

表面増強赤外およびラマン分光法による
単分子膜修飾表面の機能解析とその応用

熊本大学大学院自然科学研究科

久保 敦

目次

Chapter 1: 緒論

1. 1. 緒言	1
1. 2. 赤外分光法 (SEIRAS)	3
1. 3. 表面増強ラマン散乱 (SERS)	7
1. 4. 参考文献	10

Chapter 2: Pyridine チオール系単分子膜の表面増強赤外分光電気化学

2. 1. 緒言	13
2. 2. 実験	15
2. 3. SEIRAS による吸着挙動の解析	21
2. 3. 1. PhSH	21
2. 3. 2. 4-PySH	25
2. 3. 3. 2-PySH	29
2. 3. 4. 3-PySH	33
2. 3. 5. 2,2'-PymSSPym	36
2. 4. 吸着分子の配向状態	39
2. 5. SEIRAS による表面修飾分子の pKa 評価	43
2. 6. 結言	47
2. 7. 参考文献	49

Chapter 3: Anthraquinone 誘導体単分子膜の電気化学および赤外分光法による表面構造解析

3. 1. 緒言	50
3. 2. 実験	52
3. 3. 吸着構造	54
3. 4. アントラキノン誘導体単分子膜の電気化学的挙動	62
3. 5. アントラキノン誘導体の表面増強赤外分光電気化学測定	70
3. 6. 結言	75
3. 7. 参考文献	76

Chapter 4: SERS 法による修飾単分子膜の pKa 測定

4. 1. 緒言	78
4. 2. 実験	80

4. 3. アミノエタンチオール (2-AT) 単分子膜の表面 pKa 測定	84
4. 4. アルキル鎖長依存性	90
4. 5. カルボキシアルカンチオールの表面 pKa 測定	96
4. 6. アルキル鎖長依存性	103
4. 7. 結言	107
4. 8. 参考文献	108
 Chapter 5: Fmoc Cn SH を用いた単分子膜の作製と特性評価	
5. 1. 緒言	109
5. 2. 実験	110
5. 3. 単分子膜の電気化学的評価	114
5. 4. 赤外分光法による脱保護反応の評価	119
5. 5. FT-SERS による脱保護反応および表面特性評価	123
5. 6. 結言	127
5. 7. 参考文献	128
 Chapter 6: 種々の修飾電極を用いた NO の電気化学的検出	
6. 1. 緒言	129
6. 2. 実験	133
6. 3. NO の物理・化学的性質	141
6. 4. 未修飾カーボン電極上における NO の電気化学的挙動	143
6. 5. Hemin 修飾電極による NO の電気化学検出	151
6. 6. 反応機構	159
6. 7. その他の鉄ポルフィリン錯体修飾電極	162
6. 8. Monoazahemin 修飾電極による NO の検出	167
6. 9. ヘモグロビン修飾電極の NO 検出素子としての利用	17
	2
6. 10. 結言	176
6. 11. 参考文献	178
 Chapter 7: 結言	180

Chapter 1

緒論

1. 1. 緒言

生体内において電子伝達機能を持つチトクロム c に代表される金属タンパク質は、通常の固体電極での電子移動反応の測定は困難であり、その電気化学的酸化還元反応は、メディエーター分子の存在下で行われてきた。しかし 1982 年、本研究室において bis(4-pyridyl) disulfide (4, 4'-PySSPy) を金電極上に修飾することにより、チトクロム c の電極上における電子移動反応への電気化学的アプローチが可能となって¹⁾以来、金電極を溶液に浸漬するだけでチオール基と金との相互作用による自己組織化単分子膜 (self-assembly monolayer : SAM) を形成する修飾方法 (self-assembly 法) を用いて、多くの機能性電極を作製する研究が活発に進められている。

Self-assembly 法は、金と硫黄原子の特異的な相互作用を利用した方法で、非常に簡単な手順によって修飾分子が電極表面に自己集合し、非常に配向性の高い単分子膜を形成させることが可能である。これまで金属タンパク質の電子移動を促進するプロモーター分子修飾電極のような機能性電極の作製や種々のアルカンチオール類の単分子膜または混合単分子膜への応用^{2)~10)}のみならず、フェロセンやビオロゲン、キノンなどの酸化還元部位を持ったレドックス活性な SAM が、触媒反応やバイオセンシング、光電気化学などの観点から注目されてきた。今日、電気化学の分野のみならず表面化学や界面化学などの分野においても非常に興味深い研究分野となっている。

作製した機能性電極上での金属タンパク質や他の酸化還元活性種の電極反応は、電極表面上における機能性分子の集合状態、電荷、表面構造などの様々な要

素により影響を受けると考えられるが、これらの電極表面での性質を明らかにすることは、その電気化学的性質を理解する上で重要であると考えられる。このような観点から、機能発現のメカニズムの解明や分子・原子レベルでの SAM 構造の解析は、分光学的、電気化学的な観点からも興味深い。

一方、分光学的手法を電気化学法と組み合わせて用いることによって、電極と溶液の界面における電極自身の表面層、電極と溶液の接触層、電極表面上に固定化した物質の吸着状態やそこで起こる反応などの *in situ* 測定が可能となる¹¹⁾。これまで紫外可視分光法、電子スピン共鳴法、振動スペクトル法などが電気化学法と組み合わされることによって電気化学反応の解明に用いられてきた。振動スペクトル法には、赤外分光法やラマン分光法などがあり、これらの振動に関する情報には相補的關係がある。さらに表面増強赤外分光法 (Surface enhanced infrared adsorption spectroscopy : SEIRAS) や 表面増強ラマン散乱 (Surface enhanced Raman scattering : SERS) のような分子振動に関するシグナルの増強効果を利用した測定法の開発^{12)~14)}により、電極表面上に吸着した単分子膜 (SAM) の吸着構造に関する情報を得ることが可能となった。

本研究では、SEIRAS や FT-SERS 法を用いて、金電極上に修飾した種々のチオール系単分子膜の吸着状態や電極表面での電子移動反応、表面吸着種の酸解離挙動などの特性を明らかにするとともに、機能修飾電極の応用についても検討を行った。

1. 2. 表面増強赤外分光法 (SEIRAS)

赤外分光法は、振動分光法の一つであり、分子の振動は化学結合の様式を敏感に反映するので、得られた分子振動に関する情報により分子の同定や分子構造の研究に用いられる。測定は、固体、液体、気体のいずれの形態の試料でも可能であり、測定の目的や試料の形態によって測定法を選択しなければならない。これまで多くの測定法が開発されたが、一般に透過法と反射法に分けることができる。透過法は、KBr 錠剤法が最も一般的に用いられる方法である。反射測定法には、全反射吸収測定法 (Attenuated Total Reflection ; ATR) や拡散反射測定法、正反射測定法、高感度反射法などがよく知られている。

一般に荒れた金属表面における分子の振動は、古典的な理論では説明できない興味深いスペクトルを示す。このような現象を用いる手法として最もよく知られているものに表面増強ラマン散乱 (SERS) がある^{15)~19)}。前処理をあらかじめ施された金属表面に吸着した分子は、自由分子に比べて $10^4 \sim 10^6$ 倍も強い強度のラマン散乱を示す。表面増強赤外吸収 (Surface-Enhanced Infrared Absorption : SEIRA) は、赤外領域で観察された同様の現象の一つである。1980 年に Hartstein ら²⁰⁾ により Si 基板上に Ag や Au 薄膜を蒸着した基板上における有機薄膜の赤外吸収が非常に増強されることが発見された。以来、SEIRA の増強メカニズムの解明が行われ、Osawa ら^{21)~23)} による増強メカニズムに関する実験および理論的研究や Nishikawa ら^{24)~29)} による化合物の微量分析への応用により、新しい表面分析手段または超微量化学種の高感度分析手段として注目を集めるようになった。

金属表面に吸着した分子の赤外スペクトルの測定で最もよく知られている方法に IR reflection-adsorption spectroscopy (IRAS) がある³⁰⁾³¹⁾。SEIRAS は、IRAS に比べて 10~50 倍もの高い感度を持つ^{23) 32)}。IRAS も吸着分子の測定に十分な感度

を持つが、スペクトルの高い S / N 比を得るためには SEIRAS の方が非常に容易である。また、表面における反応過程の時間分解測定にも適しており、これまでの時間分解 FT-IR と SEIRAS を組み合わせることにより、電極表面での電気化学反応を *in situ* で測定することが可能となった³³⁾³⁴⁾。

これまで赤外吸収強度の増加は、Ag、Au、Cu、In、Pt、Ni、Al、Pb などの金属蒸着膜上に吸着したイオンや様々な分子の測定において観察されており、特に Ag、Au、Cu が大きな増強を示す。非金属基板上に蒸着されたこれらの金属薄膜は、平滑構造でなく小さな島状構造になることが知られている。SEIRAS に用いられる蒸着薄膜も数十 nm 程度の微粒子からなる島状薄膜であり、この島状構造が吸収を増大させる役割を果たすために非常に重要である。また、蒸着速度や基板温度、基板表面の特性も増強効果に大きく影響を及ぼす³⁵⁾。

SEIRAS の増強率には、吸着分子の化学的寄与も影響を及ぼす。すなわち、化学吸着した分子のスペクトルは、物理吸着した分子のものよりも大きく増強される傾向にある²¹⁾。その要因は、分子が特定の配向をとるためである。また、得られるスペクトルの強度は、直接金属表面に吸着している分子に対して最も大きく、表面からの距離の増加に伴い減少し、表面から 2 ～ 5 nm の間で急速に減衰する²¹⁾。

SEIRA で得られるスペクトルは、標準スペクトルとは著しく異なることが多く、IRAS で得られるものと同様なスペクトルである。よって、IRAS で適用される表面選択則が SEIRAS にも適用される²³⁾。これは入射光と反射光の間で生じる位相差によって表面上に形成される電場は、表面に水平なベクトルどうしで互いに打ち消し合い、表面に対し垂直なベクトルのみを与える。それゆえ、表面と水平な振動モードはスペクトルには反映されず、垂直方向に双極子モーメントが変化する振動モードが強く相互作用するため選択的に観測される。このため分子の配向に関する情報が得られる。

電気化学で得られる情報は反応速度や拡散速度などの主に速度に関する情報であり、電極界面や吸着物質の構造に関する情報は得られない。しかし、電気化学における表面プロセスの詳細な解明が求められている。一方、STM や IRAS、SERS などは電極表面と吸着分子の構造に関する情報を与える。そこで赤外分光法と電気化学法を組み合わせた赤外分光電気化学法は、高感度な表面分析の手法となる³⁶⁾³⁷⁾。

in situ 赤外分光法は、電気化学反応のメカニズムや分子およびイオンの吸着や脱離挙動が起こる電極界面に注目がおかれる。これまでの研究の多くは、IRAS によって行われてきた。IRAS による測定は、溶液による赤外光の吸収を減らすため、電極を赤外窓に押しつけることによって溶液層を非常に薄く（数 μm ）し、赤外光を液層と電極表面の界面で反射させることによりスペクトルが得られる。このセル構造から溶液相の成分移動が制限され、電極反応が印加電位に迅速に応答せず、一般的な時間分解測定を行うことは困難である。一方、Kretschmann ATR は、入射光が ATR プリズム内を通過した後、固液界面で反射する。よって、溶液による吸収の問題が解決された。電気化学測定に用いる場合、作用極に用いるプリズムは Ge、Si のような導電性赤外線透過物質に限られていたが、プリズム上に金属薄膜を蒸着することによって作用極として用いることができる。これまでもいくつかの *in situ* Kretschmann ATR-IR による報告^{38)~44)}がなされているが、厚い膜厚の金属蒸着膜が作用極として用いられたため、増強作用は観察されなかった。しかし、島状の金属薄膜を作用極として用いることにより、電極表面上の分子の吸収スペクトルが増強される。

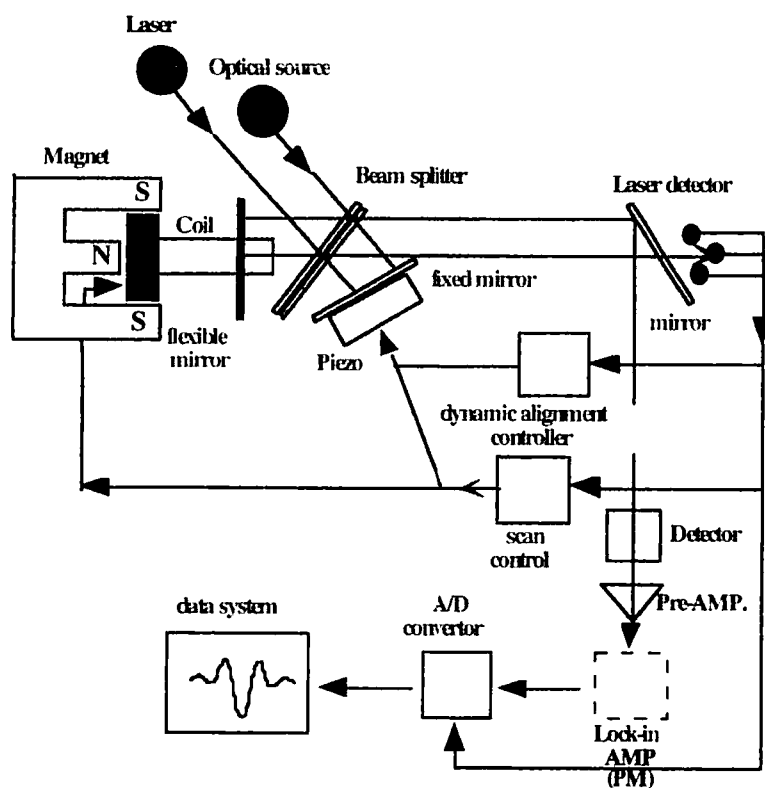


Figure 1-2-1. Schematic diagram of FT-IR.

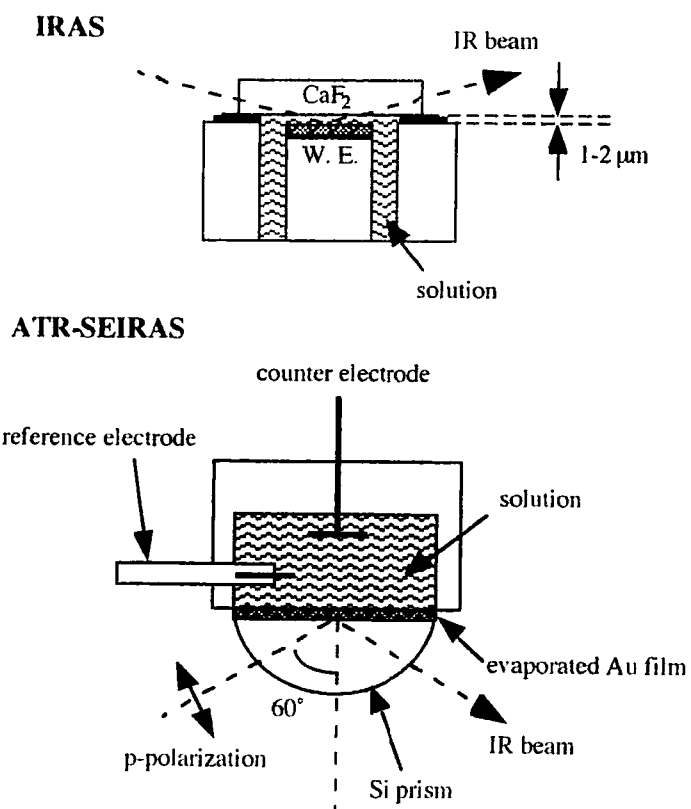


Figure 1-2-2. Typical examples of electrochemical cells of IRAS and ATR-SEIRA spectroscopy.

1. 3. 表面増強ラマン散乱 (SERS)

ラマン分光法の歴史は古く、1928 年に C. V. Raman⁴⁵⁾ と K. S. Krishnan⁴⁶⁾ とによってラマン分光法の原理である“ラマン効果の発見”が発表された。しかし、ラマン散乱光は微弱な光のためスペクトルの測定は容易ではなく、第二次世界大戦後同じように物質の構造に関する知見が得られる赤外分光法が普及するようになり、ラマン分光法は一時期影をひそめていた。しかし、1960 年代のレーザーの発明によりラマン分光法は飛躍的な発展を遂げた。He-Ne レーザーによりはじめて「レーザーラマン分光」が緒につき、1970 年代はじめには、Ar⁺ レーザーを用いることが一般的となった。現在使われているラマン分光計の基本型はこの時期に確立されたといえる。これによって、1970 年代には赤外分光法では測定が容易ではない水溶液中のタンパク質、核酸などの生体高分子の測定が広く行われ、その高次構造の推定に大きく寄与した⁴⁷⁾。しかし、まだまだ感度すなわち量子収率が著しく低い（入射光子数当たりの散乱光子数は一般に 10^{-10} 以下）ため、1970 年代前半までは表面や界面をラマン分光法で調べた研究例はほとんどなかった。この分野において応用範囲が広がるようになったのは、1974 年から 1977 年の SERS（表面増強ラマン散乱）の発見である。SERS は surface enhanced Raman scattering の略で、金、銀、銅などの電極上に吸着した化学種のラマン強度が $10^4 \sim 10^6$ 倍増強される現象である。この増強メカニズムは完全には解明されていないが、金属表面での表面プラズモンの励起が関与した機構や、吸着剤 - 吸着質間の電荷移動 (CT) に関する共鳴ラマンなどの相乗効果によるといわれている⁴⁸⁾。SERS は、基板の種類が限られることや表面に適当な roughness を与えた電極でのみ観測されるという制約はあるが、極めて高感度であり電極表面吸着種の研究に用いられている¹¹⁾。金属表面上での触媒作用や電極表面上での化学反応の機構を明らかにする上で吸着分子の構造を知ることは

基本的に重要であるが、これらの分子種の表面濃度はバルクに存在している場合に比べると極端に弱く、通常のラマン分光法を適用するのは困難である。そのため 10^6 倍にものぼる強度増強は表面吸着分子種の測定に極めて有効である。SERS を電気化学測定法と組み合わせることにより、電極反応中における吸着種の情報を in-situ で得ることができるため、多くの研究者たちがこの方法を用いて金、銀、銅の電極上での電気化学酸化還元反応^{49) 50)}、オリゴマー化⁵¹⁾、ポリマー化⁵²⁾などを報告している。

ラマン分光法の難点として挙げられるのが、微弱なラマン散乱光を覆い隠す蛍光の存在である。この蛍光を抑える技法として、最近開発された FT-Raman 分光法がある。FT-Raman 分光法のメリットは近赤外領域の励起光の使用が可能なことで、測定に対する妨害要因の一つである蛍光の影響をほとんど受けないスペクトルが得られる事が挙げられる。また可視光レーザーと比べると近赤外光レーザーは試料の光化学変化を起こしにくいという利点もあり、この FT-Raman 分光法を適用することによって SERS 法の応用範囲がさらに広がったのである⁵³⁾。

また近年、種々の機能をもつ固体表面の創製に関する研究が活発に行われている。特に有機電気化学の分野では、修飾電極への応用展開が注目されている。機能発現のために基板に対する機能分子の配向は重要であり、電子移動速度の制御に多大な影響を与えと考えられる。そこでこの機能分子の電極反応における反応機構並びに配向状態を電気化学反応とともに *in situ* で測定する必要がある。そのために、先程述べた SERS 法は非常に有効な手段である。

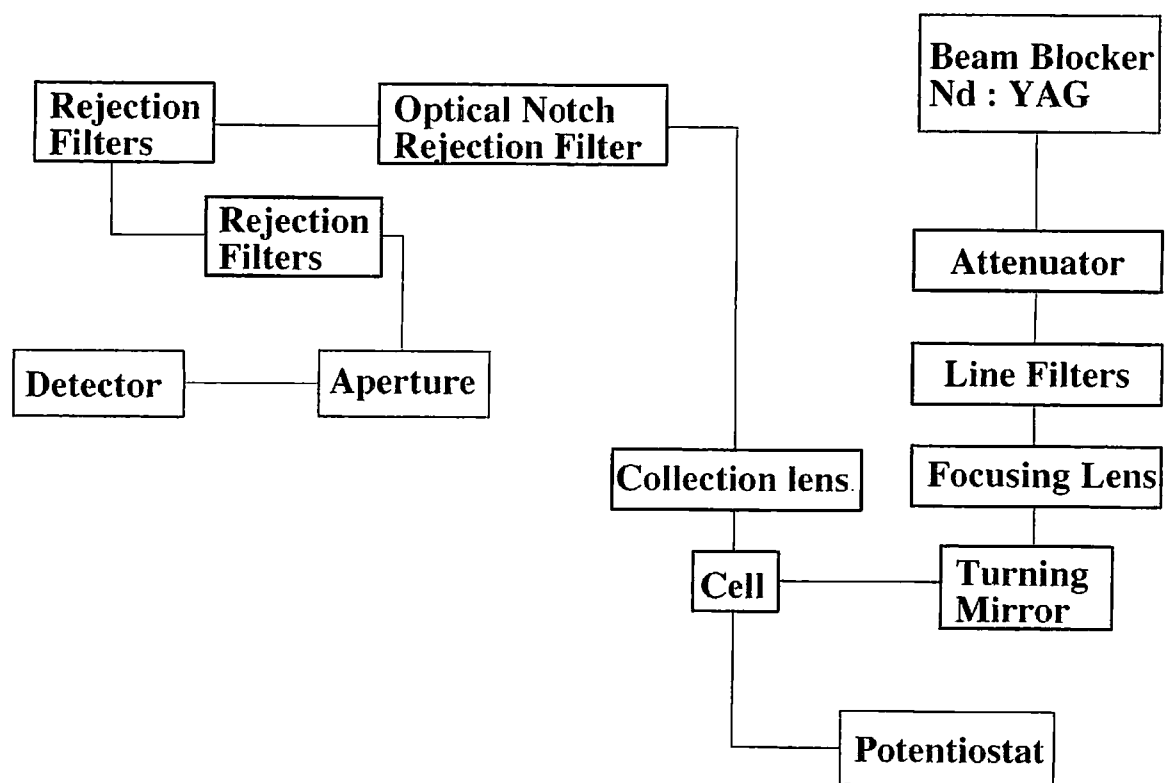


Figure 1-3-1. Block diagram of FT-Raman system

1. 4. 参考文献

- 1) 谷口 功、安河内一夫、表面、23、597 (1985).
- 2) C. E. Poirier, and M. J. Tarlov, *J. Phys. Chem.*, **99**, 10966 (1995).
- 3) P. Wagner, M. Hegner, H. J. Guntherodt, and G. Semenza, *Langmuir*, **11**, 387 (1995).
- 4) R. J. Nuzzo, L. H. Dubois, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 558 (1987).
- 5) E. Delamarche, B. Michel, and C. Gerber, *Langmuir*, **10**, 2869 (1994).
- 6) R. Heinz, and J. P. Rabe, *Langmuir*, **10**, 2869 (1995).
- 7) W. Li, J. A. Virtanen, and R. M. Penner, *Langmuir*, **11**, 4361 (1995).
- 8) C. Schonenberger, J. Jorritsma, J. A. M. Sondag-Huethorst, and L. G. J. Fokkink, *J. Phys. Chem.*, **99**, 3259 (1995).
- 9) J. A. M. Sondag-Huethorst, C. Schonenberger, and L. G. J. Fokkink, *J. Phys. Chem.*, **98**, 6826 (1994).
- 10) C. E. Poirier, and M. J. Tarlov, *Langmuir*, **10**, 2853 (1994).
- 11) 逢坂哲彌, 小山昇, 電気化学法 (応用測定マニュアル) (1991).
- 12) M. Osawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2861 (1997).
- 13) D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, **84**, 1 (1977).
- 14) R. P. Van Duyne, *J. Phys.*, **34**, 1476 (1977).
- 15) K. Chang and T. E. Furtak, "Surface Enhanced Raman Scattering," Plenum Press, New York (1982).
- 16) H. Metiu, *Prog. Surface Sci.*, **17**, 153 (1984).
- 17) A. Wokaun, "Solid State Physics," ed by H. Ehrenreich and D. Turnbull, Vol. 38, p. 233 (1984).
- 18) M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.*, **57**, 783 (1985).
- 19) A. Otto, I. Morzek, H. Grabhorn, and W. Akemann, *J. Phys.: Condens. Matter*, **4**, 1143

(1992).

- 20) A. Hartstein, J. R. Kirtley, and J. C. Tsang, *Phys. Rev. Lett.*, **45**, 201 (1980).
- 21) M. Osawa and M. Ikeda, *J. Phys. Chem.*, **95**, 9914 (1991).
- 22) M. Osawa and K. Ataka, *Surface Sci. Lett.*, **262**, L122 (1992).
- 23) M. Osawa, K. Ataka, K. Yoshi, and Y. Nishikawa, *Appl. Spectrosc.* **47**, 1497 (1993).
- 24) Y. Nishikawa, K. Fujiwara, and T. Shima, *Appl. Spectrosc.* **44**, 691 (1990).
- 25) Y. Nishikawa, K. Fujiwara, and T. Shima, *Appl. Spectrosc.* **45**, 747 (1991).
- 26) Y. Nishikawa, Y. Ito, and N. Yamakami, K. Fujiwara, and T. Shima, *Appl. Spectrosc.* **45**, 752 (1991).
- 27) Y. Nishikawa, Y. Ito, and N. Yamakami, K. Fujiwara, and T. Shima, *Surf. Interface Anal.*, **18**, 481 (1992).
- 28) Y. Nishikawa, K. Fujiwara, M. Osawa, and K. Takamura, *Anal. Sci.*, **9**, 811 (1993).
- 29) Y. Nishikawa, K. Fujiwara, and K. Takamura, *Bunseki kagaku*, **43**, 425 (1994).
- 30) W. S. E. taka, "Surface Infrared and Raman spectroscopy: Methods and Applications," Plenum Press, New York (1995).
- 31) F. M. Hoffmann, *Surface Sci. Rep.*, **3**, 107 (1983).
- 32) M. Osawa, K. Yoshi, K. Ataka, and T. Totsuyanagi, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **64/65**, 371 (1993).
- 33) M. Osawa, K. Yoshii, K. Ataka, and T. Yotsuyanagi, *Langmuir*, **10**, 640 (1994).
- 34) M. Osawa, K. Yoshii, *Appl. Spectrosc.* **51**, 512 (1997).
- 35) Y. Nishikawa, T. Nagasawa, K. Fujiwara, and M. Osawa, *Vib. Spectrosc.*, **6**, 43 (1993).
- 36) J. Lipkowski, and P. N. Ross, "Adsorption of molecules at Metal electrodes," VCH, New York (1992).
- 37) J. Lipkowski, and P. N. Ross, "Structure of Electrified Interfaces," VCH, New York

- (1993).
- 38) H. Neff, P. Lange, D. K. Roe, and J. K. Sass, *J. Electroanal. Chem.*, **150**, 523 (1983).
 - 39) G. Nazri, D. A. Corrigan, and S. P. Maheswari, *Langmuir*, **5**, 17 (1989).
 - 40) D. B. Parry, J. M. Harris, and K. Ashley, *Langmuir*, **6**, 209 (1990).
 - 41) B. W. Johnson, J. Bauhofer, K. Doblhofer, and B. Pettinger, *Electrochim. Acta*, **37**, 2321 (1992).
 - 42) E. Zippel, R. Kellner, M. Krebs, and M. W. Breiter, *J. Electroanal. Chem.*, **330**, 521 (1992).
 - 43) D. Aurbach, and O. Chusid, *J. Electrochem. Soc.*, **140**, L1 (1993).
 - 44) I. Bae, M. Sandifer, Y. W. Lee, A. A. Tryk, C. N. Sukenik, and D. A. Scherson, *Anal. Chem.*, **67**, 4508 (1995).
 - 45) C. V. Raman, The Molecular Scattering of Light (Nobel lecture delivered at Stockholm, 11 th December, 1930), *Indian J. Pure Appl. Phys.* **16**, ix (1978).
 - 46) R. S. Kridhnan, *J. Sci. Ind. Res.* 30, 2 (1971): *Indian J. Pure Appl. Phys.*, **9**, 861 (1971).
 - 47) 池田照樹、ぶんせき, **5**, 342 (1991).
 - 48) 尾崎幸洋、岩崎秀夫、生体分子分光学入門 (1992).
 - 49) K. Jackowska, J. Bkowska and A. Kudelski, *J. Electroanal. Chem.*, **350**, 177 (1993).
 - 50) Y. Ichinohe, T. Wadayama, A. Hatta, *J. Raman. Spectrosc.*, **26**, 335, (1995).
 - 51) J. Bkowska, K. Jackowska, *J. Electroanal. Chem.*, **322**, 347 (1992).
 - 52) Witold S. Szulbinski, *J. Phys. Chem.* **100**, 9077 (1996).
 - 53) G. M. Broun, G. A. Hope, D. P. Schweinsberg, P. M. Fredericks, *J. Electroanal. Chem.*, **380**, 161 (1995).

Chapter 2

Pyridine チオール系単分子膜の表面増強赤外分光電気化学

2. 1. 緒言

金属電極上に作製された有機チオールやそのジスルフィドの自己集合単分子膜 (SAM) は、化学センサ、表面のパターン化などの様々な技術への応用において非常に興味深い¹⁾²⁾。これまでアルカンチオール SAM は、作成の容易さ、長期にわたる安定性、パッキングの良い構造のため広く研究がなされてきた。近年、Figure 2-1-1 のように 4-メルカプトピリジン (4-PySH) や 4, 4'-ジピリジルジスルフィド (4, 4'-PySSPy) のような芳香族チオールによって構成された SAM は、チトクロム c の電気化学測定において電子移動プロモータとして働き、金電極表面での電気化学測定に非常に効果的であることが報告された³⁾⁴⁾。しかし、チトクロム c の電気化学応答は、構造異性体である 2-メルカプトピリジン (2-PySH) や 2, 2'-ジピリジルジスルフィド (2, 2'-PySSPy) 修飾電極を用いたとき観察されない⁵⁾。このように、プロモータ分子が電子移動反応を促進するためには、電極表面上における分子の吸着構造の違いが反映されていると考えられている。しかし、現在までこれらの系統的な検討は行われておらず、本研究では、電子移動反応を促進する 4-メルカプトピリジンをはじめ、構造が類似したピリジンチオールおよびピリミジンチオールの金電極上における電気化学的挙動および配向状態について表面増強赤外分光法 (SEIRAS) を用いて検討を行った。

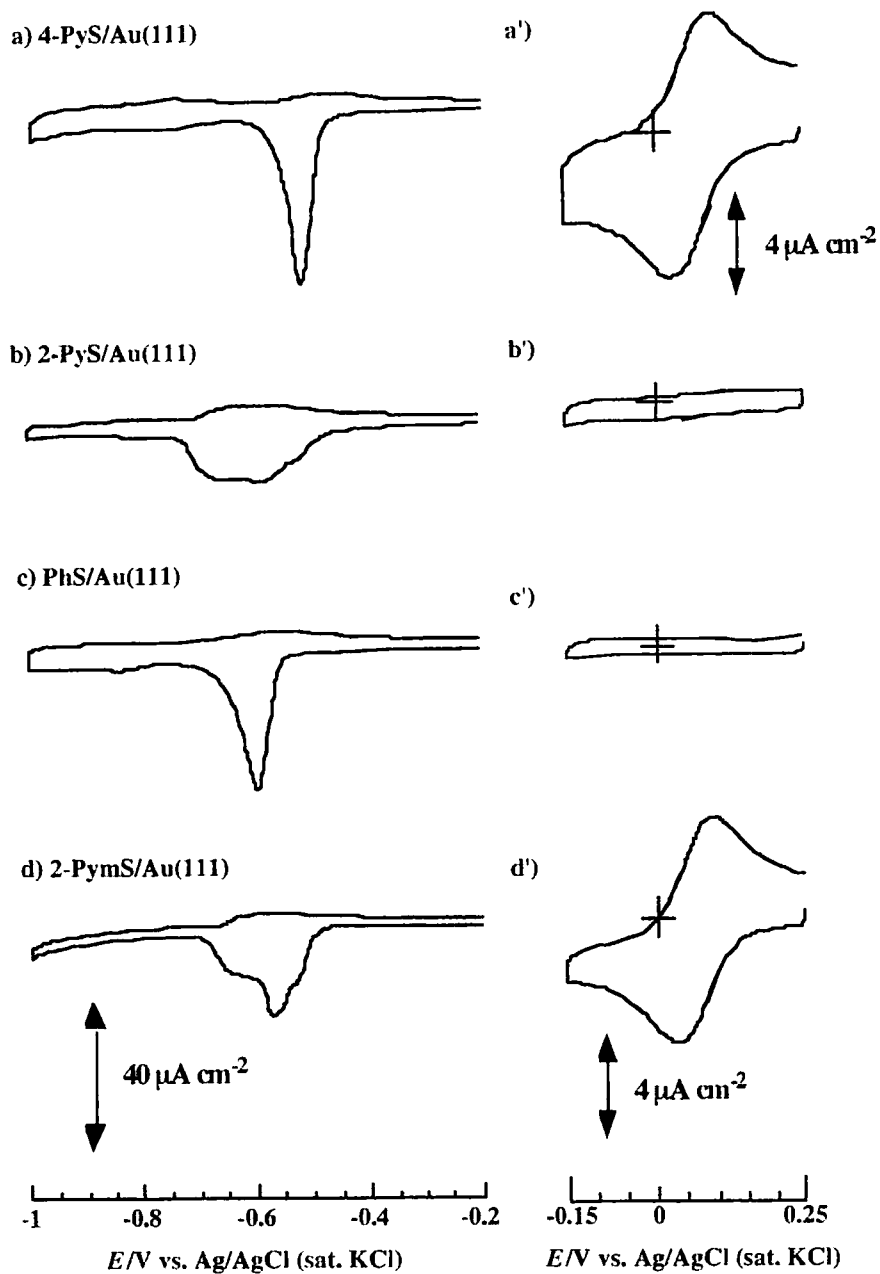


Figure 2-1-1. Typical cyclic voltammograms for the reductive desorption of a) 4-PySH, b) 2-PySH, c) PhSH and d) 2-PymSH adsorbed on Au(111) single crystal electrode in 0.1 M KOH solution and cyclic voltammograms of 100 μM horse heart cytochrome c in a phosphate buffer solution with 0.1 M NaClO_4 (pH 7.0) at modified electrodes. Scan rate: 0.05 V s^{-1} .

2. 2. 実験

2. 2. 1. 修飾物質

- 4-mercaptopyridine (4-PySH) $C_5H_5NS = 111.17$

95 % : Aldrich Chemical Company, Inc.

- 4, 4'-Dithiodipyridine (4,4'-PySSPy) ($C_{10}H_8N_2S_2$) = 220.32

98 % ナカライテスク株式会社

- 2-mercaptopyridine (2-PySH) $C_5H_5NS = 111.17$

99 % : Aldrich Chemical Company, Inc.

- 2, 2'-Dithiodipyridine (2,2'-PySSPy) ($C_{10}H_8N_2S_2$) = 220.32

98 % ナカライテスク株式会社

- 3-mercaptopyridine (3-PySH) $C_5H_5NS = 111.17$

- 3, 3'-Dithiodipyridine (3,3'-PySSPy) ($C_8H_6N_4S$) = 220.32

本研究室にて新規に合成した。

- 2-mercaptopyrimidine (2-PymSH) $C_4H_4N_2S = 111.17$

98 % : Aldrich Chemical Company, Inc.

- bis(2-pyrimidyl)disulfide (2,2'-PymSSPym) ($C_8H_6N_4S_2$) = 220.34

本研究室にて 2-PymSH を臭素によって酸化することによって合成した。

- Thiophenol (PhSH) $C_6H_6S = 110.18$

ナカライテスク株式会社

- diphenyldisulfide (PhSSPh) (C_6H_5S)₂ = 218.33

97 % 東京化成工業株式会社

2. 2. 2. 電極

- ・作用電極 Working electrode (W. E.)

- ・蒸着金電極の作製

Si 半円柱プリズムおよび純度 99.99 % の金ワイヤーをアセトン中で超音波洗浄した後、真空蒸着法により Si 半円柱プリズム上に以下の条件で作製した。

- ・蒸着条件

圧力 : 1×10^{-6} torr

蒸着速度 : $1 \text{ \AA} / 15 \text{ sec. } (6.7 \times 10^{-3} \text{ nm / s })$

膜厚 : 20 nm

基板温度 : 常温

測定の際には、Figure 2-2-1 に示した SEIRAS 測定用セルを用い、蒸着金電極とセルの間は O-ring を用いて溶液をシールした。

- ・対極 Counter electrode (C.E.) (Figure 2-2-2)

対極には Pt-plate (白金プレート) を、バーナーで赤熱させて付着している有機物を酸化処理して使用した。

- ・参照電極 Reference electrode (R.E.) (Figure 2-2-3)

研究室で作製した Ag / AgCl 電極を参照電極として使用した。内部液は飽和塩化カリウムであり、使用前に電位を確認して使用した。

【作製法】

寒天 10 g と KCl 100 g を水 150 g に加えて加熱して溶解させ、その寒天液を あ

らかじめ用意しておいたガラス管の 7 分目まで吸い上げ、その上に飽和 KCl 溶液を加えた。次に、銀線を紙ヤスリで磨いて約 3 N 塩酸溶液中で電圧を 1 V (vs. Ag / AgCl) かけ 銀線表面を AgCl とした。この銀線を寒天の詰まったガラス管に差し込み、上部をパラフィルムで固定した。

2-2-3. 支持電解質

- ・ 過塩素酸ナトリウム(無水) (Sodium Perchlorate , Anhydrous) $\text{NaClO}_4 = 122.44$

96 % 鹿特級 関東化学株式会社

- ・ 過塩素酸 (Perchloric Acid) $\text{HClO}_4 = 100.46$

(ultra-pure reagent : Cica-MERCK) 関東化学株式会社

- ・ 緩衝溶液

Britton & Robinson buffer (B&R buffer)

B&R buffer 原液 (それぞれ 0.04 M のリン酸、ホウ酸、酢酸を含む溶液) に 0.2 M NaOH を加えて pH を調整し、使用した。

- ・ リン酸 (Phosphoric acid) $\text{H}_3\text{PO}_4 = 98.00$

ナカライテスク (株) 特級試薬

- ・ ホウ酸 (Boric acid) $\text{H}_3\text{BO}_3 = 61.83$

和光純薬工業 (株) 特級試薬

- ・ 酢酸 (Acetic acid) $\text{CH}_3\text{COOH} = 60.05$

和光純薬工業 (株) 特級試薬

- ・ 水酸化ナトリウム (Sodium Hydroxide) $\text{NaOH} = 40.00$

和光純薬工業 (株) 特級試薬

2.2.4. 溶媒・その他

- ・ water 水 H_2O = 18

ADVANTEC Aquarius GS20A を用いて水道水を二回イオン交換、1 回蒸留し、さらに Millipore Milli-Q II で生成した水 (Milli-Q 水) を使用した。(比抵抗値 $\rho = 18.3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

- ・ エタノール

本研究室にて市販のものを蒸留して用いた。

日本アルコール販売株式会社 試薬一級

- ・ アセトン CH_3COCH_3 = 58.08

99.5 % : 和光純薬工業株式会社

2.2.5 修飾方法

電極の修飾は、修飾物質を $20 \mu\text{M}$ に調整した水溶液を測定セル中に注ぎ込み、20 分間放置した後、水 (Milli-Q) でセル内をよく洗浄した。

2.2.6. 測定機器

- ・ FTS-6000 spectrometer

日本バイオ・ラッド ラボラトリー株式会社

- ・ Potentiostat, Function generator : POLARIZATION UNIT PS-06

TOHO TECHNICAL RESERCH

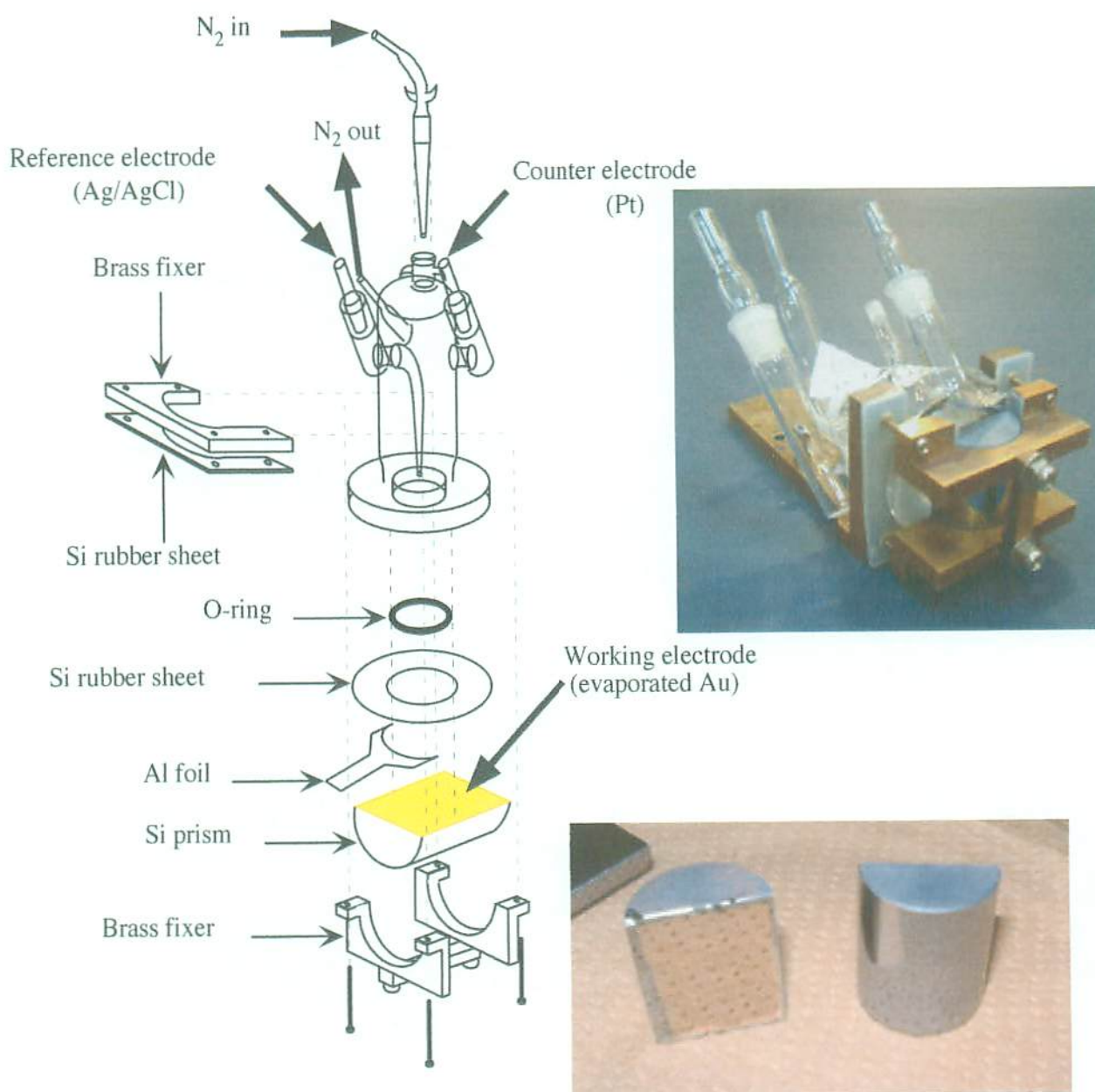


Figure 2-2-1. Cell for the in situ SEIRAS study with electrochemistry

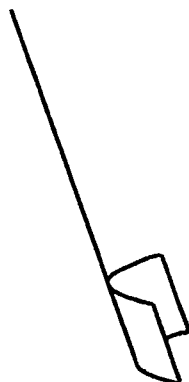


Figure 2-3-2. Counter electrode.

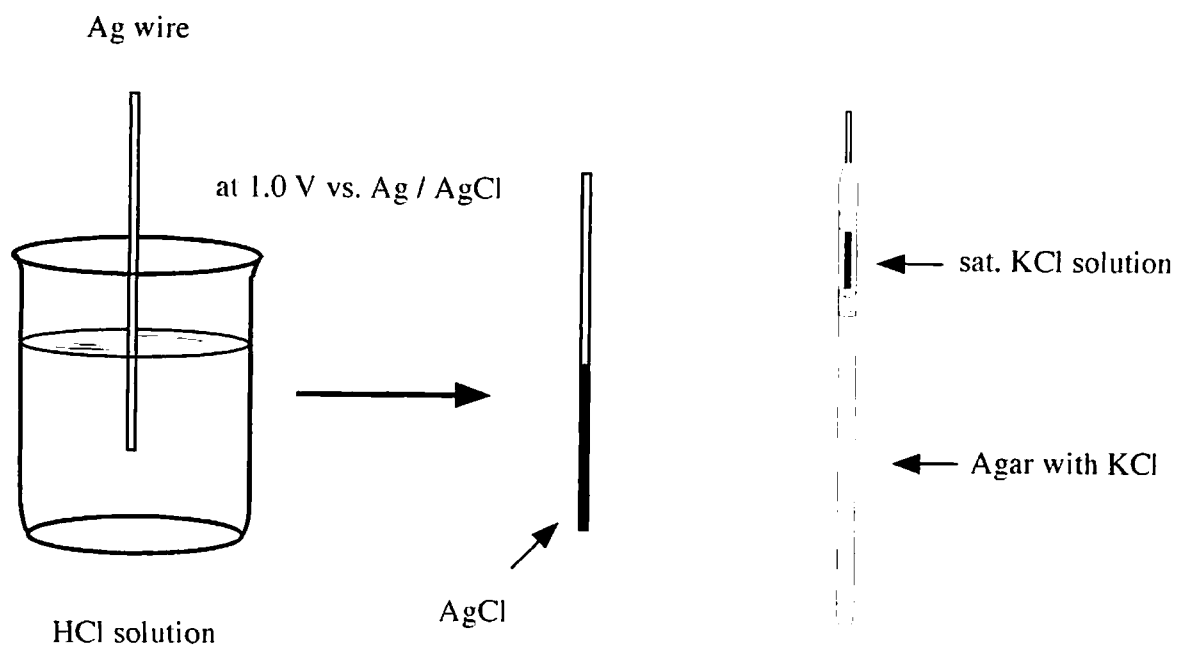


Figure 2-3-3(a). Preparation of reference electrode. Figure 2-3-3(b). Reference electrode.

2. 3. SEIRAS による吸着挙動の解析

STM 観察の結果、チオール系分子の電極上への吸着は、それらのジスルフィド体から作製した SAM と最終的な吸着状態は同じである。ここではピリジン系のチオールまたはジスルフィドを用い、作製された SAM の pH や電極電位に対する赤外スペクトルの応答を SEIRAS を用いて測定を行った。

2. 3. 1. ベンゼンチオール (PhSH)

PhSH は、単純な芳香族チオール化合物の一つであり、これまでも、電極表面での吸着挙動についての研究が数多くなされている^{6)~10)}。PhSH は、ベンゼンチオレート、硫黄原子を介し金属表面上に解離的に吸着される。そのときの吸着状態について多くの議論がなされているが、見積もられたベンゼン環の吸着角度は表面に垂直方向からわずかに傾いて吸着しているなど様々に結論付けられている^{11)~13)}。

電極上に吸着した PhSH のスペクトルを帰属するため neat PhSH およびジフェニルジスルフィド (PhSSPh) の KBr 法による透過スペクトルを測定した。Figure 2-3-1 に示したように $1300\text{ cm}^{-1} \sim 1900\text{ cm}^{-1}$ の範囲において、得られた吸収ピークは 1575 cm^{-1} 、 1475 cm^{-1} 、 1440 cm^{-1} 付近に 3 つのバンドが観測され、これら 2 つの透過スペクトルにはほとんど違いは見られなかった。これらのバンドはそれぞれベンゼン環の振動に由来するものである¹²⁾。PhSH 修飾電極の SEIRAS スペクトルは、Figure 2-3-2 に示すように 0.1 M HClO_4 水溶液中で 1472 cm^{-1} および 1574 cm^{-1} 付近に PhSH の吸着に伴う吸収が観測された。一方、 0.1 M NaClO_4 水溶液を用いた中性溶液中でのスペクトルも酸性溶液中で得られたものと同様であった。酸性および中性水溶液中におけるこれらの吸収ピークの電極電位に対する応答は、両方の溶液

中において変化しなかった (Figure 2-3-2)。このことから、PhSH の吸着状態は、溶液の pH や電極電位 (+ 0.4 ~ - 0.3 V, vs. Ag / AgCl) によってほとんど変化しないことがわかった。

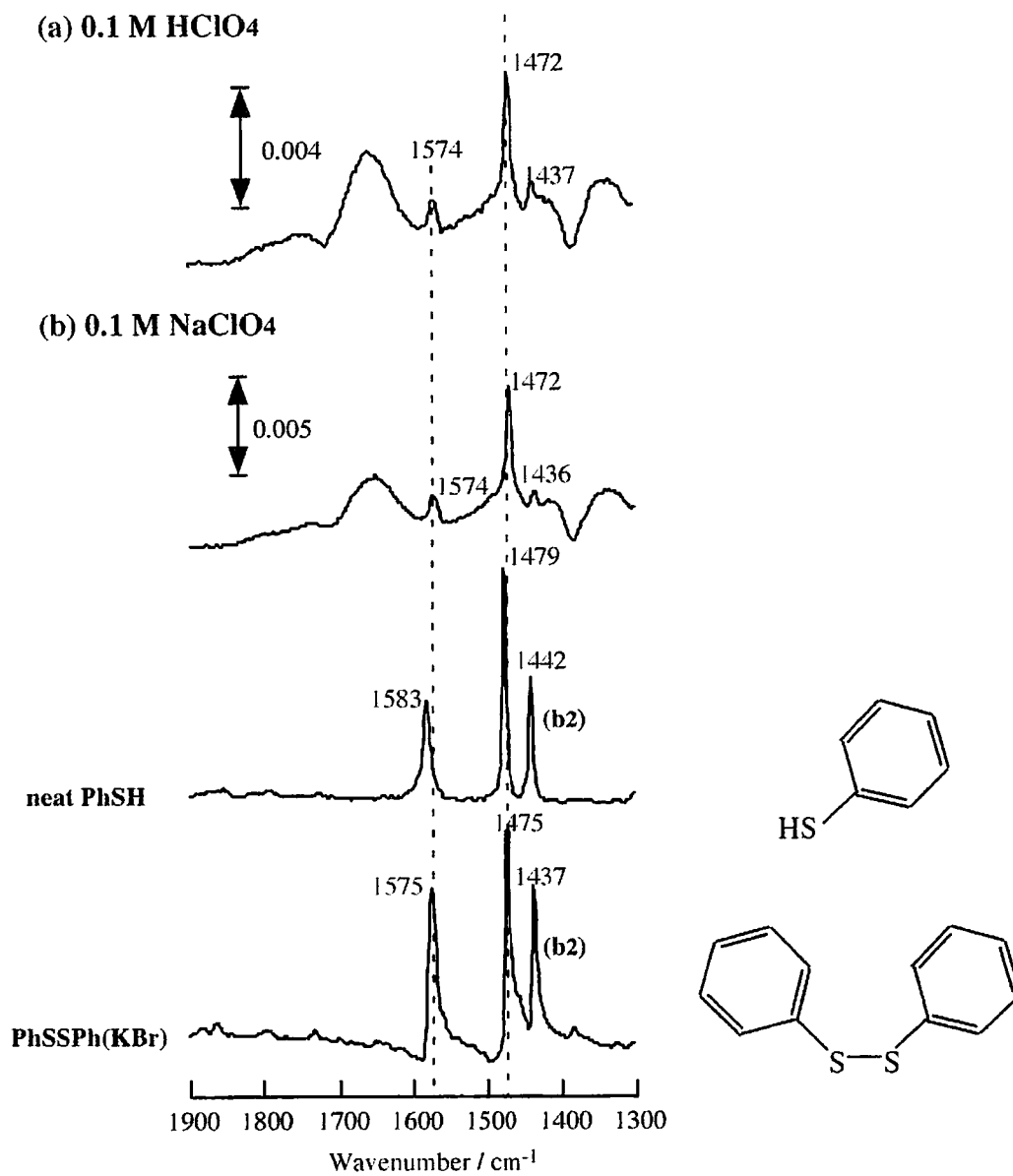


Figure 2-3-1. SEIRA spectra of PhSH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO_4 , (b) 0.1 M NaClO_4 at 0V.

