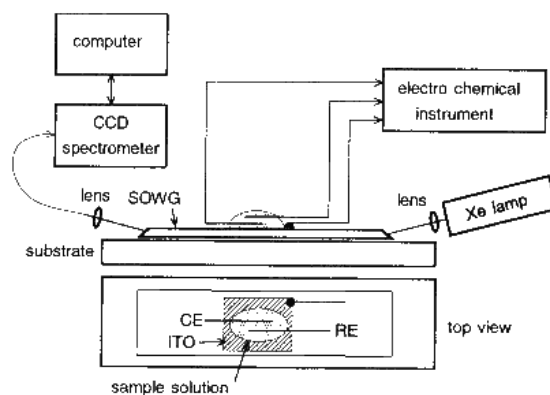


Figure 4. 直接導波路法による電極配置とITO電極上のメチレンブルーの吸収スペクトル変化。(物質工学工業技術研究所報告第8巻第3号(2000)より引用)

跡しやすい。

電気化学測定における光導波路分光測定法は大きく分けて2つの方法がある。**直接型導波路分光法**¹⁹⁻²⁶⁾と**非接触型導波路分光法**²⁷⁻²⁹⁾がそれである。

直接型光導波路分光法にも測定方法は2通りある。1つは、光導波路表面にITOなどの透明電極を蒸着し、それを作用極としてその上に対極、参照極を配置する方法で、被測定対象をエバネッセント波の界面に近い強度の強い部分で測定できるのが特徴で、セッティングが容易な方法である。また、その他にも界面に直接サンプルを置くこの測定法はエバネッセント波の到達距離を見積もりやすいなどの長所がある。主に研究は産業技術総合研究所の加藤健次博士、松田直樹博士のグループほかで行なわれている²⁰⁻²²⁾。短所としては、電極の種類に乏しいこと、つまり測定対象となるサンプルの吸収波長域と電極材料の透過波長域があってはいかならないこと、また貴金属電極を直接導波路に蒸着した場合は金属そのものの吸収と、金属の自由電子の共鳴による表面プラズモン共鳴の影響を受けることが多い(表面プラズモン共鳴を用いての電気化学測定では海外のTaoらの報告が知られている¹¹⁾。)

もう一つの**直接型光導波路分光法**は、導波路とは別の電極を作用極として導波路上に固定化し、導波路と電極の間に測定サンプルを入れて測定を行うものである^{19,23)}。この方法を用いれば、導波路を直接作用極として行う場合に問題となる電極種の制限や、表面プラズモン共鳴による影響を受けることはほとんどなくなる。この方法の場合、エバネッセント波は直接電極表面上に生じるわけではないが、エバネッセント波のしみ込む距離以内の情報であることに留意すべきである。また、ポリエチレンオキッド(PEO)のような高屈折率のサンプルでも全反射条件を満たすような導波路を選択することで解析可能であり²⁵⁾、さらにマイクロオーダーという少量での測定が可能であることから、イオン性液体の様な高価なサンプル中の解析²⁶⁾にも有効である(Figure 5)。しかしながら、この方法の場合、導波路と電極との間にサンプル溶液を入れて行うため、電極表面に吸着あるいは固定化した分子の電極応答のみを分子にダメージを与えずに検出すること、また導波路と電極界面の距離が一定になりにくいこと、再現性の良いスペクトルを得ることは困難である。この点に考慮して、電極の種類に関わらず電極上に存在する分子のみの電極応答を解析するため、提案されたのが**非接触型光導波路法**である²⁶⁻³¹⁾。

非接触型光導波路法は上述した直接型光導波路法の2つ目の方法とシステム的には同じである。作用電極を導波路上に直接つけるのではなく、別基板として導波路より染み出たエバネッセント波の届くエリアに配置することにより電極表面に存在する分子挙動を測定する方法である。この場合、導波路と電極の間にはサンプルを含まない電解質のみを入れる。この測定法のメリットは電極の種類を選ばないことで、不

