

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655071

研究課題名(和文)非標識バイオセンシングに向けた高触媒活性な窒素ドーピンググラフェン様薄膜電極開発

研究課題名(英文)Development of highly electroactive nitrogen-doped graphene like film electrode for nonlabel biosensing applications

研究代表者

丹羽 修 (Niwa, Osamu)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・総括研究主幹

研究者番号：70392644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：電子サイクロトロン共鳴(ECR)スパッタ法により、窒素ドーピングカーボン膜を形成し、その構造と窒素濃度、及び電気化学特性について調べた。窒素ドーピング膜は、適度な窒素濃度の際、拡張フルレネ構造を有しており、その表面は、窒素濃度によらず非常に平坦であった。この膜を電極として評価したところ、sp<sup>3</sup>結合を多く含むため広い電位窓を示した。また、窒素濃度9%の際、高い電気化学活性を示した。酸素や過酸化水素の還元電位は、窒素を含まないカーボン薄膜電極に比べ、それぞれ0.3Vと0.15V高電位側にシフトした。また、グアノシンやアデノシンなどの生体分子の酸化に対しても高い電極活性を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：A nitrogen-doped nanocarbon film electrode formed using the electron cyclotron resonance (ECR) sputtering method. The ECR sputtered CN films exhibited an enhanced fullerene-like microstructure at intermediate nitrogen concentration. This structure consisted of bent and cross-linked graphene sheets where layered areas remarkably decreased with increasing sp<sup>3</sup> bonding. The film has a very smooth surface with an average roughness of 0.1 to 0.2 nm. These variations in the chemical structures greatly change the electrochemical performance. The N-ECR electrode shows a wider potential window due to its higher sp<sup>3</sup> content. The N-ECR electrode (N = 9.0 at. %) shows improved electrochemical activity. The oxygen and hydrogen peroxide reduction potentials at the N-ECR electrode shifted about 0.3 and 0.15 V, respectively, and the peak height of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is greatly increased. The N-ECR electrode also shows better activity for oxidizing certain biomolecules such as guanosine and adenosine decreased.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学、分析化学

キーワード：カーボン薄膜 窒素ドーピング スパッタリング 電気化学 酸素還元 過酸化水素 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

- ① 近年、自動車の排ガスや燃料電池用の白金代替触媒としてカーボンアロイが注目され、国家レベルでの研究開発が進められている(尾崎ら, *Carbon*, 2006, 44, 1324)。カーボンアロイは、グラフェン環の炭素原子が一部窒素に置き換わると高い酸素還元活性を示すことが示唆されている。また、窒素を含むカーボンナノチューブも高い酸素還元特性を示すことが示され注目を集めている(Gong et al., *Science*, 2009, 323,760)。
- ② しかし、上記材料は粉末や繊維状であり、触媒や燃料電池ではメリットとなる広い表面積がバックグラウンド電流を増大させ、低い検出限界を得られない可能性がある。
- ③ 一方、CVD やスパッタ法を用いて窒素ドープカーボン(CN)薄膜を形成し(Zeng et al., *Carbon*,2008, 46, 663 など)その電気化学的酸素還元特性やストリッピング分析への検討がなされている(Khun and Liu, *Electrochem. Acta.*, 2009, 54, 2890 他)。しかし既報のCN薄膜は、アモルファス構造であり、膜の導電率も  $10^{-2}$  S/cm 以下と低く電気化学活性も不十分などの問題がある。また、これらの研究は、燃料電池の酸素極の開発を主体としており、バイオ分析への応用を目的とした研究例は、過酸化水素の検出への応用例など一部しか報告例がなかった。
- ④ 我々は、電子サイクロトロン共鳴(ECR)スパッタ法によりグラフェンの微結晶を有するナノカーボン膜を開発し、それがポロンドープダイヤモンド(BDD)膜に匹敵する広い電位窓とBDD膜に比べて高い電気化学活性を示すことを報告した(O. Niwa et al., *JACS* 2006,128,7144)。このカーボン膜は、グラフェンナノ結晶を多く含み導電性も 40 S/cm と高いこと、表面を窒素終端するのみで、核酸塩基に対してより速い電子移動速度を示すことを見出した。
- ⑤ そこで、スパッタ中に任意の割合で窒素原子をハイブリッドすることにより、極めて高い電気化学(触媒)活性と生体分子との速い電子移動を実現し、新たな電気化学分析やセンサ用電極を実現できると考え本提案に至った。
- ## 2. 研究の目的
- 本研究では、電気化学検出器やセンサに用いる為の、DNA等の生体分子に対して高い