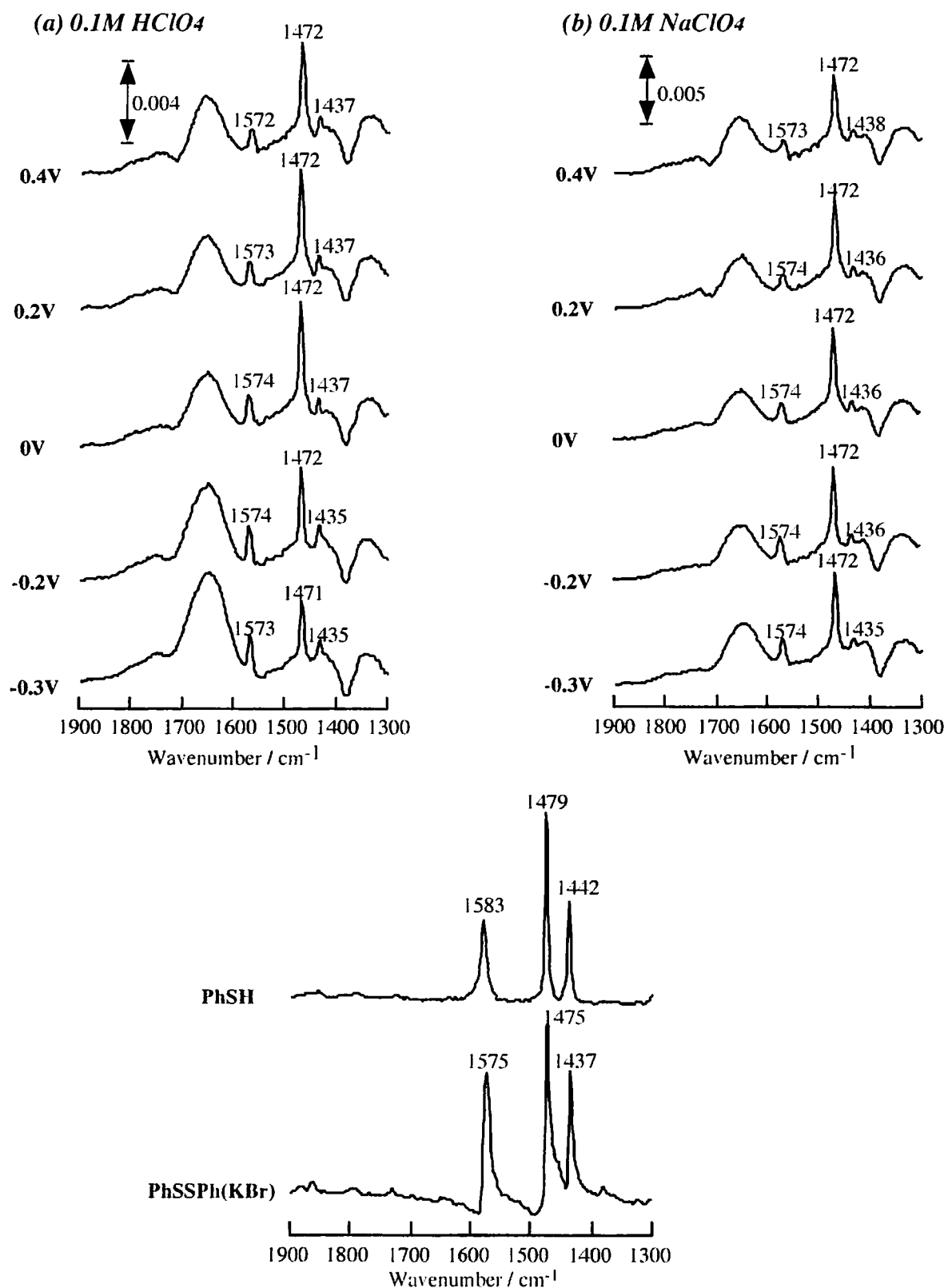


Figure 2-3-2. SEIRA spectra of PhSH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO₄ and (b) 0.1M NaClO₄ at various potentials, together with transmission infrared spectra of PhSH and PhSSPh (KBr pellet).

2.3.2. 4-ピリジンチオール (4-PySH)

電極表面上に吸着した 4-PySH のスペクトルとの比較を行うため、KBr 法によって透過スペクトルの測定を行った。Figure 2-3-3 に示したようにこの領域において、ピリジン環の面内 C=C、C=N の伸縮振動のみが観察され、4-PySH のスペクトルでは 1612 cm^{-1} および 1459 cm^{-1} に得られた吸収ピークがそれに相当するものと考えられる。一方、二量体を形成している 4,4'-PySSPy のスペクトルは、 1573 cm^{-1} 、 1481 cm^{-1} の得られた吸収ピークがそれに相当すると思われる。これらの吸収ピークが 4-PySH で得られたものと $30\sim 40\text{ cm}^{-1}$ 程度それぞれシフトしているのは、4-PySH は、分子内でチオン型を形成し、ピリジン環の N 原子に H 原子が結合しているためと考えられるが、ジスルフィド体ではそのような形態を取らない。このことがピリジン環の吸収ピークのシフトの原因であると考えられる。

4-PySH 修飾電極におけるスペクトルを測定すると、 0.1 M HClO_4 水溶液中において、 1621 cm^{-1} 、 1469 cm^{-1} に吸収ピークが得られた。これらのピークは、4-PySH の透過スペクトルで得られた吸収ピークと類似しており、酸性溶液中ではピリジン環の N 原子にプロトンが付加しているものと考えられる。一方、 0.1 M NaClO_4 水溶液中では、 1619 cm^{-1} と 1467 cm^{-1} にプロトンの付加を示す吸収ピークがわずかに観察されるが、酸性溶液中で得られたピーク強度と比較すると非常に小さい。よって、中性溶液中で 4-PySH は、ほとんどプロトン化していないと考えられる¹⁴⁾。

電位変化に対するスペクトル挙動は、Figure 2-3-4 に示すように、 0.1 M HClO_4 水溶液中で電極電位を positive に変化させると、 1621 cm^{-1} のピーク強度が減少し、 1570 cm^{-1} 付近に新たに吸収ピークが観察されるようになった。また、 1472 cm^{-1} 付近のピークは高波数側にシフトした。一方、電極電位を negative にシフトしても 1621 cm^{-1} と 1472 cm^{-1} のピークに変化は見られなかった。このことから、酸

性溶液中で 4-PySH は、電極電位を positive にすることによってプロトンの解離が起こることがわかる。0.1 M NaClO₄ 水溶液中では、1619 cm⁻¹ と 1576 cm⁻¹、1467 cm⁻¹ に吸収ピークが得られた。電極電位を positive に変化させると、0.2 V 付近では、1619 cm⁻¹ のピーク強度が減少し、0.4 V 付近ではほとんど消滅した。逆に 1576 cm⁻¹ 付近の吸収ピークは、電極電位が positive になるにつれて強度が増加した。これらのことから、4-PySH は酸性溶液中においてプロトン化していたものが、電極電位を positive にすることによってプロトンが解離し、中性中における吸着状態に近づく。また、中性溶液中では、電極電位がより negative なほどプロトン化しやすくなると考えられる。つまり、ピリジン環へのプロトンの付加は、溶液の pH や電極電位に強く影響されることが明らかになった。

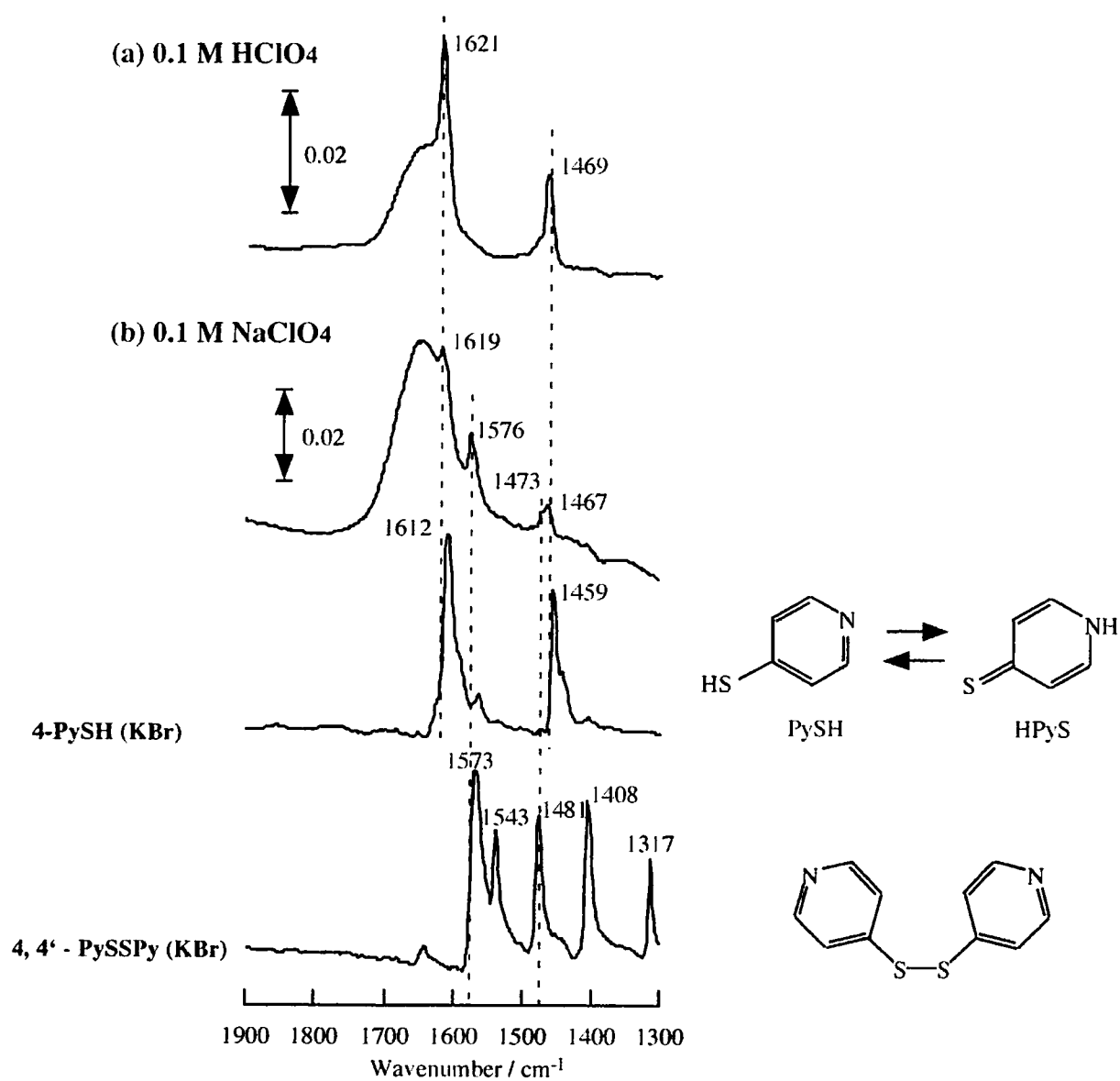


Figure 2-3-3. SEIRA spectra of 4-PySH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO_4 . (b) 0.1 M NaClO_4 at 0V.

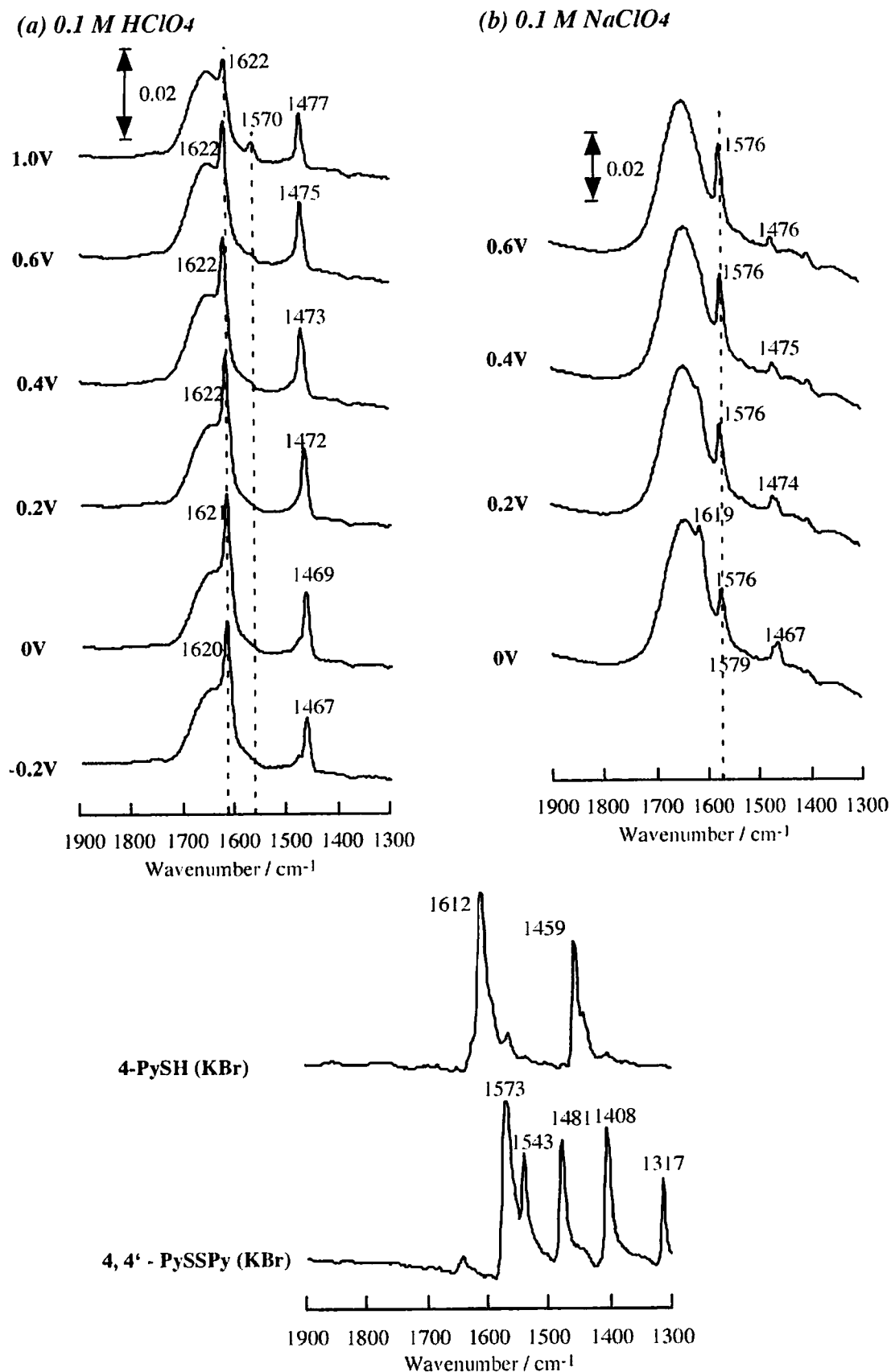


Figure 2-3-4. SEIRA spectra of 4 - PySH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO₄ and (b) 0.1 M NaClO₄ at various potentials, together with transmission infrared spectra of 4 - PySH and 4, 4' - PySSPy (KBr pellet).

2.3.3. 2-ピリジンチオール (2-PySH)

Figure 2-3-5 に 2-PySH の KBr 中の透過スペクトルと SEIRAS スペクトルを示した。KBr 中の透過スペクトルでは、 1614 cm^{-1} 、 1576 cm^{-1} 、 1496 cm^{-1} 、 1440 cm^{-1} 付近に吸収ピークが観察された。一方、2,2'-PySSPy の吸収スペクトルは、 1570 cm^{-1} 、 1445 cm^{-1} 、 1419 cm^{-1} に吸収ピークが観察された。2-PySH で観察された吸収ピークのうち 1614 cm^{-1} 、 1496 cm^{-1} の吸収ピークは、4-PySH のときと同様にピリジン環の N 原子にプロトンが付加したチオン型の形成によるピークであり、また、 1576 cm^{-1} 、 1440 cm^{-1} 付近の吸収ピークは、ピリジン環の N 原子にプロトンが付加していないものの吸収ピークであると考えられる。

金電極表面での吸収スペクトルは、0.1 M HClO₄ 水溶液中において、 1606 、 1578 、 1499 cm^{-1} 、 1446 、 1416 cm^{-1} に吸収ピークが観察された。一方、0.1 M NaClO₄ 水溶液中においては、 1578 、 1448 、 1416 cm^{-1} に吸収が観察された。これらの結果を KBr 法により得られたスペクトルと比較すると、酸性中において得られた 1606 cm^{-1} の吸収ピークは、4-PySH 修飾電極でも得られたピリジン環の N 原子がプロトン化することによって現れる吸収であると考えられるが、4-PySH で得られた吸収強度に比べて非常に小さく、また、同時に 1578 、 1446 cm^{-1} にプロトンが付加していないことを表す吸収ピークが観察された。

2-PySH 修飾電極の電極電位に対するスペクトル挙動は、Figure 2-3-6 に示したように 0.1 M HClO₄ 水溶液中では、電極電位を positive に変化させると、 1605 cm^{-1} のピーク強度は消滅し、 1578 cm^{-1} 付近の吸収ピーク強度が増加した。また、 1446 cm^{-1} 付近のピークも電極電位が positive になるに伴い増加した。一方、電極電位を negative にシフトすると 1605 cm^{-1} の吸収強度の増加に伴い 1578 cm^{-1} のピークの減少が観察された。0.1 M NaClO₄ 水溶液中では、 1578 cm^{-1} 、 1447 cm^{-1} にのみ吸収

ピークが得られ、電極電位のシフトに伴うスペクトルの変化は観察されなかった。したがって 2-PySH は電極上に修飾されると 4-PySH と異なりプロトン化されにくい状態にあることがわかる。これらの溶液中での pK_a がほぼ等しいならば、2-PySH も 4-PySH のようにプロトン付加が起こると考えられるが、得られたスペクトルではプロトン化のピークはほとんど観察されなかった。また、STM 観察の結果から電極表面上の 2-PySH は、ピリジン環の窒素原子を電極側に向けて吸着していることが提案されており、ここで得られた結果も 2-PySH のピリジン窒素原子が電極表面と相互作用するためプロトン化しにくい状態になっていると考えられる。

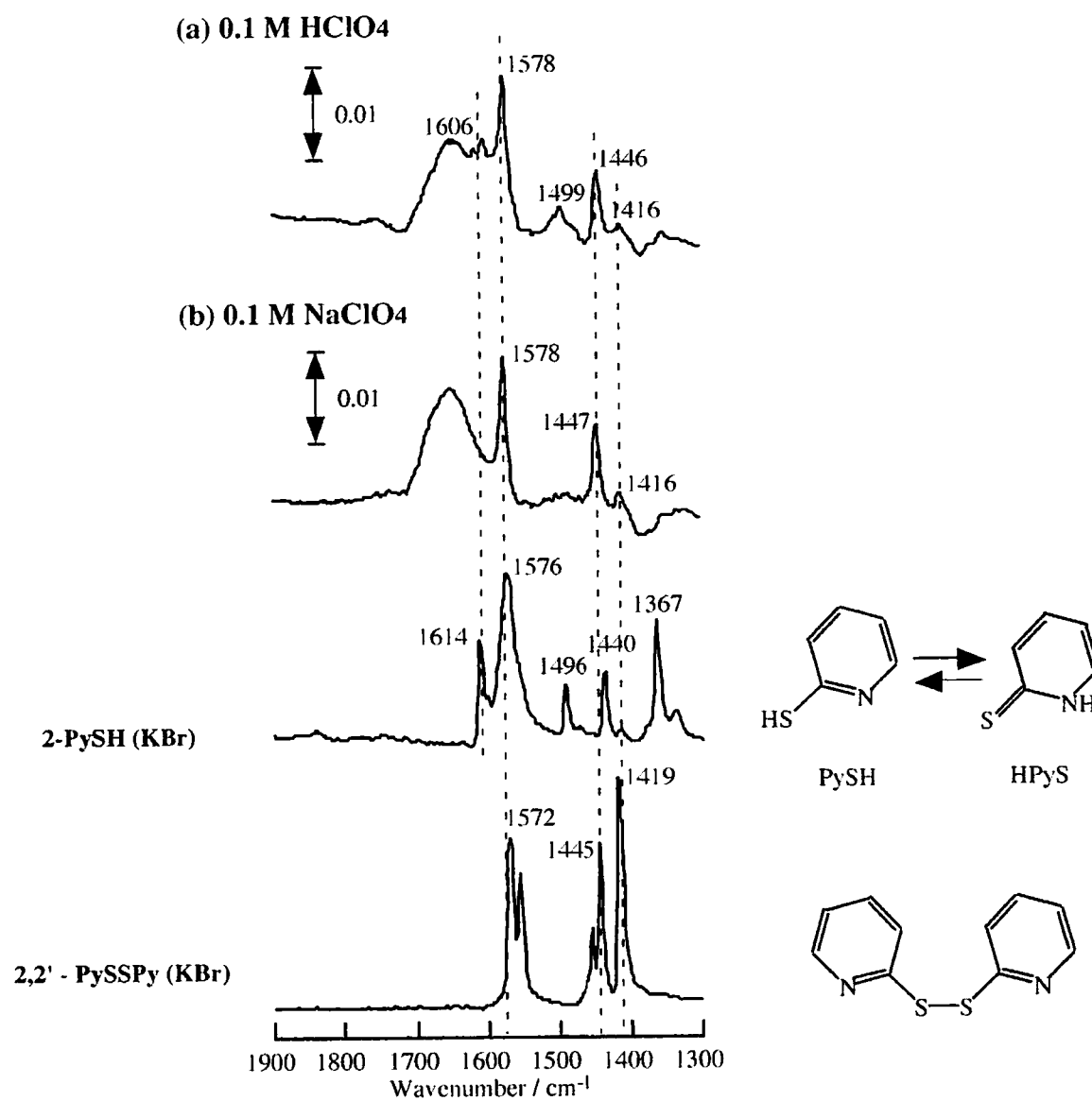


Figure 2-3-5. SEIRA spectra of 2-PySH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO_4 and (b) 0.1 M NaClO_4 at 0V.

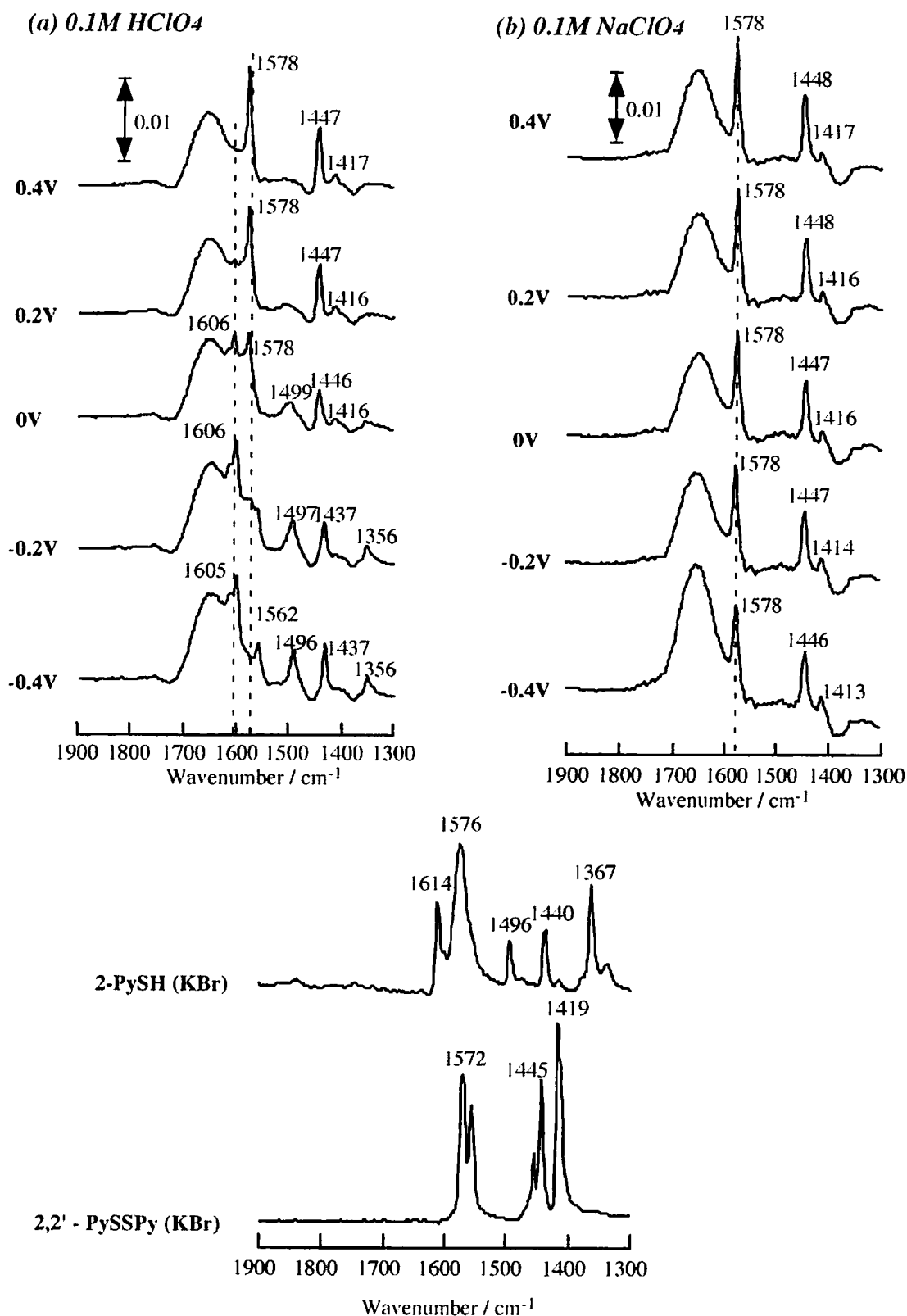


Figure 2-3-6. SEIRA spectra of 2 - PySH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO₄ and (b) 0.1 M NaClO₄ at various potentials, together with transmission infrared spectra of 2 - PySH and 2, 2' - PySSPy (KBr pellet).

2. 3. 4. 3-ピリジンチオール (3-PySH)

KBr 中での 3-PySH の透過スペクトル Figure 2-3-7 に示した。 1520 cm^{-1} および 1455 cm^{-1} に吸収ピークが得られた。一方、3,3'-PySSPy の吸収スペクトルは、 1566 cm^{-1} 、 1464 cm^{-1} 、 1404 cm^{-1} に吸収が観察された。3-PySH は、4-PySH や 2-PySH のようにチオン型 ($\text{S}=\text{PyH}$) の構造をとらないと考えられる。そこでプロトン付加体のスペクトルを得るために、3,3'-PySSPy $\cdot 2\text{HCl}$ を合成した。この透過スペクトルで得られた吸収ピークは、 1538 cm^{-1} および 1458 cm^{-1} に得られ、このスペクトルをプロトン付加体の指標として用いた。

金電極上に修飾させたときの吸収スペクトルは、0.1 M HClO_4 水溶液中において、 1529 cm^{-1} 、 1454 cm^{-1} に吸収ピークが観察された。一方、0.1 M NaClO_4 水溶液中においては、 1566 cm^{-1} 、 1464 cm^{-1} 、 1404 cm^{-1} に吸収が観察され、3,3'-PySSPy の KBr 中での測定によって得られたスペクトルと同様のスペクトルが得られた。

3-PySH 修飾電極の電極電位を positive に変化させると、0.4 V 付近までは 1527 cm^{-1} と 1452 cm^{-1} のピークが高波数シフトするものの、あまり変化は見られず、さらに電極電位を positive にするとこれらのピークは減少し、 1566 cm^{-1} と 1405 cm^{-1} に新たにピークが現れた。一方、電極電位を negative にしてもスペクトルに変化は見られなかった。0.1 M NaClO_4 水溶液中では、 1566 cm^{-1} 、 1464 cm^{-1} 、 1404 cm^{-1} に吸収ピークが見られたが、電位変化に伴うスペクトルの変化は得られなかった。得られたピークが KBr 測定における 3,3'-PySSPy のスペクトルと同様の波数にスペクトルが現れることから、中性溶液中では二量体を形成していると推測される。

(Figure 2-3-8)

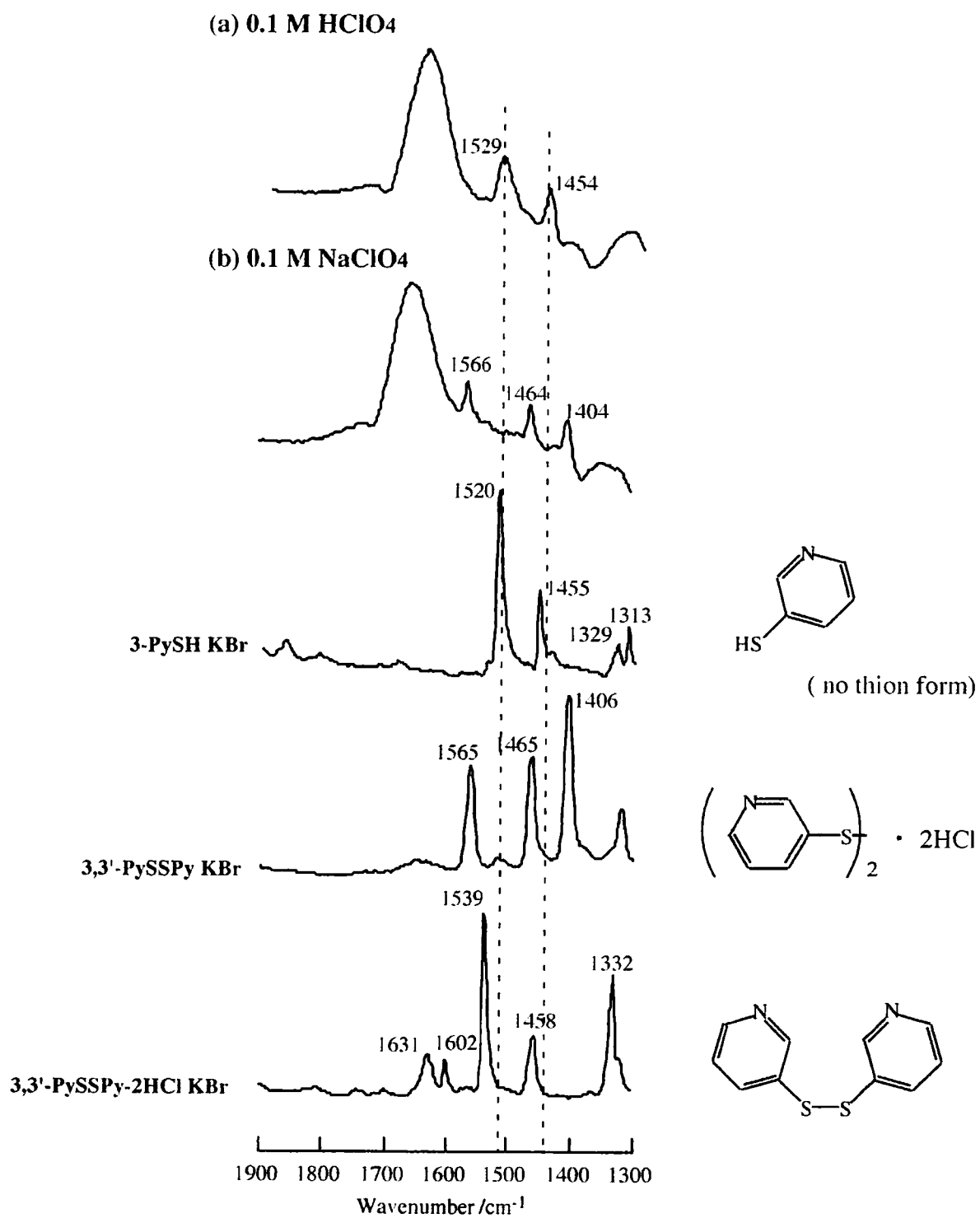


Figure 2-3-7. SEIRA spectra of 3-PySH on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO₄ and (b) 0.1 M NaClO₄ at 0 V.

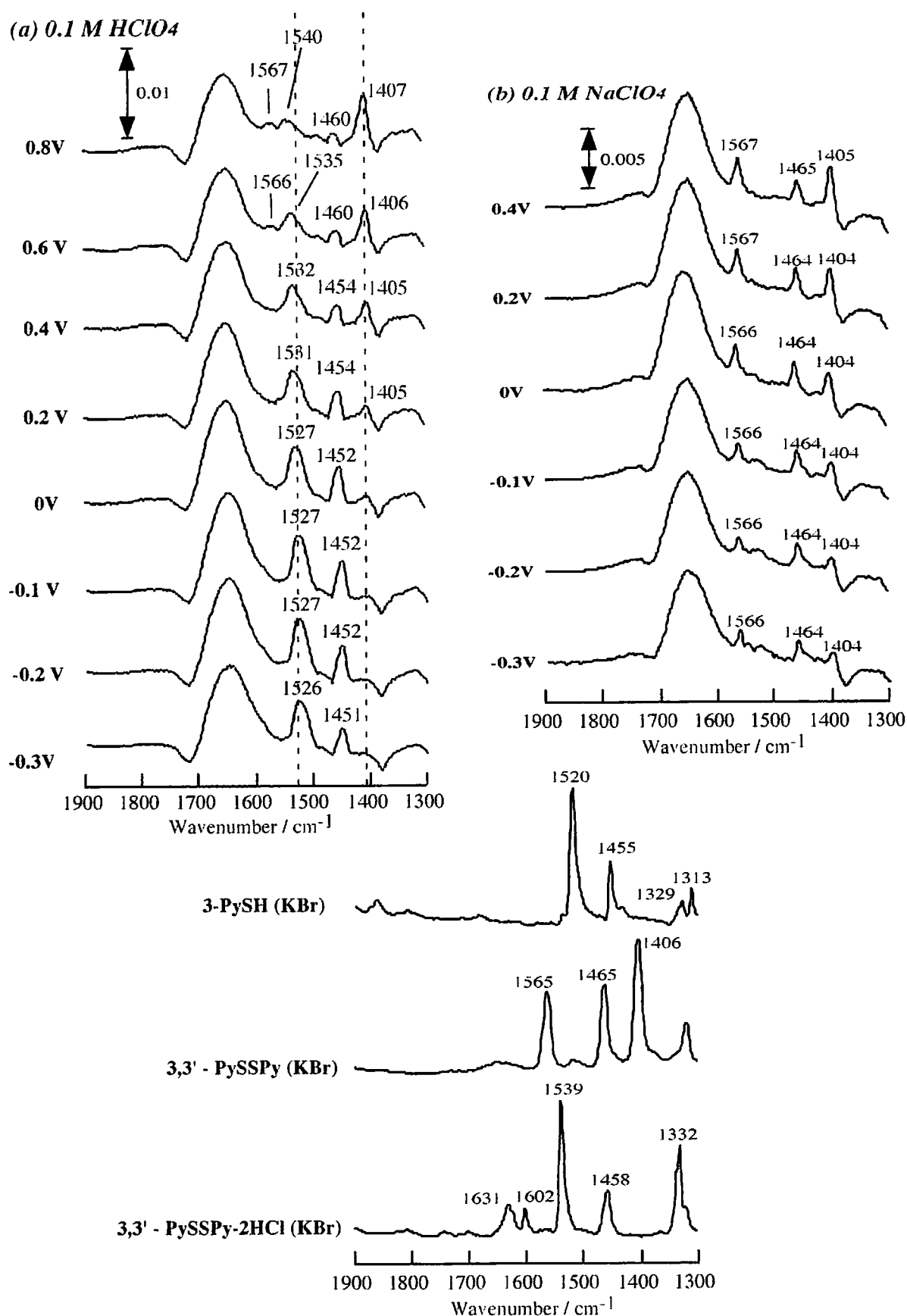


Figure 2-3-8. SEIRA spectra of 3 - PySH on Au / Si electrode in (a) HClO₄ and (b) NaClO₄ at various potentials, together with transmission infrared spectra of 3 - PySH, 3, 3' - PySSPy and 3, 3' - PySSPy-2HCl (KBr pellet).

2.3.5. 2-ピリミジンジスルフィド (2,2'-PymSSPym)

2-PymSH の KBr 中における透過スペクトルは、 1609 cm^{-1} 、 1573 cm^{-1} 、 1494 cm^{-1} 、 1424 cm^{-1} 、 1333 cm^{-1} に吸収ピークが得られた。一方、ジスルフィド体では 1566 cm^{-1} 、 1377 cm^{-1} に吸収ピークが観察された。このスペクトルから 1609 cm^{-1} に得られたピークは、チオン型の構造に伴うピリミジン環の N 原子のプロトン化に伴うピークであることがわかる。

金電極上での吸収スペクトルは、Figure 2-3-9 に示したように 0.1 M HClO_4 水溶液中において、 1607 、 1566 、 1547 、 1377 cm^{-1} にそれぞれシグナルが観察された。また、 0.1 M NaClO_4 水溶液中においては、 1566 、 1546 、 1378 cm^{-1} に吸収が観察され、これらのスペクトルを KBr 測定によって得られたスペクトルと比較すると、2,2'-PymSSPym も 2-PySH のときと同様にピリミジン環の N 原子が電極表面と弱く相互作用することによって、溶液中のプロトンの影響を受けにくい状態にあると考えられる。

2,2'-PymSSPym 修飾電極の 0.1 M HClO_4 水溶液中におけるスペクトルは、電極電位を positive に変化させると、 1607 cm^{-1} のピーク強度が減少し、 1567 cm^{-1} 付近の吸収ピーク強度が増加した。また、 1377 cm^{-1} 付近のピークも電極電位が positive になるに伴い増加した。一方、電極電位を negative にシフトすると 1606 cm^{-1} の吸収強度は増加したが、 1567 、 1377 cm^{-1} のピークの減少が観察された。 0.1 M NaClO_4 水溶液中では、電極電位のシフトに伴うスペクトルの変化は観察されなかった (Figure 2-3-10)。

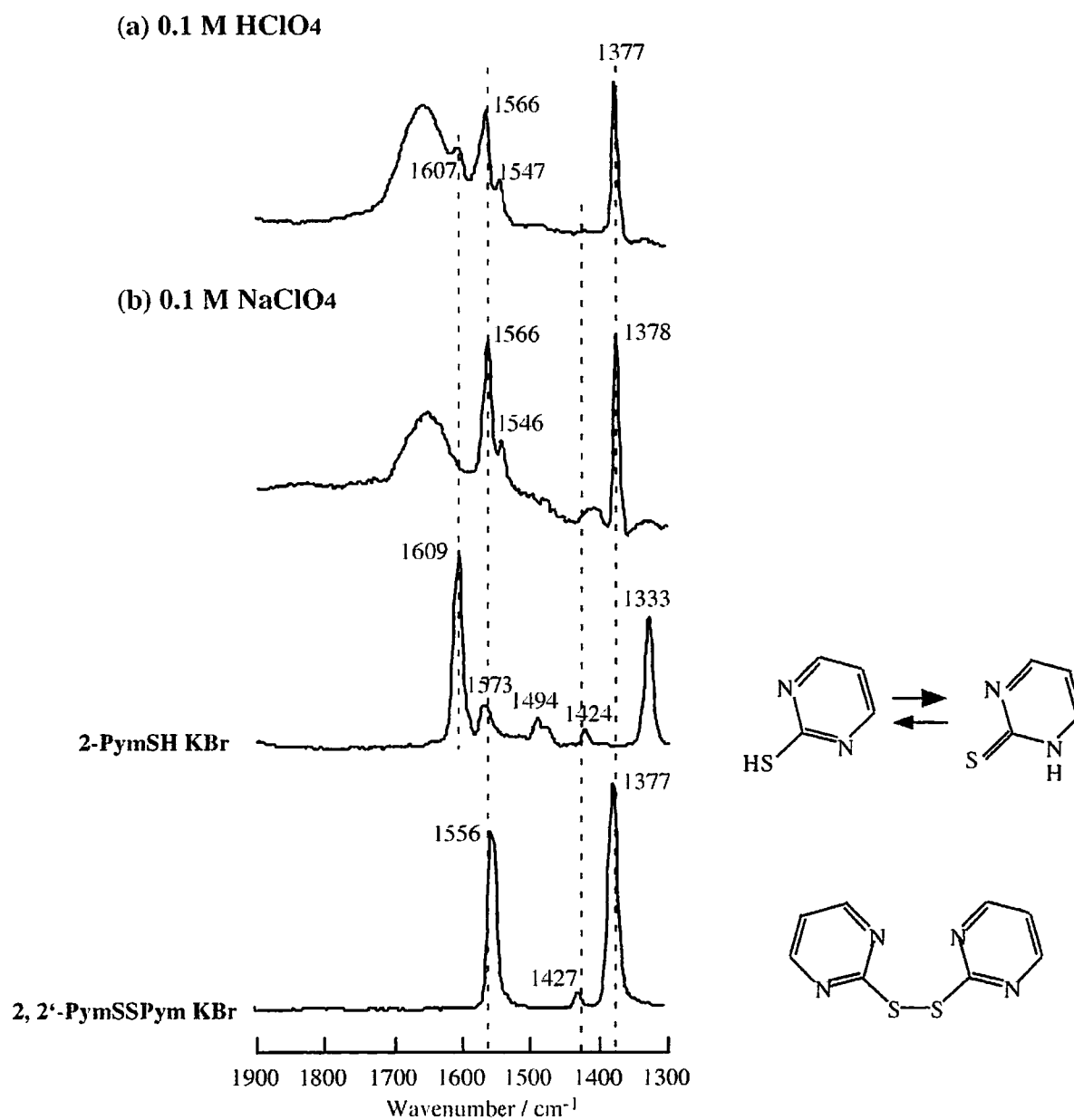


Figure 2-3-9. SEIRA spectra of 2, 2'-PymSSPym on Au / Si electrode in (a) 0.1 M HClO₄ and (b) 0.1 M NaClO₄ at 0 V.

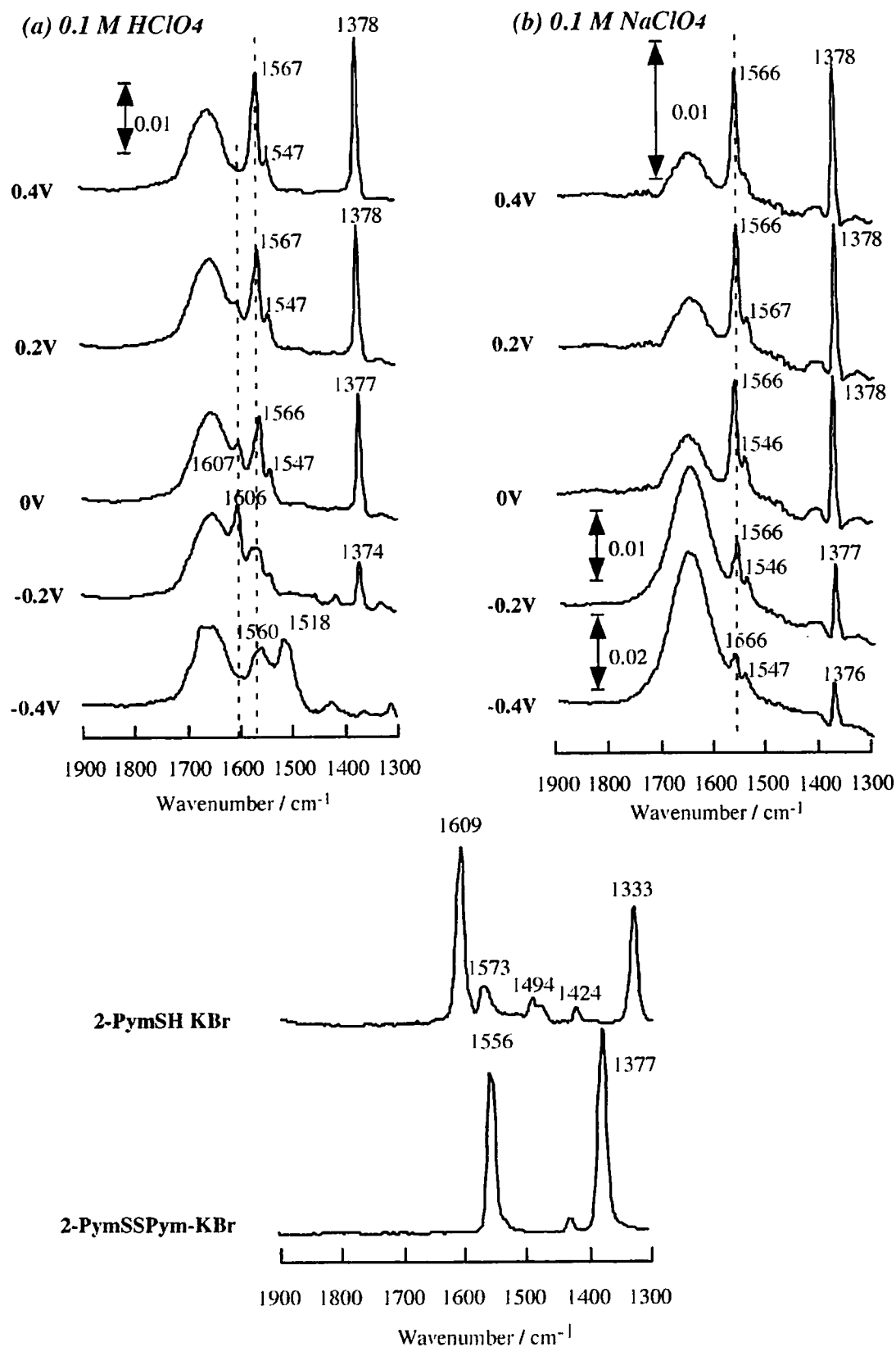


Figure 2-3-10. SEIRA spectra of 2, 2' - PymSSPym on Au / Si electrode in (a) HClO₄ and (b) NaClO₄ at various potentials, together with transmission infrared spectra of 2 - PymSH and 2, 2' - PymSSPym (KBr pellet).

2.4. 吸着分子の配向状態

電極上に吸着した SAM はそれらの高配向性から SERS などの様々な方法によってその配向についての広く検討が行われてきた。ピリジン系チオールについても STM などによって構造の解析がなされている。そこで、本研究で得られたスペクトルの結果を用いてそれぞれの吸着状態の検討を行った。

PhSH は a_1 、 b_1 、 b_2 の 3 つの振動モードを持っており、電極表面上での配向が Figure 2-4-1 のようにモデル化することができる。そこで PhSH の KBr 中におけるスペクトルと SEIRAS の結果を比較すると、 1440 cm^{-1} 付近の b_2 モードに帰属される吸収ピークのみが著しく SEIRA スペクトルでは減少していることがわかる。このことから、電極表面における PhSH の吸着状態は、ベンゼン環の横方向の平面振動 (b_2 モード) は、電極表面に対しほぼ水平を向き、 a_1 モードは明確に観察されることから、電極表面に対し垂直に近い状態で吸着しているものと考えられる。これは以前に報告されている結果¹¹⁾と同様の結果が得られた。

4-PySH も同様に考えると、 1440 cm^{-1} 付近の b_2 モードに帰属されるピークは電極表面のスペクトルでは観察されない。これは 4-PySH も PhSH 同様に b_2 モードに相当するピリジン環平面の横方向の振動は電極に対して水平方向に振動していることを意味し、そのため PhSH と類似した配向をとっていると考えられる。一方、2-PySH は、 1440 cm^{-1} 付近の b_2 モードの吸収は電極表面でも観測されている。これと先に記述したピリジン環の N 原子と電極との相互作用を考慮すると、ピリジン環の b_2 モードは電極に対し垂直方向を向いているものと考えられる。また、3-PySH の b_2 モードは、SEIRAS においても測定されている。しかし、3-PySH 修飾電極においてチトクロム c の明確な電気化学応答を示すことから、3-PySH の吸

着状態は、2-PySH 同様にピリジン環の b2 モードを電極表面に対し垂直に向けているものの、ピリジン環の N 原子は溶液方向を向いて吸着しているものと考えられる。2-PyMS は、KBr 中のスペクトルにおいて 1430 cm^{-1} 付近に b2 モードによる吸収が得られるが、このためピリジン環の平面の横方向の振動は電極に対して水平方向に振動しており、PhSH や 4-PySH と類似した構造であると思われる。しかし、STM 観察による結果から 配向状態は、PhSH や 4-PySH よりも電極側に傾いた配向であることがわかっている。

それぞれの化合物について考えられる配向状態を Figure 2-4-2 にそれぞれ示した。これらの結果はいずれも STM 観察によって得られたものと矛盾しない結果が得られたものと考えられる。

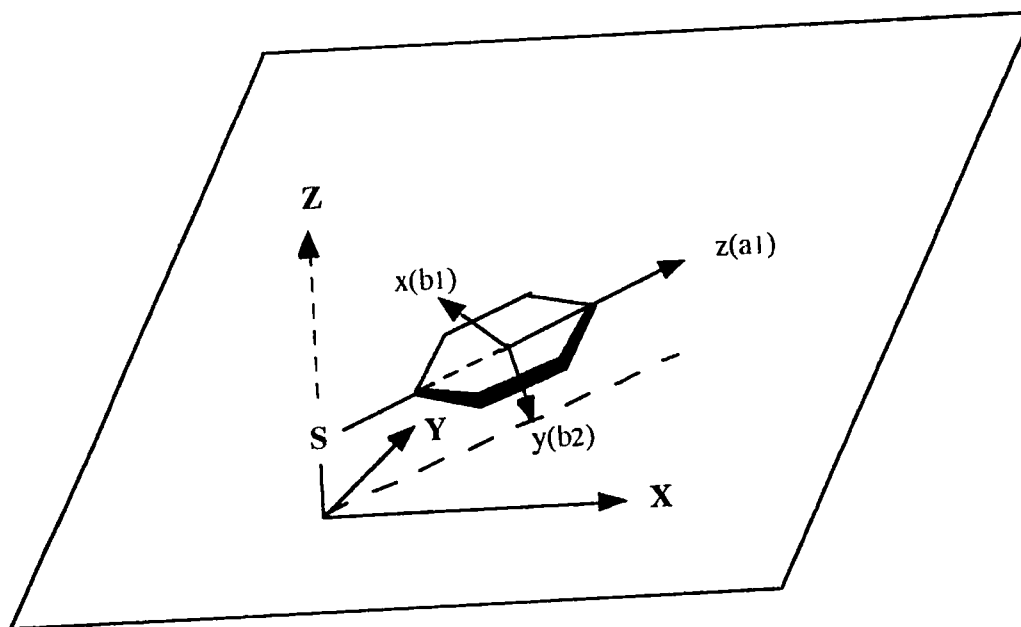


Figure 2-4-1. The directions of dipole moments of a_1 , b_1 and b_2 modes for PhSH.

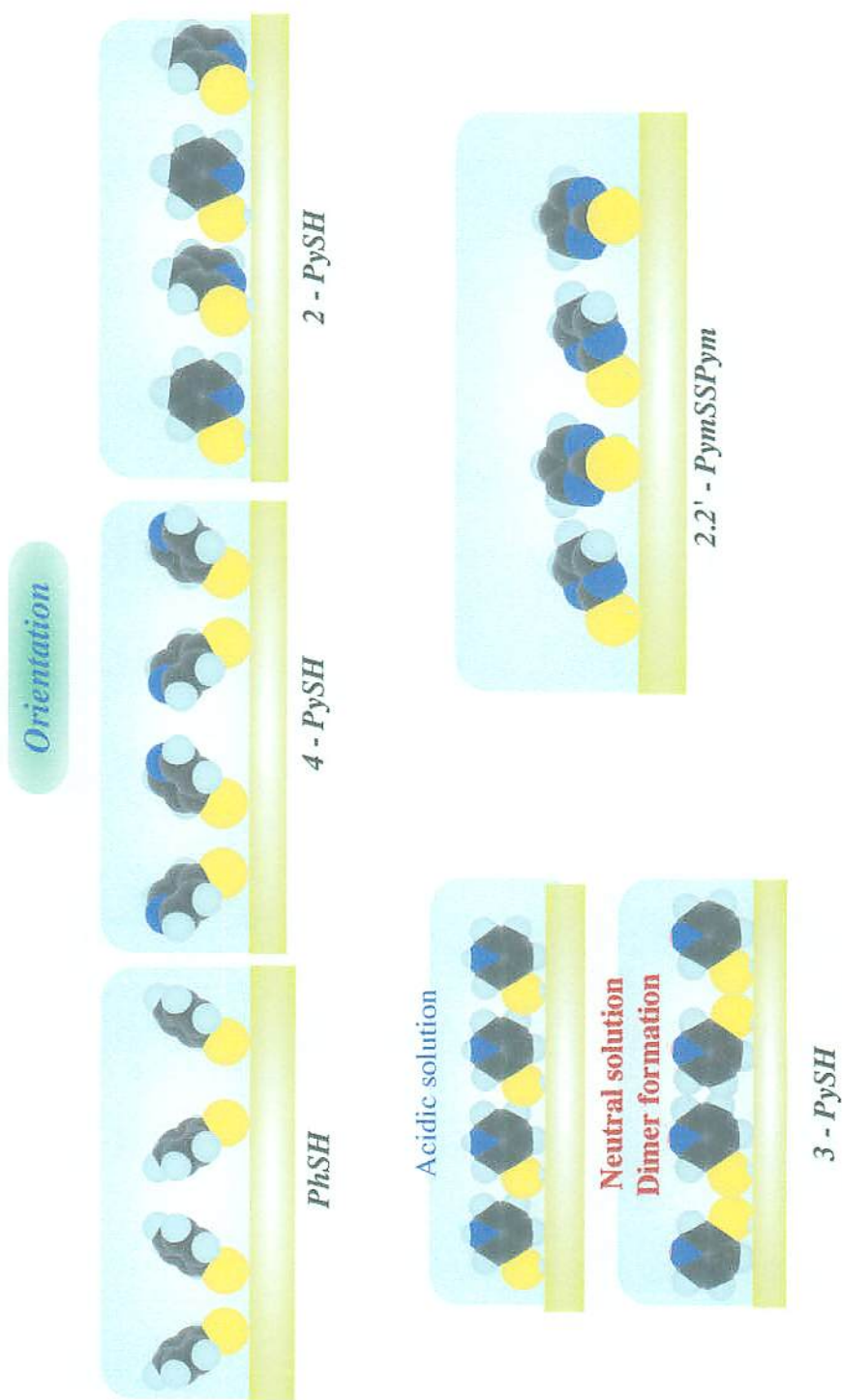


Figure 2-4-2. Possible structures of (a) PhSH, (b) 4-PySH, (c) 2-PySH, (d) 3-PySH, (e) 2,2'-PymSSPy adsorbed on Au electrode.