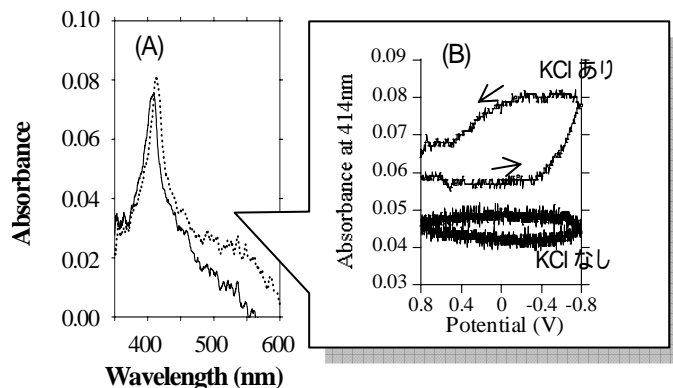
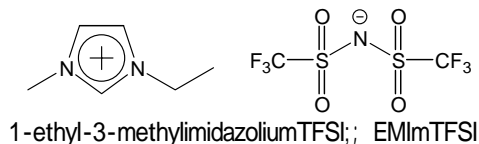


Figure 5. イオン性液体中に溶解した PEO 修飾 cyt .c の酸化還元に基づくスペクトル変化(A)、KCl の添加による電極応答の変化(B)

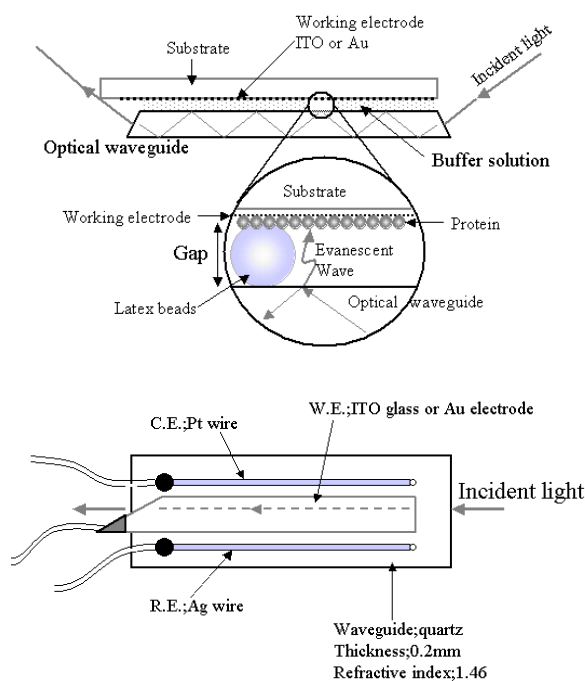


Figure6. 非接触型光導波路法の電極配置 side view and top view 28)を参考に再作図

非接触型光導波路法は上述した直接型光導波路法の2つ目の方法とシステム的には同じである。作用電極を導波路上に直接つけるのではなく、別基板として導波路より染み出たエバネッセント波の届くエリアに配置することにより電極表面に存在する分子挙動を測定する方法である。この場合、導波路と電極の間にはサンプルを含まない電解質のみを入れる。この測定法のメリットは電極の種類を選ばないことで、不

透明基板の表面であっても測定が可能なことである。この方法を用いれば、グラッシ - カーボンであってもその他の金属電極であっても電極上の分子のスペクトルを得ることができる。従来、金電極界面の電気化学測定をする際、金のメッシュにサンプルを修飾し光を透過したが測定できなかった報告を学会などで目にしたことがある。このような金電極上での分子挙動についても、本方法を用いることで測定可能であり、さらに金電極表面への修飾効果などについても簡便に解析することができる^{31,32)}。短所としては電極の配置を導波路界面より決められた距離に配置することが難しいこと、感度が若干低いことが上げられる。短所を克服する方法として、粒径 120 nm のラテックスビーズを少量バッファーに分散させることにより導波路と電極が直接接触し合うことが無いようにスペーサーの役割を果たし、且つエバネッセント波の届く距離を制御している^{27,29)}。この測定法は電極界面分光分析のみならず、本来導波路より屈折率が高い高分子フィルムでも屈折率が低い石英導波路で測れるという可能性を秘めている。