電子移動速度を有し、活測定電位範囲が広いカーボン薄膜電極を開発する為、近年電極触媒として注目されている窒素を含んだ微結晶のグラフェン構造からなる薄膜をECRスパッタ法により形成し、窒素量の最適化とスパッタ条件を検討することにより、核酸塩基やNADHなど生体分子の電気化学反応において高い電子移動と低いバックグラウンド電流を示す電極薄膜を形成する。その際、低温でプラスチックなどの基板上でも十分な導電性を確保する。この薄膜を用いて、DNA中の各塩基(G、A、T、C)の応答電流値の変化を利用したバイオセンシング法を実現する。

## 3. 研究の方法

- (1) ECRスパッタ時の基板とターゲット間バイアス(基板上のエネルギー)や窒素含量を変化させて、カーボン薄膜を形成し構造と電気化学特性を評価することによって、条件の最適化をはかった。
- (2) 作製した窒素ドープカーボン膜をTEM、XPS、AFM等により評価し、膜の硬さや導電性等の物性評価と窒素含有量の違いを把握した。
- (3) 窒素ドープカーボン膜の構造と生体分子の分子構造が電子移動速度に及ぼす影響を把握した。
- (4) 最適化した窒素ドープカーボン薄膜電極を用いて、DNAの各塩基の定量を行い、窒素を含まないカーボン薄膜電極との比較を行った。また、各塩基の応答変化を利用した蛋白との相互作用測定への応用の可能性を調べた。

## 4. 研究成果

### (1)窒素ドープ ECR スパッタ膜の作製条件と膜構造の関係把握

ECRスパッタカーボン薄膜を形成する際に、基板とターゲットの間のバイアス(電圧)を変化させると結合が変化する。例えば、電圧を上げると  $sp^3$  の割合が増加する。一方、窒素をドープする際、その結合の手が炭素より少なく、3本であることから、膜中の窒素の量によって構造が変化する。カーボン膜の窒素濃度を 0 at %から 38 at %まで変化させ、その構造変化を調べた。まず、カーボン膜内の結合状態をXPS測定で調べたところ、窒素を含有すると高エネルギー側に多くのピークが分離できる。その結果を図1に示す。

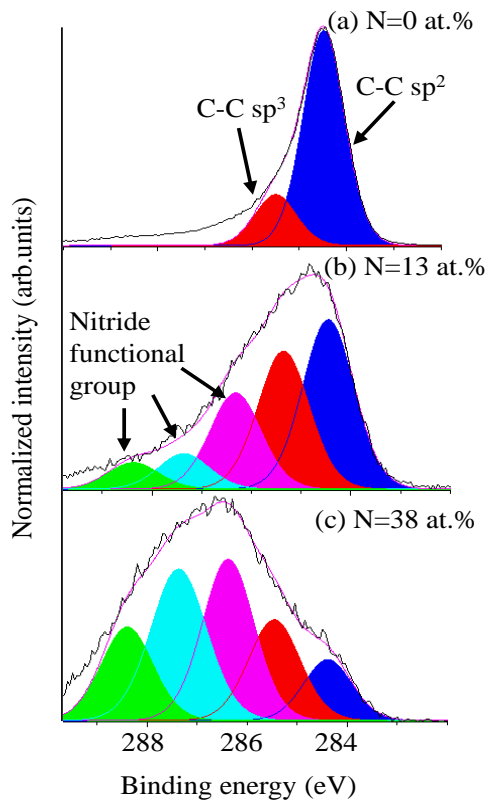


図1 カーボン結合状態の変化

窒素を含まないピュアなカーボン膜では  $sp^2$  結合や  $sp^3$  結合に基づくピークのみが分離観測されるのに対して、高濃度の窒素を含む膜では、窒素を含む各種置換基のピークが観測された。それらの窒素は、a:ピリジンライク、b:グラファイトライク、c:ニトリルライクな窒素の状態によるものと同定された。それらの基本構造を図2に示す。

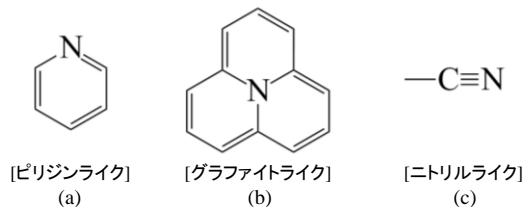


図2 結合状態の基本構造

また、膜中に含まれる窒素濃度と  $sp^2$  結合、 $sp^3$  結合、ピリジンライク結合、グラファイトライク結合の変化、表面の酸素濃度、平坦性の関係のデータを表1に示す。