2. 5. SEIRAS による表面修飾分子の pKa 評価

PySH SAM の酸解離挙動は、電極電位に影響を受けることが知られている。そこで SEIRAS を用いて PySH SAM の電極表面上における酸解離挙動の評価を試みた。

4-PySH 修飾電極の電極電位 0 V における各 pH 溶液中での SEIRAS 測定を行うと、0.1 M HClO₄ 水溶液中では、1621 cm⁻¹ 付近のプロトン化によるピークは観察されるが、1578 cm⁻¹ 付近のプロトンが付加していないときに現れる吸収ピークは観察されない。しかし pH を増加させると pH 3 付近から 1578 cm⁻¹ 付近のピークが得られるようになり、1621 cm⁻¹ 付近のピークの減少に伴い、このピークの増加が観察された。このピークの増加は約 pH 7 程度まで観察され、それ以上は一定となった。そこでこれらのピーク強度から次式によって得られた値 (f) を pH に対してプロットし滴定曲線の作製を行った。

$$f = [\text{PyS} - \text{Au}] / \{[\text{PyS} - \text{Au}] + [\text{H}^+ \text{PyS} - \text{Au}]\}$$

f はプロトン化されていない吸着分子の割合を表し、表面 pKa は f = 0.5 の時の pH と定義した。Figure 2-5-1 に得られたプロットを示した。これから 4-PySH SAM の 0 V における表面 pKa は 約 5.0 と見積もられ、4,4'-PySSPy の溶液中での pKa₂ は、4.92 であることから表面での pKa 値は溶液中のものとほぼ等しい値が得られた。また、同様の方法で測定された Wan ら¹⁹⁾の結果 (pKa = 5) とほぼ一致した。表面 pKa は電極電位に依存することから電位依存性について調べた。0.2 V、0.4 V と電位をより positive にするにつれて pKa は、3.6、2.8 と酸性側にシフトした。一方、negative な電位である -0.2 V のにおける表面 pKa は 6.3 と見積もられ、アルカリ側へシフトした。これはより positive な電位では電極にプラスの電荷がチャージされるためプロトン付加が起こりにくくなるためと考えられる。

2-PySH 修飾電極では、酸性中においても 0 V では 1606 cm^{-1} 付近のピークは非常に小さくほとんどプロトンの付加は起こっていない。しかし、電位を negative にするにつれてこのピークの増加が観察され、 -0.3 V 程度まで増加した。そこでこの電位での 1606 cm^{-1} 付近のピーク強度を吸着分子がすべてプロトン化されていると仮定すると、4-PySH と同様に表面 pKa を求めた。各 pH 溶液中で得られたスペクトルから求められた f を pH に対しプロットしたものを Figure 2-5-2 に示した。これから 2-PySH の -0.3 V における表面 pKa は約 3.4 と見積もられた。4-PySH の -0.2 V での pKa 値が 6.3 であり、negative な電位によってアルカリシフトすることを考慮すると 3 pH ユニット以上異なると考えられる。2-PySH の溶液中での pKa を先に記述したように、4-PySH と同程度であると考え、表面上に固定化された吸着構造の違いによって生じたものと考えられる。

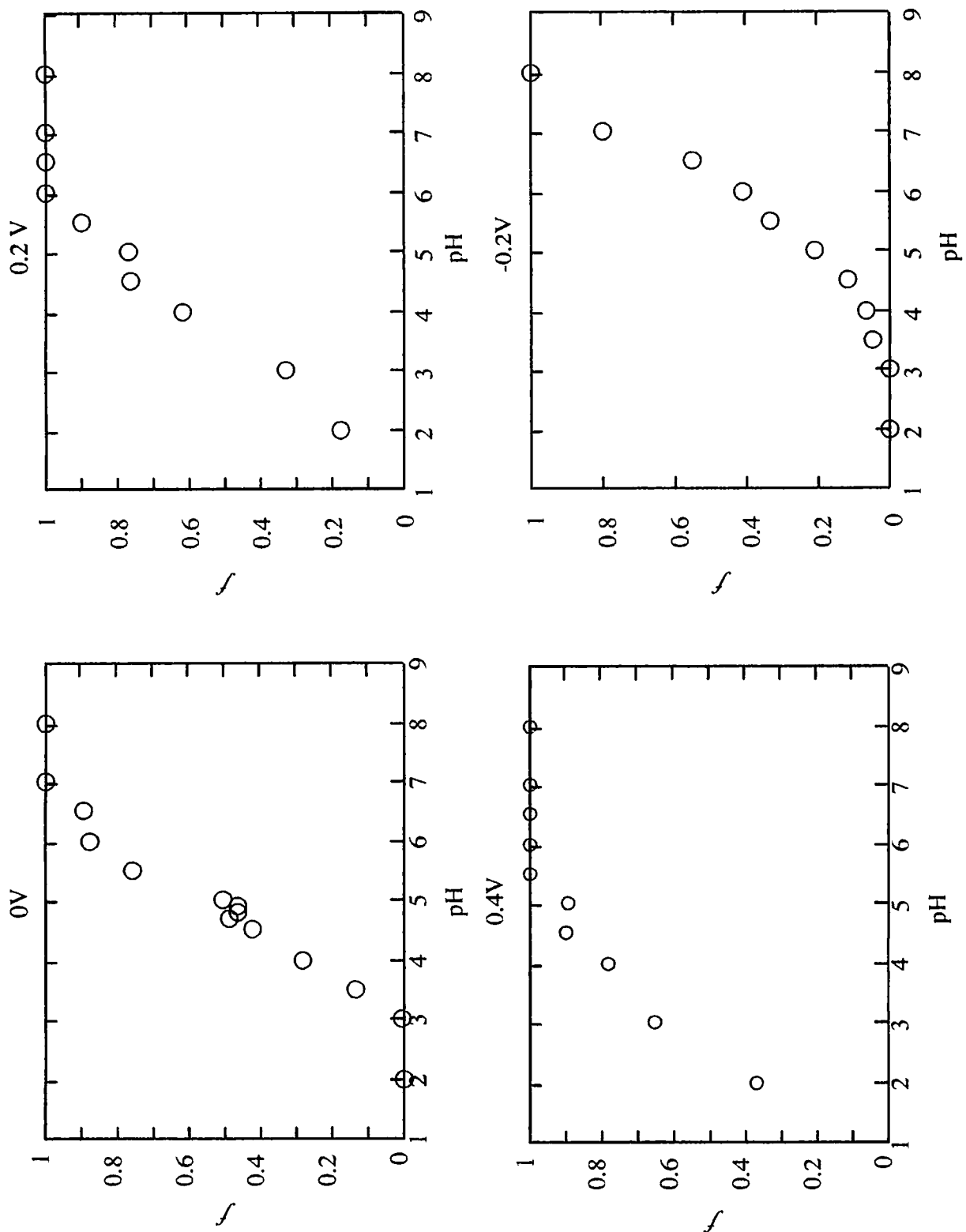


Figure 2-5-1. pH titration curves of 4-PySH SAM on Au at various potentials.

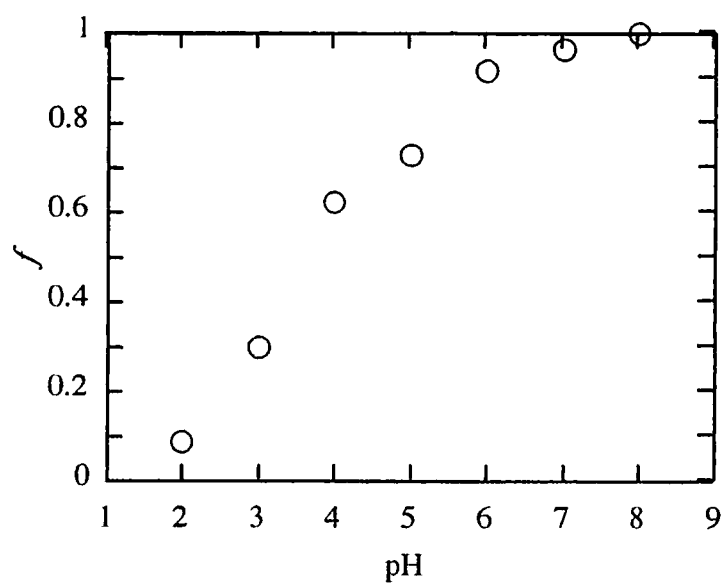


Figure 15 Titration curve of 2-PySH SAM on Au surface at -0.3 V.

2. 6. 結言

表面増強赤外分光電気化学法を用いて、金電極上におけるピリジンチオール系単分子膜の pH や電位変化に対応するスペクトルを測定し、吸着状態に関する以下のような知見が得られた。

1. PhSH 修飾電極は、酸性及び中性溶液中において 1570 cm^{-1} 、 1472 cm^{-1} 付近に吸収が観測された。一方、 1430 cm^{-1} 付近の吸収 (b2 モード) がほとんど観測されない。
2. 4-PySH 修飾電極は、溶液条件によってピリジン環の N 原子がプロトン化したものと、中性型が存在する。一方、b2 モードのシグナルはほとんど見られない。
3. 2-PySH 修飾電極は、酸性溶液中においも正の電位ではほとんどプロトン化していない。2-PySH は、電極上に S 原子と N 原子によって吸着しているものと考えられる。 1420 cm^{-1} 付近の吸収 (b2 モード) は観測される。
4. 3-PySH 修飾電極は、酸性溶液中において、 1528 cm^{-1} 、 1452 cm^{-1} 付近にピークが認められるのに対して、中性溶液中では、二量体を形成していると考えられる。b2 モードと考えられるシグナルが存在する。
5. 2,2' - PymSSPyim 修飾電極は、2-PySH 修飾電極と同様に、酸性溶液中においても正の電位ではほとんどプロトン化しない。b2 モードのシグナルはほとんど見られない。

以上の知見より考えられる吸着構造は Figure 2-4-2 に示した。

今回の実験において、得られたピリジンチオール系単分子膜のスペクトルから配向状態を予測し、STM 観察による結果と矛盾しない結果が得られた。また、pH 変化に伴うスペクトル応答から電極表面上における pKa が見積もられ、電極表面における修飾物質の酸解離挙動が明らかになった。これらの知見は、修飾物質の電極表面での特性を明らかにしたものであり、今後、チトクロム c のような金属タンパク質と機能性電極との電子伝達のメカニズムを明らかにするためにも、さらに詳細な検討が必要である。

2. 7. 参考文献

- 1) Whitesides, G. M., Mathias, J. P., Seto, C. T. *Science*, **254**, 1312 (1991)
- 2) Ulman, A. *Chem. Rev.*, **96**, 1533 (1996).
- 3) F. M. Hawlridge and I. Taniguchi, *Comments on Inorg. Chem.*, **17**, 163 (1995) and references therein.
- 4) I. Taniguchi, K. Tiyosawa, H. Yamaguchi, and K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1032 (1982).
- 5) I. Taniguchi, S. Yoshimoto, K. Nishiyama, *Chem. Lett.*, 353 (1997).
- 6) Huntly, D. R., *J. Phys. Chem.*, **96**, 4550 (1992).
- 7) Rafael, T. S. Huntly, D. R., Mullins, D. S., Gland, J. L., *J. Phys. Chem.*, **98**, 13022 (1994).
- 8) Jaffey, D. M., Madax, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3020 (1994).
- 9) Bol, C. W., Friend, C. M., Xu, X., *Langmuir*, **12**, 6083 (1996).
- 10) Weldon, M. K., Napier, M. E., Wiegand, B. C., Friend, C. M., Uvdal, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8328 (1994).
- 11) Li-Jun Wan, Mimi Terashima, Hiroyuki Noda, and Masatoshi Osawa, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 3569 (2000).
- 12) Carron, K. T., Hurley, C., *J. Phys. Chem.*, **95**, 9979 (1991).
- 13) Szafranski, C. A., Tannare, W., Laibinsis, P. E., Garrell, R., *Langmuir*, **14**, 3570 (1998).
- 14) F. S. Jung, K. Kim, M. S. Kim, *J. Electroanal. Chem.*, **407**, 139 (1997).
- 15) Li-Jun Wan, Hiroyuki Noda, Yoshitake Hara, Masatoshi Osawa, *J. Electroanal. Chem.*, **489**, 68 (2000).

Chapter 3

Anthraquinone 誘導体単分子膜の電気化学および赤外分光法による表面構造解析

3.1 緒言

一般にキノン誘導体は、生体系において酵素やタンパク質の酸化還元活性部位として非常に重要な役割を果たすことが知られており、生体内での電子移動反応のメカニズムを明らかにするモデル分子として研究が数多くなされている¹⁾²⁾。それらの酸化還元特性は、様々な電極表面上において、電気化学測定や分光学的手法によっても研究が行われている。キノンおよびキノン誘導体は、Pt や Au 表面上にキノン環によって吸着することが報告されており、Pt 表面上に物理吸着したキノン誘導体は、溶液濃度によって配向変化を起こすことが知られている^{3)~6)}。また、キノン化合物のチオール誘導体は、金属と硫黄原子によって共有結合的に金属表面に吸着し、電極電位に配向状態が影響を受けることが報告されている⁷⁾。一方、アントラキノン誘導体の多層中での詳細な分子構造が、Langmuir-Blodgett 法によって説明され、アルキル鎖長やアントラキノン部位におけるアルキル鎖の位置に強く依存することが報告されている⁸⁾。近年、表面増強ラマン散乱 (SERS) によってアントラキノン誘導体 SAM の電気化学的に引き起こされる構造変化が詳細に報告されている⁹⁾。また、走査型トンネル顕微鏡 (STM) によっても酸化還元反応による構造変化が、Au (111) - (1 x 1) 電極上の bis(2-anthraquinoyl)disulfide 修飾電極について示された¹⁰⁾。

SERS や IR-RAS のような表面振動分光法は、基板表面上での分子についての詳細な情報を得ることが可能である。近年、IR-RAS よりも数十倍 S / N 比を持つ、表面増強赤外分光法 (SEIRAS) が開発され、蒸着金電極表面上の SAM の研

究に用いられている。SEIRAS は、表面増強ラマン散乱（SERS）と類似した測定手段であり、電極表面上の構造および構造変化に対し非常に高感度に測定が可能である。SERS では、電極表面と修飾分子の距離は測定強度に影響を与えるもっとも重要な要素の一つである。しかしながら、SEIRAS 測定においてスペーサの長さが測定強度に及ぼす効果についての知見は現在まだ得られていない。そこで本研究では、アントラキノン部位に結合したチオール基またはジスルフィド基の位置が、吸着構造に与える影響やアルキル鎖長が電子移動速度および吸収強度に及ぼす影響を SEIRAS およびサイクリックボルタンメトリー（CV）法を用いて考察を行った。

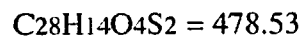
3. 2. 実験

3. 2. 1. 修飾物質

1 – Mercaptoanthraquinone (1-AQSC0)



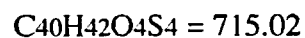
bis(2-anthraquinoyl)disulfide (2-AQSC0)



bis(3 – (1 – anthraquinonylthio)propyl)disulfide (1-AQSC3)



bis(6 – (1 – anthraquinonylthio)hexyl)disulfide (1-AQSC6)



これらの化合物は、以前に報告された方法⁹¹¹⁾によって本研究室で合成を行った。

構造は NMR、IR によって構造を確認した。

電極への修飾は、それぞれの修飾物質の飽和エタノール溶液を調製し、セル内に注ぎ込んで 20 min 間放置することによって行った。

3. 2. 2. 電極

各電極は Chapter 2、 2. 2. 2 参照のこと

3. 2. 3. 支持電解質

- ・ 過塩素酸ナトリウム
- ・ 過塩素酸
- ・ Britton & Robinson buffer (B&R buffer)

(Chapter 2、 2. 2. 3 参照)

3. 2. 4. 溶媒・その他

- ・ 水
- ・ エタノール
- ・ アセトン

(Chapter 2、 2. 2. 4 参照)

- ・ 窒素ガス (Nitrogen gas : N₂)

高純度窒素ガス (99.999% 以上)

内村酸素株式会社

測定機器

- ・ Bio-Rad FTS-6000 spectrometer

日本バイオ・ラッド ラボラトリー株式会社

検出器 : HgCdTe (MCT) detector

解像度 : 4 cm⁻¹

- ・ Potentiostat, Function generator : POLARIZATION UNIT PS-06

TOHO TECHNICAL RESERCH

- ・ Electrochemical Analyzer :

BAS - 50 W Electrochemical Analyzer

3. 3. 吸着構造

アントラキノン (AQ) 誘導体は、それぞれの誘導体に対応して立体障害などから、その吸着構造が大きく影響されることが予測される。そこで、AQ に結合したチオール基の位置が異なる 1 - Mercaptoanthraquinone (1-AQSC0) と bis(2-anthraquinoyl)disulfide (2-AQSC0) を用いて金電極上における吸着構造の違いについて検討した。

Figure 3-3-1 に 1-AQSC0 と 2-AQSC0 の KBr 中における透過スペクトルとそれぞれ金電極上に作製した SAM の 0.1 M HClO₄ 水溶液中における SEIRA スペクトルを示した。Figure 3-3-1 (a) において、1668、1595、1566、1323、1273 cm⁻¹ に非常に明確な吸収が観測された。これらの吸収ピークは、KBr 中での透過スペクトルによって得られた 1672、1591、1575、1330、1272 cm⁻¹ の吸収に対応する。一方、Figure 3-3-1 (b) に示したように 2-AQSC0 についても同様に 1665、1572、1328、1295 cm⁻¹ に吸収が観察され、これも透過スペクトルの 1677、1583、1325、1290 cm⁻¹ に対応している。

得られたスペクトルの振動の同定を行うために 9, 10-Anthraquinone (AQ) のものを参考として用いた。これまでの AQ の基本振動に関する研究^{12)~15)}から、

$$\Gamma = 12A_g + 4B_{1g} + 6B_{2g} + 11B_{3g} + 5A_u + 11B_{1u} + 11B_{2u} + 6B_{3u}$$

の基本振動が解明されている。この中で B_{1u}、B_{2u}、B_{3u} (Figure 3-3-2) の振動が赤外活性を示すことが知られている¹⁶⁾。それぞれのスペクトルでの同定された振動を Table 3-3-1 にまとめた。得られたスペクトルと AQ のスペクトルを比較すると相対的なピーク強度は、多少変化しているものの、主な環に関する振動は

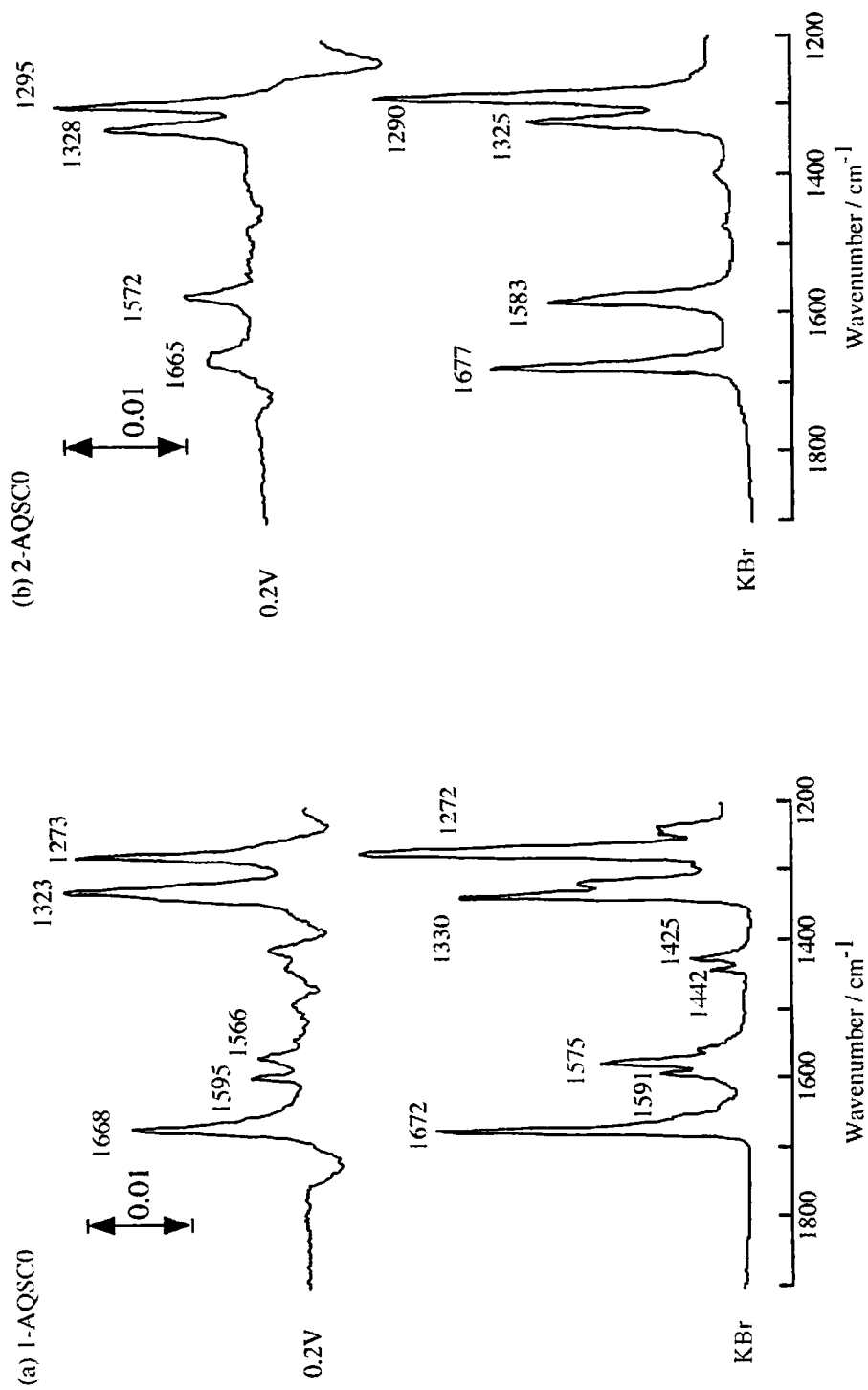


Figure 3-3-1. SEIRA spectra of (a) 1-AQSC0, (b) 2-AQSC0 in 0.1 M HClO₄ on Au /Si electrode at various potentials.

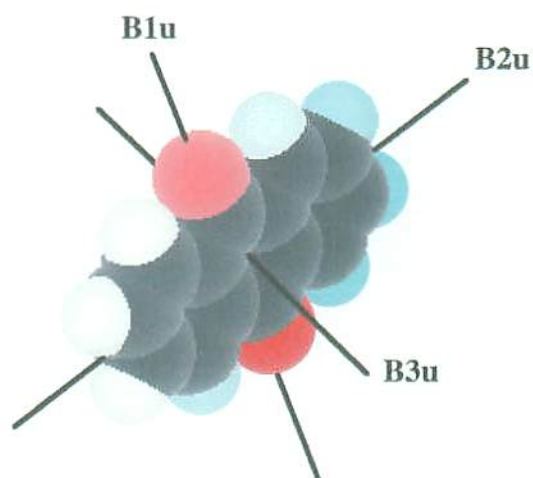


Figure 3-3-2. Representation of the directions of dipole moment of B1u, B2u, B3u modes.

Table 3-3-1. Infrared spectra data and vibrational assignment of 1-AQSC0 and 2-AQSC0 under various conditions¹⁶⁾.

AQ (KBr)	1-AQSC0			2-AQSC0			assignment
	(KBr)	(SEIRAS)	(RAS)	(KBr)	(SEIRAS)	(RAS)	
622	621			632			v31(b1u) skeletal def (ip)
694	704		704	709		709	v63(b3u) C-H bend (op)
809	804		806	812		810	v62(b3u) skeletal def(op)
937	955		955	929		929	v47(b2u) skeletal def(ip)
969	991			962		957	v61(b3u) C-H bend (op)
1171	1179		1122	1169			v28(b1u) C-H bend (ip)
1286	1273	1273	1271	1290	1295	1295	v44(b2u) C-C str
1333	1336	1323	1319	1325	1328	1323	v43(b2u) C-C str
1453	1425		1408	1401		1399	v26(b1u) C-C str
1473	1443			1474			v42(b2u) C-C str
1579	1575	1566	1565	1576	1573		v41(b2u) C-C str
1591	1592	1595	1597	1583		1573	v25(b1u) C-C str
1678	1672	1668	1680	1678	1665	1675	v24(b1u) C=O str
3066	3051			3065			v23(b1u) C-H str
3073	3072			3077			v39(b2u) C-H str

Table 3-3-1 に示すようにほとんど同じ位置に観測された (Figure 3-3-3)。AQ 環の C-C 伸縮振動のモードの一つである $\nu_{25}(\text{B1u})$ は、 1591 cm^{-1} に現れ、同様のバンドが、 1591 cm^{-1} (1-AQSC0)、 1583 cm^{-1} (2-AQSC0) にそれぞれ観測された。 1286 cm^{-1} 、 1332 cm^{-1} に観測される AQ の振動モード $\nu_{43}(\text{b2u})$ と $\nu_{44}(\text{b2u})$ は、1-AQSC0 では 1273 cm^{-1} 、 1336 cm^{-1} に、2-AQSC0 では 1290 cm^{-1} と 1325 cm^{-1} にそれぞれ観測された。これらの特徴は、1-AQSC0 や 2-AQSC0 の環に関するモードが AQ のものと比較できることを意味し、 1286 cm^{-1} 、 1332 cm^{-1} に観測される AQ の振動モード (B2u) は、AQ 環の長軸に沿って振動しており、AQ のカルボニル基のモード (B1u) は、短軸方向に振動していることを表している (Figure 3-3-2)。これらを考慮して SEIRA スペクトルと透過スペクトルの比較を行うと、C=O 伸縮振動に対応するピークと AQ 環の長軸に沿った振動モードのピークの比が 1-AQSC0 と 2-AQSC0 では異なっていることがわかる。このことから 2-AQSC0 は 1-AQSC0 に比べて AQ 環の長軸が電極表面に対し垂直方向に傾いていることが示唆される。

SEIRAS で測定される領域において AQ 環の面外に関する情報は、Table 3-3-1 に示したようにこれよりも低波数領域に観測されるが、基板である Si プリズムの透過率が低いため溶液中での測定は困難である。そこで、SEIRAS に用いた電極と同様の蒸着金基板を用いて大気中における RAS スペクトルを測定した。Figure 3-3-4 に 1-AQSC0 および 2-AQSC0 修飾蒸着金の RAS スペクトルを示した。これらにおいても C=O 伸縮振動のピークは、1-AQSC0 よりも 2-AQSC0 のほうが小さいことがわかる。また、面外に対応する振動は、1-AQSC0 では、 805 cm^{-1} 、 705 cm^{-1} に、2-AQSC0 では、 810 cm^{-1} 、 709 cm^{-1} にそれぞれ得られた。しかしながら、これらの振動強度は明らかに 1-AQSC0 よりも 2-AQSC0 の方が強く現れている。このことから 1-AQSC0 は、AQ 環の短軸を電極に対し垂直に向けて吸着しており、一方、

2-AQSC0 は AQ 環の短軸が金電極の垂直成分からやや傾いた配向をとっていることが示唆された。以上のことを考慮すると、Figure 3-3-5 のように 1-AQSC0 および 2-AQSC0 の金電極上における配向状態を描くことができる。

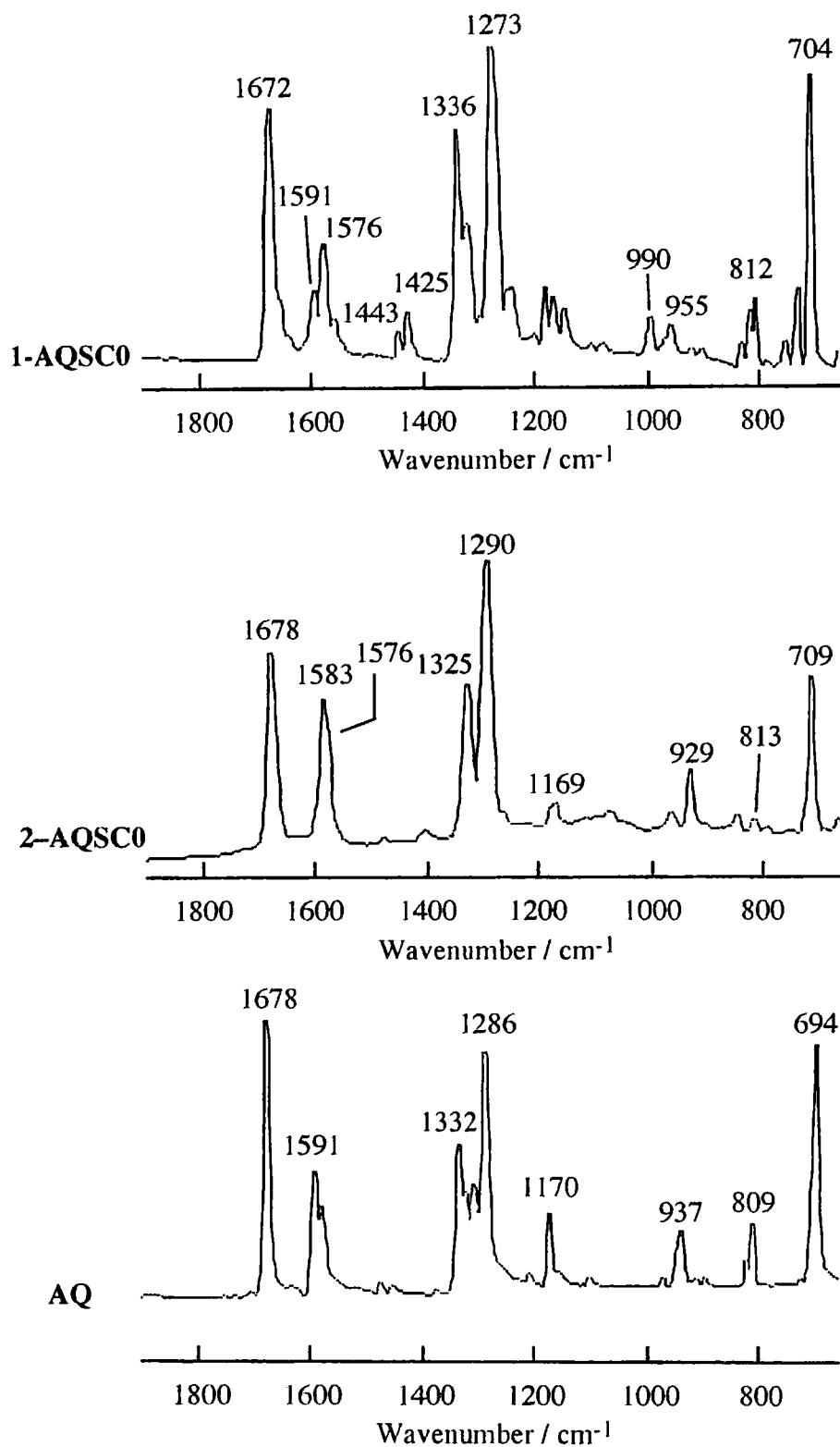


Figure 3-3-3. Transmission spectra of (a) 1-AQSC0, (b) 2-AQSC0 and (c) AQ in KBr matrixes.

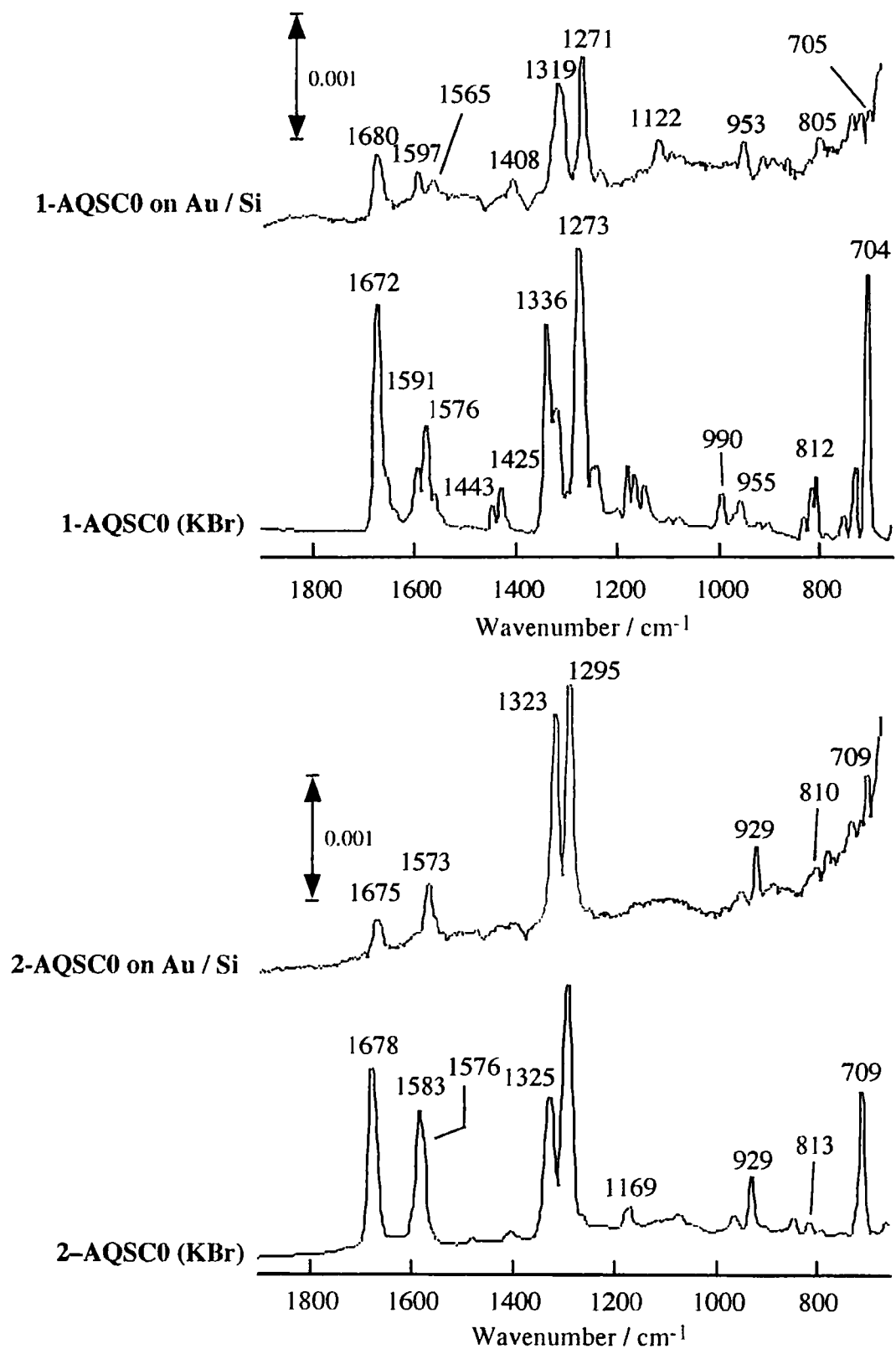
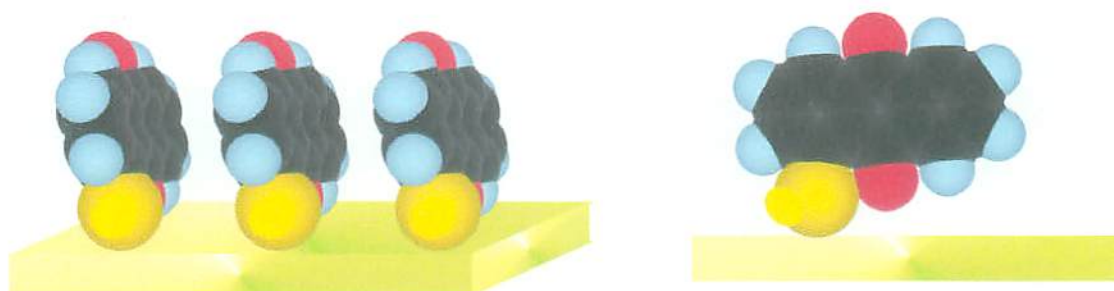


Figure 3-3-4. RAS spectra of 1-AQSC0 and 2-AQSC0 SAM on Au / Si

1-AQSC0



2-AQSC0

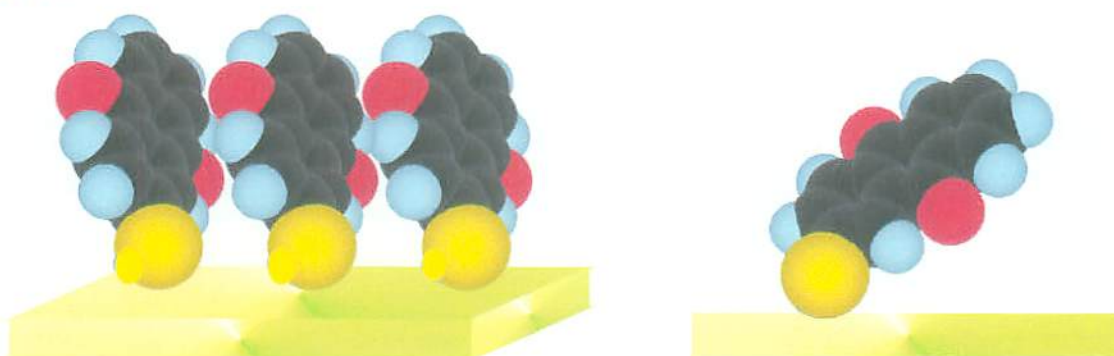


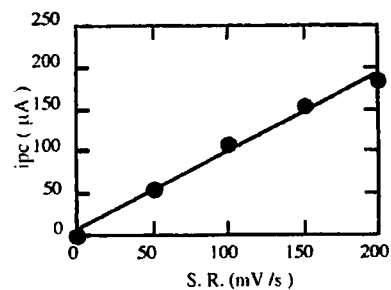
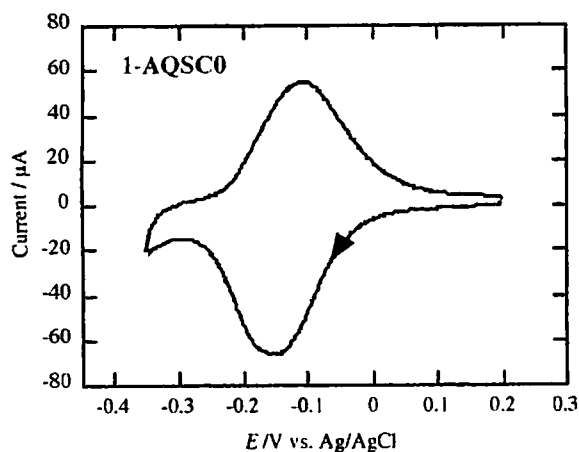
Figure 3-3-5. Schematic illustrations of 1-AQSC0 and 2-AQSC0 adsorbed on Au surface.

3.4. アントラキノン誘導体単分子膜の電気化学的挙動

AQ は、分子内に酸化還元活性であるキノン部位を持っており、その電気化学的特性は非常に興味深い。Sato らは、蒸着金電極上における 2-メルカプトベンゾキノンの電気化学的特性をフリーのベンゾキノンやヒドロキノンのものと比較検討を行い、酸化還元電位は、pH に対し 60 mV / pH で依存することが報告している¹⁷⁾。そこで、本研究においては、1-AQSC0 にアルキル鎖を導入した 1-AQSC3 および 1-AQSC6 を用いて、これらの SAM の電気化学的挙動を検討した。

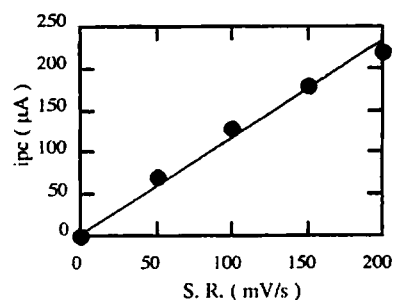
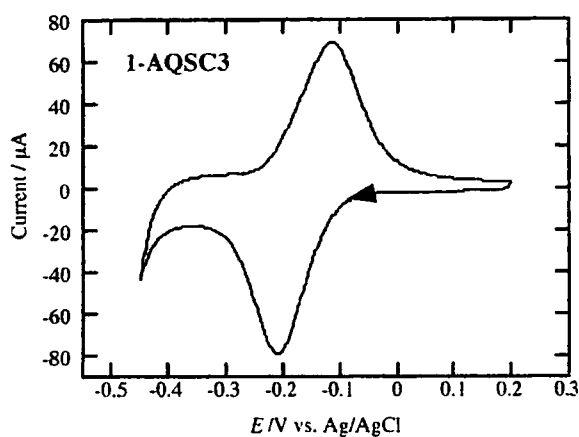
Figure 3-4-1 に 1-AQSC0 単分子膜の 0.1 M HClO₄ 中での CV の結果を示す。- 0.15 V 付近に明確な酸化還元ピークを与え、ピーク電流値は、掃引速度に比例した。このことよりこの酸化還元波は電極表面上に吸着したアントラキノンに由来する酸化還元波であることが確認された。同様に 1-AQSC3、1-AQSC6 修飾単分子膜の 0.1 M HClO₄ 中での CV の結果をそれぞれ Figure 3-4-2、Figure 3-4-3 に示す。これらの修飾電極においても 1-AQSC0 と同様にアントラキノン部位の明確な酸化還元波を示し、そのピーク電流値は、掃引速度に比例することから、電極上に吸着したアントラキノン誘導体の酸化還元波であることが確認した。これらの電極表面上に吸着したアントラキノン誘導体の修飾量は、CV の酸化波から次式によって見積もられ、

$$\text{吸着量} = \frac{(X \times Y \times \text{ピーク面積} / S. R. \times n) / 96485}{\text{電極面積}}$$



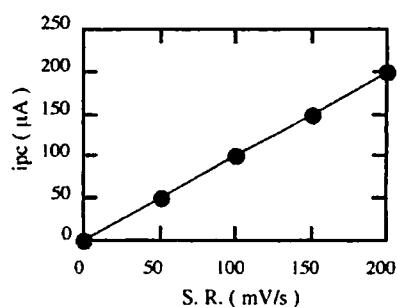
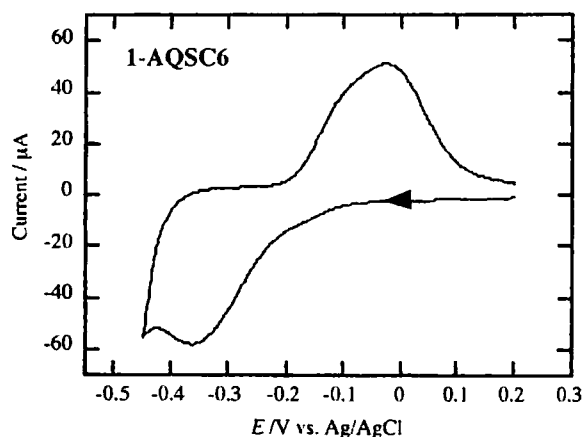
Surface excess : $2.7 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$
 $E^{0'} = -0.13 \text{ V}$

Figure 3-4-1. Cyclic voltammogram of 1-AQSC0-modified Au/Si electrode in 0.1 M HClO₄. Modification time : 20 min. S. R. : 50 mV/s.



Surface excess : $3.0 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$
 $E^{0'} = -0.15 \text{ V}$

Figure 3-4-2. Cyclic voltammogram of 1-AQSC3-modified Au/Si electrode in 0.1 M HClO₄. Modification time : 20 min. S. R. : 50 mV/s.



Surface excess : $3.5 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$
 $E^{0'} = -0.19 \text{ V}$

Figure 3-4-3. Cyclic voltammogram of 1-AQSC6-modified Au/Si electrode in 0.1 M HClO₄. Modification time : 20 min. S. R. : 50 mV/s.

それぞれ 2.7 ± 0.3 (1-AQSC0)、 3.0 ± 0.3 (1-AQSC3)、 3.5 ± 0.3 (1-AQSC6) $\times 10^{-10} \text{ mol / cm}^{-2}$ であった。アルカンチオール SAM の吸着量が $1.3 \times 10^{-9} \text{ mol / cm}^{-2}$ であることから、アントラキノン環の 1 分子によって占有される面積を考慮すると、アントラキノン誘導体の表面修飾量は、電極上に単分子膜に相当すると考えられる。

pH 1~7 の酸性溶液中において CV 測定を行うと、Figure 3-4-4~3-4-6 に示すように、すべてのアントラキノン誘導体修飾電極において安定な酸化還元波が得られ、pH 変化に伴い酸化還元電位は 60 mV / pH で変化していった。一般に AQ は、プロトン性溶媒中で可逆的な 2 電子 2 プロトン反応によって酸化還元反応をすることが知られている。ここで、 $R + 2H^+ + 2e^- \rightarrow RH_2$ の反応を考えると、Nernst の式により、

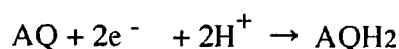
$$E = E^{0'} + (2.3 RT / n F) \log([R][H^+]^2 / [RH_2])$$

$$= E^{0'} + (0.059 / n) \log([R][H^+]^2 / [RH_2])$$

となり、 $[R] = [RH_2]$ 、反応電子数 $n = 2$ 、 $\text{pH} = -\log[H^+]$ より、

$$E = E^{0'} - 0.059 \text{ pH}$$

が成り立つ。よって、AQ の酸化還元反応が 2 電子 2 プロトン反応であれば、酸化還元電位の変化は約 60 mV / pH となる。このことを考慮すると金電極上に固定化された AQ 誘導体も溶液中と同様に、次式に示されるように 2 電子 2 プロトン反応である考えられる。



(AQ は、酸化体、AQH₂ は、還元体をそれぞれ示す。)

掃引速度 50 mV / s における 1-AQSC0、1-AQSC3、1-AQSC6 修飾電極でのピークセパレーションは、それぞれ 30、110、300 mV であった。このボルタモグラムのピークセパレーション (ΔE_p) は、吸着酸化還元分子の電子移動速度定数との関係があ

り、次式¹⁸⁾で求めることができる。

$$\text{Log } k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log(RT/nFv) - \alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p/2.3RT$$

k_s : 電子移動速度定数

R : 8.314 (JK⁻¹mol⁻¹)

ΔE_p : ピークセパレーション (V)

T : 293 K

v : 掃引速度 (V/s)

n : 電子数 ($n = 2$)

α : 転移係数

F : 96,485

Table 3-4-1 にこの式によって算出されたそれぞれの pH 溶液中におけるアントラキノン誘導体修飾電極の電子移動速度を示す。酸化還元活性種と電極表面との距離が、電子移動速度の検出には重要な要因であり、ここでは、アルキル鎖の長さが電子移動速度に重大な影響を及ぼしていると考えられる。すべての pH 領域において、1-AQSC6 の電子移動速度は、1-AQSC0 の電子移動速度に比べて 3 桁程度小さくなっている。よって、1-AQSC0 は分子内にチオール基を持っており、電極表面上に直接チオレート基の形で吸着しているものと考えられる。一方、1-AQSC3 や 1-AQSC6 は、分子内に金電極に吸着しうるスルフィド基とジスルフィド基の両方を持っている。もし、1-AQSC3 や 1-AQSC6 のアントラキノン部位がスルフィドの S 原子で電極表面に直接吸着しているならば、電子移動速度定数はアルキル鎖の長さに依存しないはずである。しかし、この場合電子移動速度はアルキル鎖に強く依存していることがわかる。よって、1-AQSC3 や 1-AQSC6 分子は、ジスルフィドの解裂によって生じたチオレート基によって吸着しており、Figure 3-4-7 によって描かれるように、アントラキノン部位は分子内のアルキル鎖によって電極表面から離れた位置に存在していることを示す。

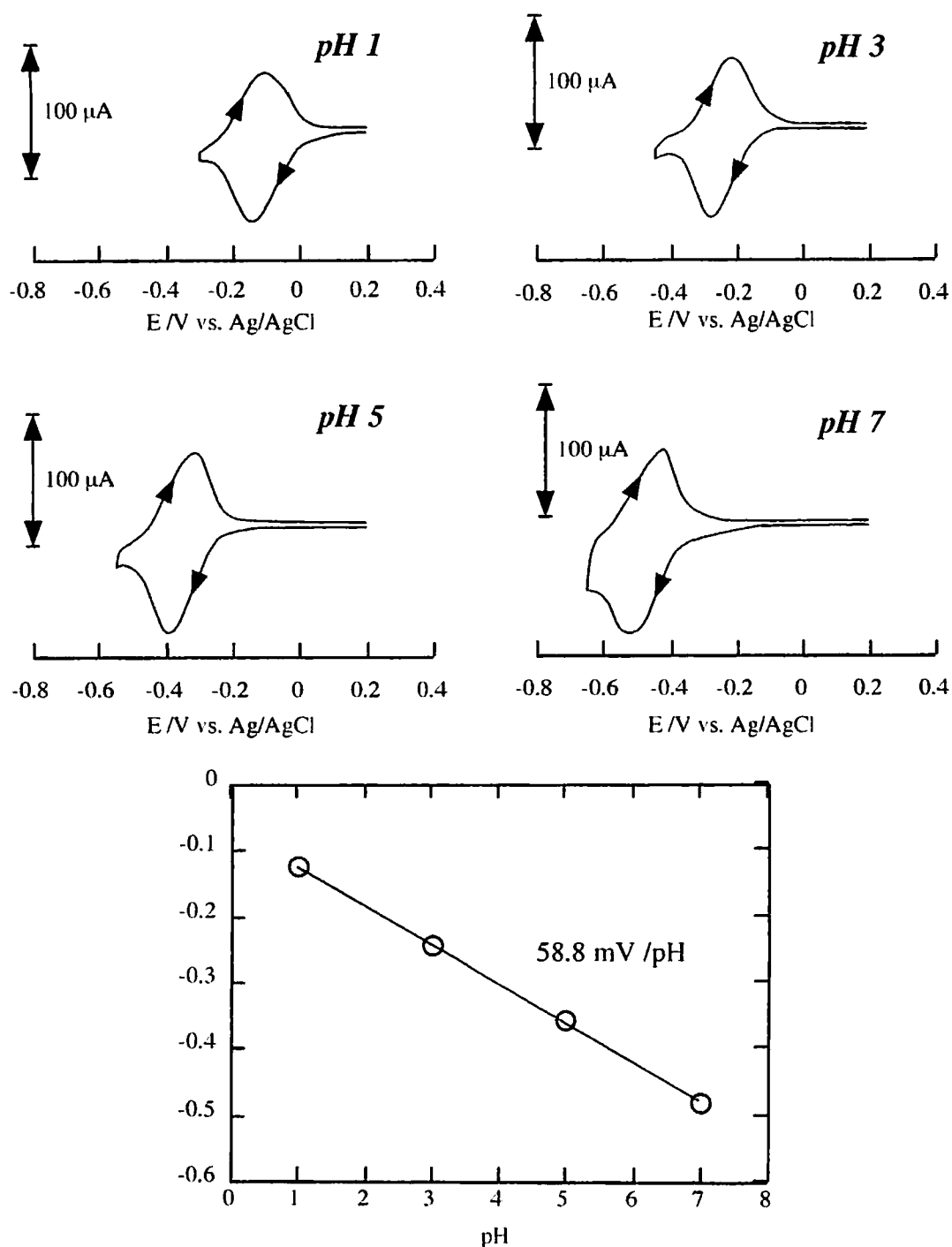


Figure 3-4-4. Cyclic voltammograms of 1AQSC0 modified Au/Si electrode in various pH solutions and plot of E^0 vs. pH. E^0 values were obtained from cyclic voltammograms.

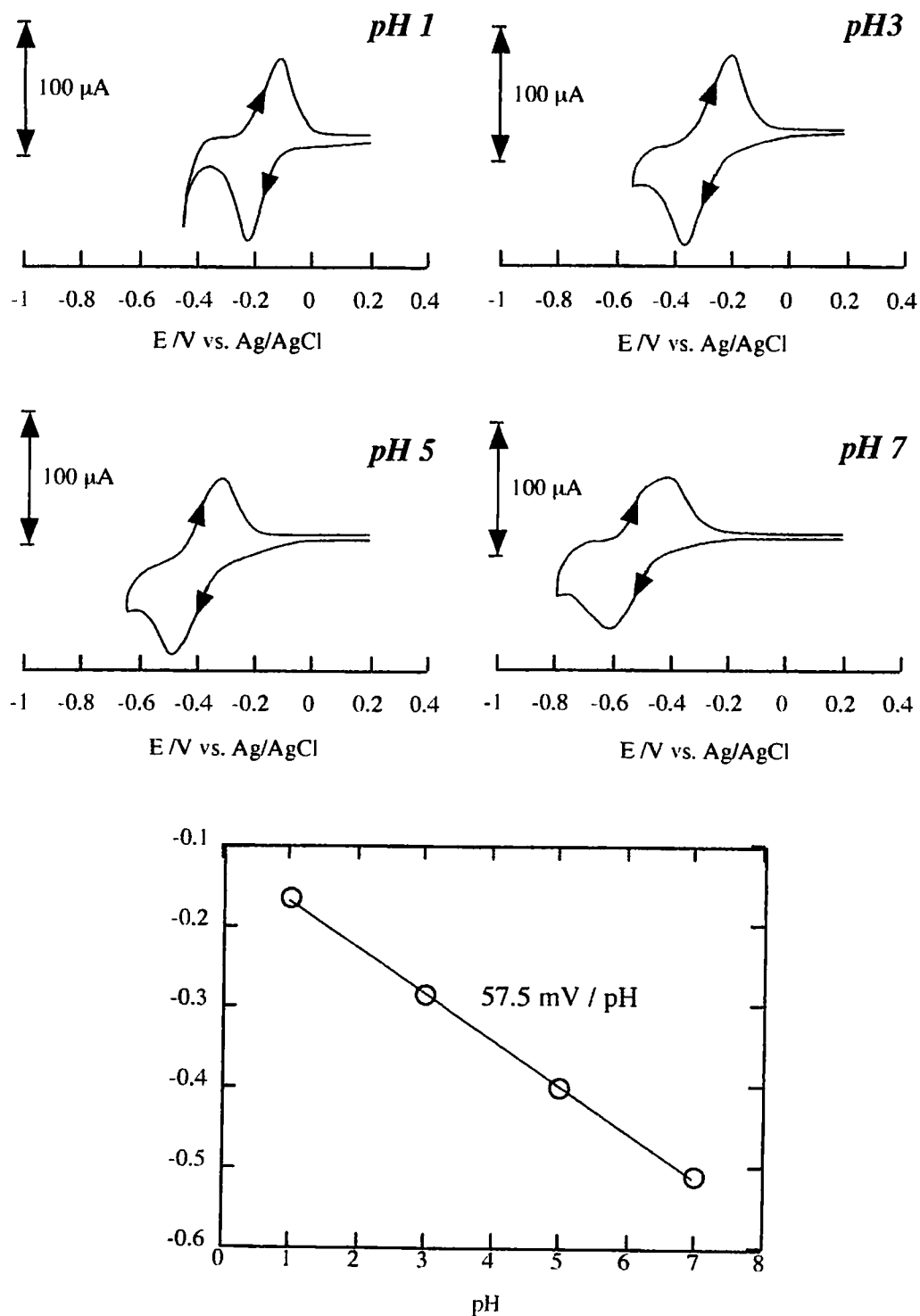


Figure 3-4-5. Cyclic voltammograms of 1-AQSC3 modified Au/Si electrode in various pH solutions and plot of $E^{0'}$ vs. pH. $E^{0'}$ values were obtained from cyclic voltammograms.