従来、最も現場で用いられてきた LB 膜の研究分野に加え、光機能性分子の吸収スペクトル測定^{32,33)}、電気化学測定との組み合わせによる電荷移動イメージング、生体分子アフィニティー計測、高分子の UV 劣化測定に加え、それらの測定法のリアルタイム in-situ 測定が可能となるであろう。

5. 電極表面の 2 次元イメージングを目指して

光導波路分光法の応用はアプリケーションに合わせさまざまな用途が考えられる。蛍光励起することもでき、励起状態の吸収スペクトルをも測定することを可能とする³⁴⁾³⁵⁾。導波路上に金、銀薄膜をつけることにより同じ光学系で波長共鳴型の表面プラズモン共鳴センサ³⁶⁾にもなり、加えて金、銀薄膜の代わりに屈折率の低い高分子薄膜、光応答性高分子薄膜を付け法線方向からあてたポンプ光により光応答薄膜の消衰係数変化を起こさせ、白色光のフェムト秒超高速変調を目指す試みもなされている。³⁷⁾ さらに、光導波路分光法の特長である界面近傍の選択的な解析、繰り返し反射による高感度測定の実現による単分子膜の詳細な解析³⁸⁾、あるいは CCD 分光器とコンピュータの発達により、リアルタイム測定³⁹⁾などが既に報告されている。

センシングに用いる導波路そのものの構造の研究も進んでおり、TiO₂ を導波路にした複合構造導波路や硝子導波路の研究も進んでいる⁴⁰⁾⁴¹⁾。特に酸化チタンの光触媒効果を評価することができる光学系としても注目されつつある。プローブ物質を導波路上につけることにより特定の物質のセンシングについても研究が進められている。具体的には、界面を用いての測定法であるため、選択性の高い導波路界面（特定分子に感応する界面の修飾、たとえば pH 色素のコーティングによるアンモニア分子のセンシングなど。）を構築することにより高感度センサを実現したりすることも可能である⁴²⁾。また近年、偏光子を用いることによる分子の配向解析の可能性も示されており⁴³⁾⁴⁴⁾、これらを組み合わせることにより、さらなる応用が期待される。特に、現在開発が進められている分野としては有機 EL のフィールドでの応用が期待される。これは色素開発、正孔輸送層の界面欠陥の調査、配線によるプラズモン共鳴の消光シミュレーションチェックなどの使用法が考えられ、有機発光色素のキャストプロセスをダイナミクスで捉えようという試みである⁴⁵⁾。バイオ関連でもアプリケーションが考えられており、光吸収、屈折率変化の両面からの生体分子間相互作用の評価などが期待される。

さらに、光導波路分光法による電極表面の 2 次元イメージングへの応用も期待される。Figure 7. に示すように、導波路の光が入る 2 端面を研磨した導波路の 4 端面全てを研磨し、これを回転式のステージに固定する。まず、Y スキャンを行いながらスペクトルデータをプールする。次にステージを 90° 回転させ、同様に Y スキャンを行い、プールされた 2 方向からのスペクトル情報を併せて処理することで 2 次元のデータが検出可能となる。また、より高感度化が達成されれば、1 回反射のみが可能となるような光学系を XY ステージ下に構築し、ステージの位置を制御しながら測定を行うことで (Figure 8.) 電極上の部分ごとのスペクトルを得ることも可能になるであろう。