表1 カーボン電極の表面特性

		0%	2.5%	10%	40%
N concentration (at.%)		0	8.98	20.19	30.39
C 1s (%)	$sp^2$ bonding	81.5	64.3	55.2	46.2
	$sp^3$ bonding	18.5	35.7	44.8	53.8
N 1s (%)	Graphite-like bonding	0	63.2	56.9	44.5
	Pyridine-like bonding	0	36.8	43.1	55.5
O/C		0.04	0.05	0.07	0.13
Ra (nm)		0.1	0.2	0.2	0.2

窒素濃度が増加すると、 $sp^2$  結合が、約 80%から 46%に減少し、逆に  $sp^3$  結合は、18.5%から 53.8%に増加した。これは、窒素濃度が増えることで、より揃ったグラファイト構造が形成されにくくなることを示している。

実際、窒素を含まないピュアなカーボン薄膜と窒素を含むカーボン膜の透過型電子顕微鏡 (TEM) 写真を比較すると、ピュアな膜では、多くの層状構造が観測され、微小なグラファイト (グラフェン) 構造を含むことが分かる。一方、窒素を多く含む膜では、その様な層状構造が減少した。

一方、窒素濃度が増加すると窒素を骨格に含むグラファイトライク構造やピリジンライク構造双方の濃度が増加するが、窒素濃度 9 at %では、グラファイトライク構造の濃度が支配的である。その後、より高い窒素濃度では、ピリジンライク構造が支配的になる。また、窒素濃度が 40 at % 近くになると、ニトリルライク構造の濃度が高くなることも別のデータより示唆された。一方、膜表面の酸素濃度比 (O/C 比) は、N 濃度が増加するに従い、0.04から0.13まで増加した。その一方、膜の平坦性は(平均粗さ)は、0.1~0.2 nm とほとんど変化しなかった。

## (2) 窒素ドーピング ECR スパッタ膜の基本的な電気化学特性

作製した窒素ドーピングカーボン薄膜の基本的な電気化学特性の評価を行った。図3にピュアな ECR カーボン薄膜と窒素濃度を変えて作製したカーボン薄膜の電位窓の比較を示す。

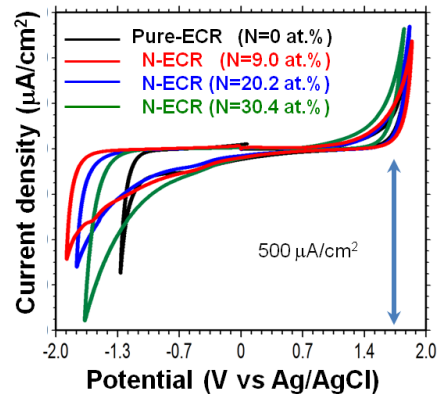


図3 硫酸中の電位窓の変化

測定は、サイクリックボルタンメトリ法を用いた。単位面積当たり絶対値で 500 mA/cm<sup>2</sup> 以下の電流値が得られる電位範囲を電位窓として比較した。窒素を含まないピュアカーボン薄膜電極では、3.3V の電位窓が得られたのに対して、窒素濃度 9 at %では、3.8V に増加した。これは窒素濃度増加と共に、より安定な  $sp^3$  結合が増加したためと考えられる。この様な現象は、ピュアな ECR カーボン膜で、スパッタ中の基板とターゲット間のバイアス電圧を上げると  $sp^3$  結合が増加し、同時に電位窓も広くなることと類似している (J. Jia and O. Niwa et al., Anal. Chem., 2007, 78, 98-195)。一方、窒素濃度が 9 at %を越えると、電位窓は減少をはじめ、窒素濃度 30.4 at %で

3.3V まで低下した。これは、多くの窒素原子が構造中に入り、エネルギー的に弱いピリジンライク構造などが増加することに起因すると推測される。

次に、代表的な電気化学活性分子であるルテニウム錯体( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ )とフェロシアンイド( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ )を用いてそれらの応答性の変化を各電極で評価した。その結果を図 3(a) ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ )、(b)  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  に示す。