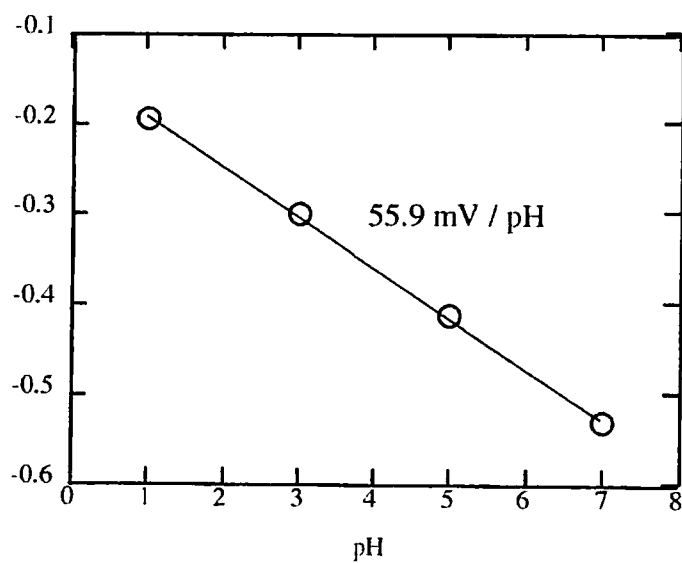
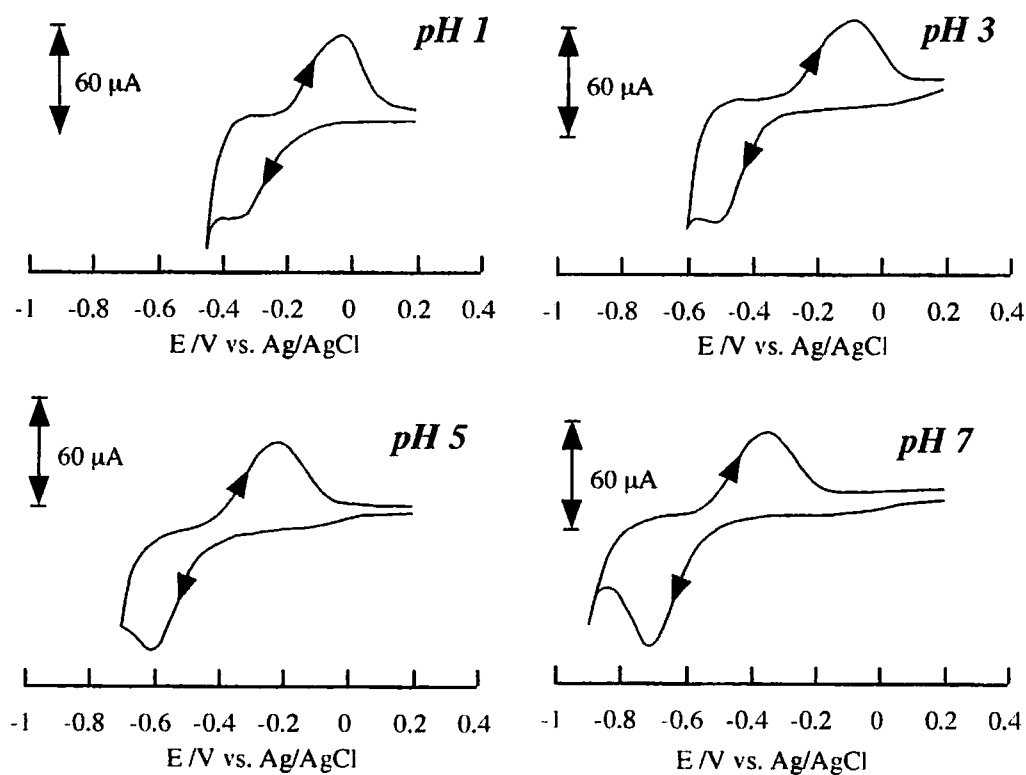


Figure 3-4-6. Cyclic voltammograms of 1-AQSC6 modified Au/Si electrode in various pH solutions and plot of E^0 vs. pH. E^0 values were obtained from cyclic voltammograms.

Table 3-4-1 Estimated values of $ks(s^{-1})$ by Laviron's equation.

	pH 1	pH 3	pH 5	pH 7
1-AQSC0	7.5	3.0	1.4×10^{-1}	7.9×10^{-1}
1-AQSC3	2.3×10^{-1}	1.0×10^{-1}	8.6×10^{-2}	3.9×10^{-2}
1-AQSC6	3.1×10^{-3}	5.4×10^{-4}	1.3×10^{-3}	2.6×10^{-3}

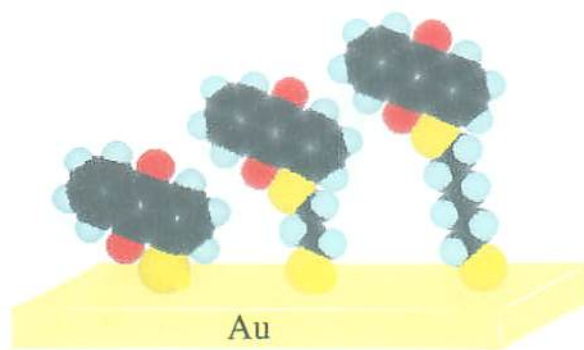


Figure 3-4-7. Schematic illustration of 1-AQSC0, 1-AQSC3, 1-AQSC6 adsorbed on Au surface.

3. 5. アントラキノン誘導体の表面増強赤外分光電気化学測定

アントラキノン誘導体単分子膜の電極表面での酸化還元反応に伴う挙動の詳細を調べるため、金電極表面上での *in situ* 表面増強赤外分光電気化学測定を行った。

Figure 3-5-1 に 0.1 M HClO₄ 水溶液中での 1-AQSC0 単分子膜の SEIRA スペクトルを示す。1-AQSC0 の金電極上における酸化還元電位は、 -0.15 V であり、印加電位を 0.2 V に設定したときの 1-AQSC0 は酸化体である。このとき 1668 cm^{-1} にアントラキノン部位の C=O 伸縮振動 (blu) に相当する吸収が得られた。また、 1323 cm^{-1} と 1273 cm^{-1} にアントラキノン環の C-C 伸縮振動 (B2u) の吸収が同時に観察された。また、ここで得られた C=O の伸縮振動 (Blu) は、吸着の前後における溶液中の水分子の変角振動の影響が 1650 cm^{-1} 付近に現れるために、C=O 伸縮振動の吸収強度はこのことを考慮しなければならない。同様に 2-AQS 修飾電極においても、 1665 cm^{-1} に C=O の伸縮振動 (Blu) に相当する吸収が得られ、 1328 cm^{-1} と 1295 cm^{-1} にアントラキノン環の C-C 伸縮振動 (B2u) の吸収が観察された (Figure 3-5-2)。これらの吸収強度は、電極電位が 0.2 V から -0.1 V のアントラキノン部位が酸化体である領域では変化はなく、 -0.15 V 付近での AQSC0 の還元によりこれらの吸収ピーク強度は弱くなり、新たに 1373 cm^{-1} に吸収が現れる。その後、電極電位が -0.3 V にされると 1668 cm^{-1} および 1323 cm^{-1} 、 1273 cm^{-1} の吸収は完全に消滅した。同様の電位変化に伴うスペクトルの変化が 2-AQSC0 修飾電極についても得られた。

Figure 3-5-3 に 0.1 M HClO₄ 水溶液中での 1-AQSC3 単分子膜のスペクトルを示す。1-AQSC3 が酸化体の状態である電極電位が 0.2 V のとき、 1669 cm^{-1} に C=O の伸縮振動 (Blu) に相当する吸収が得られた。また、 1338 cm^{-1} 、 1325 cm^{-1} 、 1275 cm^{-1} のアントラキノン環の C-C 伸縮振動 (B2u) に相当する吸収が観察された。これら

のアントラキノン環の in-plane のスペクトルは非常に 1-AQSC0 のものと類似したスペクトルが得られたが、吸収強度は 1-AQSC0 のシグナルに比べて約半分程度であった。また、 -0.2 V の 1-AQSC3 の還元ピークまでこれらの吸収ピーク強度は減少し、1-AQSC3 が完全に還元されるとこれらのピークは消滅し、新たに 1370 cm^{-1} に吸収が確認された。

Figure 3-5-4 に 0.1 M HClO_4 水溶液中での 1-AQSC6 単分子膜のスペクトルを示す。この場合も他のアントラキノン誘導体のときと同様に、 0.2 V の酸化体では、 1666 cm^{-1} および 1339 cm^{-1} 、 1276 cm^{-1} にそれぞれ吸収が観測された。また、 -0.4 V での 1-AQSC6 の還元によって、非常に弱い新たな吸収が 1372 cm^{-1} に観測された。

すべてのアントラキノン誘導体において電位変化に対応するアントラキノン部位の還元に伴う環の面内振動の減少が見られた。Figure 3-5-5 に示すように類似した酸化還元反応を行うキノンとヒドロキノンの KBr 中における透過スペクトルは、その酸化体および還元体の間での面内振動に関してそれほど差が生じない。そのためアントラキノン誘導体の還元反応に伴うスペクトルの変化は、アントラキノン環の配向変化によってもたらされたものであると考えられる。このような還元反応に伴う配向変化は、Ag 電極上に吸着した 2-AQ-COOH についても報告されており、Osawa らは、酸化体で 2-AQ-COOH は、ほぼ電極に対し垂直に近い状態で吸着しているが、還元体は、電極表面に AQ 平面がフラットに横たわっていると結論づけている¹⁹⁾。しかし、アントラキノン誘導体の還元体についてもスペクトルによる同定が必要である。また、スペクトルの吸収は表面濃度、配向、振動モード、表面形態などに依存する。先に述べたように、1-AQSC6 の表面アントラキノン部位の表面被覆は、他の 1-AQSC0 や 1-AQSC3 に比べて大きいにもかかわらず、アントラキ

ノン環の面内振動の吸収の大きさは、1-AQSC0 や 1-AQSC3 に比べて非常に小さい。この理由は、その他の条件はほぼ等しいと考えられるため、アントラキノン部位と電極表面との距離に依存したものであると考えられ、電気化学測定によって得られた結果と矛盾しない。よって、これらの結果から、1-AQSC3 や 1-AQSC6 のアントラキノン部位は、側鎖のアルキル鎖によって電極表面から離れて存在していることが SEIRAS によっても示された。

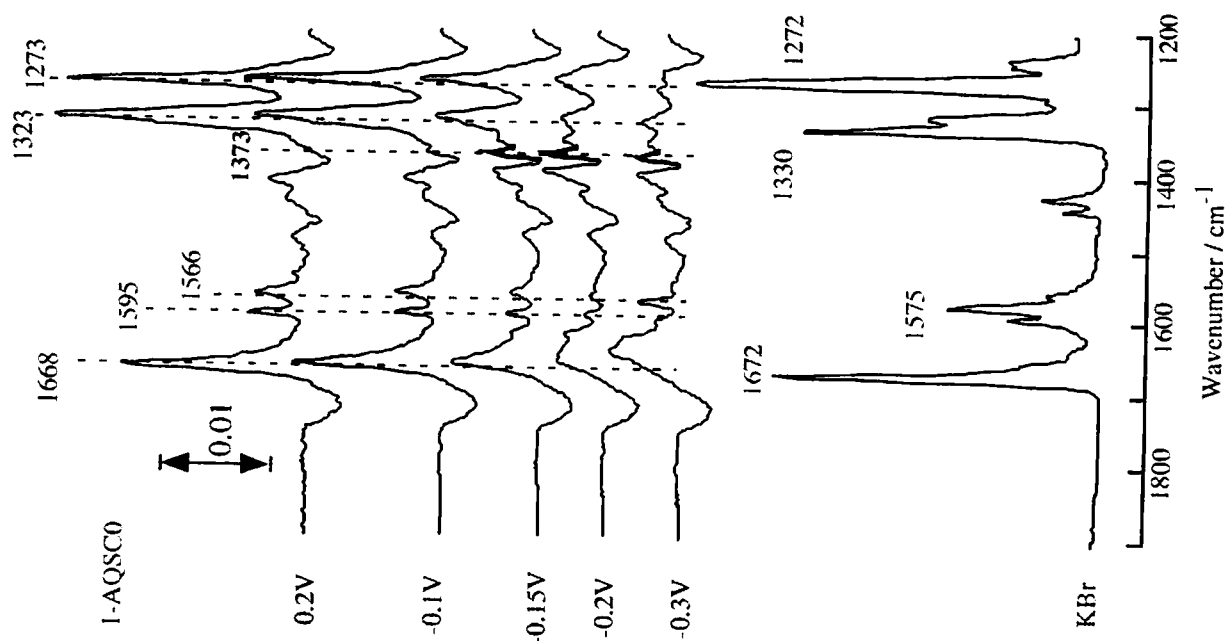


Figure 3-5-1. SEIRA spectra of 1-AQSC0 at various potentials in 0.1 M HClO_4 on Au /Si electrode.

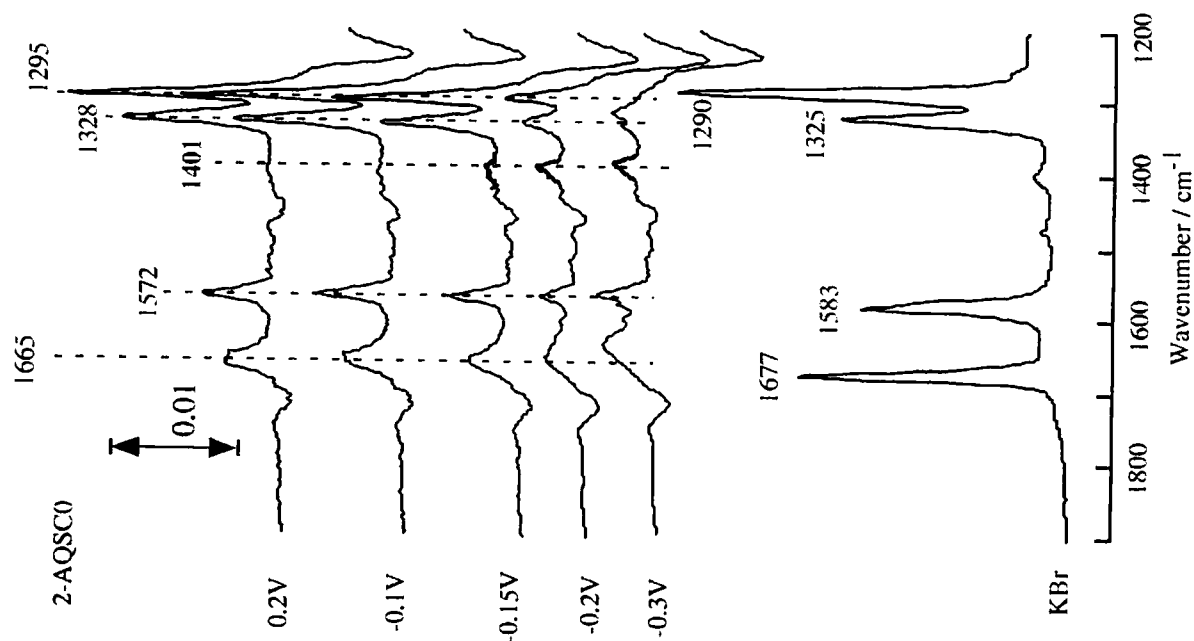


Figure 3-5-2. SEIRA spectra of 2-AQSC0 at various potentials in 0.1 M HClO_4 on Au /Si electrode.

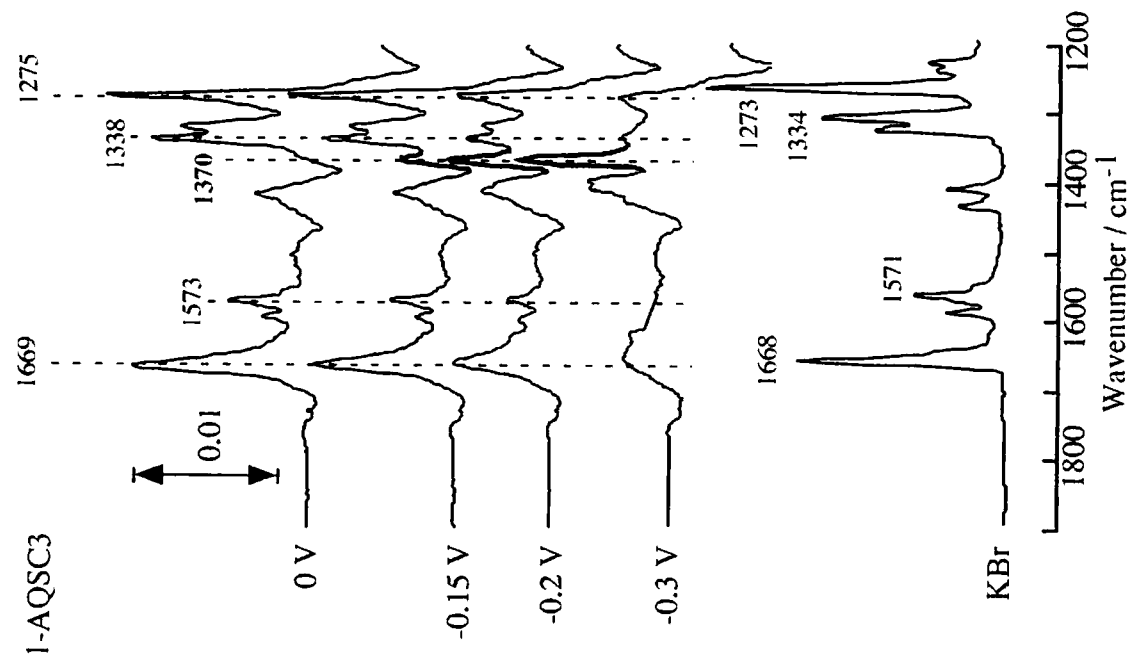


Figure 3-5-3. SEIRA spectra of 1-AQSC3 at various potentials in 0.1 M HClO₄ on Au /Si electrode.

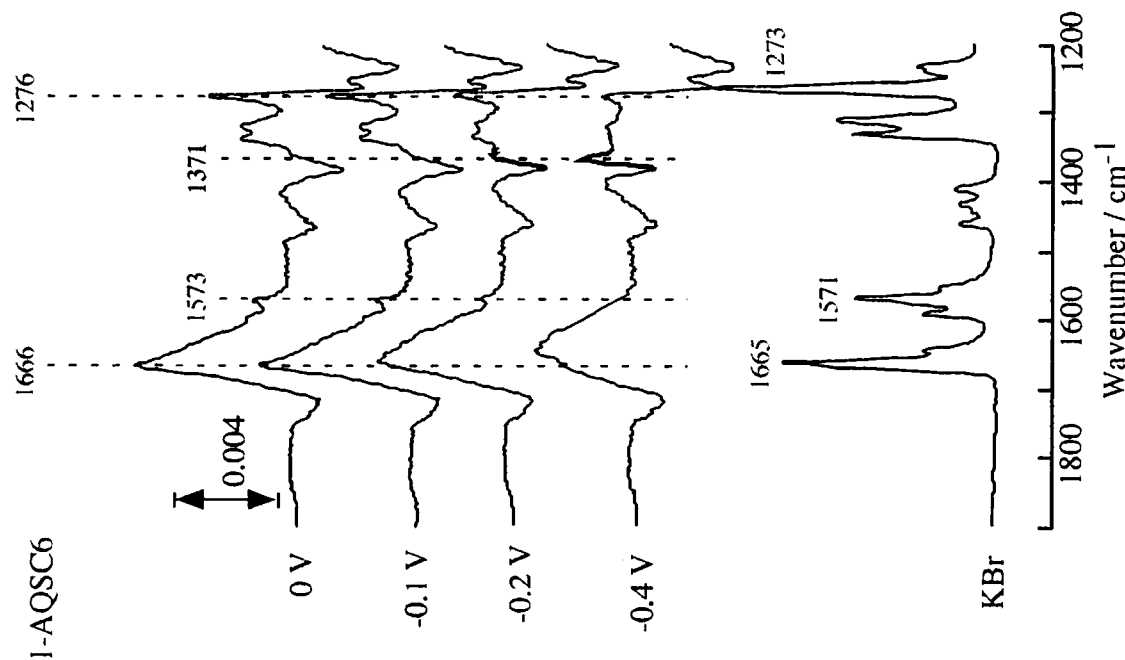


Figure 3-5-4. SEIRA spectra of 1-AQSC6 at various potentials in 0.1 M HClO₄ on Au /Si electrode.

3.6. 結言

金電極上に修飾したアントラキノン誘導体 SAM の結合に用いられるチオール基の結合位置の違いによる吸着構造の違いや側鎖に導入されたアルキル鎖の長さの電子移動速度に与える影響を SEIRAS およびサイクリックボルタンメトリー (CV) 法を用いて検討を行い、以下に示す知見が得られた。

1. チオール基の結合位置の異なる 1-AQSC0 と 2-AQSC0 では吸着構造が異なり、1-AQSC0 は、AQ 環の短軸を電極に対し垂直に向けて吸着しており、一方、2-AQSC0 は AQ 環の短軸が金電極の垂直成分からやや傾いた配向をとっている。2-AQSC0 は 1-AQSC0 に比べて AQ 環の長軸が電極表面に対し垂直方向に傾いていることが示唆された。
2. 1-AQSC3、1-AQSC6 の SEIRAS 測定では、1-AQSC0 と比較して鎖長が長くなるにつれて吸収強度が減少していった。また、これらの物質の CV 測定では、鎖長が長くなるにつれてピークセパレーションが広くなり、電子移動速度定数は小さくなった。このことから、アントラキノン部位は、電極から離れて存在すると考えられる。
3. AQSC0 修飾電極の SEIRAS 測定において、酸化体では、 1660 cm^{-1} 付近にカルボニル、 1300 cm^{-1} 付近に環に基づく明確な吸収が観測されたが、還元体においてはこれらの吸収は減少し、 1400 cm^{-1} 付近に OH による新たなピークが観測された。このことから、酸化体では短軸方向が電極に対し垂直方向を向いて吸着しており、還元体にすると電極と水平方向に傾くと考えられる。

3. 7. 参考文献

- 1) Murray, R. W., *Molecular Design of Electrode Surface ; Techniques of Chemistry Series :* John Wiley & Sons . New York, 1992 ; Vol. XXII.
- 2) Pierrat, O. Lechat, N., Bourdillon, C., Laval, J.-M., *Langmuir*, **13**, 4112 (1997).
- 3) Hubbard, A. T., *Chem. Rev.*, **88**, 633 (1988).
- 4) Soriaga, M. P., Hubbard, A. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2735 (1982).
- 5) Soriaga, M. P., Hubbard, A. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3937 (1982).
- 6) Soriaga, M. P., Soriaga, E. B., Hubbard, A. T., Benziger, J. B., *Inorg. Chem*, **24**, 65 (1985).
- 7) L. Zhang, T. Lu, G. W. Gokel, and A. E. Kaifer, *Langmuir*, **97**, 86 (1993).
- 8) Nakahara, H., Fukuda, K., *Colloid Interface Sci.*, **69**, 24 (1979).
- 9) K. Nishiyama, S. Tahara, S. Tanoue. Y. Uchida, and I. Taniguchi, *J. Electroanal. Chem.*, **133**, 3630 (1999).
- 10) S. Yoshimoto, N. Hirakawa, K. Nishiyama, and I. Taniguchi, *Langmuir*, **113**, 8284 (2000).
- 11) M. Yamada, K. Kubo and H. Nishihara, *Chem. Lett.*, 1999, 1335.
- 12) Pecile, C., Lunelli, B., *J. Chem. Phys.*, **46**, 2109, (1967).
- 13) Singh, S.N., Singh, S. R., *Spectrochim. Acta*, **24A**, 1591 (1968).
- 14) Girlando, A., Ragazzon, D., Pecile, C., *Spectrochim. Acta*, **36A**, 1053 (1980).
- 15) Spanget-Larsen, J., Christensen, D., *Spectrochim. Acta*, **43A**, 311 (1987) and cited reference therein.
- 16) S. W. Han, T. H. Ha, C. H. Kim. And K. Kim, *Langmuir*, **14**, 6113 (1998).
- 17) Y. Sato, M. Fujita, F. Mizutani, and K. Uosaki, *J. Electroanal. Chem.*, **409**, 145, (1996).
- 18) E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.*, **52**, 355 (1974) ; E. Laviron *J. Electroanal. Chem.*, **100**, 263 (1979) ; E. Laviron *J. Electroanal. Chem.*, **101**, 19 (1979).

- 19) Osawa, M., Ataka, K-I., Yoshii, K., Yotsuyanagi, T., *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **64/65**, 371 (1993).

Chapter 4

SERS 法による修飾単分子膜の表面 pKa 測定

4. 1. 緒言

アミノ基やカルボキシル基などのような末端に結合性の官能基をもつ化合物を用いて金表面上に作製された単分子膜は、生体試料（酵素や DNA など）や金属・半導体微粒子、機能性高分子などの表面への固定化や多層膜への展開につながる^{1)~6)}。このようなアプローチは、センサーなどのより実用的なデバイスへの応用を考える上で重要であると考えられている。それゆえ単分子膜中のこれらの官能基の酸解離挙動を評価することは、表面化学の基礎的な見知やその技術的な重要性の観点から非常に興味深く広く研究が行われている。しかし、一般に単分子膜の電極表面上における酸解離定数（pKa）は、溶液中のそれとは異なることが知られている。このような違いは、分子間の静電相互作用などにより、バルクと SAM 中の分子の環境が異なるためである。これまでも接触角⁷⁾や QCM⁸⁾、赤外分光法⁹⁾、二重層キャパシタンス法¹⁰⁾などの方法によって、表面における pKa の測定が行われている。

表面増強ラマン散乱（SERS）は、スペクトルの解釈が困難であったり、S/N のよいスペクトルを得るためにあらかじめ ORC 処理を施さないといけないなどの欠点は持つものの、電極表面上に固定化された分子の構造や構造変化を調べる方法として最も有効な方法の一つである¹¹⁾。また、SERS は、電気化学で用いられる一般的な支持電解質である過塩素酸イオン（ ClO_4^- ）や硝酸イオン（ NO_3^- ）、硫酸イオン（ SO_4^{2-} ）のような無機イオンの振動バンドを検出することに用いることができる。

一方、様々な方法によって、機能性官能基を持つ単分子膜の電極表面上における酸解離挙動が議論されているが、これまでの測定方法は、電極表面の質量変化やキャパシタンスの変化のような電極全体の変化を観察することによって行われ

ており、末端官能基でイオン対形成反応する対イオンを直接モニターし、電極表面上における SAM の酸解離挙動を議論した例はこれまでに報告されていない。そこで本研究では、末端にアミノ基やカルボキシル基を持つ単分子膜の金電極表面における酸解離挙動の詳細を FT-SERS により評価した。

4. 2. 実験

4. 2. 1. 修飾物質

- ・ アミノエタントチオール (2-AT) Aminoethanethiol $\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{SH} = 77.15$

東京化成工業株式会社

- ・ アミノヘキサントチオール塩酸塩 (6-AT, HCl)

Aminohexanethiol, hydrochloride $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{NSCl} = 169.72$

- ・ アミノオクタントチオール塩酸塩 (8-AT, HCl)

Aminooctanethiol, hydrochloride $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NSCl} = 197.77$

- ・ アミノウンデカントチオール塩酸塩 (11-AT, HCl)

Aminoundekanethiol, hydrochloride $\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{NSCl} = 239.61$

同仁化学株式会社

- ・ 3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA)

3-mercaptopropionic acid $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S} = 100.15$

- ・ 5-カルボキシ-1-ペンタントチオール

5-carboxy-1-pentanethiol $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2\text{S} = 148.22$

- ・ 7-カルボキシ-1-ペンタントチオール

7-carboxy-1-peptanethiol $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2\text{S} = 176.28$

同仁化学株式会社

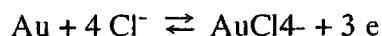
4. 2. 2. 電極

- ・ 作用極 Working electrode

0.8 mm 径の金線 (99.99 %) を、1500 番のサンドペーパー、0.3 μm のアルミナスラリーで磨いた後、Milli-Q で 15 分程度超音波洗浄した。また、修飾電極の作製は ORC 処理した後修飾を行った。

・ Oxidation-Reduction cycle (ORC) (Figure 4-2-1)

ORC 処理は 0.1 M KCl 水溶液中で行った。-0.2 ~ +1.2 V の電位範囲を一定の速度で掃引すると次式の酸化反応と還元反応が交互に起こり、40 周掃引を繰り返すことにより表面に十分な roughness を与えることができる。



今回用いた ORC 処理の条件を以下に示した。

溶液：0.1 M KCl

掃引幅：- 0.2 V ~ + 1.2 V

掃引速度：50 mV / sec 掃引回数：40 cycles

4. 2. 3. SERS measurement

電気化学ラマン分光システムを、Fig.2.4.2 に示した。SERS 測定には Fig.2-4-3 に示した自作セルを用いた。電極電位はポテンショスタットで制御し、Nd : YAG レーザー (1064 nm) を励起光として用いた。

あらかじめ ORC 処理を施した金電極に、アミノ基を有しアルキル鎖長が異なるアミノエタントチオール (2-AT)、アミノヘキサントチオール (6-AT)、アミノオクタントチオール (8-AT)、アミノウンデカントチオール (11-AT) は、濃度 20 μM の水溶液またはエタノール溶液を調製し、金電極を 20 分間浸漬することで自己組織化的に吸着させ、それぞれの修飾金電極を作製した。3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA)、5-カルボキシ-1-ペンタントチオール、7-カルボキシ-1-ペンタントチオールは、100 μM 水溶液に 10 min 程度浸漬しそれぞれの修飾金電極を作製した。修飾金電極を FT-Raman 用セル (Figure 4-2-2) にセットし、励起光を前方より電極先端に照射し、ラマン散乱光は励起光に対して 180° にセットしたレンズで集光し検出した。

4. 2. 3. 支持電解質

- ・過塩素酸ナトリウム
- ・過塩素酸
- ・ Britton & Robinson buffer (B&R buffer)

(Chapter 2、 2. 2. 3 参照)

4. 2. 4. 溶媒・その他

- ・ 水
- ・ エタノール
- ・ アセトン

(Chapter 2、 2. 2. 4 参照)

測定機器

- ・ FT-Raman Spectrometer

Bio-Rad FTS-175c spectrophotometer Raman accessory unit

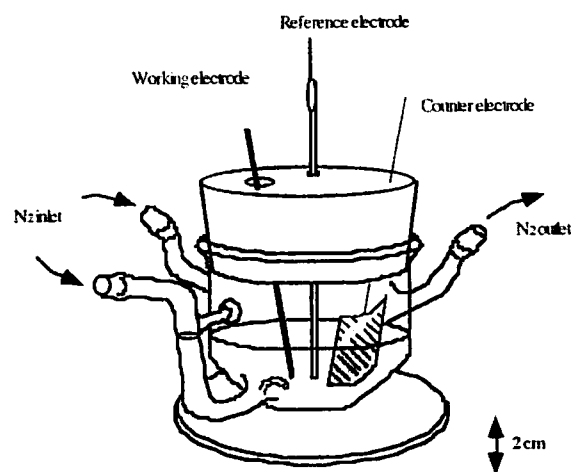


Figure 4-2-1. Cell for cyclic voltammetry

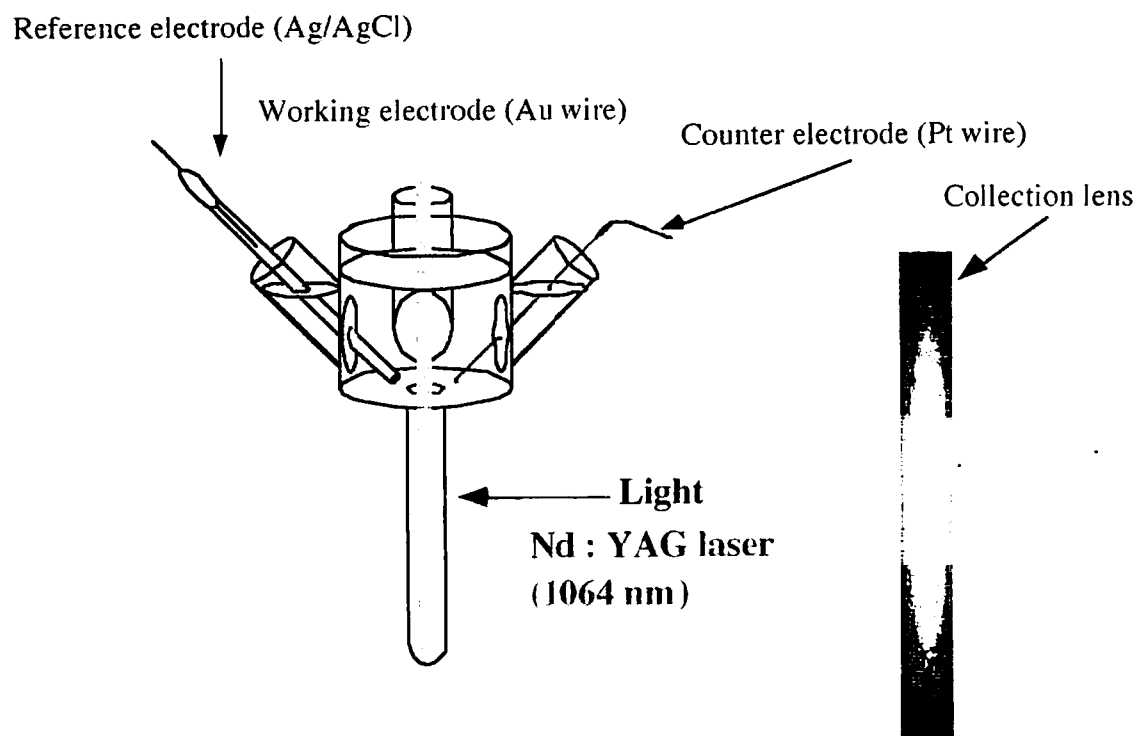


Figure 4-2-2. Cell for SERS measurements.

4.3. アミノエタニチオール (2-AT) 単分子膜の表面 pKa 測定

Figure 4-3-1 (a), (b) に 2-AT の粉末、および 1 M 過塩素酸水溶液のラマンスペクトルを示した。(a) では、C-H 伸縮振動および N-H 伸縮振動が得られた。また、(b) において 933 cm^{-1} に ClO_4^- の Cl-O 伸縮振動に相当するシグナルが観察される¹²⁾¹³⁾。一方、2-AT 修飾金電極の 0.25 M NaClO_4 を含む各 pH の緩衝溶液中での SERS スペクトル (電極電位 0 V) を Figure 4-3-1 (c)~(e) に示した。pH 2.6 での 2-AT 修飾金電極の SERS スペクトルは、明確に 933 cm^{-1} のシグナルが観察された。このバンドは ClO_4^- の Cl-O 伸縮振動のバンドと一致し、このことから、プロトン化した 2-AT に対するカウンターイオン (ClO_4^-) が FT-SERS によって検出された。この電気化学において頻繁に用いられるアニオンの一つである ClO_4^- は、赤外分光法に対しては不活性であるが、ラマン分光法に対しては比較的強い活性を持っている。 1300 cm^{-1} 、 1620 cm^{-1} および 2940 cm^{-1} の SERS 強度は、pH に対して依存しない。一方、 933 cm^{-1} のピーク強度は pH の増加に伴い減少し、pH 8 以上では一定になった。メルカプトエタノールやエタニチオール、プロパンチオール単分子膜を用いて同様の実験を行ったところ、 933 cm^{-1} のバンドはどの場合も得られなかった。また、pH に依存しない 2940 cm^{-1} の脂肪族の C-H に基づくバンド強度は、すべての単分子膜において同様の挙動を示した。

SERS スペクトルの強度は、電極の表面状態に依存しているため pH 変化に依存しない内部標準として C-H 伸縮振動に相当する 2940 cm^{-1} のピーク強度を用い、標準化した強度 (I_{933} / I_{2940}) を pH に対してプロットした (Figure 4-3-2)。電極電位 0 V では、2-AT 単分子膜の表面 pKa は、 5.0 ± 0.2 であると見積もられ、溶液中における 2-AT の pKa は、およそ 8.3 であることから、電極表面上ではこれよりおよそ 3.3 pH ユニットも異なっていることがわかる。また、この値は、二重層キャパシタンス法によって得られた⁴⁰⁾値とほぼ等しい。

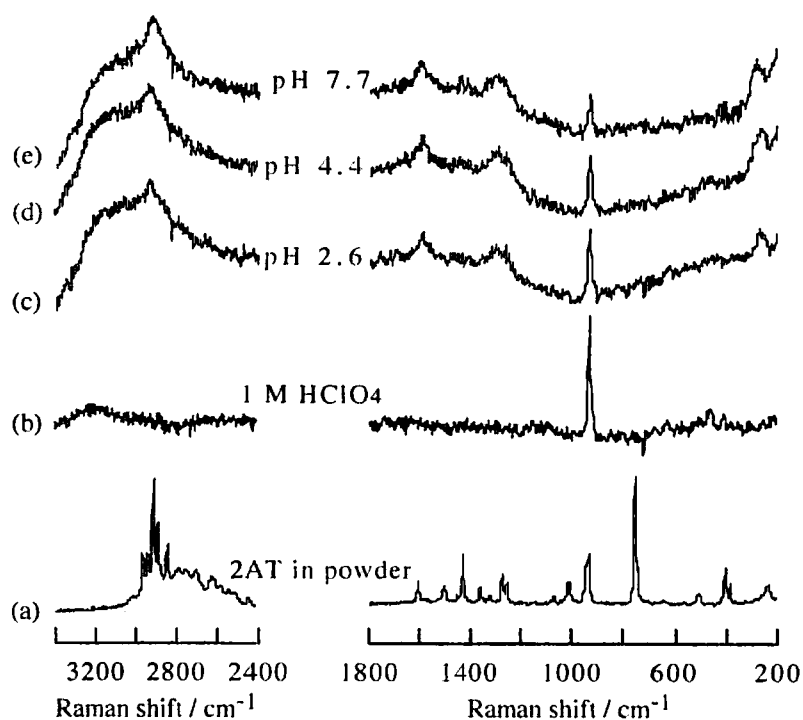


Figure 4-3-1. Raman spectra of (a) 2AT in powder and (b) 1.0 M HClO_4 aqueous solution, and SERS spectra of 2AT SAM on Au electrode at 0 V in (c) pH 2.6, (d) pH 4.4, and (e) pH 7.7 of Britton & Robinson buffer containing 0.25 M NaClO_4 .

アニオンによる影響を評価するため 0.25 M NaNO₃ を含む溶液中において同様の実験を行った。Figure 4-3-2 に示すように pH 2.6 における SERS スペクトルは、1048 cm⁻¹ に N-O 伸縮振動に相当するピークが観察された¹²⁾。この N-O 伸縮振動の溶液中におけるバンド強度は、ClO₄⁻ の Cl-O 伸縮振動のバンド強度の約 80 % であった。修飾電極を用いて得られた N-O 伸縮振動のバンド強度もまた溶液中と同様の比率で観測された。また、ClO₄⁻ のときと同様に標準化した強度 (I₁₀₄₈ / I₁₂₉₄₀) を pH に対しプロットすると、pKa は約 5.0 ± 0.2 であると見積もられ (Figure 4-3-3)、ClO₄⁻ を用いたときと同じ値であった。これらの結果は、電極電位 0 V における 2-AT 修飾電極の pKa は、用いるアニオンに依存しないことを示した。

一般に電極表面における pKa は、電極電位に依存することが知られている。電極電位を 0.1 V に保持したとき、pKa は、4.1 ± 0.2 と評価され、さらに電極電位が 0.2 V のときの pKa の値は、3.4 ± 0.2 であると見積もられた (Figure 4-3-4)。電極電位を positive 方向にシフトさせるにつれて、表面 pKa 値は酸性側にシフトした。電位変化に伴う pKa 値のシフト挙動は、2-AT の表面 pKa 値の酸性側へのシフトは、電極電位を positive にすることで電極全体のチャージがよりプラスになり、プロトンが付加しにくくなるためと考えられる (Figure 4-3-5)。

これらの結果から、強いラマン活性を持つアニオンを用いることによって、そのラマン強度をプローブとして電極表面における酸解離挙動を評価することが可能であることがわかった。

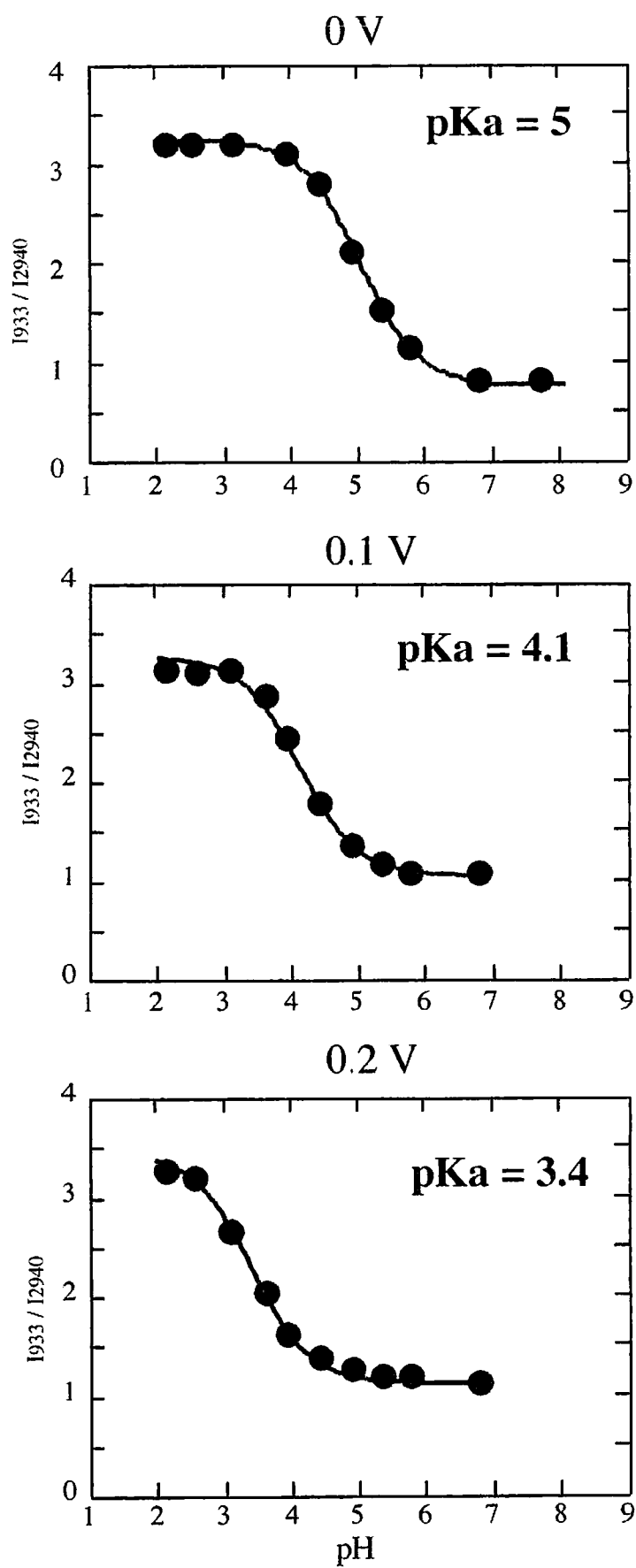


Figure 4-3-2. Plot of pH vs. I_{933} / I_{2940} at 2-AT modified electrode.

2 - Aminoethanethiol in B&R + 0.25 M NaNO₃

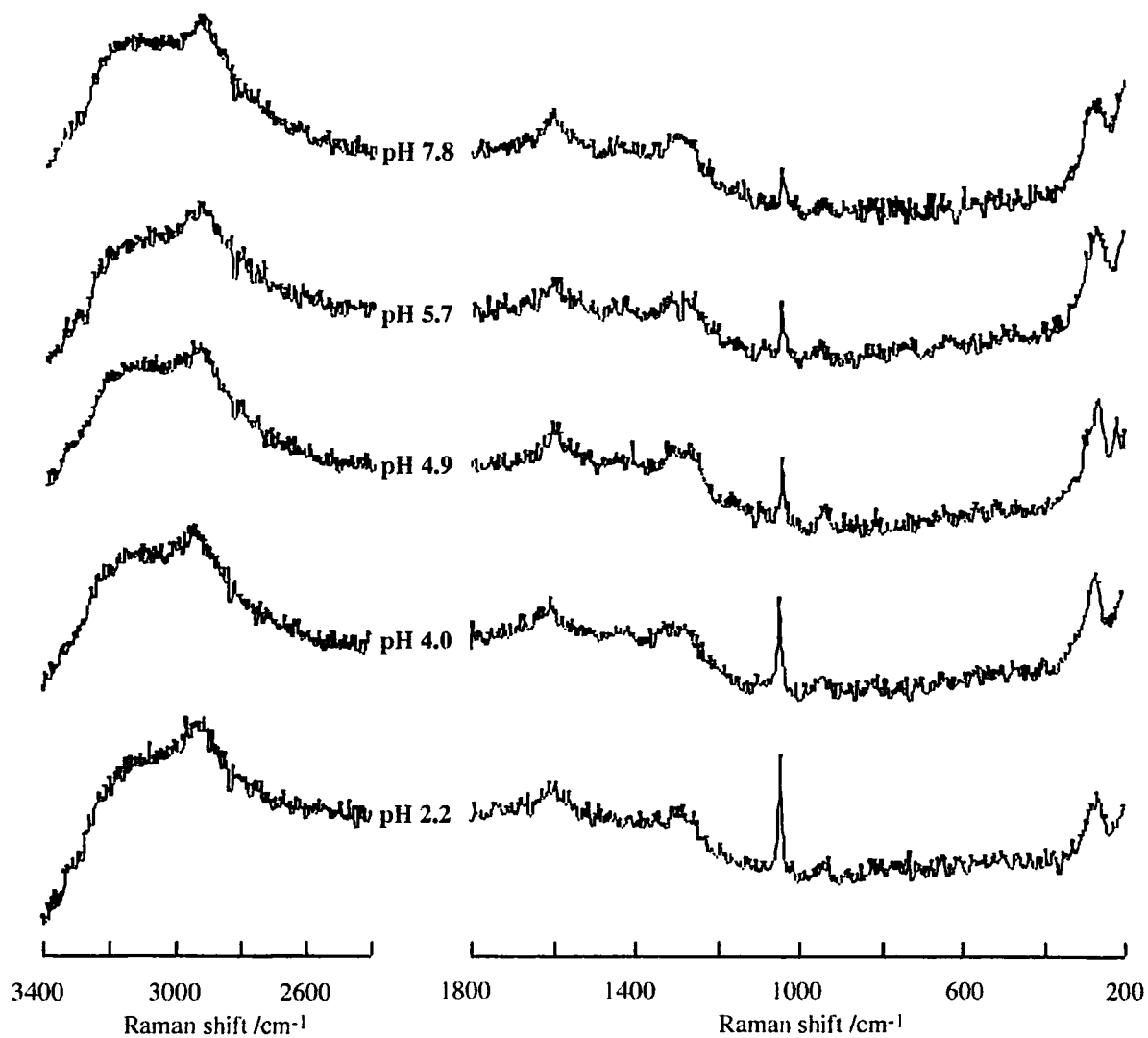


Figure 4-3-3. SERS spectra of 2-AT modified Au electrode at 0 V in various pH solutions.

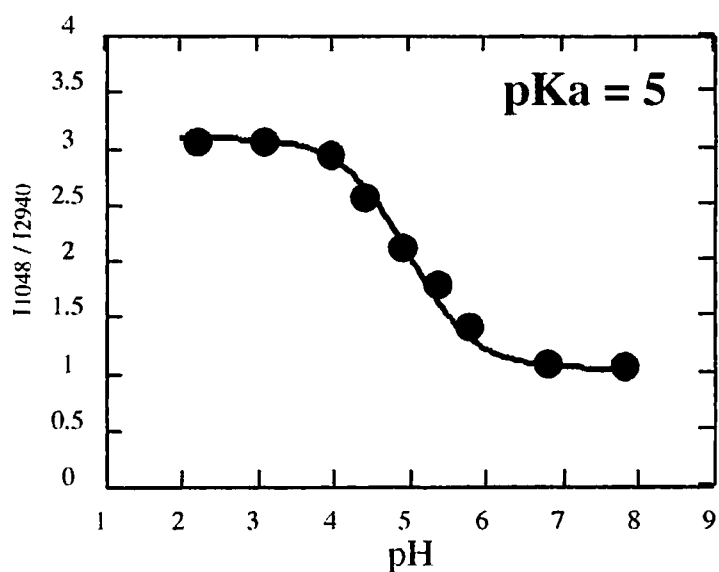


Figure 4-3-4. Plot of pH vs. I₁₀₄₈ / I₂₉₄₀ at 2-AT modified electrode.

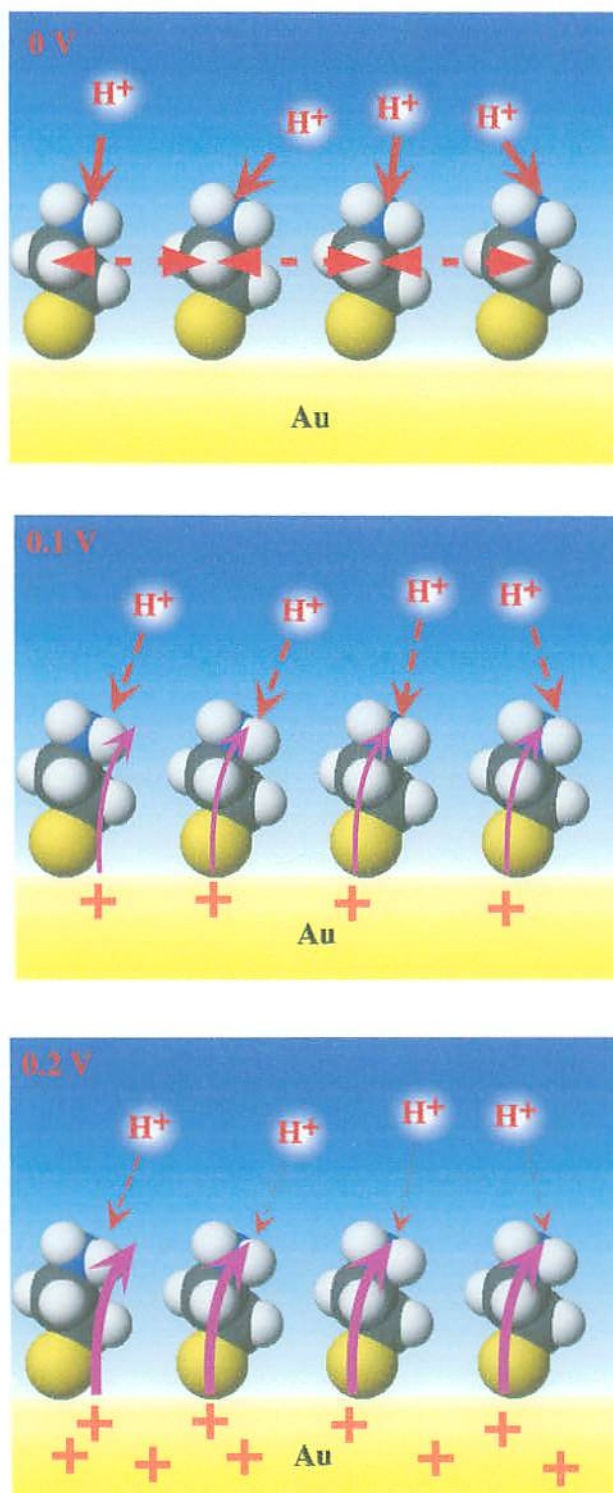


Figure 4-3-5. Schematic illustration of potential dependence for 2-AT modified electrode.