これからも研究の現場をサポートしながら、装置の応用・発展を進め、従来にない新規分析機器の開発に力を注いでいきたい。

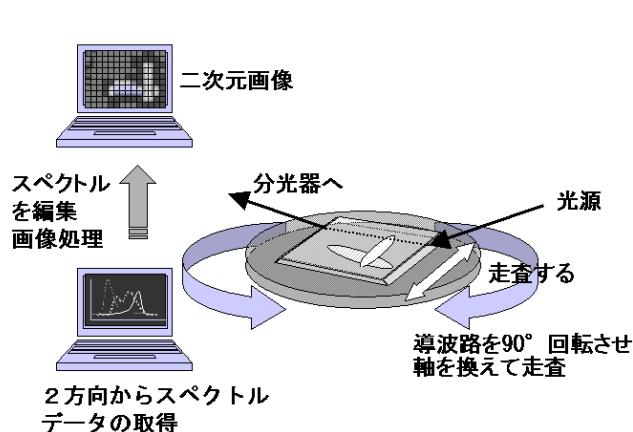


Figure 7. 直接導波路法による
二次元測定の可能性

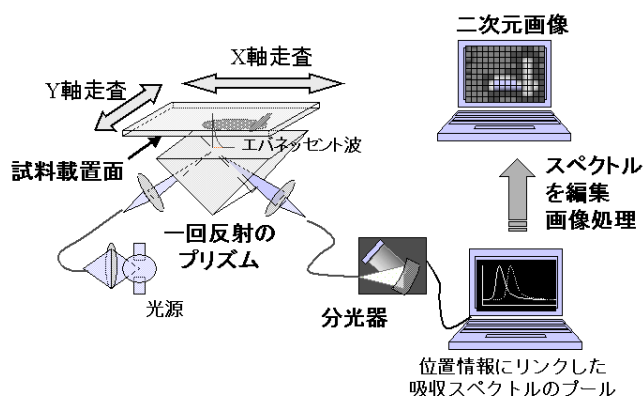


Figure 8. 非接触導波路法による
二次元測定の可能性

謝辞

本稿を書くにあたり、ご協力頂いた東京農工大学大学院工学研究科大野弘幸教授と産業技術総合研究所有機標準研究室室長加藤健次博士に心よりお礼申し上げます。

文献

- 1) 加藤健次, ぶんせき, スラブ光導波路を利用した界面・薄膜計測 No.2 (1995).
- 2) 河田 聡, 大津元一編, 近接場ナノフォトニクス入門 オプトロニクス社.(2000).
- 3) S.S. Saavedra and W.M Reichert, *Anal. Chem.*, **62**, 2251 (1990).
- 4) K. Tsunoda, H. Ueno, and H. Akaiwa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 1581 (1992).
- 5) T. Hinoue, H. Murata and Y. Yokoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3811 (1987).
- 6) K. Itoh and A. Fujishima, *J. Phys. Chem.*, **92**, 7043 (1988).
- 7) J.D. Swallen, M. Tacke, R. Santo, K.E. Rieckhoff, and J. Fischer, *Helvetica Chim. Acta.*, **61**, 960 (1988).
- 8) M.D. Degrandpre, L.W. Burgess, P.L. White, and D.S. Goldman, *Anal. Chem.*, **62**, 2012 (1990).
- 9) A. Otto, *Physica Status Solidi*, **26**, K99 (1968).
- 10) Y. Shi, C.J. Seliskar, and W.R. Heineman, *Anal. Chem.*, **69**, 4819 (1997).
- 11) S. Boussaad, J. Pean, and N.J. Tao, *Anal. Chem.*, **72**, 222 (2000).
- 12) G.F. Anthony and M.C. Robert, *Anal. Chem.*, **70**, 449A (1998).
- 13) H. Sota and Y. Hasegawa, *Anal. Chem.*, **70**, 2019 (1998).
- 14) L.A. Lyon, M.D. Musick and M.J. Natan, *Anal. Chem.*, **70**, 5177 (1998).
- 15) C.E.H. Berger, T.A.M. Beumer, R.P.H. Kooyman and J. Greve, *Anal. Chem.*, **70**, 703, (1998).
- 16) K.D. Pavey and C.J. Olliff, *Biomaterials*, **20**, 885 (1999).
- 17) J.M. Brockman, A.G. Frutos and R.M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8044 (1999).
- 18) K. Kato, A. Takatu, N. Matsuda, R. Azumi, and M. Matsumoto, *Chem Lett*, 437 (1995).
- 19) 来栖史代, 大野弘幸, 高橋浩三, 日本化学会第 76 回春期年会要旨集, 3D3 04 (1999).
- 20) N. Matsuda, A. Takatsu, and K. Kato. *Chem.Lett.*, 105(1996).
- 21) J.T. Bradshaw, S.B. Mendes, N.R. Armstrong, and S.S. Saavedra, *Anal. Chem.*, **75**, 1080 (2003).
- 22) W.J. Doherty, C.L. Donley, N.R. Armstrong and S.S. Saavedra, *Applied Spectroscopy*, **56**, 920 (2002).
- 23) K.Fukuda and H.Ohno, *Electroanalysis*, **14**, 605 (2002).
- 24) 加藤健次, 物質工学工業技術研究報告書, **8(3)**, 95(2000).
- 25) K. Fujita and H. Ohno, *Polym. Adv. Technol.*, **14**, 486 (2003).
- 26) H. Ohno, C. Suzuki, K. Fukumoto, M. Yoshizawa, K. Fujita, *Chem. Lett.*, 450(2003).