4.4. アルキル鎖長依存性

この方法によって得られる対イオンのシグナルは、対イオンの持つラマン強度や、電極表面から活性部位までの距離に依存することが予想されることから、アルキル鎖長の異なるアミノアルカンチオール ($C=2, 6, 8, 11$) をそれぞれ修飾し、検出されるシグナルの強度の比較を行った。

Figure 4-4-1 に示すように Cl-O のピーク強度は、アミノ末端アルカンチオールのアルキル鎖長が増加するに従って減少していった。これは Figure 4-4-2 のようにイオン対を形成するアミノ基が電極表面から離れて存在するためであり、このことから、この方法による表面 pKa の評価は、シグナルの S/N の増加のため、アルキル鎖長 6 程度が限界であり、それよりも長いものに関しては適さないことがわかった。

そこで明確なシグナルが観察された 6-アミノヘキサチオール (6-AT) についても同様の測定を行い、表面 pKa の評価を行った。Figure 4-4-3 に 6-AT 単分子膜を用いて、電極電位 0 V におけるスペクトルを示した。得られたスペクトルは 2-AT のときと同様に pH 増加に伴う 933 cm^{-1} のシグナルの減少が観察され、標準化した強度を pH に対しプロットすることで見積もられる表面 pKa は、 3.8 ± 0.2 となった (Figure 4-4-4)。2-AT 単分子膜の場合と比較して、およそ 1.2 pH ユニット酸性側にシフトしていた。この pKa 値の鎖長に依存した酸性側へのシフトは、長鎖長のものは分子間の疎水相互作用によって吸着分子が密にパッキングするため、アミノ基へのプロトン付加が起こりにくい状態になるためと考えられる。

この表面 pKa の電極電位に対する依存性についても測定を行った。Figure 4-4-5 に示したプロットから電極電位が 0.1 V のときの表面 pKa は、 4.6 ± 0.2 であった。また、0.2 V のときは 5.1 ± 0.2 であった。この結果は、電位による pKa 値のシフトは、2-AT のときとは異なり、電位が positive になるにつれてアルカリ側

にシフトした。しかし、2-AT の場合と同様のメカニズムで反応が起こるとするならば、6-AT で得られた結果は矛盾することになる。この違いは、密にパッキングしていた膜構造が positive な電位を印加することによってその構造に変化が生じ、pKa がバルクの状態に近づいたものと考えられる(Figure 4-4-6)。

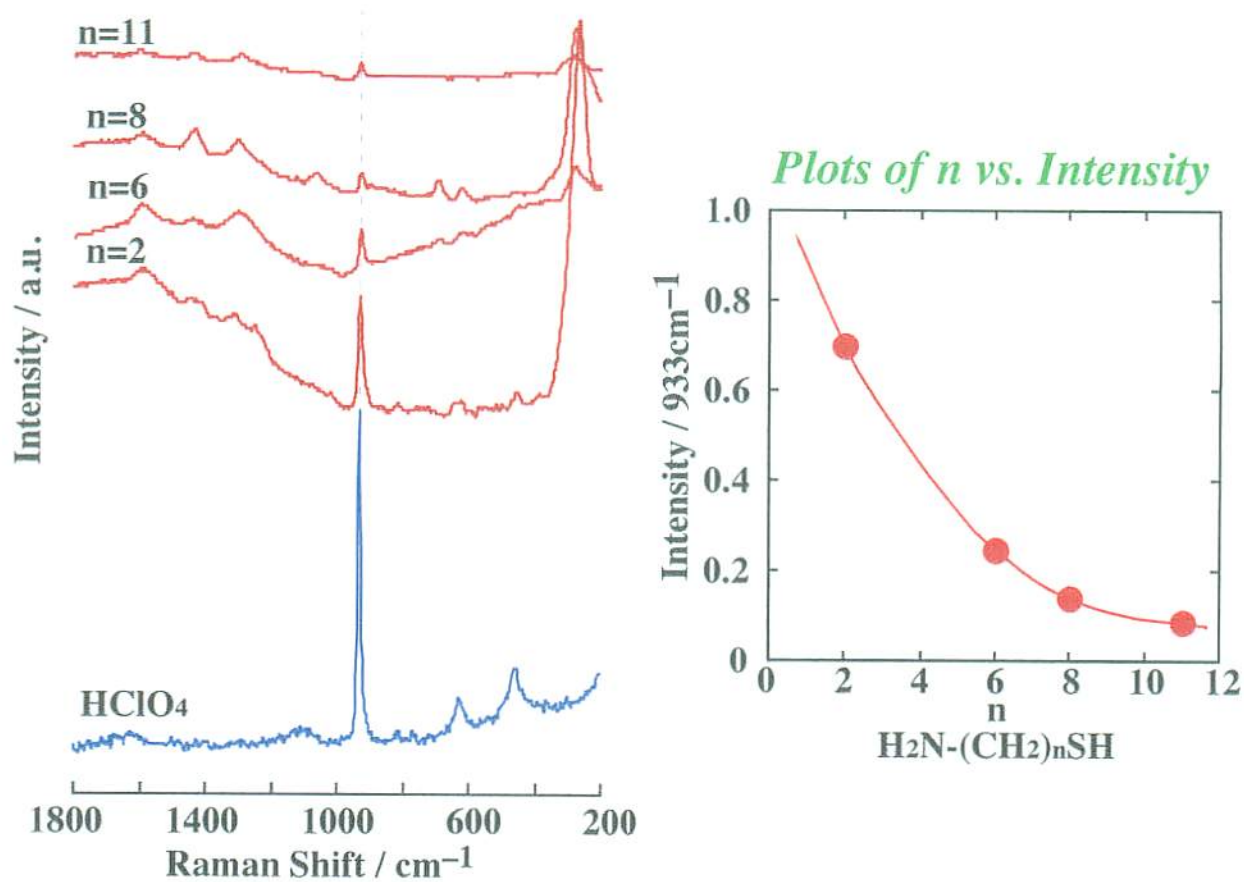


Figure 4-4-1. SERS spectra of $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ modified Au electrodes in 0.1 M HClO_4 . Nd : YAG laser (1064 nm) was used for excitation.

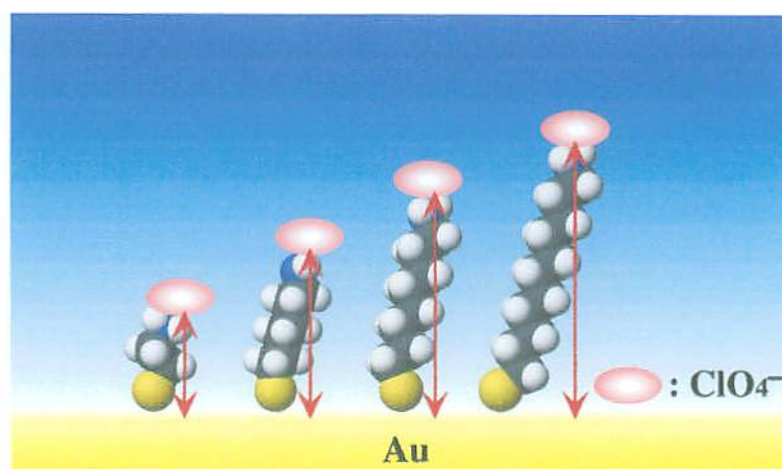


Figure 4-4-2. Schematic illustration of 2AT, 6AT, 8AT, 11AT SAMs associated with ClO_4^- on Au electrode.

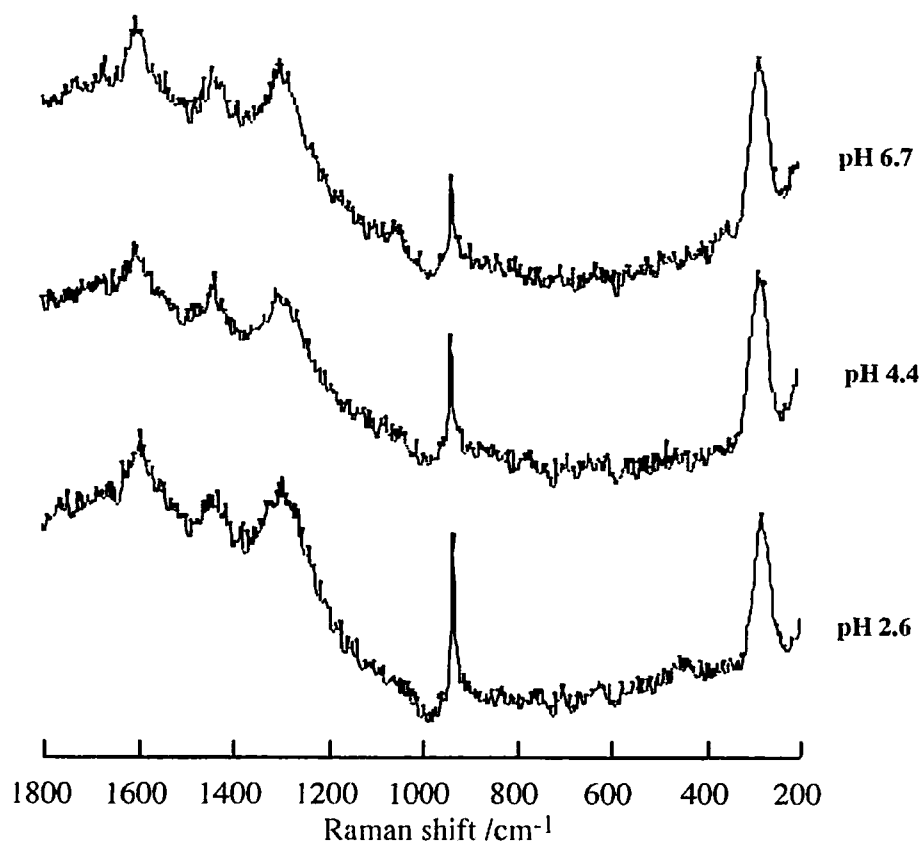


Figure 4-4-3. SERS spectra of 6-AT modified Au electrode at 0 V in various pH solutions.

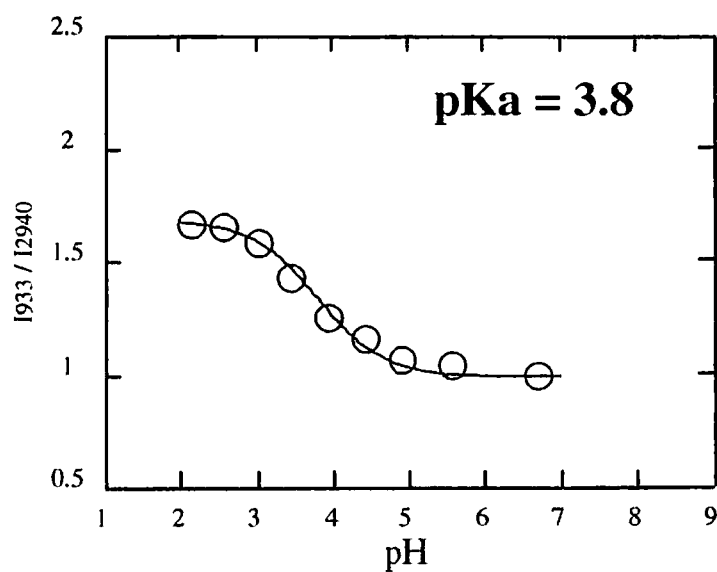


Figure 4-4-4. Plot of pH vs. I_{933} / I_{2940} at 6-AT modified electrode.

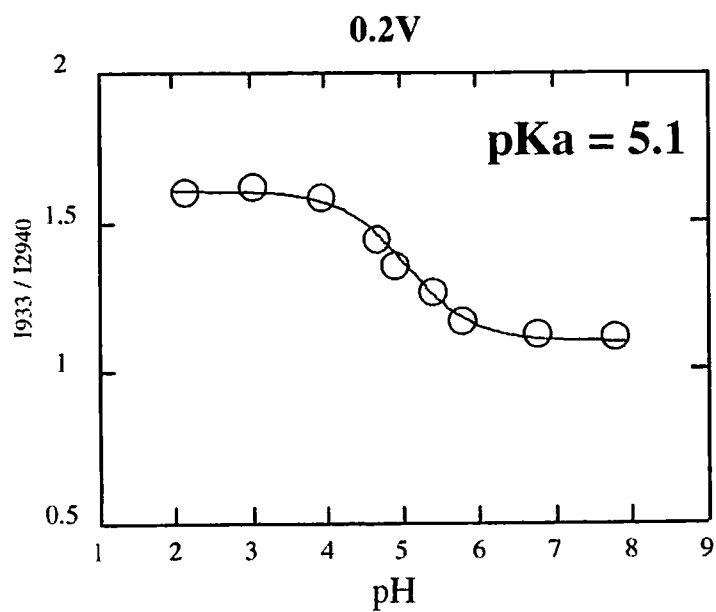
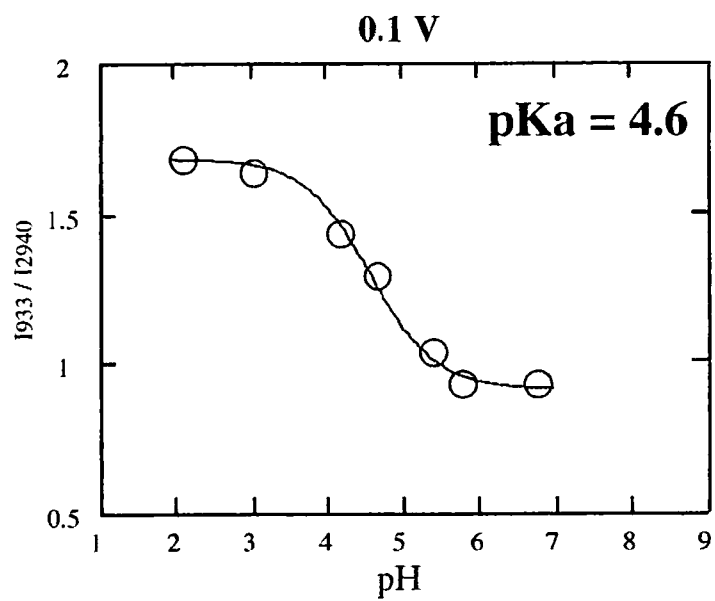


Figure 4-4-5. Plot of pH vs. I_{933} / I_{2940} at 6-AT modified electrode.

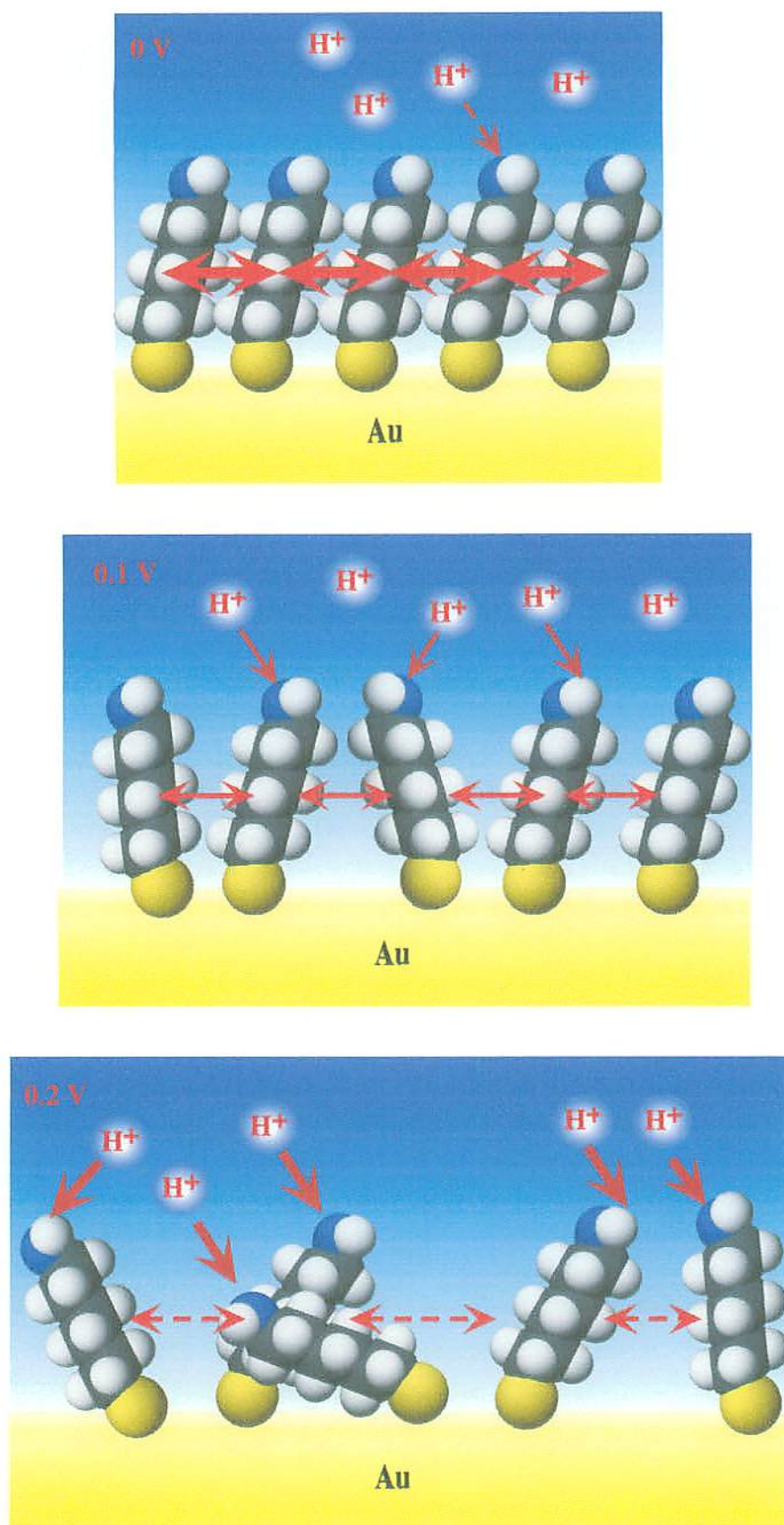


Figure 4-4-6. Schematic illustration of potential dependence for 6-AT modified electrode.

4.5. カルボキシアルカンチオール の表面 pKa 測定

対イオンをプローブとしてカチオン性官能基を持つ単分子膜の表面 pKa の評価が可能であることが明らかになったことから、ここでは末端にカルボキシル基のようなアニオン性官能基を持つ単分子膜の表面 pKa の評価を行った。pKa の評価は、フェロセニルメチルトリメチルアンモニウムイオンをプローブとして用いた。

フェロセニルメチルトリメチルアンモニウムブロミドの 1M 水溶液と粉末のラマンスペクトルを Figure 4-5-1 に示した。これらのスペクトルからシクロペンタジエニル環の呼吸振動に帰属される 1100 cm^{-1} 付近のシグナルと Fe(II) とシクロペンタジエニル環の伸縮振動に帰属される 320 cm^{-1} のピークおよびメチル基の CH の振動が 3100 cm^{-1} 付近に確認された。

3-mercaptopropionic acid (3-MPA) を電極に修飾し、電極電位 0 V におけるフェロセニルメチルトリメチルアンモニウムイオンを含む水溶液中での SERS スペクトルを測定すると、Figure 4-5-2 に示すように pH 4.5 において 1100 cm^{-1} 付近にシクロペンタジエニル環のシグナルが観察された。カチオン性単分子膜のときと同様に pH を増加させると、このピーク強度は増加する傾向を示した。このピーク強度の増加は、およそ pH 8 程度まで観察されそれ以上ではほぼ一定になった。その他のピークはカチオン性単分子膜のときと同様に pH 変化に伴いピーク強度は変化しない。SERS スペクトルの強度は、電極の表面状態に依存しているため、pH 変化に依存しない C-H 伸縮振動に相当する 2940 cm^{-1} の脂肪族の C-H に帰属されるピーク強度を内部標準として用い、標準化した強度 (I_{1100} / I_{2940}) を pH に対してプロットしたものを Figure 4-5-3 に示した。このプロットより 3-MPA の電極電位 0 V における表面 pKa は、 7.0 ± 0.2 であると見積もられた。この値は、溶液中の alkanolic acid の pKa よりもおよそ 2.5 pH ユニットアルカリ側にシフトしていた。この表面 pKa のアルカリ側へのシフトは、以前報告された Kakiuchi らのキャ

パシタンス測定 ($\text{pK}_a = 8$)、Shimazu らの QCM 測定 ($\text{pK}_a = 5.8 \pm 0.1$) によって得られた結果でも観測されており妥当な値であると考えられる。

電極電位に対する表面 pK_a の依存性を調べるため、電位を 0.1 V に固定し同様の測定を行った。Figure 4-5-4 に示すように、0 V のときと同様に pH の増加に伴うシグナルの増加が観察され、およそ pH 9 以上で一定になった。Figure 4-5-5 のプロットから見積もられる pK_a の値は 7.5 ± 0.2 であった。0.2 V を印加すると Figure 4-5-6 のようなスペクトルが得られ、見積もられる pK_a は 8.0 ± 0.2 とさらにアルカリシフトした (Figure 4-5-7)。

この電位に依存した pK_a 値のアルカリシフトは、positive な電位をかけることにより生じる電極のプラスチャージをカルボキシル基が中和するように働くために、プロトンが脱離しにくい状況になるためと考えられる (Figure 4-5-8)。

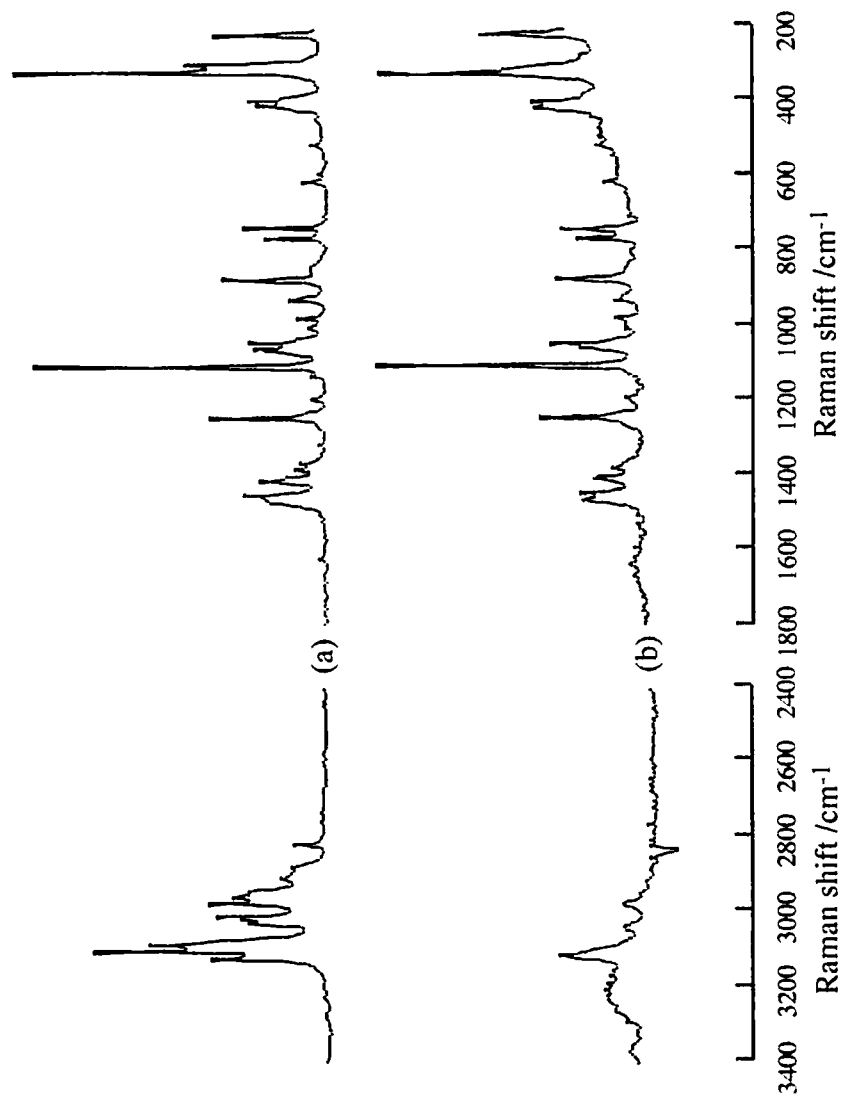


Figure 4-5-1. Raman spectra of (a) Ferrocenylmethyl trimethylammonium Bromide powder and (b) 1M aqueous solution.

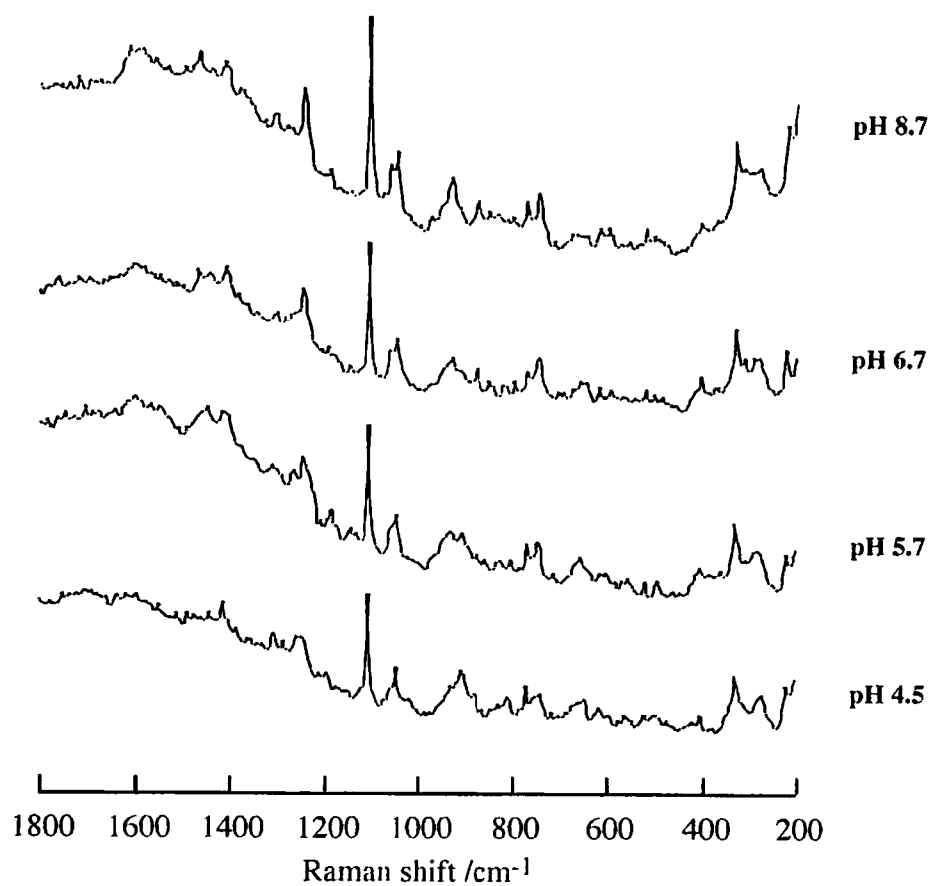


Figure 4-5-2. SERS spectra of 3-MPA modified Au electrode at 0 V in various pH solutions.

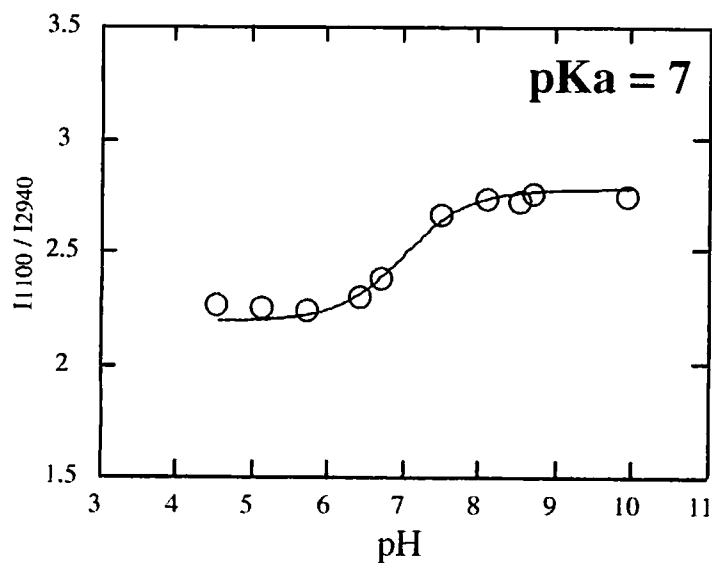


Figure 4-5-3. Plot of pH vs. I_{1100} / I_{2940} at 3-MPA modified electrode.

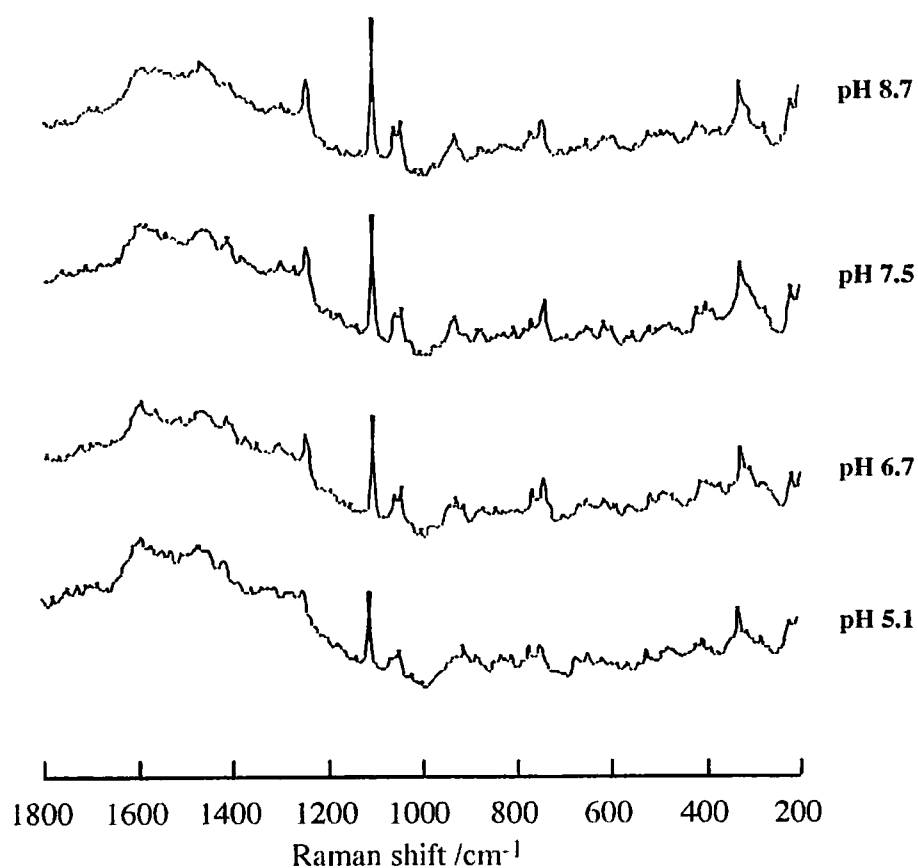


Figure 4-5-4. SERS spectra of 3-MPA modified Au electrode at 0.1 V in various pH solutions.

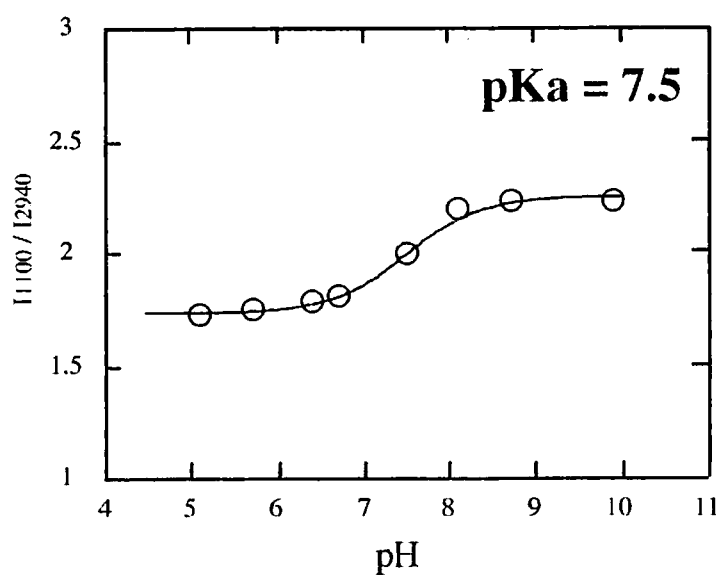


Figure 4-5-5. Plot of pH vs. I_{1100} / I_{2940} at 3-MPA modified electrode.

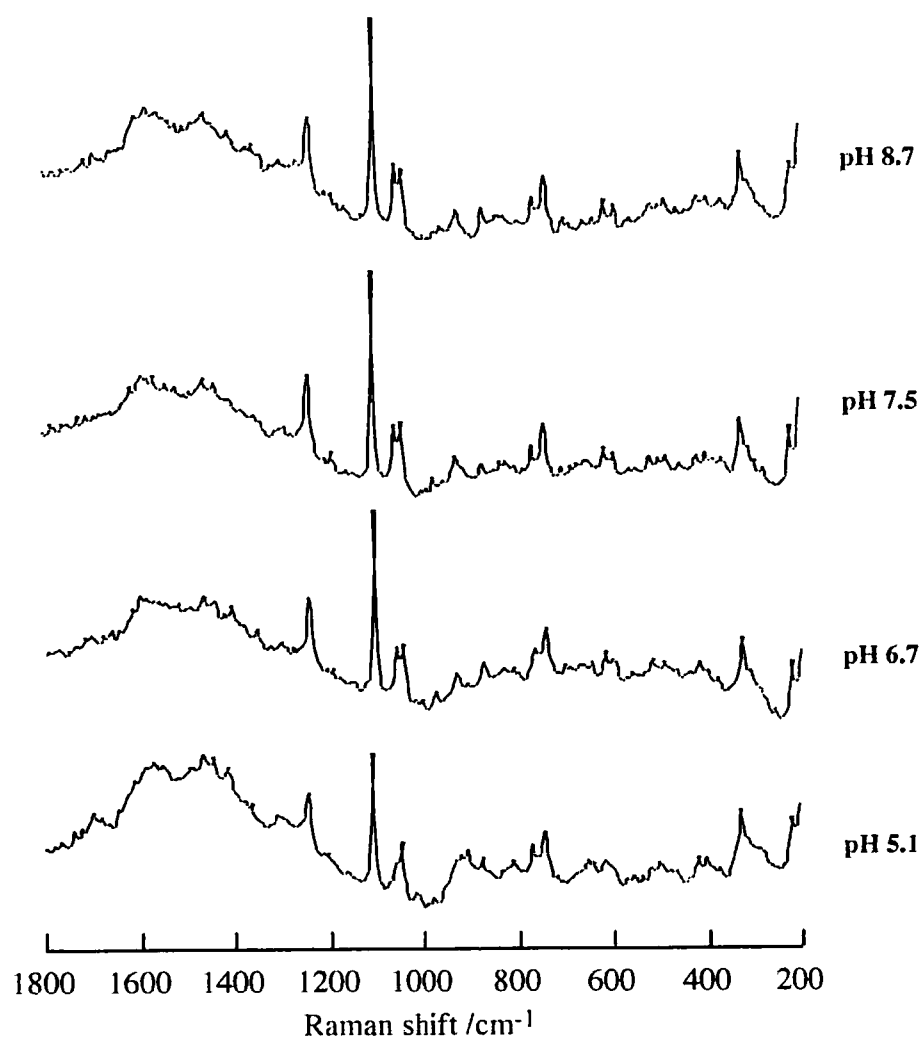


Figure 4-5-6. SERS spectra of 3-MPA modified Au electrode at 0.2 V in various pH solutions.

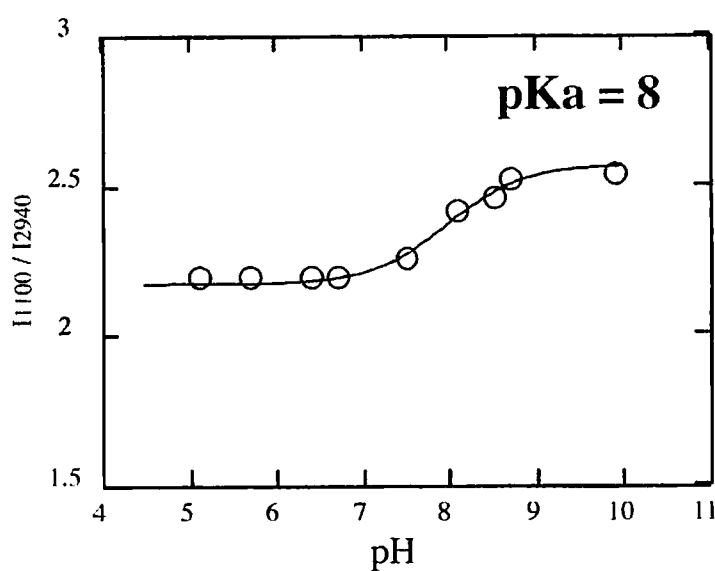


Figure 4-5-7. Plot of pH vs. I_{1100} / I_{2940} at 3-MPA modified electrode.

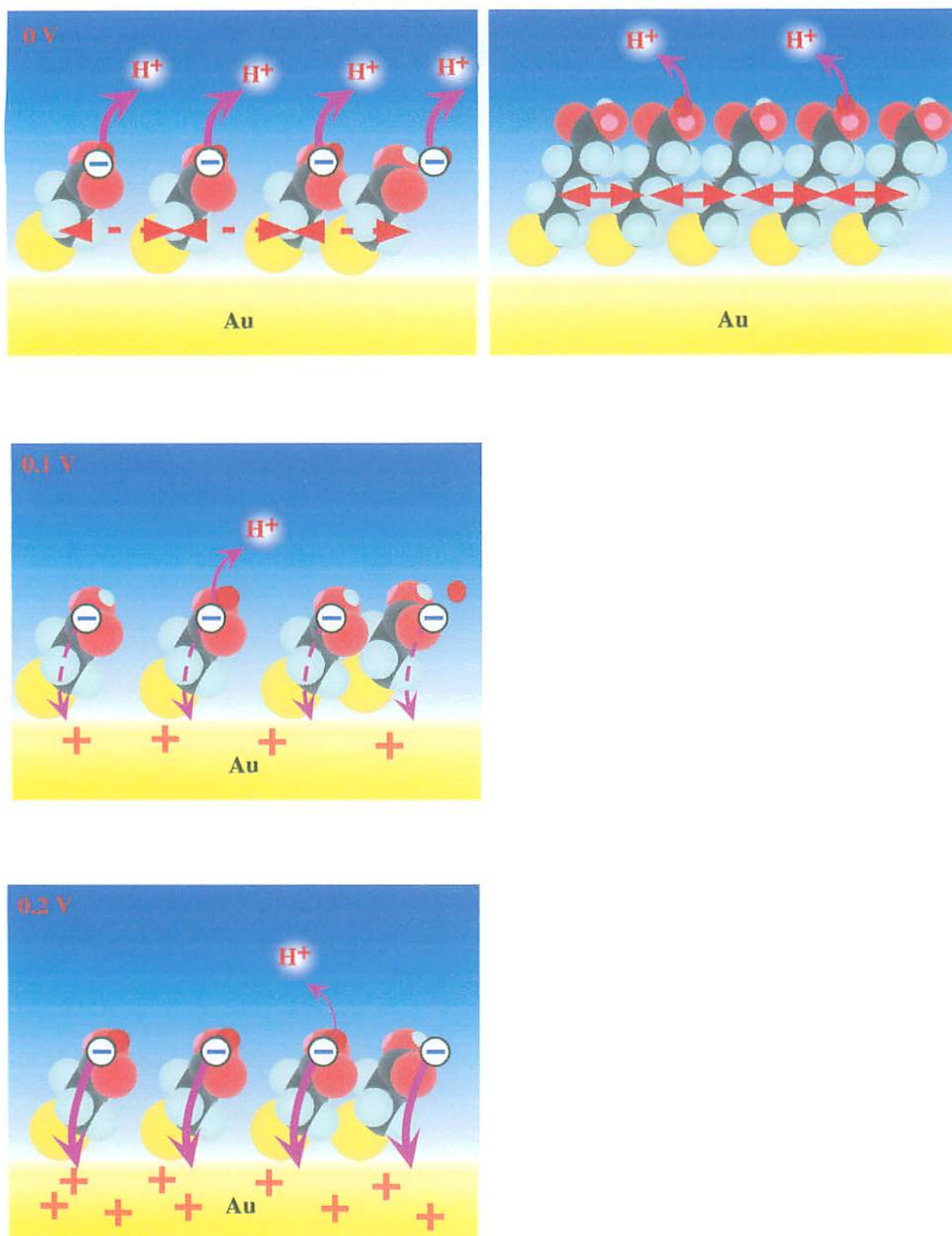


Figure 4-5-8. Schematic illustration of potential and alkyl chain length dependence for carboxyl-alkanethiol modified electrode.

4. 6. アルキル鎖長依存性

フェロセニルトリメチルアンモニウムイオンのピーク強度は、Figure 4-6-1 に示すように、アミノ末端アルカンチオール単分子膜で得られた結果と同様にアルキル鎖長が増加するに従って減少していった。7-carboxy-1-heptanethiol 修飾電極を用いて各 pH でのスペクトルの測定を行っても、ピーク強度が弱いために Figure 4-6-2 のように pH に対する強度の変化をプロットしても変化が現れなかった。

そこでピーク強度の変化を得ることができる 5-carboxy-1-pentanethiol について測定を行い、表面 pKa の評価を行った。Figure 4-6-3 に電極電位 0 V におけるスペクトルを示した。標準化した強度を pH に対しプロットして見積もられた表面 pKa は、 7.5 ± 0.3 (Figure 4-6-4) となり、3-MPA のときに得られた値よりも 0.5 pH ユニット程度アルカリ側にシフトした値が得られた。二重層キャパシタンス測定での結果は 8.7 と報告されており、同程度の鎖長に依存した pKa 値のシフトが得られたものと考えられる。この表面 pKa の電極電位に対する依存性についても測定を行った。電極電位が 0.1 V のときの表面 pKa は、 7.8 ± 0.2 であった。また、0.2 V のときは 8.1 ± 0.2 と見積もられた (Figure 4-6-5)。

カルボキシル末端の場合の pKa の鎖長依存性は、アミノ基の場合と同様に鎖長が長くなるに伴い吸着分子がより密にパッキングするため、プロトンが脱離しにくい状況になるためと考えられる。また、電位変化による pKa のシフトは、3-MPA の時と同様に positive な電位をかけることにより生じる電極のプラスチャージをカルボキシル基が中性を保とうと働くために、プロトンが脱離しにくい状況になるためと考えられる (Figure 4-5-8)。

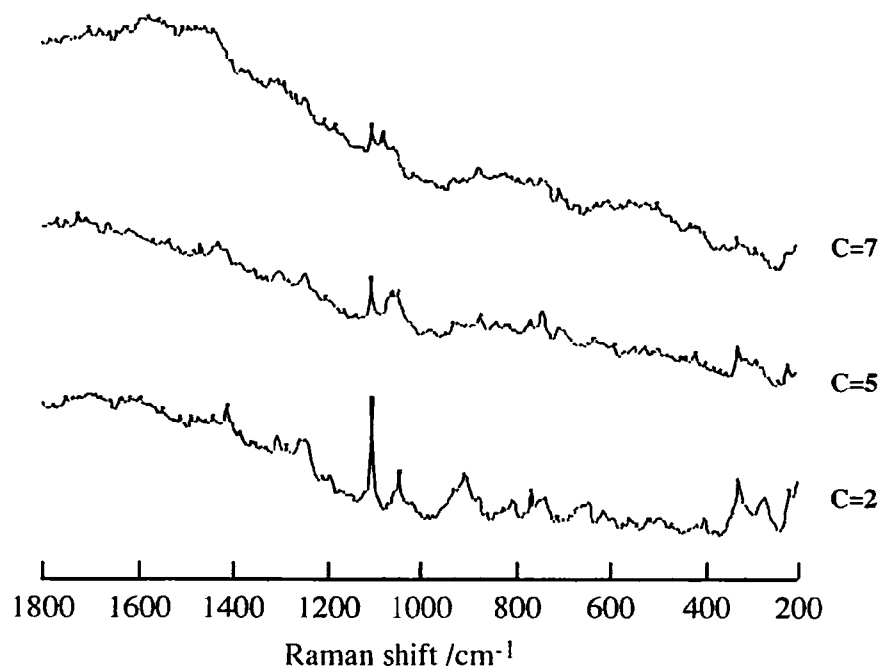


Figure 4-6-1. SERS spectra of HS-(CH₂)_n-COOH (n= 2, 5, 7) modified Au electrode at 0 V in pH 4.5.

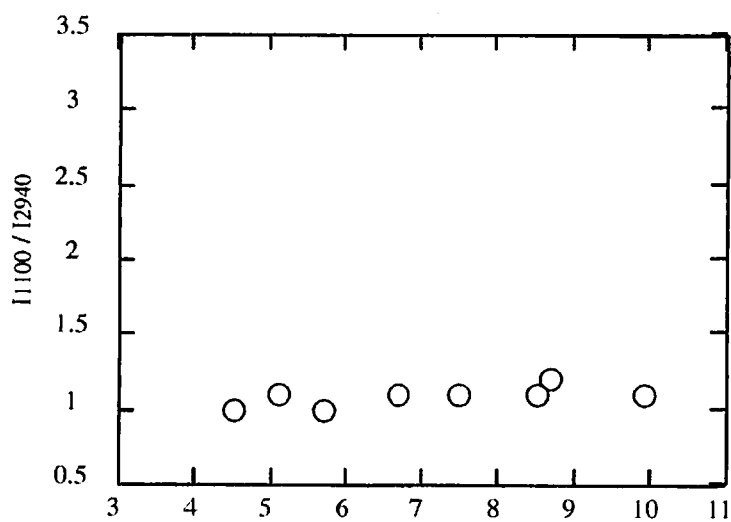


Figure 4-6-2. Plot of pH vs. I₁₁₀₀ / I₂₉₄₀ at 7-carboxy-1-heptanethiol modified electrode.

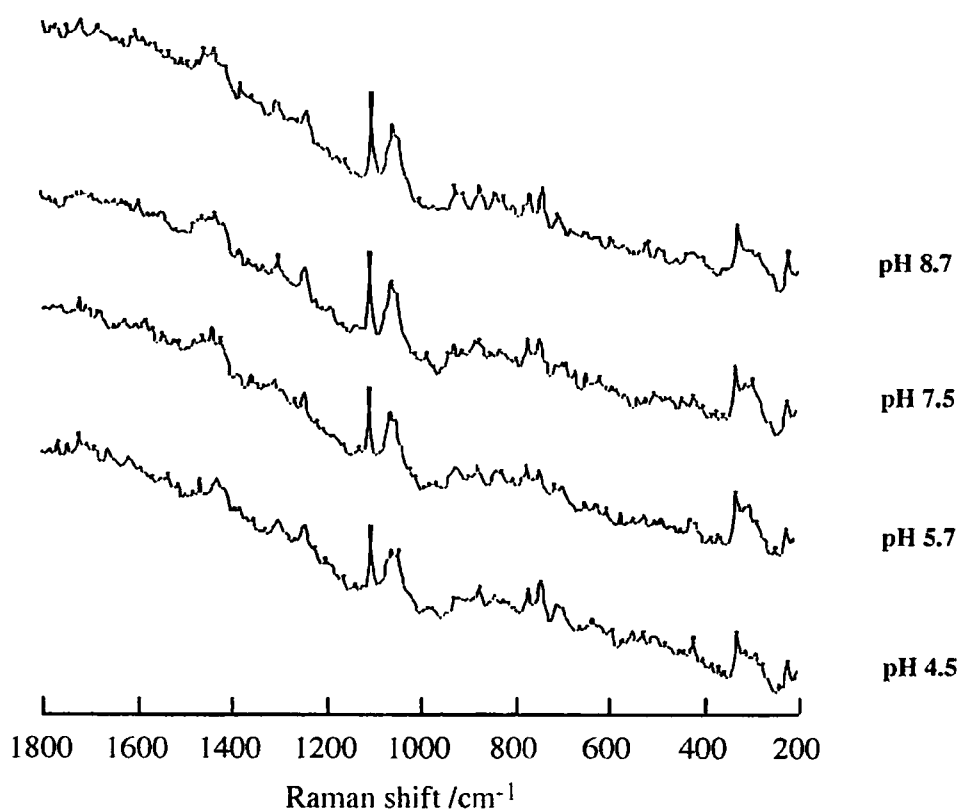


Figure 4-6-3. SERS spectra of 5-carboxy-1-pentanethiol modified Au electrode at 0 V in various pH solutions.

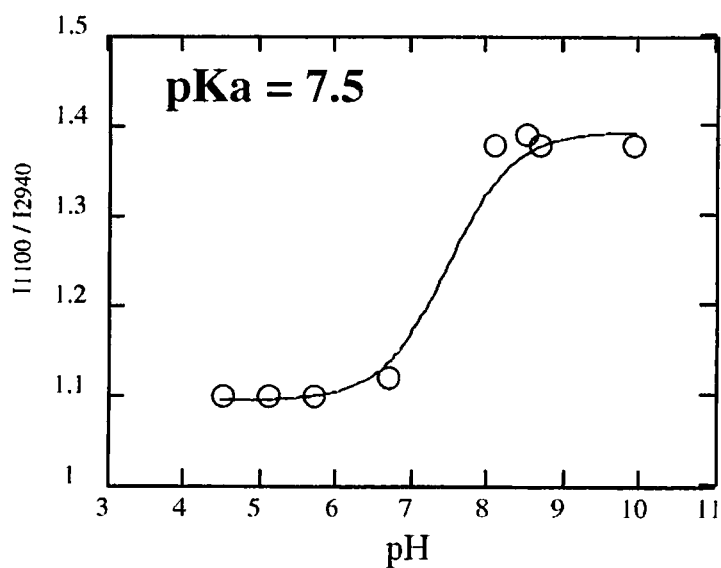


Figure 4-6-4. Plot of pH vs. I_{1100} / I_{2940} at 5-carboxy-1-pentanethiol modified electrode.

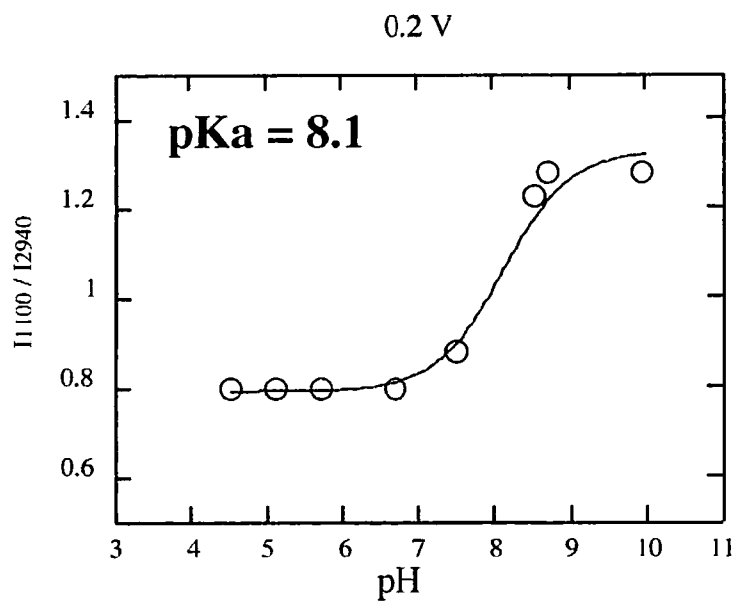
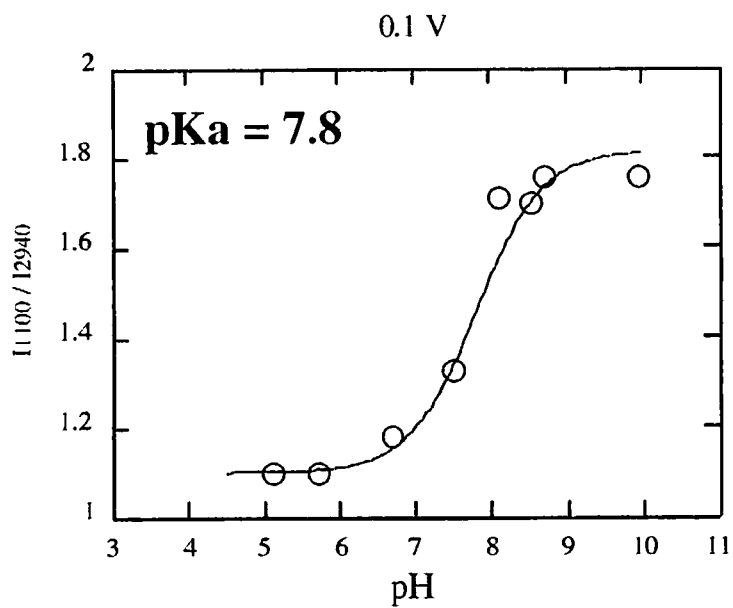


Figure 4-6-5. Plot of pH vs. I_{1100} / I_{2940} at 5-carboxy-1-pentanethiol modified electrode.

4.7. 結言

末端にアミノ基やカルボキシル基を持つ単分子膜の金電極表面における酸解離挙動の詳細を FT-SERS により評価した。

1. 2AT 修飾電極において、0.1 M 過塩素酸中では、 933 cm^{-1} に Cl - O 伸縮振動に帰属されるピークが得られた。また、0.1 M 硝酸中においては 1048 cm^{-1} に N-O 伸縮振動に帰属されるピークが得られた。電極を 0 V (vs. Ag/AgCl) の場合、2AT の表面 pKa は、約 5 であった。電極電位を positive にすると pKa は酸性側にシフトし、0.1 V のとき約 4.1、0.2 V のときは約 3.4 であった。

強いラマン活性を持つアニオンを用いることによって、そのラマン強度をプローブとして電極表面における酸解離挙動を評価することが可能であることがわかった。

2. 6AT 修飾電極の 0 V のときの表面 pKa は、 3.8 ± 0.2 であった。電極電位が 0.1 V のときの表面 pKa は、 4.6 ± 0.2 であった。また、0.2 V のときは 5.1 ± 0.2 であった。

3. 3-MPA の電極電位 0 V における表面 pKa は、 7.0 ± 0.2 であると見積もられた。電極電位を positive にすると pKa はアルカリ側にシフトし、0.1 V のとき pKa の値は 7.5 ± 0.2 、0.2 V を印加すると pKa は 8.0 ± 0.2 であった。

4. 5-carboxy-1-pentanethiol の表面 pKa は、0 V のとき 7.5 ± 0.3 と見積もられた。電極電位が 0.1 V のときは、 7.8 ± 0.2 、0.2 V のときは 8.1 ± 0.2 であった。

4.8 参考文献

- 1) A.Ulman, "*An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*", Academic Press, New York (1991)
- 2) H.O.Finklea, "Electroanalytical Chemistry", A.J.Bard and I.Rubinstein Eds., Marcel Dekker, New York , **Vol.19**,p.109 (1996).
- 3) 魚崎浩平, 佐藤縁. 化学工業, **45**, 182 (1994).
- 4) 魚崎浩平, 佐藤縁, 近藤敏啓. 化学工業, **45** , 945 (1994).
- 5) 佐藤縁, 水谷文雄, 魚崎浩平. 触媒, **37** , 69 (1995).
- 6) 近藤敏啓. 魚崎浩平, 光化学. **20** , 69 (1995).
- 7) C. D. Bain and G. M. Whitesides, *Langmuir*, **5**, 1370 (1989); S. E. Creager, J. Clarke, *Langmuir*, **10**, 3675 (1994).
- 8) K. Shimazu and K. Uosaki, *Chem. Lett.*, **1998**, 669; K. Sugihara, K. Shimazu, and K. Uosaki, *Langmuir*, **16**, 7101 (2000).
- 9) L. -J. Wan, H. Noda, Y. Hara, and M. Osawa, *J. Electroanal. Chem.*, **489**, 68 (2000).
- 10) a) M. A. Bryant and R. M. Crooks, *Langmuir*, **9**, 385 (1993); b) T. Kakiuchi, M. Iida, S. Imabayashi, and K. Niki, *Langmuir*, **16**, 5397 (2000).
- 11) W. Suetaka (with the assistance of John T. Yates, Jr.), "Surface Infrared and Raman Spectroscopy –Method and Applications," Plenum Press, NewYork (1995) and references therein.
- 12) N. B. Colthup, "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy," Academic Press, Boston (1987).
- 13) K. Nakamoto, "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry," John Wiley & Sons, Inc., New York (1997).

Chapter 5

Fmoc-NH-C_n SH を用いた単分子膜の作製と特性評価

5.1 緒言

末端にアミノ基を有するアルカンチオールは、金基板上に高配向の単分子膜を作製することができ、その機能性官能基を利用してタンパク質や酵素など固定化に広範囲に用いられている。しかし、Sprik らは¹⁾、単分子膜の末端アミノ基が CO₂ と反応して カルバミン酸塩 を生成し、化学修飾に用いられる機能性官能基を不活性化すると報告している。また Thin らは、接触角などの結果から HS-(CH₂)₁₀-NH₃⁺ などによって単分子膜を構築する際、疎水性の多層構造を形成するためチャージした表面の構築ができないとも報告している²⁾。そこで、単分子膜上のアミノ基の機能が正しく働くような表面を構築するため、本研究では、ペプチドの合成の際にアミンの保護基として用いられる Fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) 基を持つアルカンチオールを用いて、単分子膜を作製し、単分子膜中で脱保護反応を行うことによりアミノアルカンチオール単分子膜の構築を試み、それぞれの過程を電気化学法による還元脱離、末端アミン生成のための脱保護反応の赤外分光法による確認、生成された末端アミノアルカンチオール単分子膜の表面特性について評価した。

5.2 実験

5.2.1. 修飾物質

- ・ N-Fmoc-Aminohexanethiol (6-FAHT) $C_{21}H_{25}NO_2S=355.49$
- ・ N-Fmoc-Aminooctanethiol (8-FAOT) $C_{23}H_{29}NO_2S=383.55$
- ・ N-Fmoc-Aminoundecanethiol (11-FAUT) $C_{26}H_{35}NO_2S=425.63$

これらの構造は Figure 5-2-1 に示した。

- ・ 6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride (6-AHT · HCl) $C_6H_{16}ClNS=169.72$
- ・ 8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride (8-AOT · HCl) $C_8H_{20}ClNS=197.77$
- ・ 11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride (11AUT · HCl) $C_{11}H_{26}ClNS=239.85$

同仁化学。

それぞれのサンプルの基板への修飾は、濃度 100 mM エタノール溶液に 5 min 浸漬することによって行った。

5.2.2. 電極および基板

- ・ 蒸着金電極 (CV 測定用)

Mica を 1.5 cm x 1.5 cm 程度の大きさにカットし、表裏ともに数回ずつへき開いて清浄な面を露出させ、基板温度約 250 °C で真空蒸着法により作製した。電極は水素炎で表面をアニールして表面を平滑にした。電気化学測定は、Figure 5-2-2 に示す測定セルを用いた。

- ・ 蒸着金基板 (RAS 測定用)

約 1 cm x 3 cm 程度のガラス板をアセトンで超音波洗浄した後、真空蒸着法により以下の条件で作製した。

圧力 : 1×10^{-6} torr

蒸着速度 : 1 Å / 1 sec

膜厚 : 1000 Å

基板温度 : 常温

・ FT-SERS 用電極

Chapter 4、4-2-2 参照

5. 2. 3 支持電解質

・ 水酸化カリウム (Potassium Hydroxide) KOH = 56.11

85 % 以上含有 和光純薬工業 (株) 特級試薬

・ 過塩素酸ナトリウム

・ Britton & Robinson buffer (B&R buffer)

(Chapter 2、 2. 2. 3 参照)

5. 2. 4 溶媒・その他

・ アセトニトリル (Acetonitrile) CH₃CN = 41.05

99 % 含有 ナカライテスク株式会社 スペクトル用特製試薬

・ ピペリジン (Piperidine) C₅H₁₁N = 85.15

・ 水

・ エタノール

・ アセトン

(Chapter 2、 2. 2. 4 参照)

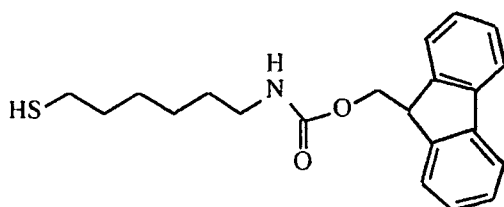
測定機器

・ FT-Raman Spectrometer : Bio-Rad FTS-175c spectrophotometer Raman accessory unit

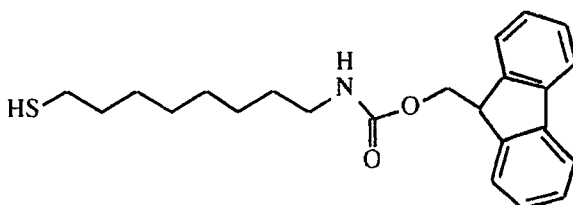
- Potentiostat, Function generator : POLARIZATION UNIT PS-06
- TOHO TECHNICAL RESERCH

Sample

Fmoc-NH-C6-SH (C₂₁H₂₅NO₂S)



Fmoc-NH-C8-SH (C₂₃H₂₉NO₂S)



Fmoc-NH-C11-SH (C₂₆H₃₅NO₂S)

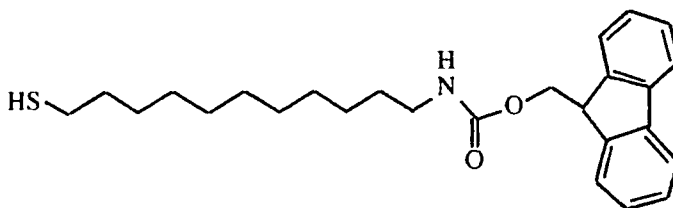


Figure 5-2-1. Structure of Fmoc -C_n SH (n = 6, 8, 11)

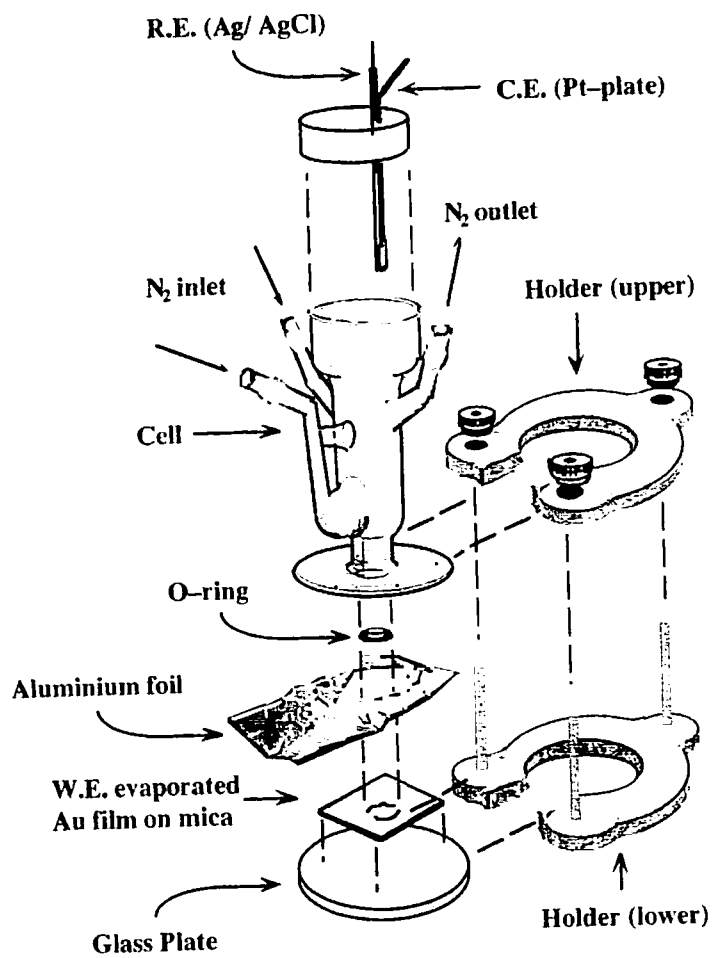
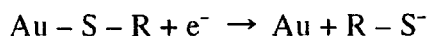


Figure 5-2-2. Cell for cyclic voltammetry

5.3 単分子膜の電気化学的評価

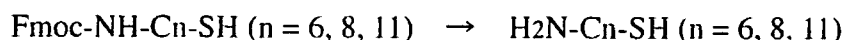
チオール分子が吸着した電極を KOH 等のアルカリ溶液中において還元方向に電位掃引し、その際に起こるチオール分子の吸着状態を定性的に評価することができる。吸着チオール分子の還元脱離反応は一般に次式で表される³⁾。



このように吸着している分子が 1 電子反応により脱離するとすれば、ピーク面積より求められる脱離の際に生じる電気量は、電極表面の吸着分子の量を表すことになり、単位面積あたりの吸着量を求めることができる。

Figure 5-3-1 に鎖長の異なる Fmoc-NH-C_n-SH (n = 6, 8, 11) 単分子膜の還元脱離波形を示した。還元脱離波形はアルキル鎖長に関係なく、一本の明瞭な還元ピークを示した。それぞれの還元脱離電位は、- 1.09 V (n=6)、- 1.11 V (n=8)、- 1.14 V (n=11) であり、アルカンチオールの還元脱離挙動と同様にアルキル鎖長が長くなるにつれて脱離電位は negative シフトした。また、それぞれのピーク面積から見積もられる吸着量は、 9.95×10^{-10} (n = 6)、 9.19×10^{-10} (n = 8)、 9.19×10^{-10} (n = 11) mol / cm² と算出された。アルカンチオール単分子膜の吸着量が 1.3×10^{-9} mol / cm² 程度であることから、吸着量がやや少ないように思われるが Fmoc 基の占有面積を考慮すると妥当な値であると考えられる。このことからいずれの鎖長の Fmoc-NH-C_n-SH も金電極上において単分子膜を形成しているものと考えられる。

作製した Fmoc-NH-C_n-SH 単分子膜を 20 % ピペリジンを含むアセトニトリル溶液中に 30 min 浸漬し、式のような Fmoc 基の脱保護反応を行った。



反応後の還元脱離波形を Figure 5-3-2 に示した。反応後のそれぞれのボルタモグラムにおいても明瞭な還元脱離ピークが得られ、脱離電位は、- 0.94 V (n=6)、- 1.03 V

($n=8$)、 -1.08 V ($n=11$) に観察され、反応前の還元脱離電位よりもやや positive シフトした。しかし、還元脱離のピーク面積は反応の前後で変化が見られないことから、吸着量はほぼ一定に保たれているものと考えられる。脱保護反応後の SAM は末端にアミノ基が生成していると考えられるため、同様の鎖長の 6-AHT,HCl、8-AOT,HCl、11-AUT,HCl を用いて単分子膜を作製し、還元脱離を測定し比較を行った。Figure 5-3-3 にそれぞれの単分子膜の還元脱離の CV を示した。還元脱離波形は Fmoc の脱保護反応により作製したものと比較して鋭いピークが観察された。また、脱離電位は、 -0.89 V (6-AHT,HCl)、 -0.97 V (8-AOT,HCl)、 -1.12 V (11-AUT,HCl) であり、脱保護反応によって生じた SAM のものとほぼ一致する結果が得られた。これらのことから、金電極上に $\text{Fmoc} - \text{NH} - \text{C}_n - \text{SH}$ を固定化した状態で脱保護反応を行っても、反応の前後で単分子膜の吸着状態に影響を与えるものではないことが示唆された。

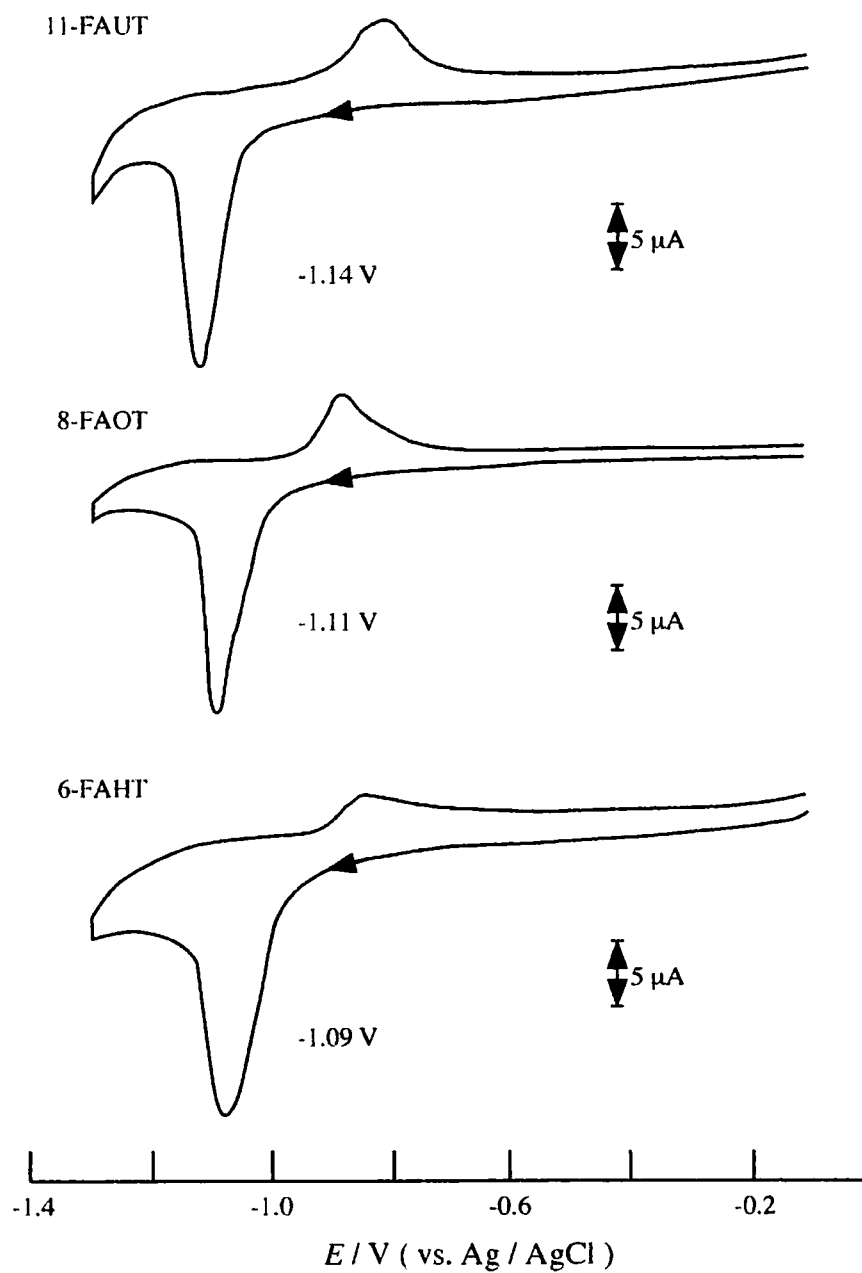


Figure 5-3-1. Cyclic voltammograms of reductive desorption of Fmoc – NH – Cn – SH from Au / mica surface in 0.1 M KOH aqueous solution.

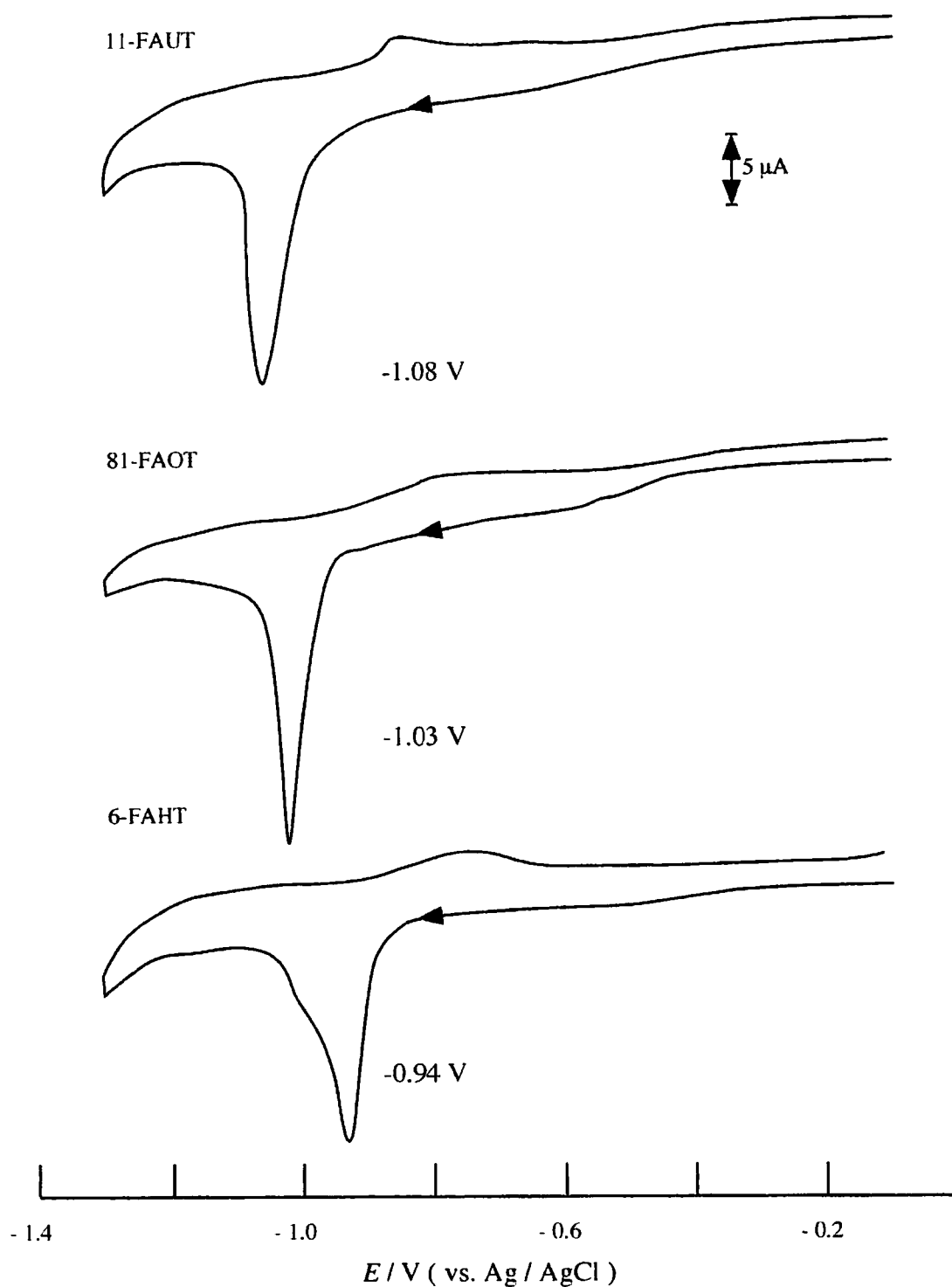


Figure 5-3-2. Cyclic voltammograms of the reductive desorption of Fmoc – NH – Cn – SH after deprotection reaction from Au / mica surface in 0.1 M KOH aqueous solution.

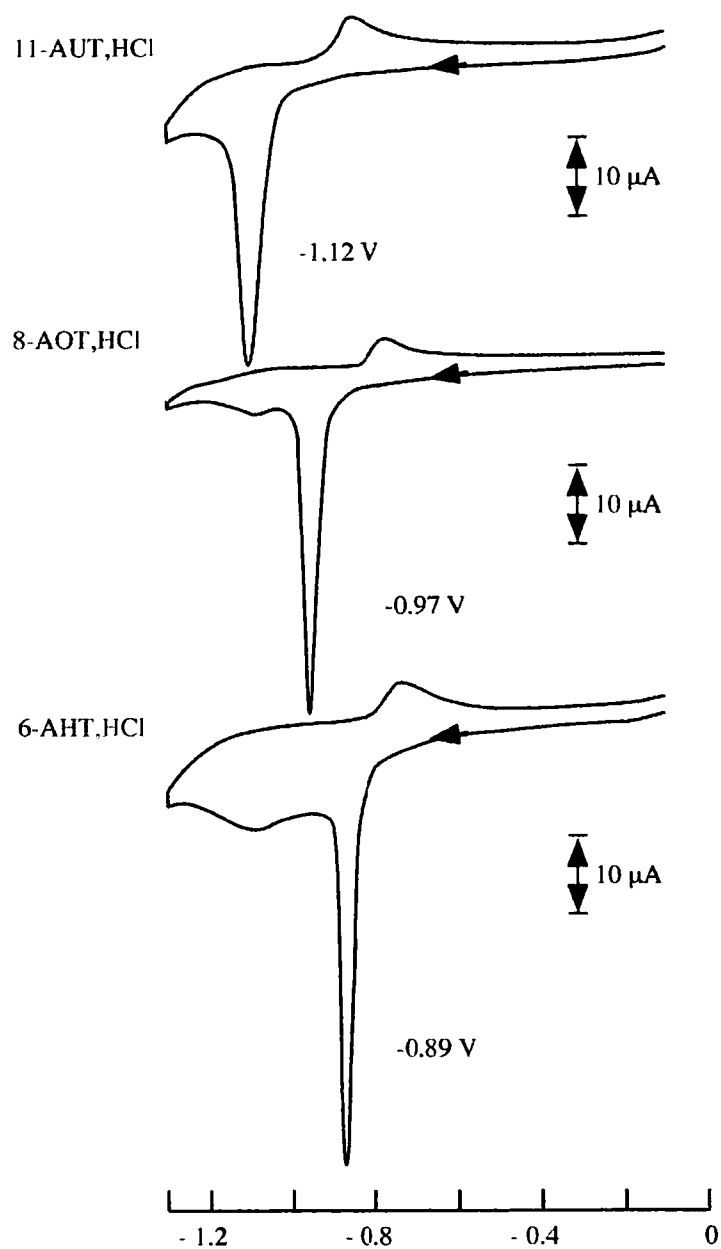


Figure 5-3-3. Cyclic voltammograms of reductive desorption of 11-AUT,HC, 8-AOT,HC, 6-AHT, HCl from Au / mica surface in 0.1 M KOH aqueous solution.

5. 4. 赤外分光法による脱保護反応の評価

Figure 5-4-1 に金基板上に作製した 6-FAHT の単分子膜の脱保護反応前後の RAS スペクトルおよびそれらに対応する化合物の KBr 中での透過スペクトルを示した。KBr 中の吸収スペクトルにおいて、6-FAHT は 1717 cm^{-1} 、 1545 cm^{-1} 、 1450 cm^{-1} 、 1267 cm^{-1} 、 1153 cm^{-1} 、 737 cm^{-1} に吸収ピークを与えた。これらのピークは、カルボニルの伸縮振動、C=C の環振動、CHN のグループ振動、C-N と N-H の混合振動、Fmoc 基の C-O-C エステルの振動、芳香環の C-H 面外振動にそれぞれ帰属される⁴⁾。これと類似したスペクトルが 6-FAHT 修飾基板上でも得られた。このことから 6-FAHT が確かに金表面に吸着していることが確認された。一方、脱保護後のスペクトルでは、反応前に観察されていたこれらの吸収ピークは観察されなかったが、 1508 cm^{-1} 付近に非常に弱い吸収ピークが現れた。一般にアミノ基の N-H 伸縮振動は、 $3200\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるが、非常に吸収強度が弱いために検出できなかった。 1508 cm^{-1} 付近に得られた吸収ピークは、6-AHT、HCl から作製された単分子膜の同様の測定においても得られることから、反応によって単分子膜表面にアミノ基が露出したものと考えられる。その他の鎖長の異なる Fmoc チオール単分子膜についても同様の実験を行った。Figure 5-4-2、5-4-3 に示すように 8-FAOT、11-FAUT の単分子膜においても 6-FAHT のときと同様に脱保護反応の前後におけるスペクトルの変化が観察された。これらのことから、金基板上に吸着した Fmoc-NH-C_n-SH 単分子膜の吸着した状態で脱保護反応が進行し、Fmoc 基が外れていることが確認された。

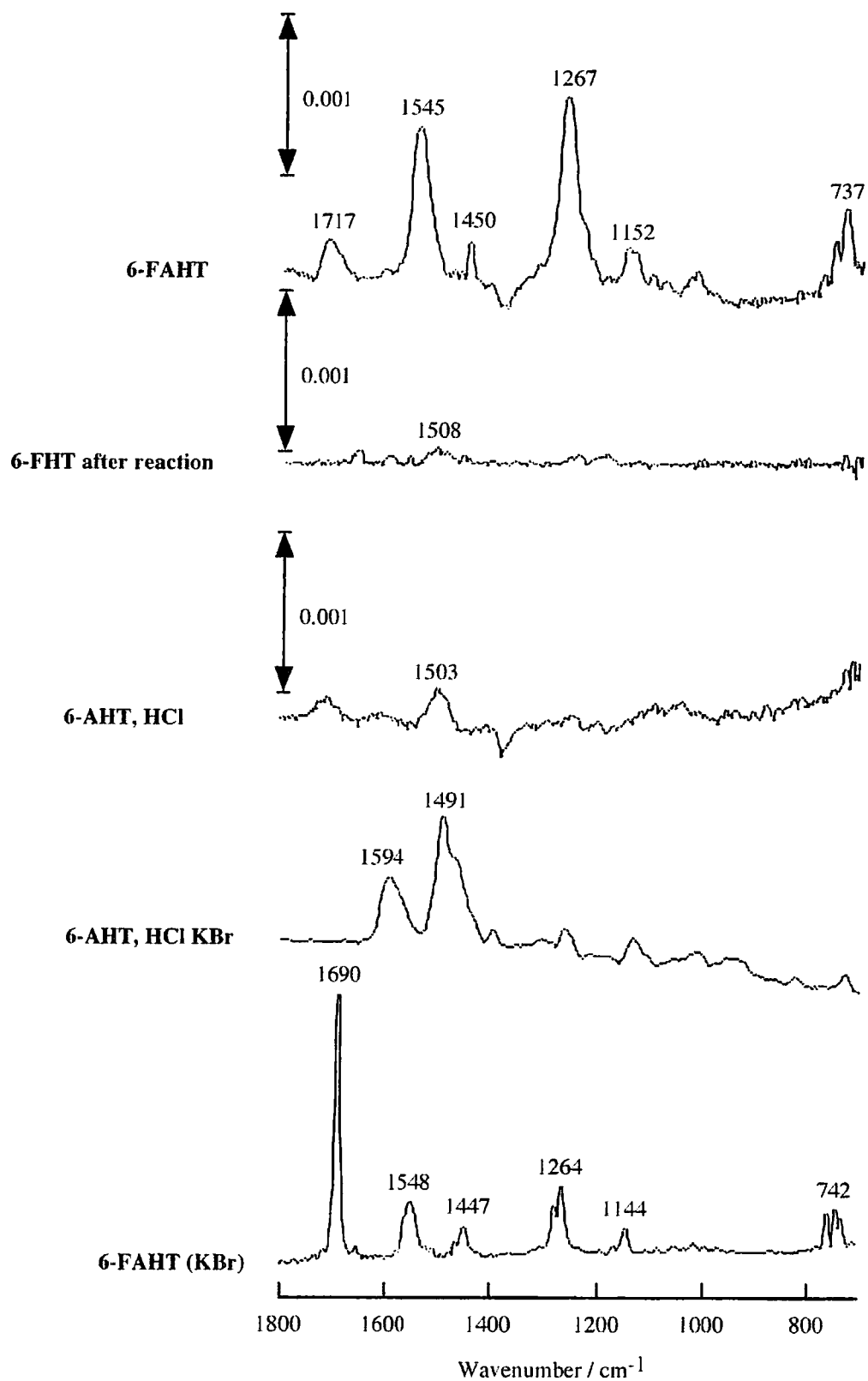


Figure 5-4-1. RAS spectra of modified Au surface.
 (a) 6-FAHT. (b) after reaction of 6-FAHT, (c) 6-AHT, HCl
 Transmission infrared spectra of 6-AHT, HCl and 6-FAHT.

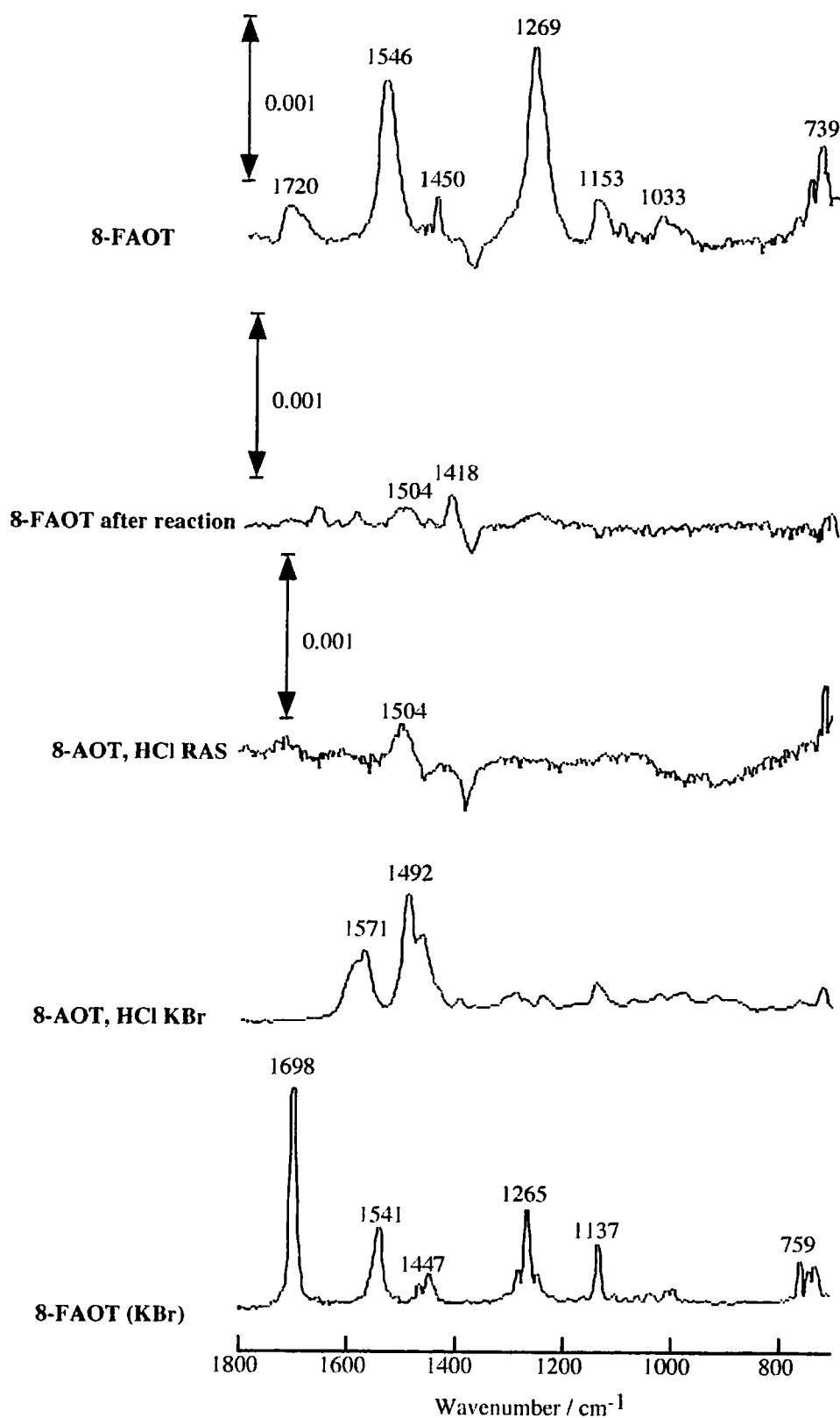


Figure 5-4-2. RAS spectra of modified Au surface.
 (a) 8-FAOT, (b) after reaction of 8-FAOT, (c) 8-AOT, HCl
 Transmission infrared spectra of 8-AOT, HCl and 8-FAOT.

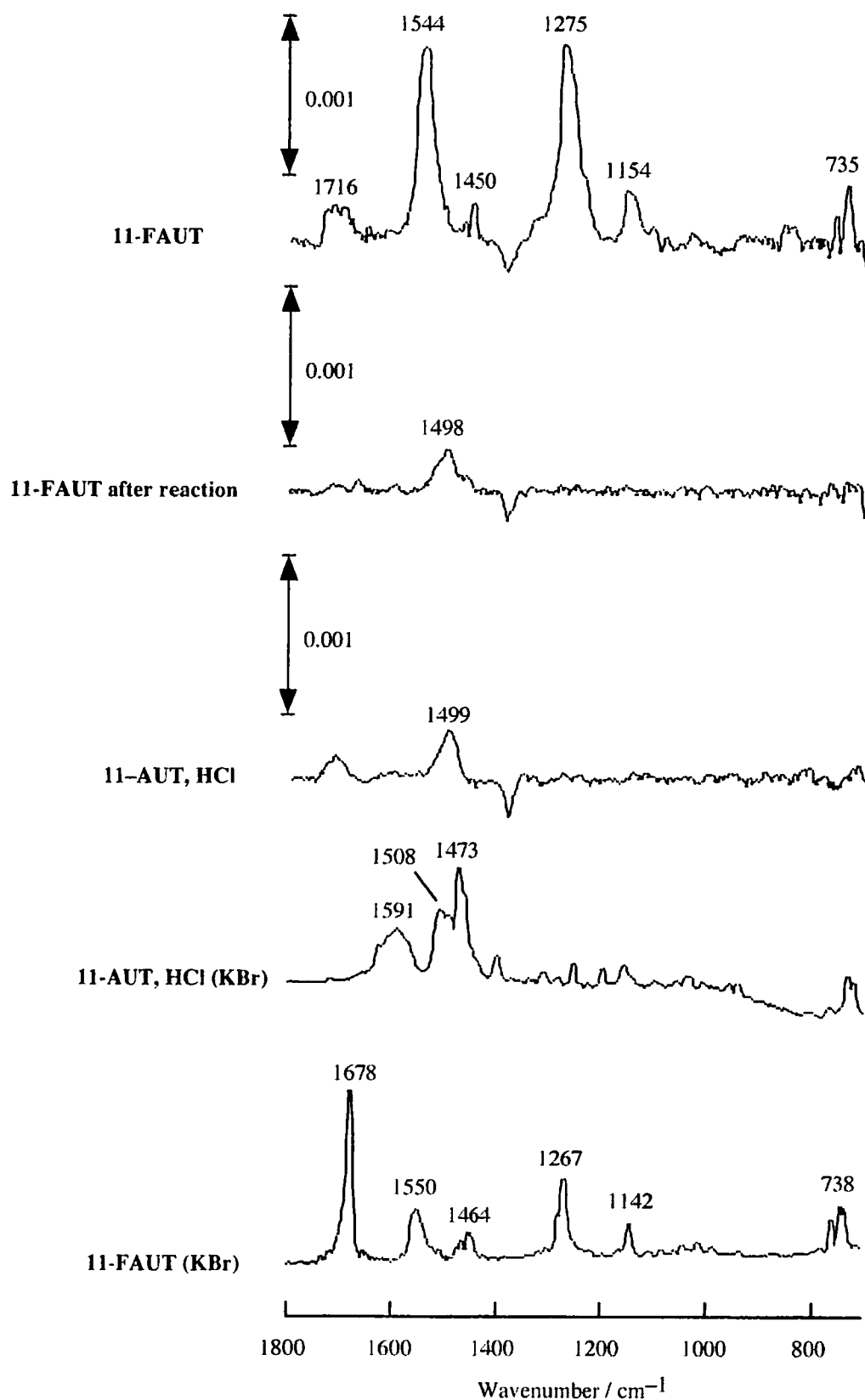


Figure 5-4-3. RAS spectra of modified Au surface.
 (a) 11-FAUT, (b) after reaction of 11-FAUT, (c) 11-AUT, HCl
 Transmission infrared spectra of 11-AUT, HCl and 11-FAUT.

5. 5. FT-SERS による脱保護反応および表面特性評価

反応によってアミノ基が単分子膜の表面に露出しているならば、前章で記述したように酸性溶液中においてアミノ基がプロトン化されイオン対を形成するはずである。そこで、FT-SERS 法によって 0.1 M HClO₄ 中での反応前後のスペクトルを調べた。

Figure 5-5-1 にそれぞれの Fmoc-NH-C_n-SH 修飾電極の 0.1 M HClO₄ 水溶液中での SERS スペクトルを示した。いずれのスペクトルも反応前は 1100 cm⁻¹ 付近に芳香環の振動と 1600 cm⁻¹ 付近にカルボニルの振動が観察された⁵⁾。しかし、933 cm⁻¹ 付近の過塩素酸イオンのシグナルは、末端が Fmoc 基によって保護されているため観察されない。一方、反応後のスペクトルから芳香環やカルボニルの振動に伴うピークは減少していることがわかる。また、933 cm⁻¹ に過塩素酸イオンのシグナルが新たに観察されていることから、末端は反応によって Fmoc 基がはずれ、新たに生じたアミノ基がプロトン化され過塩素酸イオンとイオン対を形成していることが確認された。また、このシグナルのピーク強度は、アルキル鎖長が長くなるにつれて減少していることがわかる。よって、反応後の膜もアミノアルカンチオール塩酸塩から単分子膜を作製したときと同様に、反応活性である末端アミノ基と電極との距離がアルキル鎖長に依存していることが明らかになった。

酸性溶液中でのアミノ基のイオン対形成反応が確認されたことから、反応後の単分子膜の電極表面上における表面 pK_a の評価を行った。評価は前章で行った方法を用いた。電極電位を 0 V に設定し、各 pH 溶液中における SERS スペクトルを測定したところ、Figure 5-5-2 に示すように pH 3 において明確な過塩素酸イオンのシグナルが観察された。このピーク強度は、pH の増加に伴い減少し、pH 6 以上ではほぼ一定になった。これは 6-AHT, HCl より作製された単分子膜と同様の挙

動を示した。そこで、このスペクトルから pKa を評価するため 933 cm^{-1} のシグナルを C-H 伸縮振動に相当する 2940 cm^{-1} のピーク強度を内部標準として用い、標準化した強度 (I_{933} / I_{2940}) を pH に対してプロットした (Figure 5-3-3)。このプロットから表面 pKa は 3.7 ± 0.3 と評価され、6-AHT, HCl より作製された単分子膜の表面 pKa が 3.8 ± 0.2 ⁶⁾であることから、6-FAHT から作製されたアミノアルカンチオールも最終的な単分子膜の性質は同じであると考えられる。

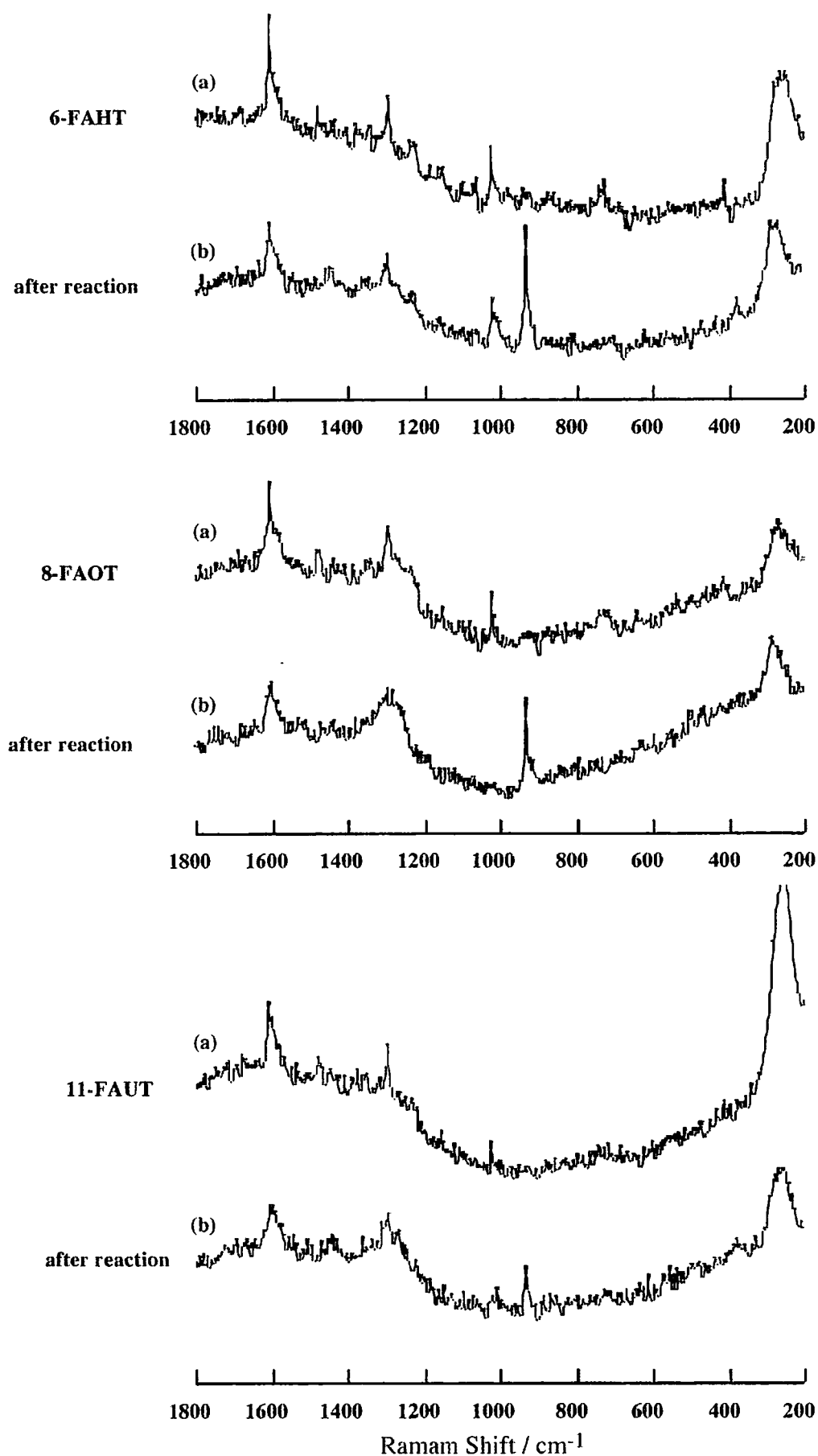


Figure 5-5-1. SERS spectra of (a) Fmoc-NH-C_n-SH, (b) after reaction modified Au electrode in 0.1 M HClO₄. (n = 6, 8, 11)

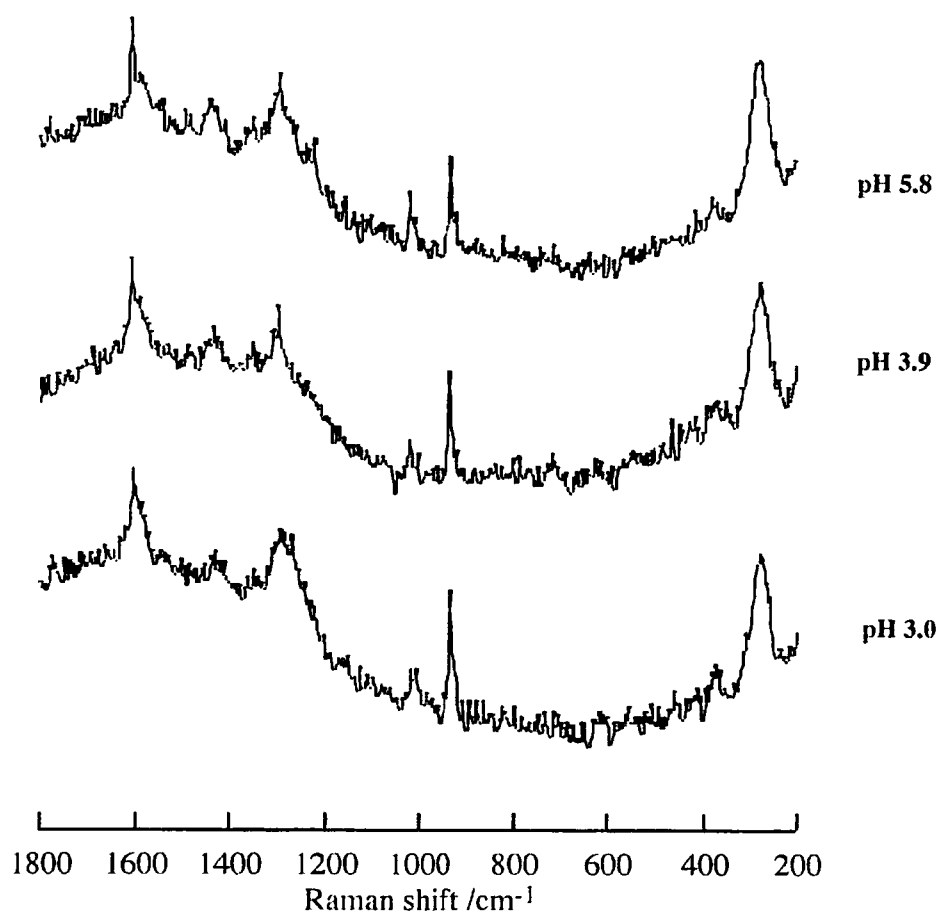


Figure 5-5-2. SERS spectra of 6-FAHT-modified electrode after reaction at 0V in various pH solutions.

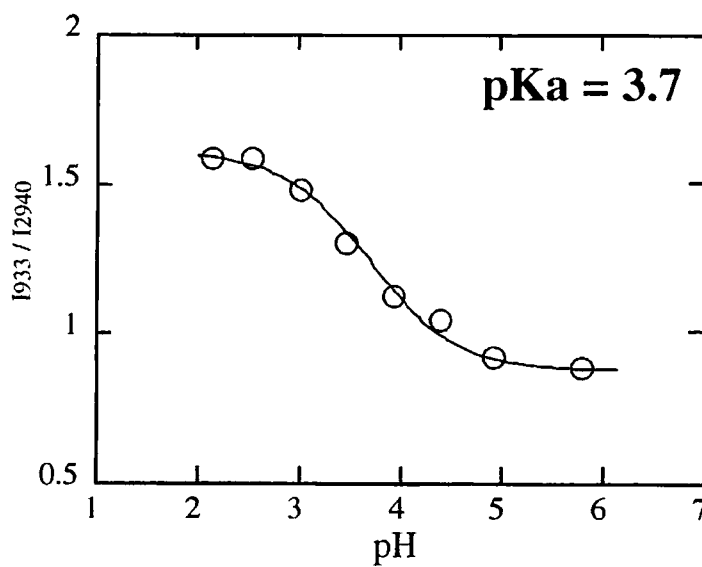


Figure 5-5-3. Plot of pH vs. I_{933} / I_{2940} at 6-FAHT modified electrode after reaction at 0V.

5.6. 結言

末端アミノ基を Fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) 基によって保護したアルカンチオール化合物を用いて、単分子膜を作製し、単分子膜中で脱保護反応を行うことによりアミノアルカンチオール単分子膜の構築を試み、それぞれの過程を電気化学法による還元脱離、末端アミン生成のための脱保護反応の赤外分光法による確認、生成された末端アミノアルカンチオール単分子膜の表面特性について評価した。

1. 電気化学的還元脱離によって算出された修飾量は、 9.95×10^{-10} (6-FAHT)、 9.19×10^{-10} (8-FAOT)、 9.19×10^{-10} (11-FAUT) mol / cm² と算出された。脱保護反応後の修飾量もほとんど変化しなかった。
2. 脱保護反応前の赤外スペクトルは、Fmoc 基に由来する吸収ピークが観察されたが、反応後はこれらのピークは消滅し、Fmoc 基が外れたことが確認された。
3. 反応によって生じた末端アミノ基の単分子膜は、電極表面での pKa は 3.7 ± 0.3 と評価され、6-AHT, HCl より作製された単分子膜の表面 pKa が 3.8 ± 0.2 であることから、6-FAHT から作製されたアミノアルカンチオールも最終的な単分子膜の性質は同じであると考えられる。

5. 7. 参考文献

- 1) M. Sprik, E. Delamarche, and B. Michel, *Langmuir*, **10**, 4116 (1994).
- 2) Joe Tien, Andreas Terfort, and George M. Whitesides, , *Langmuir*. **13**, 5349 (1997).
- 3) C. Zhong and D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11617 (1994).
- 4) Jennifer M. Brockman, Anthony G. Frutos, and Robert M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8044 (1999).
- 5) N. B. Colthup. "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy," Academic Press, Boston (1987).
- 6) Katsuhiko Nishiyama, Atsushi Kubo, Akihiro Ueda and Isao Taniguchi. *Chem. Lett.* . in press.

Chapter 6

種々の修飾電極を用いた NO の電気化学的検出

6. 1. 緒言

一酸化窒素 (NO) は、窒素と酸素の混合気体を放電の作用で反応させることで生成される、無色の気体である。NO は自然界にも存在し、その多くは地球上の生物によって生成され、その 1/15 程度が人間活動によって生成している。人工的に生成される NO の多くは自動車の排気ガスに含まれる。そのため、自動車の交通量の多い幹線道路周辺では、比較的高い NO 濃度が記録されており、NO は、NO₂ などとともに排気ガスによる大気汚染の原因物質と考えられてきた。

ところが一方では、発癌誘発の関連物質としての研究をきっかけとして生体内での様々な研究がなされてきた。その中で、Furchgott ら¹⁾の研究において、血管内皮へのアセチルコリンの作用が血管を弛緩させ、このとき血管内皮から内皮依存性弛緩物質 (EDRF) と呼ばれる非常に不安定な物質が放出され、この物質が強い弛緩作用を持つことがわかった。この EDRF は、ニトロ化合物の作用に類似しており、1987 年に Palmer ら²⁾により、フリーラジカルの NO であることが見出された。その後、NO の種々の生理作用が明らかになるにしたがい、NO は医学や生化学の研究者たちによって注目されるようになり、当初わずか 10 報あまりであった研究報告も、現在では年間 2,000 報をはるかに越え、その関連研究は爆発的な広がりを見せている³⁾。それらにより NO が、生体内に過剰に存在すると、インシュリン生成細胞の破壊を起こし

たり、高血圧症、糖尿病、貧血、動脈硬化症などが起こるなどといった多くの病気を進行させる主要因子となることがわかってきた。また、中枢神経系においては、逆行性伝達物質として働くなどといった多様な生理作用に非常に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

このように、NO の生理的役割が明らかになるにつれて、一部の専門領域だけではなく、循環器系、中枢神経系、免疫系などの幅広い分野で非常に興味をもたれるようになってきた。当然のこととして、生体系からこの NO を感度よく検出する方法が、広い範囲の研究者によって熱望されてきている。NO を特異的に検出、定量ができれば、NO がどのように生理作用を発現しているのか、常温で気体である NO を生体系はどのように制御しているのかなど重要な生理学上の知見が得られるものと考えられ、その学問上の意義は大きい。

NO の検出手法として求められることは、特異性、高感度、汎用性、操作の容易さであろう。生体系における NO は、半減期が非常に短く、O₂ により容易に亜硝酸イオン (NO₂⁻) や硝酸イオン (NO₃⁻) に酸化され、さらに、生理的条件下で極微量しか存在していないと考えられており、一般的に NO の直接測定は非常に困難である。

現在までに報告されている NO の測定法は、二つに大別できる。一つは NO の O₂ などによる酸化物である NO₂⁻ あるいは NO₃⁻ を測定する方法であり、他方は NO を直接測定する方法である。前者の NO₂⁻、NO₃⁻ に関しては NO の生理活性化合物としての役割が明らかになる以前から、錯体化学的興味または大気汚染との関係から精力的に研究が行われており、NO₂⁻、NO₃⁻ の測定法は従来から知られているものが多

い。後者の NO を直接測定する方法は、NO の生理活性が注目され始めてから盛んに研究され始めたものであり、化学発光法⁴⁾、ESR 法⁵⁾、電極法等が注目を集めている。

電極法による測定は、最初 K. Shibuki ら⁶⁾によって酸素電極である Clark type 電極を微小化した電極が作製され、この電極を用いてラットの小脳組織において NO の測定が行われた。その後、生体内における NO の直接測定を目的としてさまざまな電極の研究が行われ、Malinski ら⁷⁾により Ni (II) porphyrin type の電極が開発された。この電極法は、極微量の NO をリアルタイムに測定できる点で非常に優れた方法である。この電極を用いて生体系での NO の直接検出の報告もなされており^{8)~10)}、さらに類似するニッケル錯体を用いたセンサーの報告も活発に行われている¹¹⁾¹²⁾。しかしこれらの電極は、電極ごとの差が大きく正確な判定が難しい¹³⁾。

NO 関連の研究は最も注目を集めている分野ではあるが、NO の作用機構については詳しく分かっておらず、同じ系における NO の作用についてさえ、相反する結論が導かれ、論争が続いているのが現状である。たとえば、虚血 - 再灌流系では、NO は組織障害を起こすという報告に対し、NO は障害から保護するという報告があり、さらには NO は全く無関係であると言った報告もある。このように、互いに矛盾する報告がなされる理由としては、まず NO の不安定さが挙げられる。NO は非常に反応性の高いフリーラジカルであり、発生後ただちに多くの物質と反応して変化を続け、しかもその中の多くの反応物は生理活性を有している。NO の組織傷害における毒性や保護性がことに

よると NO そのものにあるのではなく、代謝物にあるかもしれないからである。そこで、NO の関連代謝物系において、これらを区別して評価することが大切となる。

そこで本研究では、電極への修飾物質としてミオグロビンやヘモグロビン等のヘムタンパク質の活性中心であるヘミンやその類縁体である鉄ポルフィリン錯体およびヘムタンパク質であるヘモグロビンを用いて、それらの修飾電極の NO センサー素子としての特性について検討した。

6. 2. 実験

6. 2. 1. 試料

- ・ 酸化窒素 (NO) ガス

> 99 %

日本酸素株式会社

・ NO 飽和溶液の作成は、窒素雰囲気下にしたグローブボックス内で、NO バブリング用セルを高純度窒素ガス、NO ガスでそれぞれ 30 min 程度バブリングし飽和溶液としたものを用いた。

飽和溶液の濃度は、1.9 mM¹⁴⁾とし、実験中に示した NO 濃度は、この飽和溶液のセル内の 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0) への添加量から NO の濃度を算出した。

6. 2. 2. 修飾物質

hemin (hemin chloride)

ヘミン $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4 = 652.0$

SIGMA Chemical

- ・ 合成ヘム

- ・ mesoheme IX : メソヘム

- ・ etiohemin (1,3,5,7-tetraethyl-2,4,6,8-tetramethylporphyrin) : エチオヘミン

- ・ tetramethylhemin (meso-tetramethylporphyrin) : テトラメチルヘミン

- ・ tetraethylhemin (meso-tetraethylporphyrin) : テトラエチルヘミン

- ・ monoazahemin (α -azamesoporphyrin XIII) : モノアザヘミン
- ・ diazahemin (β, γ -diazamesoporphyrin III) : ジアザヘミン

これらの合成ヘムは、共同研究に基づいて京都薬科大学薬品物理化学教室の根矢三郎先生から頂いた。それぞれの構造を hemin と比較して Figure 6-2-1 に示した。

ヘモグロビン (Hb) : From Horse Heart

SIGMA Chemical

精製法

イオン交換カラムクロマトグラフ法により精製した。溶離液として Phosphate buffer (pH = 7.0) を用い、30 min \times 10 回湿潤した樹脂をカラムに詰め、半日溶離液を流して平衡化させた後、200 mg の Hb を 5.0 ml の溶離液にとかしたものを流した。流出してきた Hb 溶液を限外濾過し、UV スペクトルにより濃度を決定した。($\epsilon = 1.35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hb 還元体 431 nm))

6. 2. 3. 支持電解質

- ・ 過塩素酸ナトリウム

(Chapter 2、 2. 2. 3 参照)

6. 2. 4. 緩衝溶液

- ・ Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate

リン酸二水素ナトリウム・二水和物 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 156.01$

試薬特級 和光純薬工業株式会社

- ・ Disodium Hydrogenphosphate 12-Water

リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 358.14$

試薬特級 和光純薬工業株式会社

リン酸に水素ナトリウム 20 mmol とリン酸水素ナトリウム 26.3 mmol を Milli - Q 水に溶かし 1 L とし、pH 7.0 (m = 0.1) となったものを使用した。

6. 2. 5. 溶媒

- ・ メチルアルコール Methanol $\text{CH}_3\text{OH} = 32.04$

試薬特級 99 % ナカライテスク(株)

- ・ 水
- ・ エタノール

(Chapter 2、 2. 2. 4 参照)

6. 2. 6. その他

- ・ Sodium Nitrate

硝酸ナトリウム $\text{NaNO}_3 = 84.99$

和光純薬工業株式会社 試薬特級

- ・ Sodium Nitrite

亜硝酸ナトリウム $\text{NaNO}_2 = 69.00$

半井化学薬品株式会社 試薬特級

- ・ Nafion® perfluorinated ion-exchange powder (Figure 6-2-2)

ナフィオンイオン交換膜

Aldrich Chemical

ナフィオン修飾電極の作製法

5 wt% ナフィオン原液をエタノールを溶媒として 0.25 wt% とし、それを 10 μl 電極上にキャストし、風乾させて使用した。

- ・ New VISTA (洗浄用界面活性剤)

エー・アイ・シー(株)製

蒸留水に溶かして使用した。

- ・ ダイヤモンドペースト (0.25 μm , 水性)

Engis 社製

- ・ ダイヤモンドペースト (6.0 μm)

BAS 社製

- ・ Nitrogen gas 窒素ガス

内村酸素株式会社の高純度窒素 (99.999 % 以上) を使用した。

6. 2. 7. 電極

- ・ 作用極 Working electrode (W.E.)