- 27) H. Ohno, K. Fukuda, and F. Kurusu, *Chem. Lett.*, 76(2000).
- 28) 大野弘幸, 藤田恭子, 日本接着学会誌, **38**, 306 (2002).
- 29) K. Fujita, C. Suzuki, and H. Ohno, *Electrochem. Commun.*, **5**, 47 (2003).
- 30) 鈴木千維子, 藤田恭子, 大野弘幸, 2002年電気化学秋季大会要旨集, 1K12 (2002).
- 31) 荒木美怜, 藤田恭子, 大野弘幸, 日本化学会第83春季年会要旨集, 1G9 40 (2003).
- 32) K. Ijro, J. Matsumoto, M. Moriue, and M. Shimomura, *Asia Nano2002*, 2P-07(2002).
- 33) J. Nisida, J. Matsumoto, M. Mrisue, K. Ijro, and M. Shimomura, *Asia Nano2002*, 5P-05(2002).
- 34) M. Mitsuishi, T. Tanuma, J. Matsui, J. Chen, and T. Miyashita., *Langmuir*, **17**, 7449 (2001).
- 35) H. Kawai, K. Nakano, and T. Nagamura, *Chem. Lett.*, 22(2001).
- 36) 栗原一嘉, 宮地麻紀子, 高橋浩三, 島田幸洋, 鈴木孝治, 日本化学会第83春季年会要旨集, 3B4 03 (2003).
- 37) 長村利彦, 内藤篤志, 永井康之, 2003年光化学討論会要旨集, 1C16(2003).
- 38) H. Ohno, S. Yoneyama, F. Nakamura, K. Fukuda, M. Hara, and M. Shimomura, *Langmuir*, **18**, 1661 (2002).
- 39) Z. Qi and N. Matsuda, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 6873 (2003).
- 40) Z. Qi, N. Matsuda, T. Yoshida, H. Asano, A. Takatsu, and K. Kato, *Optics Lett.*, **22**, 27 (2002).
- 41) Z. Qi, N. Matsuda, K. Itoh, and D. Qing, *J. Lightwave Tech.*, **8**, 20 (2002).
- 42) 伊藤公紀, 機能材料, 14, p.15(1994).
- 43) 藤田恭子, 大野弘幸, 第51回高分子討論会要旨集, IPe123 (2002).
- 44) 江口美陽, 高木慎介, 井上晴夫, 2003年光化学討論会要旨集, 1C13(2003).
- 45) 伊藤 潔, 黒田孝二, 高橋浩三, 堀内道雄, 第8回高分子分析討論会要旨集, 15 (2003).