Glassy carbon electrode (GC) (直径 1 mm)(Figure 6-2-3(a))

グラッシーカーボン電極

Bioanalytical systems Inc. (BAS)

電極は、ダイヤモンド研磨剤 (6.0 μm) とダイヤモンド研磨用パットを使用して研磨を行い、超音波洗浄機を用いて研磨剤を洗い落とした。再び同様にダイヤモンド研磨剤 (0.25 μm) で研磨したあと超音波洗浄を行い、 Milli-Q 水を用いて洗浄した。

- ・ 酸化インジウム電極 : Indium oxide (In_2O_3) electrode : (Figure 6-2-3(b))

厚さ 0.3 mm のガラスの両面に蒸着した酸化インジウム板に、ニッケル線を銀ペーストで接続し、アラルダイト (エポキシ系強力接着剤) で固定し、さらにシリコンでアラルダイトをコーティングして作製した。作製した電極は生化学界面活性剤 (VISTA) で適当な時間超音波洗浄した後、純水 (Milli -Q 水) で 5 分毎に水を交換しながら 15 分程度超音波洗浄し使用した。電極面積は 0.5 × 0.5 cm とした。

- ・ 対極、参照電極は Chapter 2、 2. 2. 2 参照のこと

6. 2. 8. 測定方法および測定機器

- ・ Cyclic voltammetry (CV)

CV 測定に用いたセルを Figure 6-2-4 に示す。溶液は、測定前に高純度 N₂ ガスで約 20 分バブリングすることにより、溶液中の溶存酸素を除去し、測定時にはバブリングをやめ、N₂ 雰囲気下で行った。測定温度は 25 °C とした。

【測定機器】

Electrochemical Analyzer :

BAS - 50 W Electrochemical Analyzer

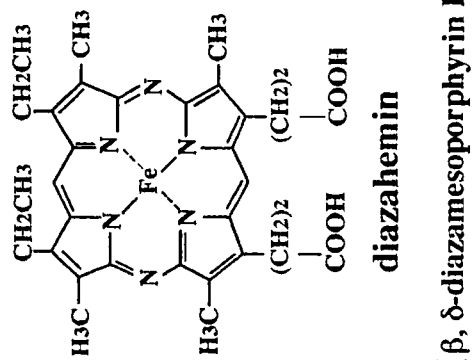
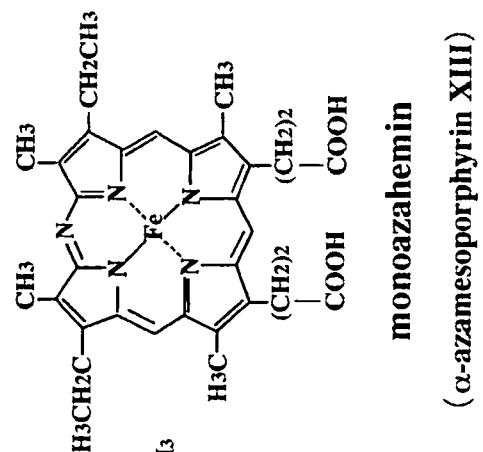
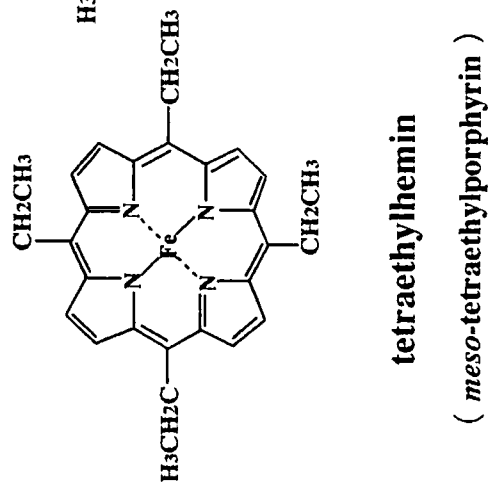
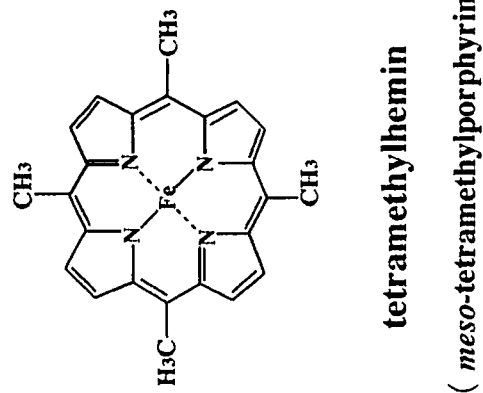
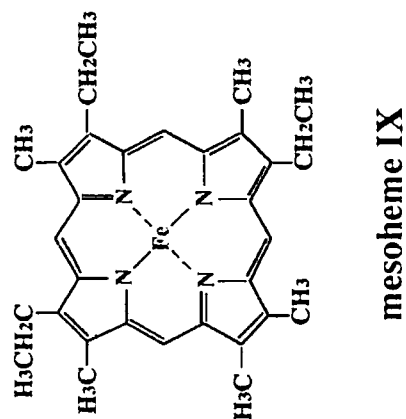
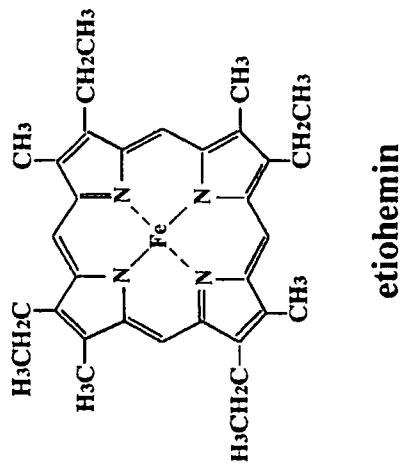
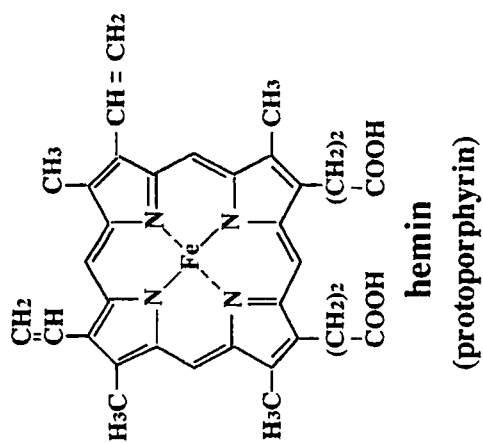


Figure 6-2-1. Structures of modified hemes.

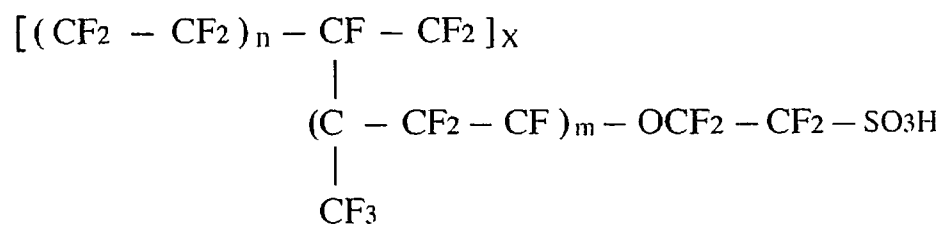


Figure 6-2-2. Structure of Nafion®

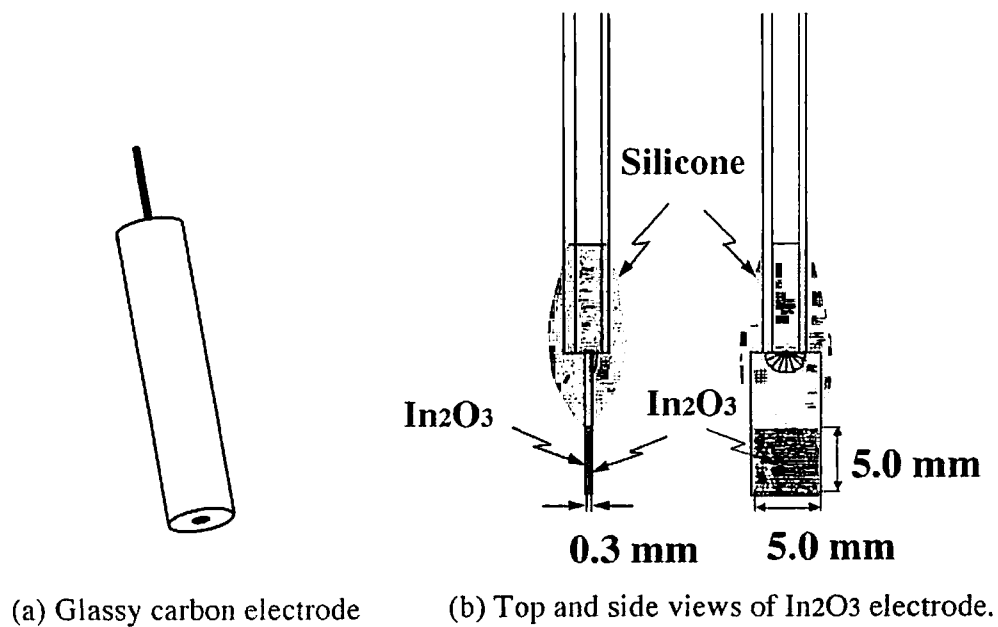


Figure 6-2-3 Working electrode.

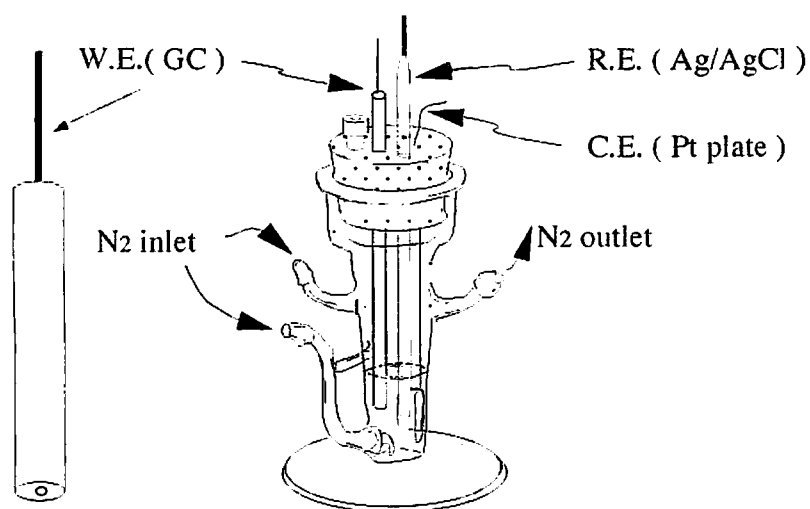


Figure 6-2-4. Cell for cyclic voltammetry.

6.3. NO の物理・化学的性質

まず NO の物性について構造、物理的性質、化学的性質についてまとめた。

NO は、次のような共鳴構造を取っていると考えられている。



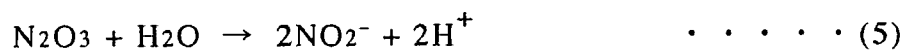
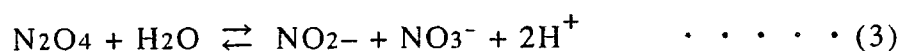
N と O の結合距離は、気体で 1.151 Å で、二重結合で期待されている結合距離 1.18 Å と三重結合で期待される結合距離 1.06 Å との間である。N と O の結合次数は 2.5 、結合エネルギーは 149.9 kcal / mol である。NO の電子配置は CO および N₂ よりも電子が一つ多く、この電子は反結合性軌道を占めている。不対電子をもっているため常磁性であり、したがって、フリーラジカルとしての性質を示す。π* 軌道の電子は比較的容易に失われ、ニトロシルイオン (NO⁺) を生ずる。除かれた電子は反結合性軌道からでていくため、結合は NO よりも NO⁺ のほうが強い³⁾。

物理的性質

NO は酸化窒素のなかで最も低い融点 (- 163.6 °C) と沸点 (- 151.8 °C) をもち、常温では気体で、また、可視光を吸収しないので無色である。無臭で水に対する溶解度はきわめて低い。ただし、NO は、水 (25 °C で 1.9 mM) に対してよりもトルエン (同、11 mM)、メタノール (同、14 mM) などの非水溶媒によく溶けることが知られている¹⁴⁾。

化学的特性

・NO は、酸素のない条件下ではかなり安定に存在する。しかし、酸素が存在すると直ちに反応して・NO₂ となり、水中では迅速に加水分解されて NO₂⁻ と NO₃⁻ になる（式 (1)～(5)）。実際には式(4)、(5)の反応は式(3) の反応よりも 10 倍程度速いため、NO の水中での単純な加水分解ではほとんど NO₂⁻となる¹⁵⁾。



また、NO は容易に酸化または還元されるため、還元剤としても酸化剤としても働く。また金属との親和性が高いため錯体もつくる。

6. 4. 未修飾カーボン電極上における NO の電気化学的挙動

酸化反応

Figure 6-4-1 に、0 ～ + 1.3 V の掃引範囲でグラッシーカーボン（GC）電極を用いて CV を測定した結果を示した。このとき NO の添加にともない +0.80 V、+1.15 V 付近にそれぞれ酸化波が観測された。Figure 6-4-2 に示すように、どちらのピークも NO 濃度の増加によって電流値の増加が観測されたことから、NO または NO 関連物質の酸化波であると考えられる。

還元反応

Figure 6-4-3 に、0 ～ - 1.2 V の掃引範囲でグラッシーカーボン（GC）電極を用いて CV を測定した結果を示した。このとき NO の添加にともない - 0.95 V 付近に還元波が観測された。この還元波も Figure 6-4-4 に示すように、酸化波と同様に NO 濃度の増加によって電流値の増加が観測されることから、NO または NO 関連物質の還元波であると考えられる。

NO 代謝物の影響

NO は、非常に活性なフリーラジカルであり、水溶液中で亜硝酸イオン（ NO_2^- ）、硝酸イオン（ NO_3^- ）などの酸化物に変化する。そこでこれらの物質が GC 電極を用いたときどのような挙動を示すかを調べた。Figure 6-4-5、Figure 6-4-6 に示すように、 NO_3^- は、酸化反応、還元反応のどちらについても測定範囲内では全く影響を与えないことが

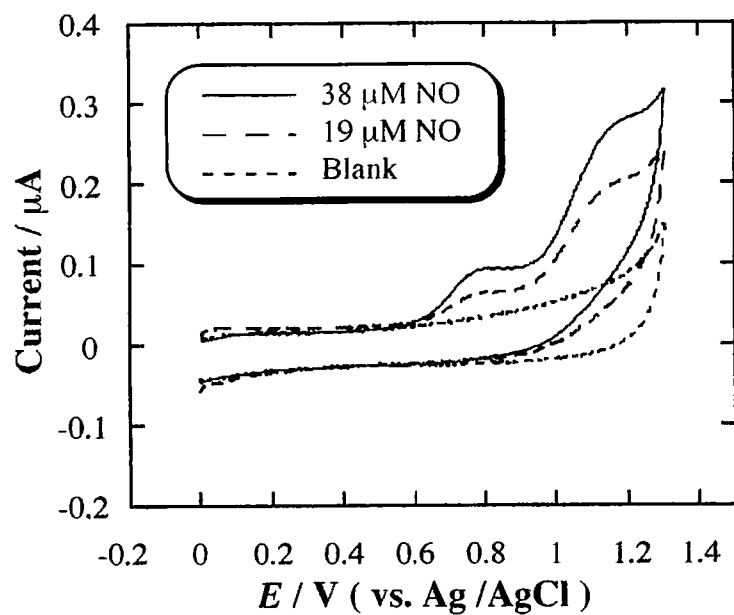


Figure 6-4-1. Cyclic voltammograms of NO at a bare GC electrode in PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

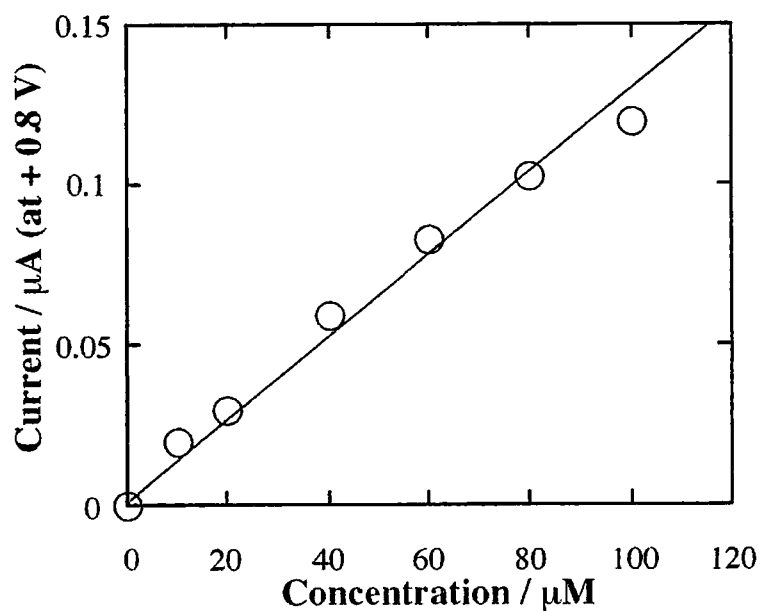


Figure 6-4-2. Calibration curve for NO obtained by using a bare GC electrode at +0.80 V.

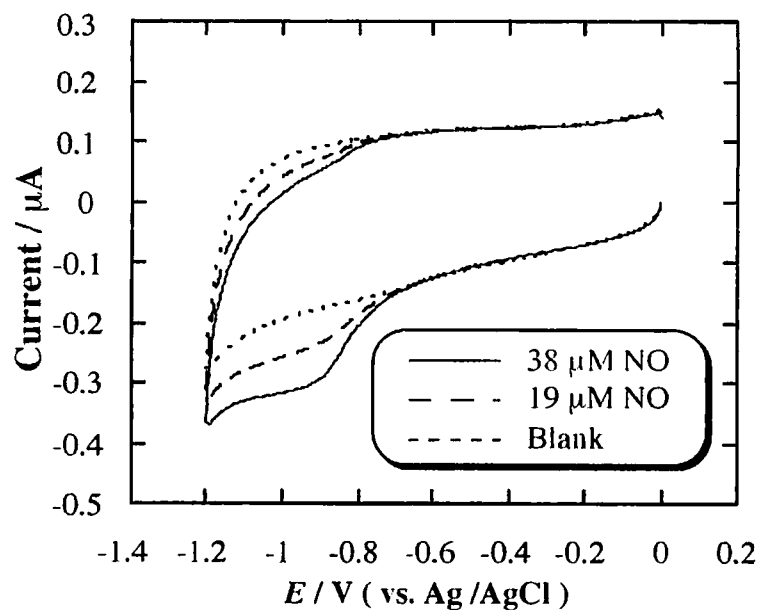


Figure 6-4-3. Cyclic voltammograms of NO at a bare GC electrode in PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

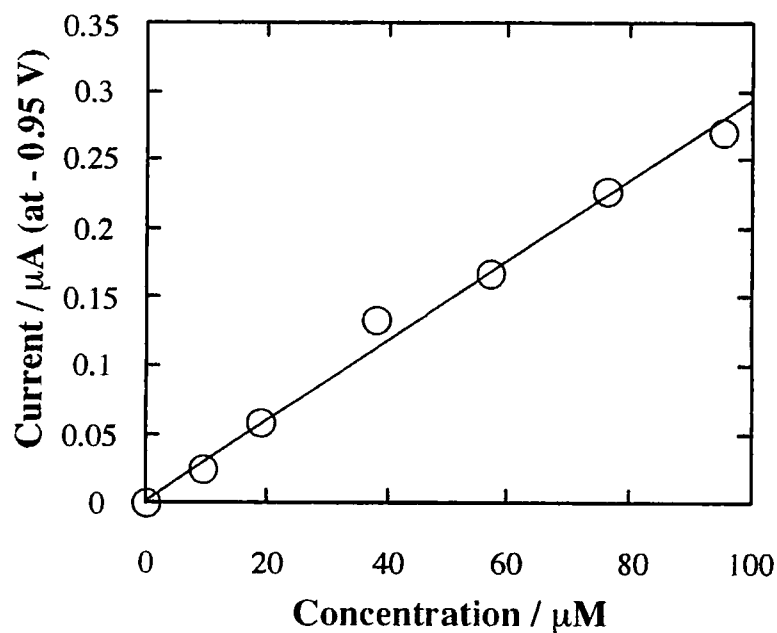


Figure 6-4-4. Calibration curve for NO obtained by using a bare GC electrode at -0.95 V.

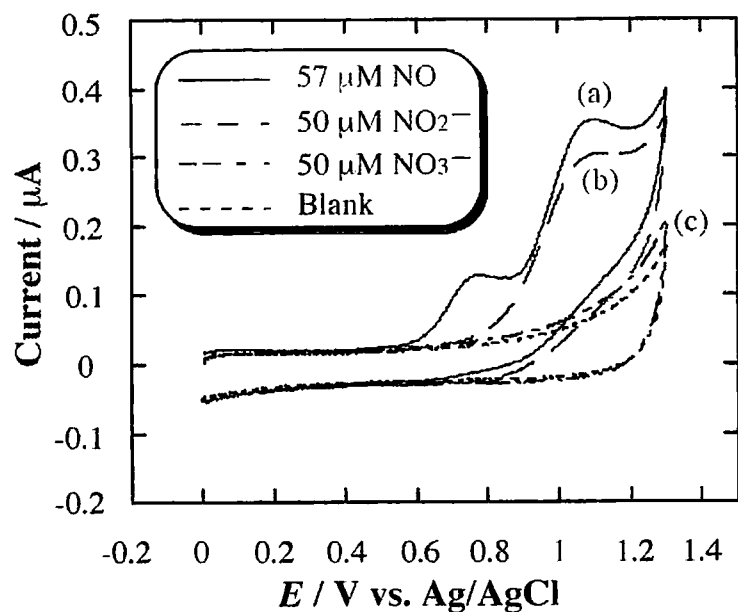


Figure 6-4-5. Cyclic voltammograms at a bare GC electrode in PBS (pH 7.0) with (a) 57 μM NO and (b) 50 μM NaNO₂ and (c) 50 μM NaNO₃ , S. R. = 200 mV /s.

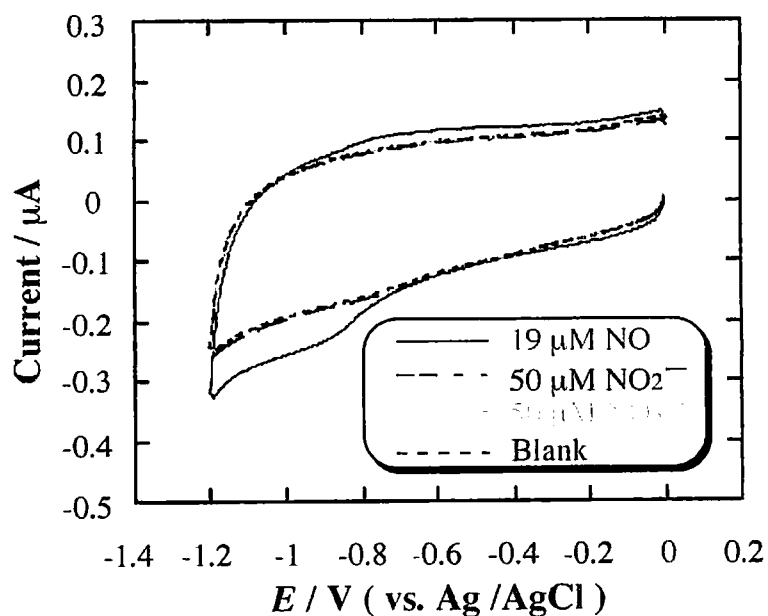


Figure 6-4-6. Cyclic voltammograms at a bare GC electrode in PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

わかった。一方、 NO_2^- は、+1.15 V 付近でその酸化ピークが観察されが、還元反応においては NO_3^- と同様全く影響は見られなかった。

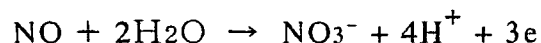
NO を電極で直接測定する場合、特に生体内では亜硝酸イオンやアスコルビン酸塩やその他のアニオン性化学種が、検出に対し干渉する恐れがある。センサーとしての電極を作製する際にはこれらの阻害を防ぎ、NO だけを選択的に検出する必要があり、そのためには工夫が必要である。

NO_2^- のようなマイナス電荷を持つ物質を電極表面より排除するために、カチオン交換膜である Nafion が広く利用されている (Fig. 2-3-1)。そこで、GC 電極上に 0.25 wt. % Nafion 溶液を 10 μl キャストし、室温で風乾させた Nafion 修飾 GC 電極を用いてその効果を調査した。Nafion を修飾すると、期待どおりに NO_2^- の酸化に伴うピークはほとんど観察されなくなった。

また、NO を添加して測定したところ、Nafion 膜を修飾する前に観察されていた二つの酸化ピークのうち、 NO_2^- によるものだと考えられたピークは観察されなくなり、NO の酸化によるピークのみが観察された (Figure 6-4-7)。このことから NO は、Nafion 膜の中を通過するのに対して、 NO_2^- は通過しないことがわかる。すなわち、マイナス電荷を帯びた Nafion 膜で電極表面をコートすると、溶液中の NO_2^- は静電的反発のために電極表面に近づけなくなり、その結果、 NO_2^- の酸化を抑えることができる。

この結果、Nafion 膜を用いることで NO_2^- の影響を受けずに NO を酸化できることが示された。

電極上での NO の酸化反応が次式にしたがって進行しているとすると、反応電子数は 3 であり¹⁶⁾、



二つの酸化波の電流の大きさが約 1 : 2 であることから考えて + 0.80 V 付近の酸化ピークは、おそらく



で表される 1 電子反応による NO の酸化反応であり、+ 1.15 V 付近に観測される二つ目の酸化ピークは、おそらく NO₂⁻ の 2 電子反応の酸化反応

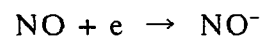


であると考えられる。

Figure 6-4-8 に示す還元反応においては Nafion を電極上に修飾した場合、未修飾の場合いずれも同様に - 0.95 V における還元ピークが観測されたことから、この還元ピークは NO の還元によるものと考えられる。

NO の還元反応は一般に 1 電子反応により進行する¹⁷⁾ことが知られており、

- 0.95 V 付近の還元ピークは、おそらく次式により進行すると考えられる。



これらのことから NO の未修飾カーボン電極上での電気化学反応は、酸化反応および還元反応がそれぞれ +0.80 V 、 - 0.95 V 付近で観測されると推測される。

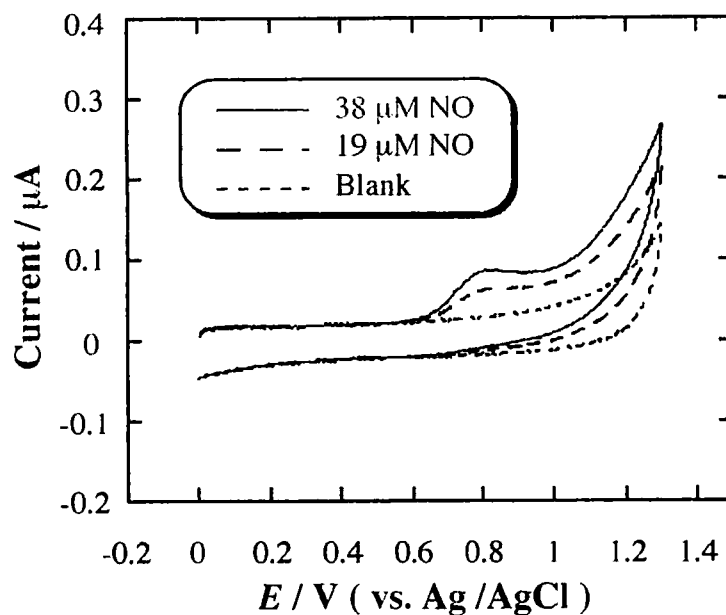


Figure 6-4-7. Cyclic voltammograms of NO at a Nafion coated GC electrode in PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

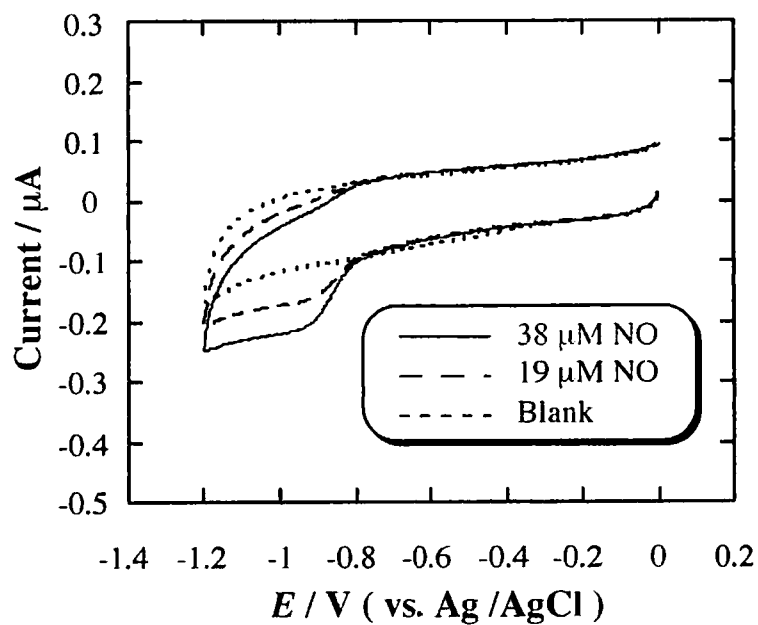


Figure 6-4-8. Cyclic voltammograms of NO at a Nafion coated GC electrode in PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

6. 5. Hemin 修飾電極による NO の電気化学検出

6. 5. 1. 電位掃引による電極への修飾

100 μ M hemin のメタノール溶液中において +0.3 ~ -0.9 V の掃引範囲で繰り返し掃引することにより GC 電極上への hemin の修飾固定化を試みた (Figure 6-5-1)。この電極を超純水で洗浄したあと、0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0) 中での blank の測定を行うと、hemin の中心金属イオンの Fe(III) / Fe(II) に基づく酸化還元ピークが -0.3 V 付近に観測された (Figure 6-5-2)。この電気化学応答は pH 7.0 の PBS 溶液中での CV において、ピークセパレーションが約 30 mV と狭いこと、また Scan rate 変化においてピーク電流値 (ipc) が Scan rate に比例したことから、hemin が電極上に吸着修飾したものであることを確認した (Figure 6-5-3、6-5-4)。

電極上に吸着した hemin の吸着量は、pH 7.0 の PBS 中で測定された掃引速度 200 mV /s のサイクリックボルタモグラムの還元ピーク (ipc) のピーク面積から次式を用いて単位面積あたりの hemin 吸着量を算出したところ、およそ 2.14×10^{-9} mol / cm² であった。

$$\text{吸着量} = \frac{(X \times Y \times \text{ピーク面積} / \text{S. R.} \times n) / 96485}{\text{電極面積}}$$

ここで、X は X 軸感度 (V / cm)、Y は Y 軸感度 (A / cm)、n は反応電子数である。

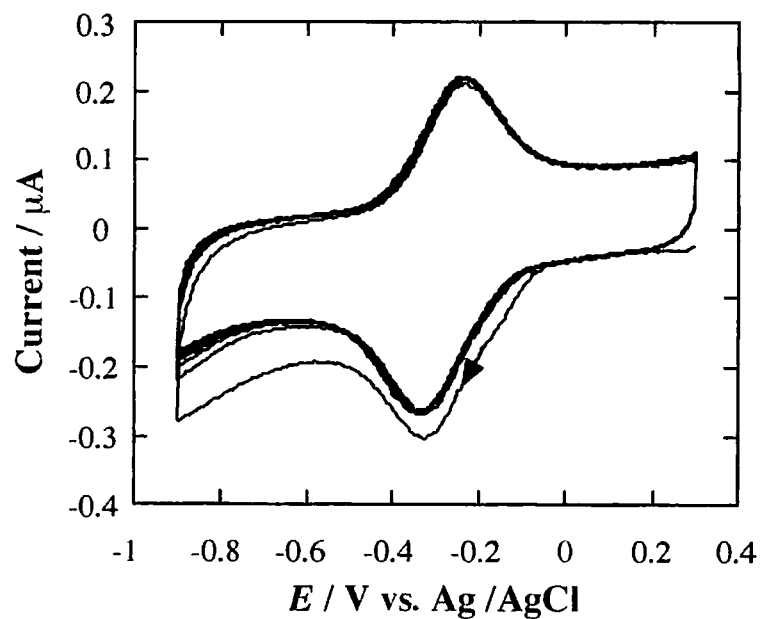


Figure 6-5-1. Cyclic voltammogram of 100 μM hemin in MeOH + 0.1 M NaClO₄ at a GC electrode, S. R. = 200 mV /s.

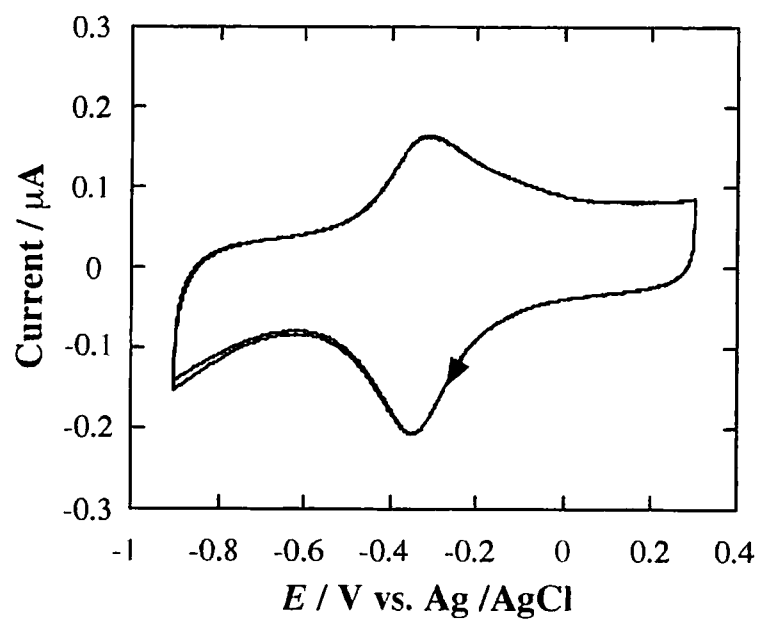


Figure 6-5-2. Cyclic voltammogram of hemin modified GC electrode in 0.1 M PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

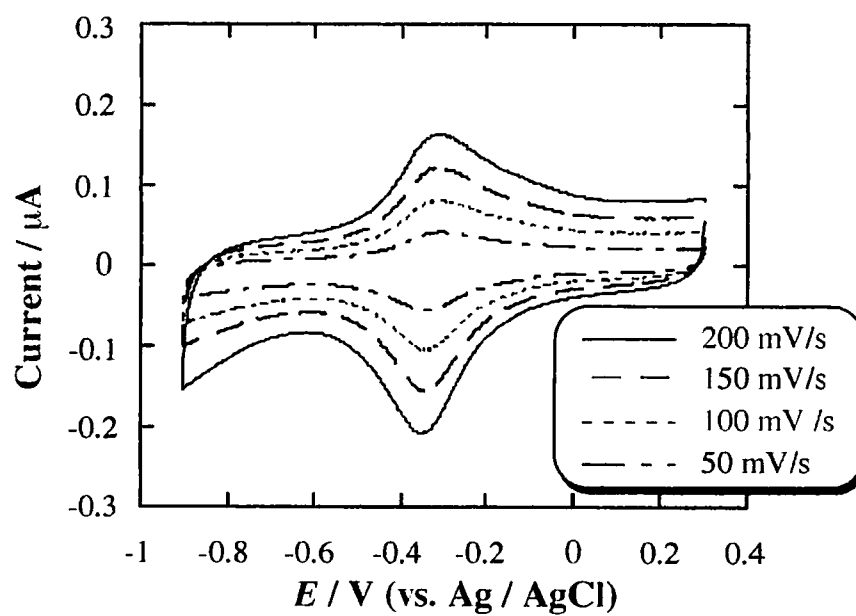


Figure 6-5-3. Cyclic voltammograms of hemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0) at various scan rates.

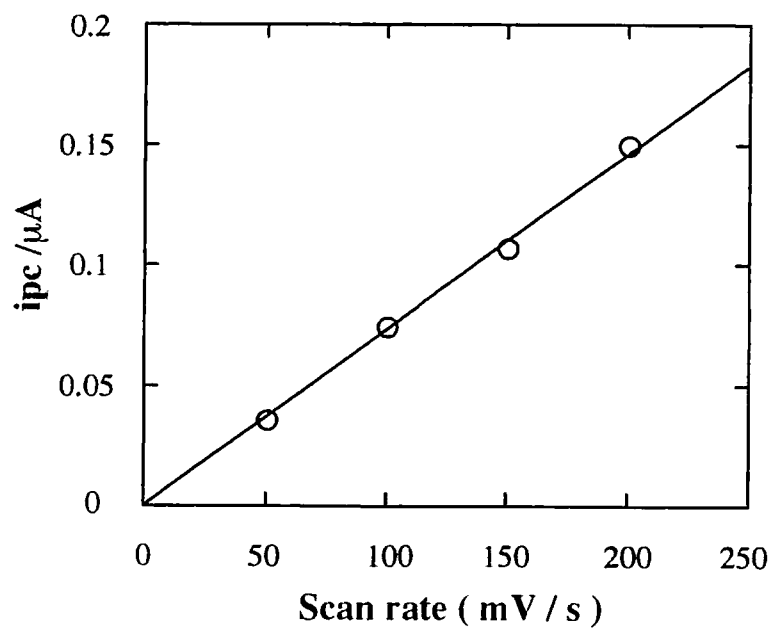


Figure 6-5-4. Plot of i_{pc} vs. scan rate.

Hemin は、メタノールと水への溶解度の違いにより GC 電極上から脱離せずに吸着しているものと考えられる。

この修飾電極を用いて NO の検出を試みた。pH 7.0 の PBS (2 ml) 中に NO を添加 (20 μ l) したところ、 -0.78 V 付近に還元ピークが観測された。この電位における還元ピークは 亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) や硝酸ナトリウム (NaNO_3) では観測されなかった (Figure 6-5-5)。このことから -0.78 V 付近における還元ピークは、NO の還元に伴うピークと考えられ、NO に対して選択性をもつと考えられる。

また、NO の濃度変化に対する応答を調べた結果、Figure 6-5-6 に示すように、溶液中の NO 濃度の増加にともない -0.78 V 付近における NO の還元ピーク電流値の増加が観測され、一方、これに伴い -0.3 V 付近の $\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)}$ に基づく酸化還元ピークの減少が確認された。また、この -0.78 V 付近の還元電流値の増加は、NO の濃度が約 $100 \mu\text{M}$ 程度まで直線的に増加した (Figure 6-5-7)。

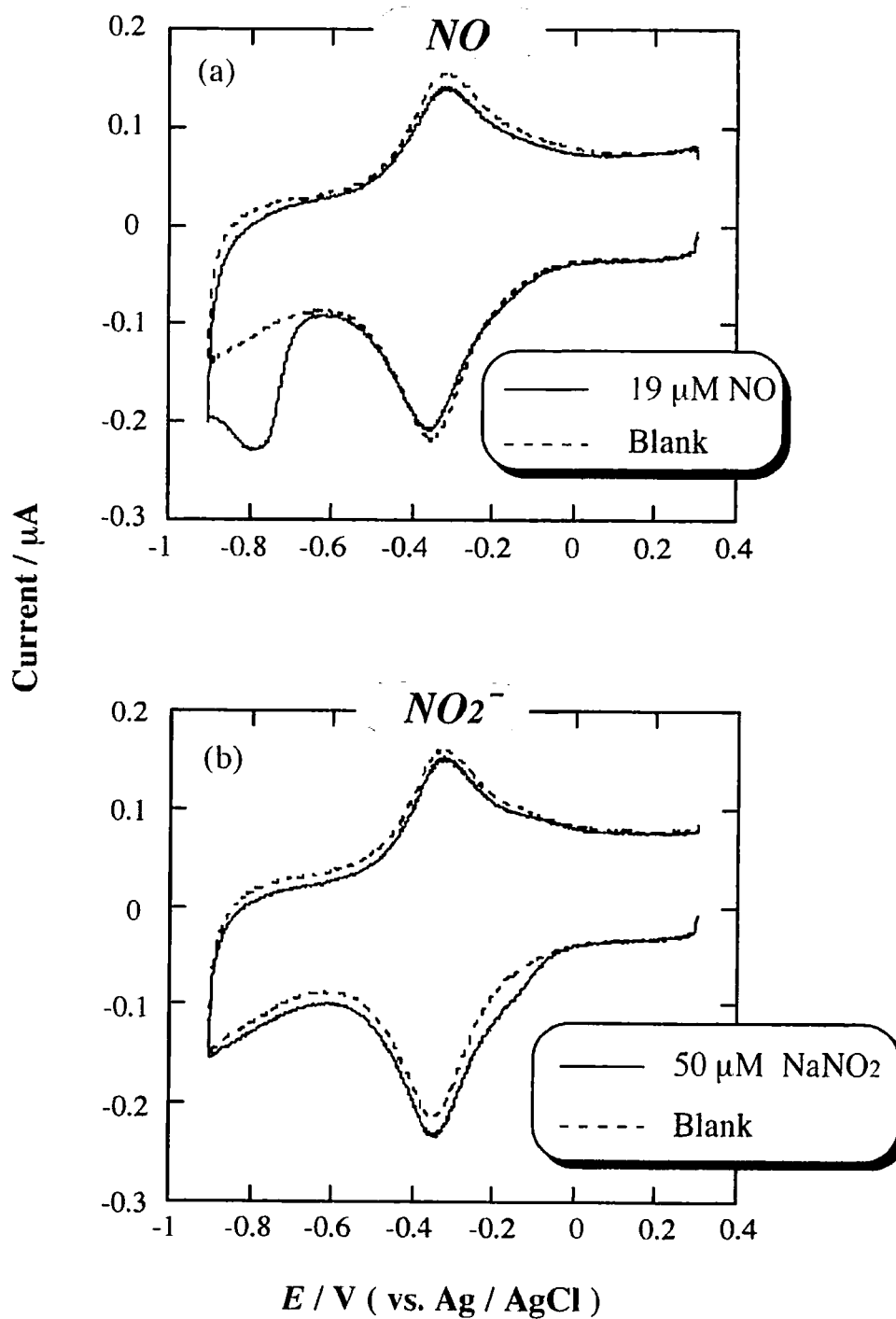


Figure 6-5-5. Cyclic voltammograms of hemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0) after addition of (a) NO (19 μM) , (b) NaNO₂ (50 μM), (Scan rate = 200 mV /s).

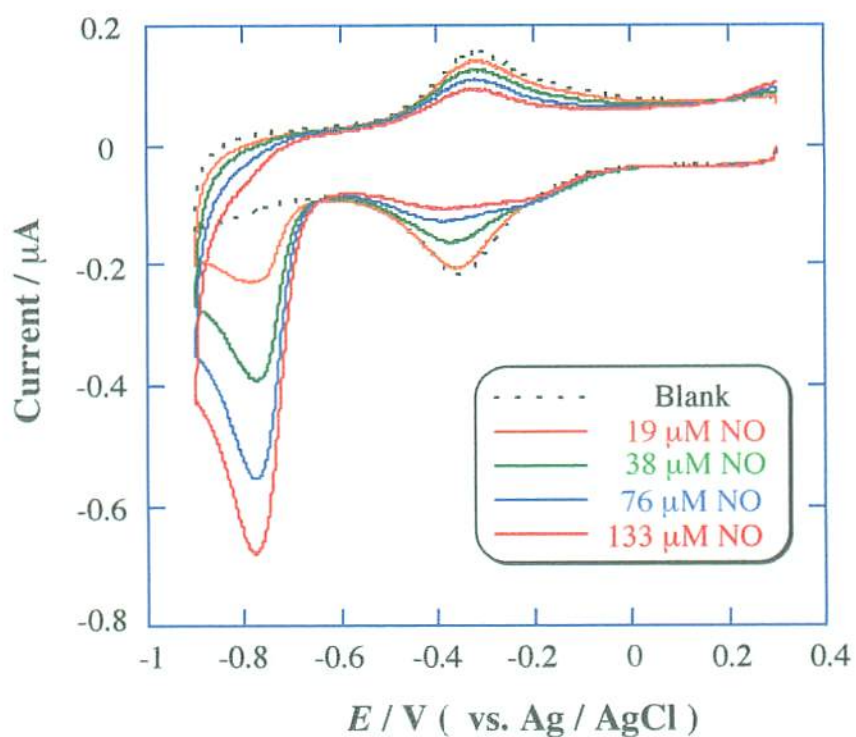


Figure 6-5-6. Cyclic voltammograms of NO in various concentrations at a hemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0), S. R. = 200 mV /s.

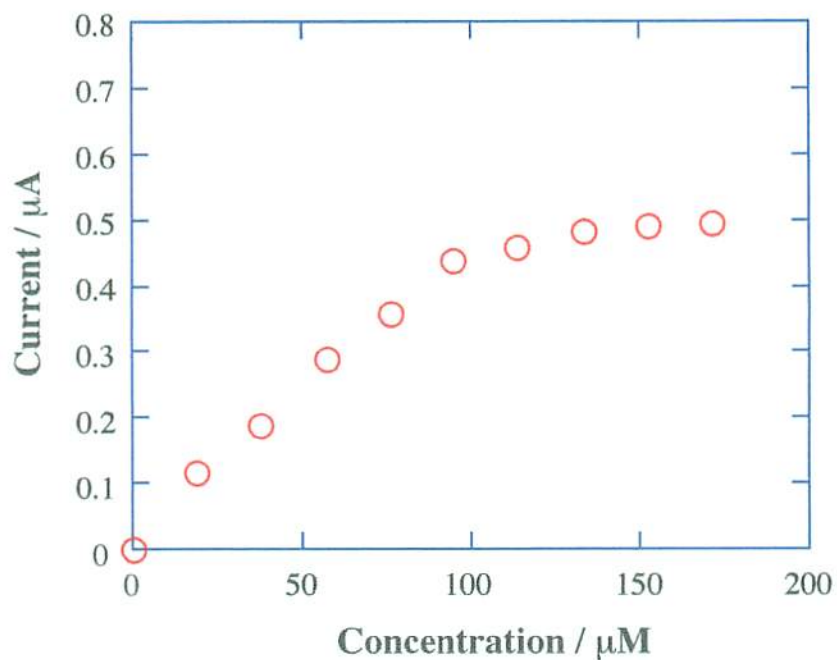


Figure 6-5-7. Plot of current at -0.78 V as a function of NO concentration.

6.5.2. キャスト法による hemin の電極への修飾

GC 電極上への hemin の修飾は、hemin の電極上への物理吸着により電極上に固定化されているため、hemin のメタノール溶液を GC 電極上にキャストし、風乾させることでも hemin を電極上に固定化することは可能である。この修飾方法と電位掃引法での NO に対する反応性の違いについて検討を行った。

キャスト法により作製された hemin 修飾電極において、電極上に修飾された hemin の吸着量は電位掃引法で作製した場合と同程度の修飾量であったが、この電極上での -0.78 V 付近に観測される NO の還元ピーク波形は、電位掃引法により作製した hemin 修飾電極と比較してブロードなものとなり、NO 還元電流値も減少した(Figure 6-5-8)。この原因はおそらく、GC 電極上での hemin の吸着状態が異なるためと考えられるがその詳細は不明である。このことから GC 電極上への鉄ポルフィリン錯体の修飾は、NO の検出ということを考慮に入れた際、キャスト法による修飾固定化よりも電位掃引法による修飾固定化のほうが有効であると考えられる。

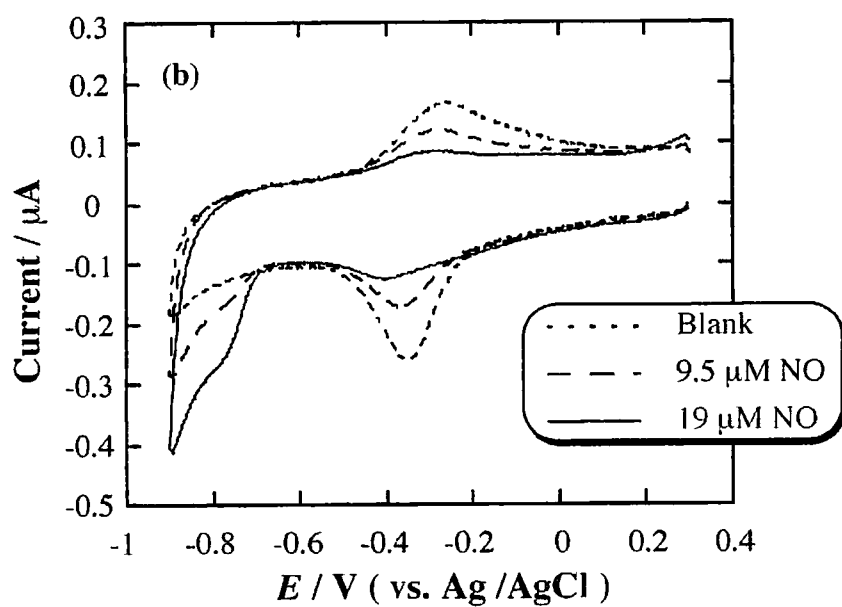
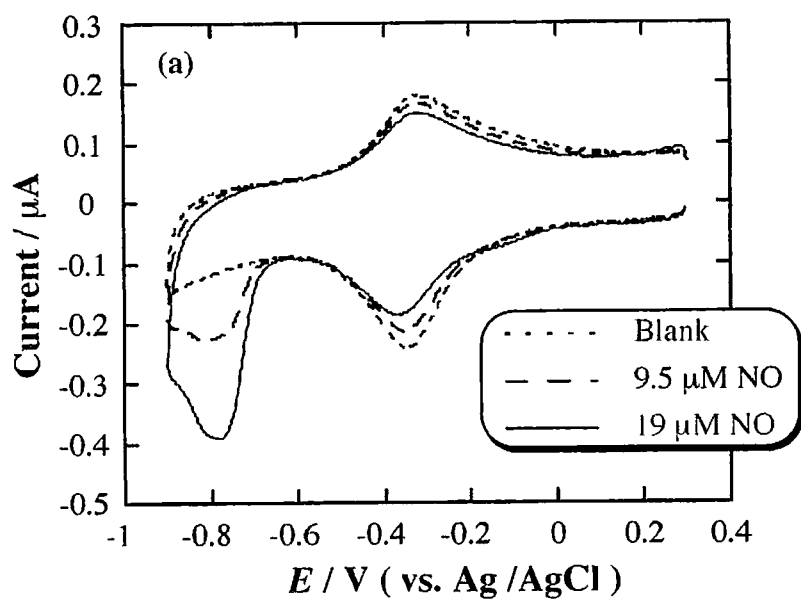


Figure 6-5-8. Cyclic voltammograms of NO at a hemin modified GC electrode prepared by (a) potential scanning and (b) casting methods.

6. 6. 反応機構

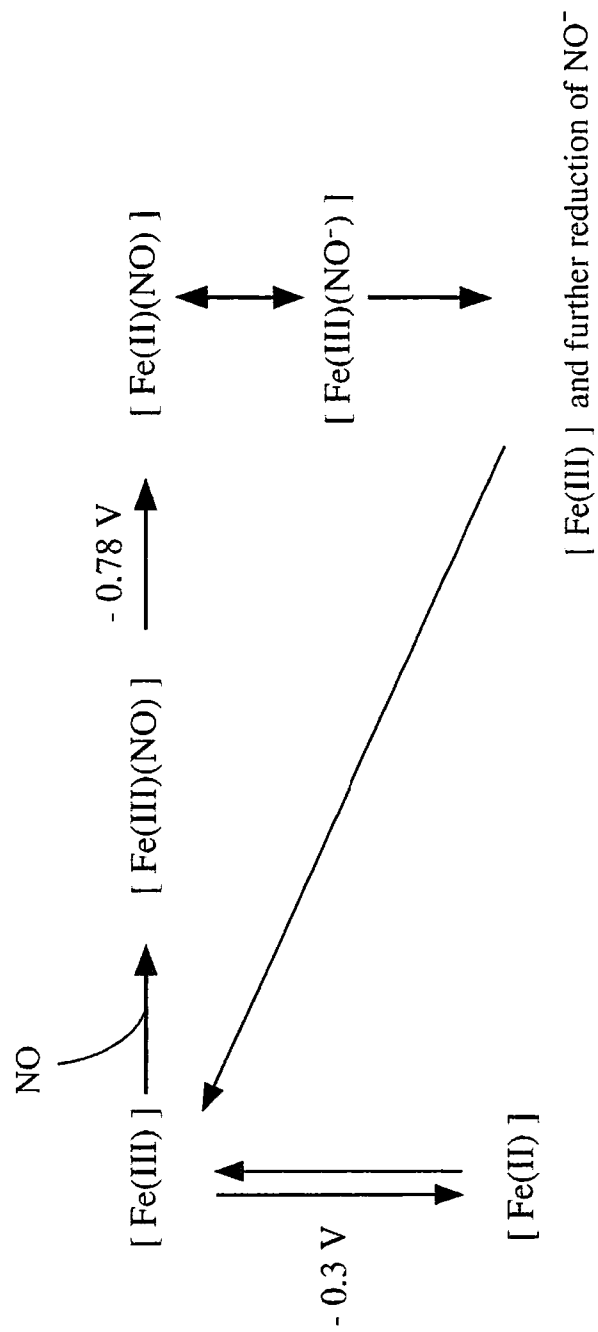
これまでも鉄ポルフィリン錯体は酸性溶液中において、亜硝酸イオン (NO_2^-) のアンモニア (NH_3) への有効な触媒として様々な研究の報告がなされている^{18)~21)}。これらの研究において、 NO_2^- は、酸性溶液中において次式のように不均化反応によりフリーの NO を生成する。



生成した NO は、鉄ポルフィリン錯体の活性中心である Fe(III) に対し、axial 配位子としての高い親和性によりニトロシル錯体を形成することが知られている。本研究において得られたサイクリックボルタモグラムの結果についてもこれらの研究の結果に類似したものが得られたことから、本研究においても同様の反応機構により反応が進行するものと推測される。

本研究における CV 測定の結果から、鉄ポルフィリン錯体と NO との相互作用は次のように考えられる。まず、電極上に修飾された鉄ポルフィリン錯体の Fe(III) に NO が配位し、 $[\text{Fe(III)} - \text{NO}]$ のニトロシル錯体を形成する。このときに NO が配位していない鉄ポルフィリン錯体は、 -0.3 V 付近で Fe(III) / Fe(II) に基づく酸化還元波形が観測される。NO 添加量の増加に伴い -0.3 V 付近での Fe(III) / Fe(II) の酸化還元電流値の減少し、一方、NO が配位した $[\text{Fe(III)} - \text{NO}]$ は、 -0.78 V 付近で還元されて $[\text{Fe(II)} - \text{NO}]$ となる。ここで -0.78 V 付

近の還元電流は、 -0.3 V 付近のそれよりも数倍大きいことから、分子内において Fe(II) から NO への電子移動をおこなうことによって $[\text{Fe(III)}-(\text{NO}^-)]$ を生成する。 $[\text{Fe(III)}-(\text{NO}^-)]$ が生成されると NO^- は、多電子の還元反応プロセスを経てさらに還元が進行し、アンモニアや N_2O 、 N_2 、 N_2H_4 などの還元生成物となりバルク中へ放出されるもの推測される。



Scheme. Possible reactions of NO at a hemin modified electrode.

6. 7. その他の鉄ポルフィリン錯体修飾電極

Hemin 修飾電極の NO に対する電気化学反応が観測されたことから、hemin の類縁体である鉄ポルフィリン錯体を同様に GC 電極上に修飾して、NO に対する電気化学挙動の違いについて比較検討した。

修飾物質には mesoheme IX , etiohemin , tetramethylhemin , tetraethylhemin , monoazahemin , diazahemin (Figure 6-2-1) を用い、それぞれ 100 μ M メタノール溶液を調製した後、電位掃引により GC 電極上に hemin と同様の方法で修飾固定化した。

Figure 6-7-1～Figure 6-7-7 にこれらの修飾電極を用いて 0.1 M PBS (pH = 7.0) 中で NO に対する反応性を測定した結果を示した。mesoheme IX , etiohemin , tetramethylhemin , tetraethylhemin においては、hemin 修飾電極同様 NO の還元ピークが観測され、NO の還元電位にも大きな違いは観測されなかった。一方、ポルフィリン環に N 原子を一つ導入した monoazahemin 修飾電極においては、NO の還元ピークは -0.69 V 付近に観測され、hemin 修飾電極に比べおよそ 0.1 V 程度 positive な電位で還元反応が生じることが観測された。

しかし、ポルフィリン環に N 原子が二つ導入された diazahemin においては、NO 還元ピークの電位は monoazahemin 修飾電極の電位とほぼ同じ電位に観測された。それぞれの修飾電極における NO 還元電位を Table に示した。

これらの結果から、monoazahemin が NO 検出用の電極修飾物質として有効であることを見出した。

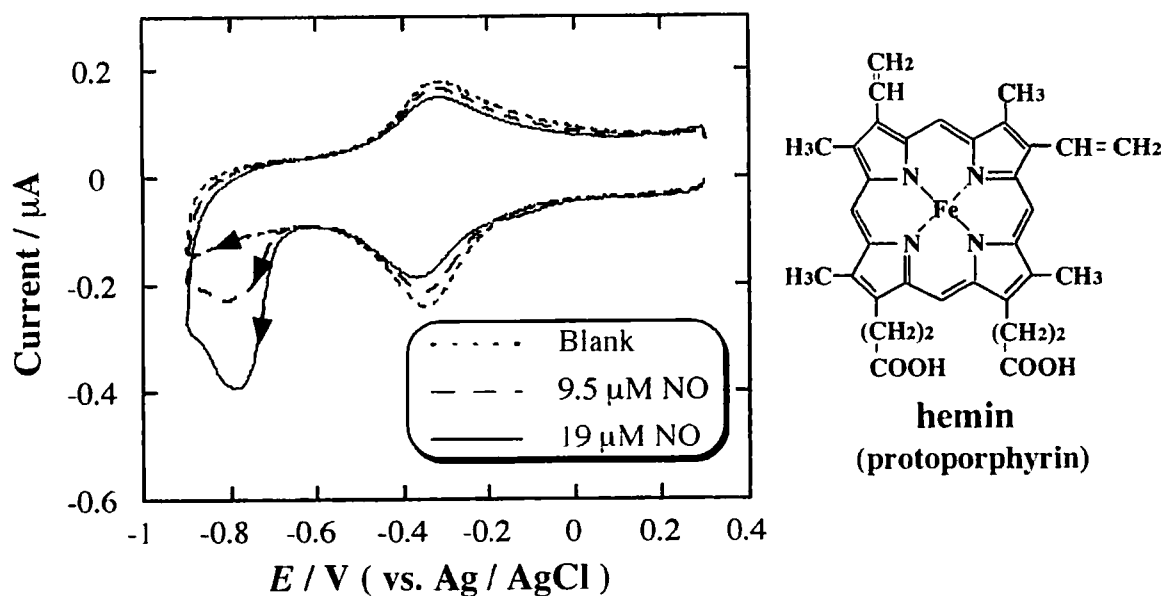


Figure 6-7-1. Cyclic voltammograms of NO at a hemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

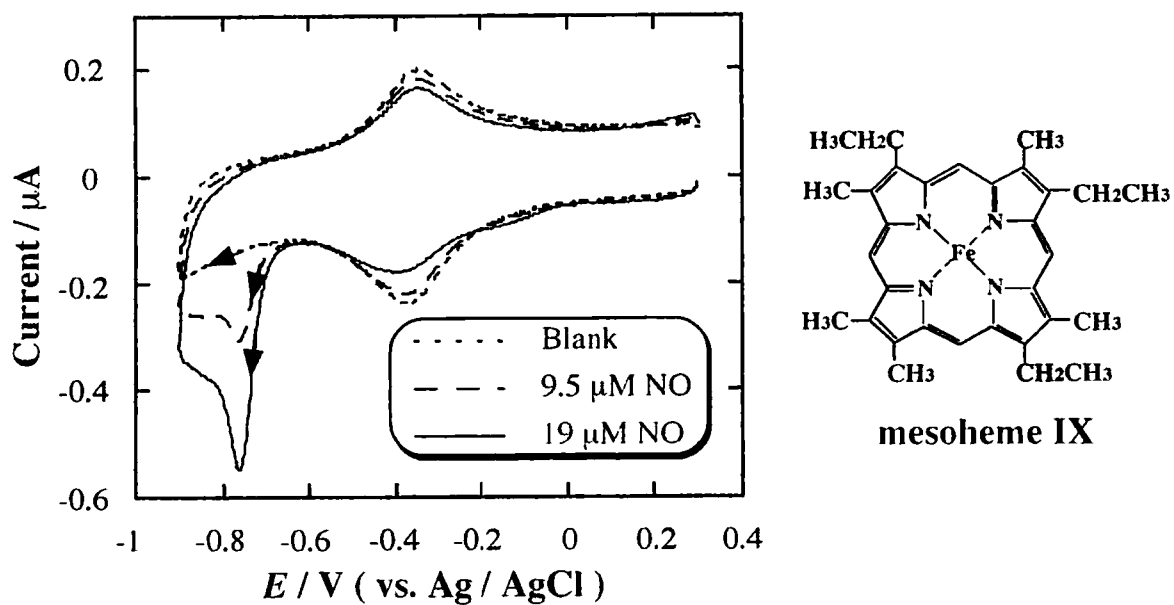


Figure 6-7-2. Cyclic voltammograms of NO at a mesoheme IX modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

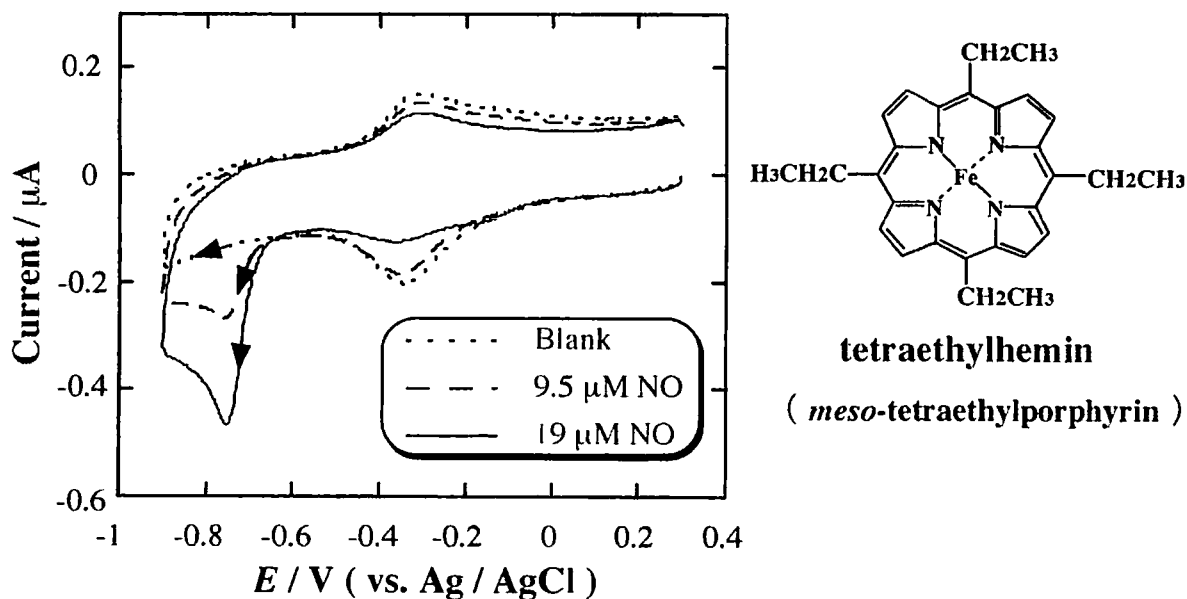


Figure 6-7-3. Cyclic voltammograms of NO at a tetraethylhemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

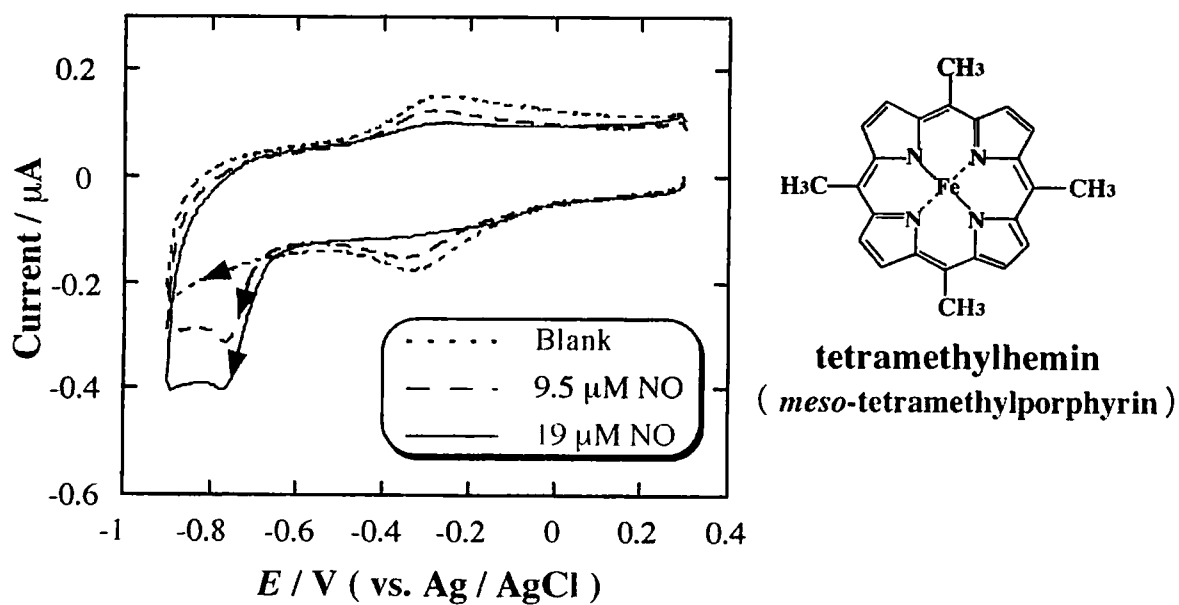


Figure 6-7-4. Cyclic voltammograms of NO at a tetramethylhemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

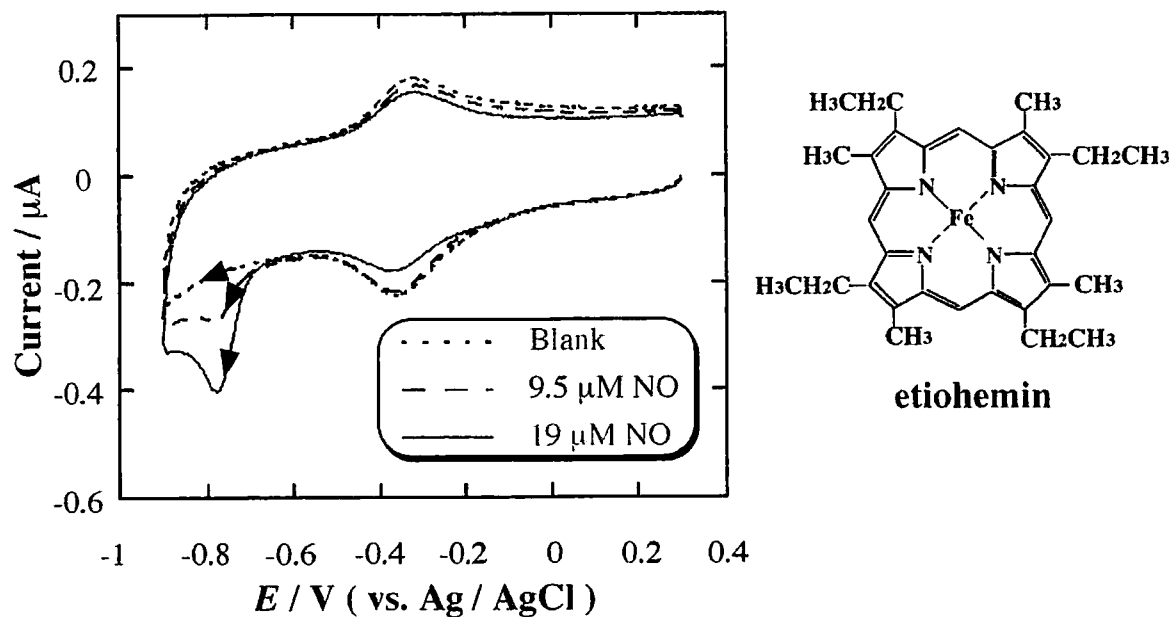


Figure 6-7-5. Cyclic voltammograms of NO at a etiohemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

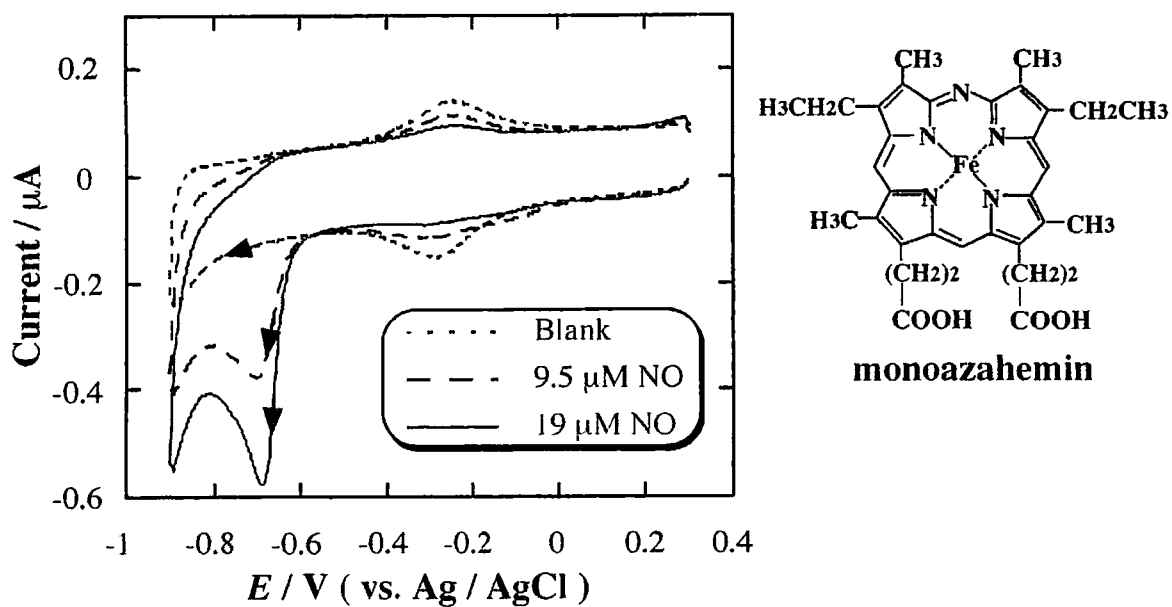


Figure 6-7-6. Cyclic voltammograms of NO at a monoazahemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

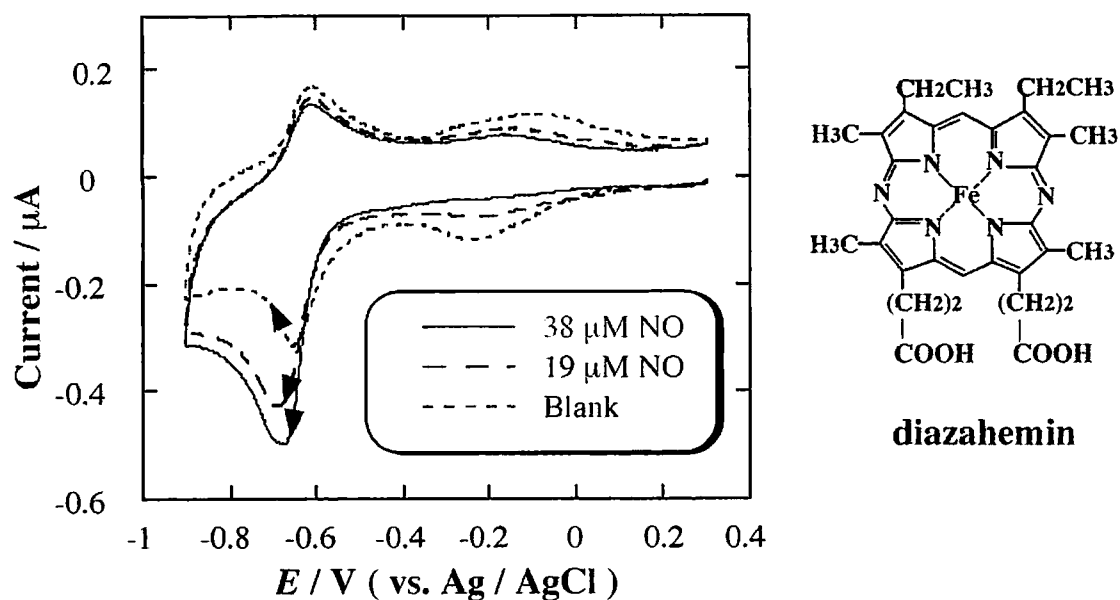


Figure 6-7-7. Cyclic voltammograms of NO at a diazahemin modified GC electrode in PBS(pH 7.0).

Table. Reduction potential of NO at various heme modified electrodes.

heme	NO reduction potential (V)
hemin	-0.78
mesoheme	-0.76
etiohemin	-0.78
tetramethylhemin	-0.75
tetraethylhemin	-0.76
monoazahemin	-0.69
diazahemin	-0.69

6. 8. Monoazahemin 修飾電極による NO の検出

鉄ポルフィリン錯体の類縁体のなかで NO 検出用のセンシング素子として最も有効であった monoazahemin 修飾電極を用いて、この修飾電極の NO 検出用電極としての詳細な特性の評価した。

CV 測定において、monoazahemin 修飾電極の NO の濃度変化に対する応答は、Figure 6-8-1 に示すように NO 濃度が約 60 μM 程度まで -0.69 V 付近での NO 還元電流値の直線的な増加が観測された。さらに NO の酸化物である NO_2^- や NO_3^- の添加による影響は、hemin 修飾電極のときと同様まったく影響を及ぼさないことが確認された (Figure 6-8-2)。また、Figure 6-8-3 に示すように NO 濃度が約 1 μM であっても -0.69 V 付近の還元ピークは観測され、この修飾電極における NO の検出限界は 1 μM であると考えられる。このことから低濃度の NO 濃度であっても検出することが可能であると思われる。

また、Figure 6-8-5 に一度 NO を測定した電極を NO の存在しない溶液中に移し電位掃引を行ったときの CV を示した。first scan では、NO に基づく -0.69 V の還元電流が観測されるが、second scan からはこの電位での還元電流は観測されず、NO の配位によって消滅していた -0.3 V 付近の $\text{Fe(III)} / \text{Fe(II)}$ の酸化還元ピークが再び明確に観測されるようになった。この溶液に NO の飽和溶液の添加を行ったところ、再び -0.69 V の NO の還元ピークが観測されるようになり、還元電流値も同程度の電流値が観測された (Figure 6-8-6)。このことからこの修飾電極は、NO の検出に対し繰り返しの使用可能なことが示唆される。

しかしこの電極は、NO 還元の電位再現性が得られるが、触媒還元電流値については電極間で多少の差がありセンサーとして用いる場合、電極ごとの校正が必要である。また、ポルフィリンの修飾固定化が物理吸着のため、些細な要因での脱離が起こる。このことからさらに強固な修飾固定化を行うために、電極上へのポルフィリン錯体の化学的吸着による修飾固定化が必要であると考えられる。さらに、亜硝酸イオンや硝酸イオンでの NO 検出に対する阻害は観測されなかったが、生体内においての他の阻害物質の存在や電極表面の保護といったことを考慮し Nafion 膜の修飾は必要であると考えられる。

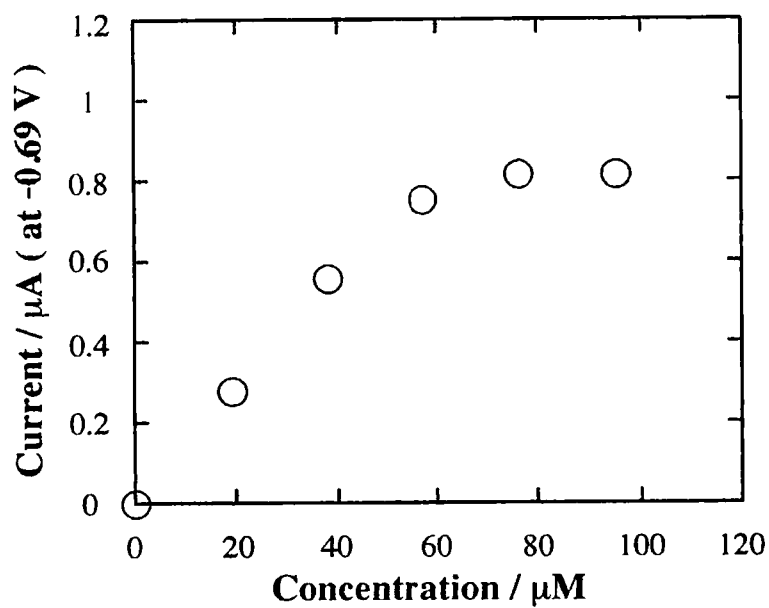


Figure 6-8-1. Plot of current measured by CV at various NO concentrations.

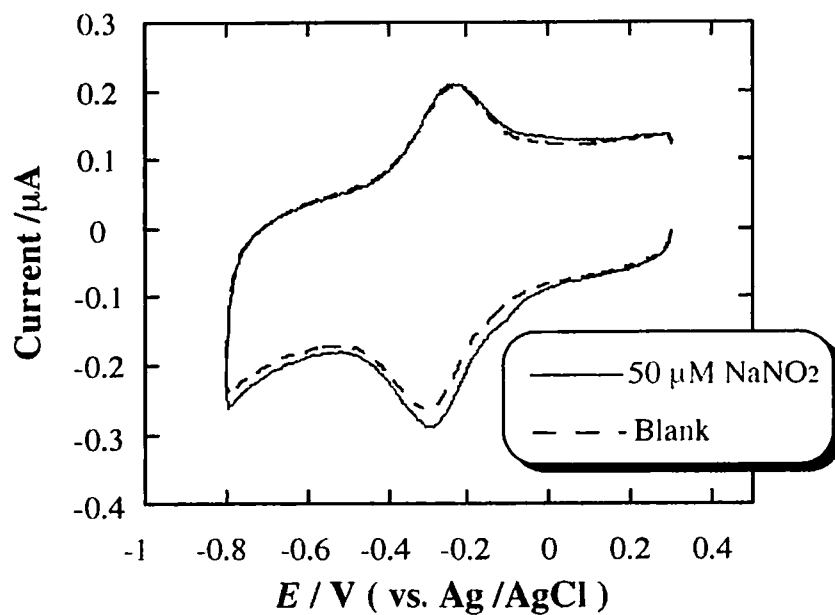


Figure 6-8-2. Cyclic voltammograms of 50 μM NaNO_2 at a monoazahemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

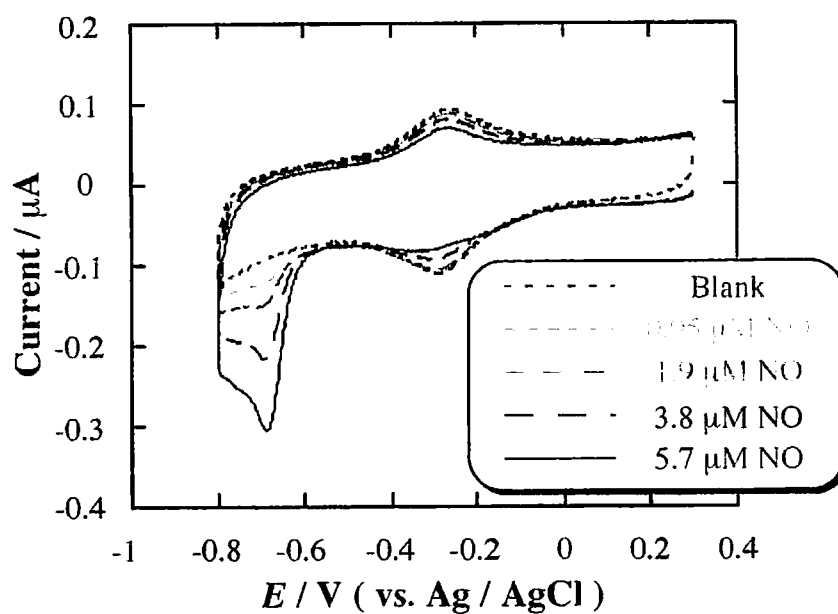


Figure 6-8-3. Cyclic voltammograms of different NO concentrations at a monoazahemin modified GC electrode in PBS (pH 7.0).

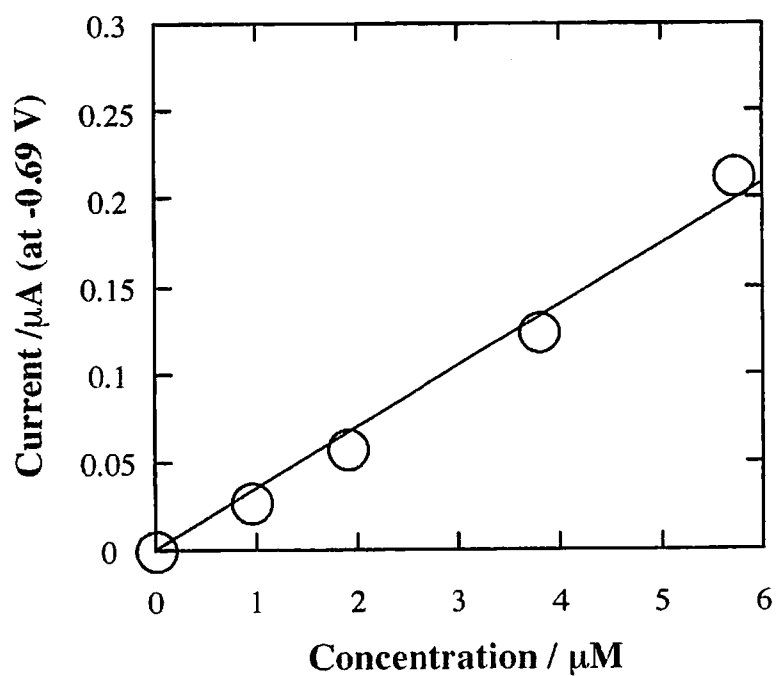


Figure 6-8-4. Plot of current measured by CV and NO concentration.

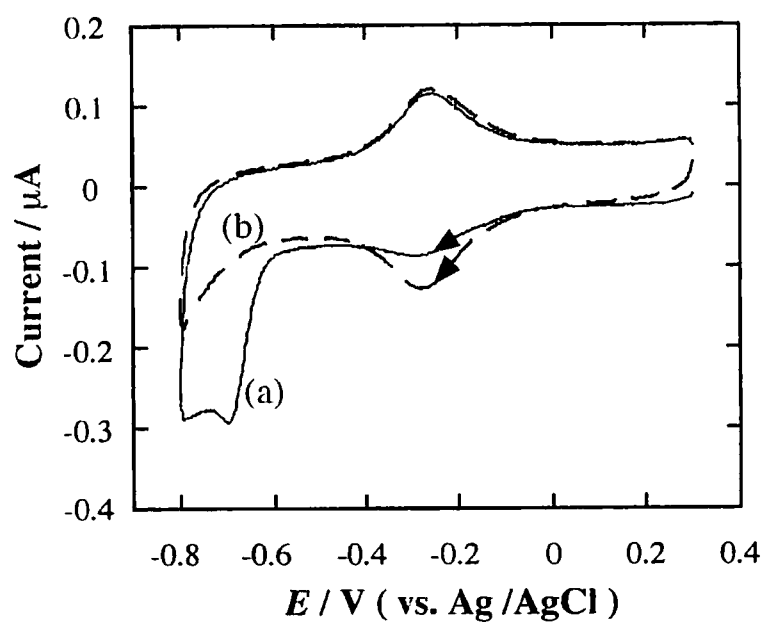


Figure 6-8-5. Cyclic voltammograms of monoazahemin modified electrode in PBS (pH 7.0) after the electrode was transferred from PBS + NO to a new PBS : (a) first scan ; (b) second scan.

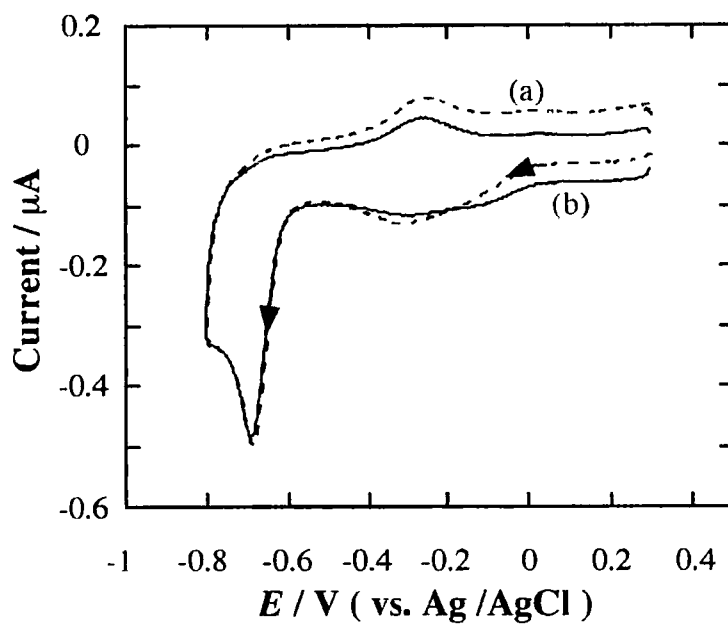


Figure 6-8-6. Cyclic voltammograms of NO at a monoazahemin modified electrode in PBS (a) 9.5 μM NO and (b) addition of NO after measuring the data shown in Figure 6-8-5.

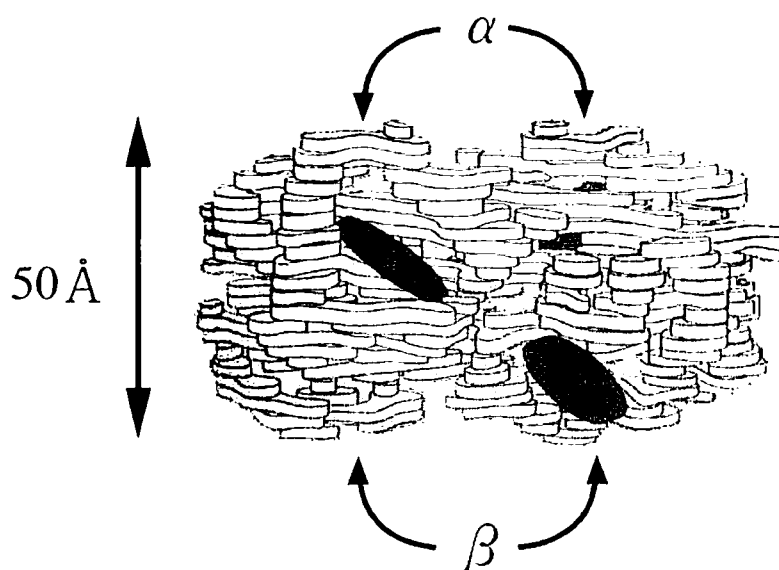
6. 9. ヘモグロビン修飾電極の NO 検出素子としての利用

生体内で生成される NO は、生体内に存在するわずかな間にヘムタンパク質と相互作用し、その付加体を生成する。ヘムタンパク質に対する NO の相互作用は、これまでの分光学を中心とした研究から明らかになっている²²⁾。そこでこの相互作用を利用し、ヘムタンパク質であるヘモグロビンの NO 検出用の素子としての可能性について検討を行った。

ヘモグロビンの構造と性質を Figure 6-9-1 に示す。ヘモグロビンは、Figure 6-9-2 に示すように酸化インジウム電極を用いた CV 測定により -0.16 V 付近に酸化還元電位を示す。これはヘモグロビンの活性中心であるヘム鉄の酸化還元反応 ($\text{Fe(III)} / \text{Fe(II)}$) に基づくものである。ヘモグロビン溶液中において掃引速度変化を行うと、Figure 6-9-3 に示されるようにピーク電流値が掃引速度に比例した。これはヘモグロビンの等電点 (pI) が 7.1 であるため、測定条件中の pH 7.0 においてヘモグロビンは弱く正の電荷を帯びており、表面が負に帯電した酸化インジウム電極上に静電的な弱い吸着をしているものと考えられる。しかし、ヘモグロビンが吸着した電極をヘモグロビンの存在しない PBS (pH = 7.0) 中に移し CV 測定を行うと、Figure 6-9-2 において観測されたヘム鉄の酸化還元反応は観測されない。これは電極とヘモグロビンの静電的な相互作用が弱いため、ヘモグロビンが電極上から容易に脱離してしまと考えられる。そこで NO の電気化学的測定はヘモグロビンを含む溶液中で行った。

Figure 6-9-4 にヘモグロビン修飾電極を用いて、NO の検出を

行ったときの CV を示した。このとき -0.65 V 付近に NO の還元ピークが観測された。この還元ピーク電流値は NO の濃度増加に対して直線的に増加した (Figure 6-9-5)。このことからヘモグロビンは、電極上にヘモグロビンを修飾固定化することにより、NO 検出用修飾物として利用することが可能であることが示唆される。



Hemoglobin (horse)	
Molecular weight :	ca. 68,000
Amino acid residues :	141/each α chain 146/each β chain
Redox center : Heme	$4\text{ Fe}^{3+} + 4\text{ e} \rightleftharpoons 4\text{ Fe}^{2+}$
Isoelectric point :	7.1
Dimensions size :	ca. $64 \times 55 \times 50$ angstroms

Figure 6-9-1. The three dimensional structure of hemoglobin based on the X-ray crystallography and some properties of hemoglobin.

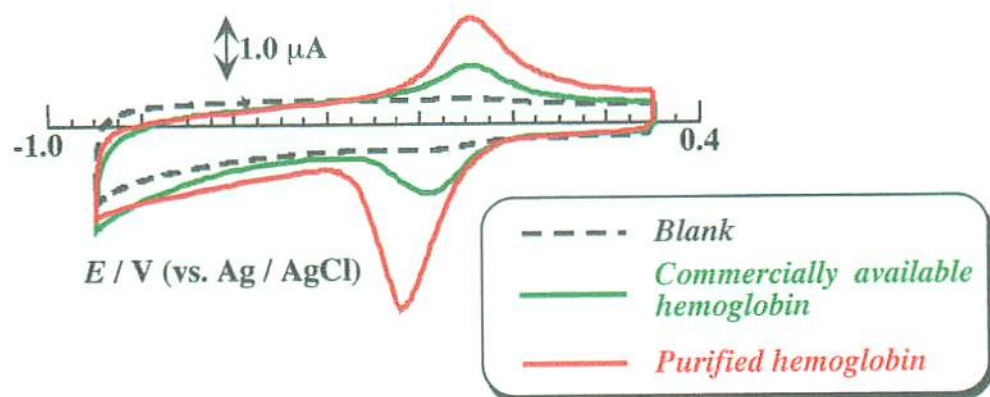


Figure 6-9-2. Cyclic voltammograms of 50 μM hemoglobin on In_2O_3 electrode in a phosphate buffer solution (pH 7.0) at a scan rate of 50 mV / s .

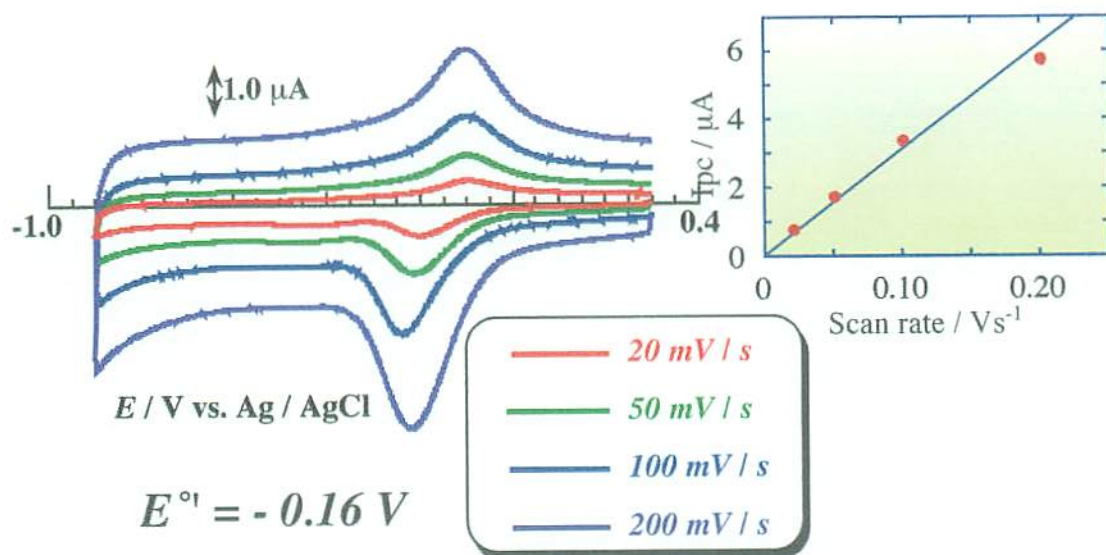


Figure 6-9-3. Cyclic voltammograms of 50 μM hemoglobin modified In_2O_3 electrode in a phosphate buffer solution (pH 7.0) at various scan rates .

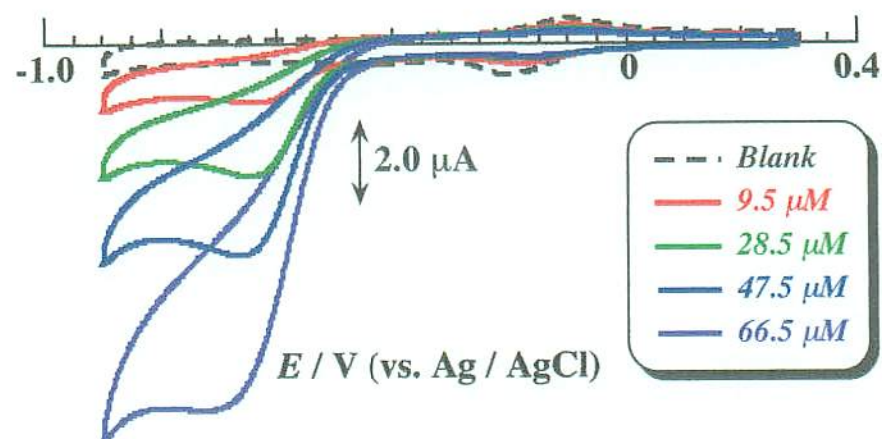


Figure 6-9-4. Cyclic voltammograms of various concentrations of NO in the presence of 50 μM hemoglobin on In_2O_3 electrode at a scan rate of 50 mV / s in a phosphate buffer solution (pH 7.0) .

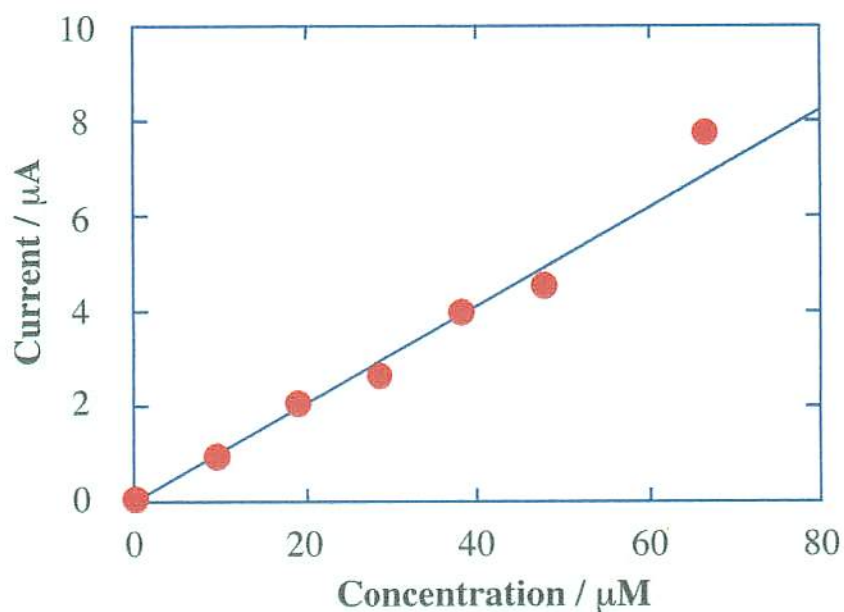


Figure 6-9-5. Dependence of reduction peak current of hemoglobin modified In_2O_3 electrode on NO concentration at a scan rate of 50 mV / s in a phosphate buffer solution (pH 7.0) .

6. 10. 結言

本研究において、生体内において非常に重要な役割を果たしている NO の電気化学的検出を試み、以下に示す知見が得られた。

1. Hemin 修飾電極上で NO は、 -0.78 V 付近において NO の還元ピークを与えた。この還元電流値は、NO 濃度が約 $100\text{ }\mu\text{M}$ まで比例して増加した。

2. Hemin 修飾電極上での NO の還元反応は、hemin の中心金属である三価の鉄に NO が配位したものは -0.78 V で還元され、一方、hemin 自身は、 -0.3 V 付近で酸化還元反応を生じる。次に Fe(II) と NO の間で電子移動が起こり、Fe(III) と NO^- または高次の還元生成物として解離するものと考えられる。

3. Hemin の類縁体である monoazahemin 修飾電極では、NO の還元電位が約 -0.69 V で観測された。また、この電極を用いたとき NO の限界検出濃度は、 $1\text{ }\mu\text{M}$ であった。

4. 修飾物質としてヘムタンパク質である hemoglobin を用い修飾電極を作製し、NO の検出を行ったところ、NO の還元電位は、約 -0.65 V に観測され、また NO 濃度の増加にともない還元電流値が増加した。

今回の実験において、鉄ポルフィリン錯体が NO 検出用素子として有効な修飾物質であることが示された。しかし、生体内には様々な物質が共存しており、それらが電極に与える影響については明らかではない。今後、本研究で開発した NO 検出用の電極が、生体内における NO 分子の測定に利用できるようにするためにも、さらに詳細な検討が必要である。電気化学的手法を用いた NO の検出はその簡便さから、さらに優れた NO 検出電極の開発が期待される。また、さらに有効な修飾物質の発見が待たれる。

6.11. 参考文献

- 1) Furchgott, R. F. Zawadzki, J. V., *Nature*, **288**, 373-376, (1980).
- 2) R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, *Nature*, Vol. 327, **11**, 524-526, (1987).
- 3) 日本化学会編, 季刊化学総説 NO - 化学と生物, 学会出版センター, No. 30 (1996).
- 4) Xiangji Zhou and Mark A. Arnold, *Anal. Chem.* **68**, 1748-1754, (1996).
- 5) Andrei Komarov, David Mattson, Mark M. Jones, P. K. Singh and Ching-San Lai, *Biochemical and Biophysical Research communications*, Vol. 195, No.3, 1191-1198, (1993).
- 6) Katsuei Shibuki, *Neuroscience Research*, **9**, 69-76, (1990).
- 7) T. Malinski, Z. Taha, *Nature*, **358**, 676-678, (1992).
- 8) P. Vallance, S. Patton, K. Bhagat, Raymond MacAllister, M. Radomski, S. Moncada, T. Malinski, *The Lancet*, **346**, 153-154, (1995).
- 9) Z. Taha, F. Kiechle, T. Malinski, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol.188, No.2, 734-739, (1992).
- 10) T. Malinski, Z. Taha, S. Grunfeld, S. Patton, M. Kapturczak, P. Tomboulia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.193, No.3, 1076-1082, (1993).
- 11) F. Bedioui, S. Trevin, J. Devynck, F. Lantoine, A. Brunet and M. A. Devynck, *Biosensor & Bioelectronics*, Vol. 12, NO. 3, 205-212, (1997).
- 12) S. Trevin, F. Bedioui, J. Devynck, *J. Electroanal. Chem.*, **408**, 261-265, (1996).

- 13) F. Lantoiné, S. Trevin, F. Bedioui, J. Devynck, *J. Electroanal. chem.*, **392**, 85-89, (1995).
- 14) Shaw, A. W., Vosper, A. J., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1239-1244, (1977).
- 15) Jonathan S. Stamler, David J. Singel, Joseph Loscalzo, *Science*, **258**, 1898-1902, (1992).
- 16) 進藤直紀, 修士論文 (熊本大学), (1997).
- 17) M. Maskus, F. Pariente, Q. Wu, A. Toffanin, J. P. Shapleigh, and H. D. Abruna, *Anal. Chem.*, **68**, 3128-3134, (1996).
- 18) M. H. Barley, K. J. Takeuchi, T. M. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5876-5885, (1986).
- 19) F. Bedioui, S. Trevin. V. Albin, M. Guadalupe Gomez Villegas, J. Devynck, *Analytica Chimica Acta*, **341**, 177-185, (1997).
- 20) J. N. Younathan, K. S. Wood, T. J. Meyer, *Inorg. chem.*, **31**, 3280-3285, (1992).
- 21) Mark H. Barley, Matthew Rhodes, and Thomas J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **26**, 1746-1750, (1987).
- 22) Mikio Hoshino, Masahiro Maeda, Reiko Konishi, Hiroshi Seki and Peter C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 5702-5707, (1996).

Chapter 7

結論

本研究では、金電極上に修飾した種々のチオール系単分子膜の電気化学的挙動を表面増強赤外およびラマン分光法を用いて検討を行った。さらに、機能性分子修飾電極の高感度検出の応用例についても示した。

以下に得られた知見をまとめた。

Chapter 2 においては、チトクロム c の電子移動反応を促進させる役割を果たすピリジンチオール系単分子膜の吸着挙動について表面増強赤外分光電気化学法を用いて検討した。4-PySH 修飾電極では、pH や電極電位に依存したプロトン付加反応が観察されたのに対し、2-PySH はそのようなスペクトル変化はほとんど観察されなかった。また、b2 モードに相当する吸収ピークは、4-PySH では観察されないのに対し、2-PySH では明らかに確認された。これは、4-PySH は、ピリジン環の N 原子を溶液側に向けて吸着しているのに対し、2-PySH は、ピリジン環の N 原子が電極表面と相互作用していると考えられる。3-PySH は、pH や電極電位に依存したプロトン付加反応が観察され、b2 モードも観察されたことから、ピリジン環の N 原子は、溶液側を向いていると考えられる。しかし、中性領域では他の化合物と異なり 2 量体を形成することが明らかになった。2-PymS 修飾電極の赤外スペクトルは、2-PySH のものと類似した挙動を示した。

これらの知見は、STM などの他の手法によって得られている吸着構造を支持する結果を示している。

Chapter 3 では、金電極上に修飾したアントラキノ誘導体 SAM のチオール基の結合位置による吸着構造の違いやアルキル鎖の長さの影響を SEIRAS およびサイクリックボルタンメトリー (CV) 法を用いて検討を行い、チオール基の結合位置の異なる 1-AQSC0、と 2-AQSC0 では吸着構造が異なり、1-AQSC0 は、AQ 環の短軸を電極に対し垂直に向けて吸着しており、一方、2-AQSC0 は AQ 環の短軸が金電極の垂直成分からやや傾いた配向をとっている。また、2-AQSC0 は 1-AQSC0 に比べて AQ 環の長軸が電極表面に対し垂直方向に傾いて吸着していることが示唆された。また、鎖長の異なるアルキル鎖を導入することによって、SEIRAS や CV の結果から、アントラキノ部位は電極表面から離れて存在することが明らかとなった。

Chapter 4 では、FT-SERS 法を用いてアミノ基やカルボキシル基を有するアルカンチオールの電極表面における酸解離挙動を評価した。強いラマン活性を持つイオンを用いて、そのラマン強度をプローブとして電極表面における酸解離挙動を評価することが可能であることが初めて見出された。この手法は、電極近傍で起こるイオン対形成反応を直接観察することが可能であり、電極表面における酸解離特性の新たな評価方法として提案がなされた。

Chapter 5 では、末端アミノ基の保護基として Fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) 基を持つアルカンチオールを用いて単分子膜を作製し、固定化した状態で脱保護反応により Fmoc 基を外すことが可能であることを電気化学法および赤外分光法により証明した。また、反応により生じたアミノアルカンチオールの表面特性

を FT-SERS 法による酸解離特性の評価も行った。CV の結果において、反応前後における吸着量にほとんど違いは見られなかったが、赤外スペクトルは明らかに異なり、固定化されたままで反応が進行していることが証明された。また、反応で生じたアミノアルカンチオール単分子膜の酸解離挙動から反応過程における膜の状態は変化しないことが示された。

Chapter 6 では、機能性分子修飾電極の例として近年、環境汚染および生体内において重要な役割を果たすことが知られている一酸化窒素 (NO) の電気化学的検出を鉄ポルフィリン錯体やヘモグロビン修飾電極により行った。種々の鉄ポルフィリン錯体を用いて測定を行った結果、いずれの錯体においても検出が可能であったが、その中でもポルフィリン骨格に N 原子を持つ monoazahemin が最も有効な修飾物質であることが示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導・ご助言くださいました谷口 功教授、西山勝彦講師、山口博子助手に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。また、合成ヘムを提供していただいた京都薬科大学薬品物理学教室の根矢三郎先生に深く感謝いたします。研究を進めるにあたり西川亜希子氏、田尻正紀氏を初めとする谷口研究室の学生諸氏の数々のご協力を頂き心より感謝申し上げます。