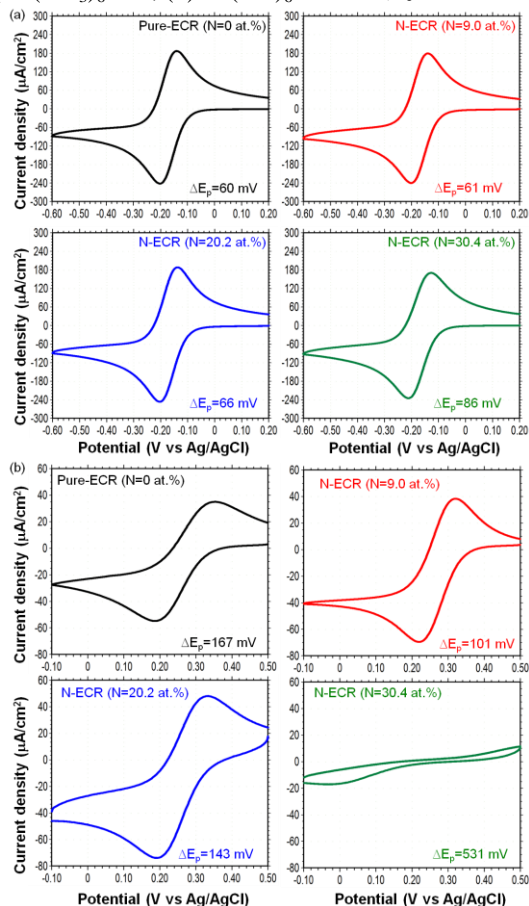


図4 電気化学活性分子の応答の変化

特に各活性種の酸化還元ピークの電位差(ピークセパレーション:  $\Delta E_p$ )に注目して比較を行った。窒素濃度 0 at % から 20.2 at % まで、窒素濃度が増加しても ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  の  $\Delta E_p$  は殆ど変化せず、理想的な値に近い 60 mV 程度であった。これは、( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  が外圏型の電子移動を示し、電極表面の特性にあまり影響しない電気化学特性を有することによる。一方、窒素濃度が 30.4 at % になると  $\Delta E_p$  は、86 mV と急に広がった。これは、窒素濃度増加による  $\text{sp}^2$  結合の低下によってカーボン膜の抵抗が無視できないほど増加したための  $iR$  降下によるものと考えられる。一方、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  では、窒素濃度 9 at % で  $\Delta E_p$  は、167 mV から 101 mV に減少した。これは、既法の Swain らの結果と一致した(X. Yang, G Swain et al., Anal. Chem., 2012, 85, 9845-9851)。Swain らが報告した窒素ドープカーボン膜は、窒素濃度の増加により表面が粗くなり表面積が増加するため、厳密な比較が困難であるが、今回の我々の結果は、膜表面の粗さが窒素濃度

によって殆ど変化しないため、N ドープカーボン薄膜電極上での  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  の電子移動速度の変化を明確に反映したものと考えられる。更に窒素濃度が増加すると  $\Delta E_p$  は、大幅に増加し、窒素濃度 30.4 at % では、あまり明瞭なピークが観察されなかった。これは、カーボン膜の秩序構造が TEM 観察の結果にも示す様に窒素濃度の増加により秩序構造が乱れてよりアモルファスに近い構造になったため、電子移動速度が低下したものと推測される。

### (3) 窒素ドープ ECR スパッタ膜を用いた生体分子、DNA 関連分子の定量

(2)の検討結果から、作製した 3 種類の窒素濃度の異なる ECR カーボン電極の中では、窒素濃度 9 at % の電極が最も優れた電気化学特性を有することが分かった。そこで、この電極を利用して生体分子のセンシングを検討した。まず、還元側の領域で、酸素の還元電流の測定を行った。その結果、ピュアカーボン薄膜電極(窒素濃度 0 at %)の膜に比べて、酸素還元電流のピークは、約 0.2V ポジティブ側にシフトし酸素還元過電圧が大きく低下したことが分かった。そこで、酸化酵素の反応生成物で電気化学バイオセンサの検出対象である過酸化水素の還元側での検出を行った。図 5 にピュアカーボン電極(窒素濃度 0 at %)と窒素濃度 9 at % のカーボン電極で過酸化水素の測定を行った結果を比較してしめす。

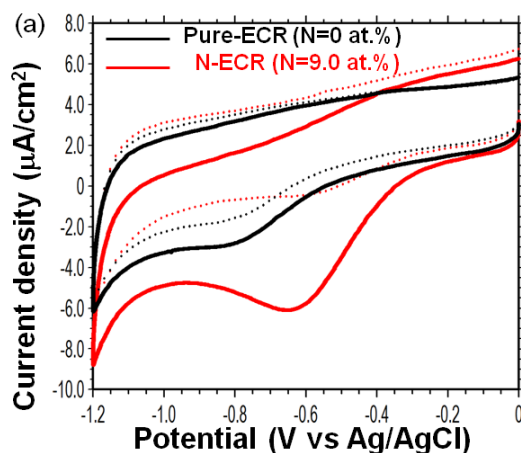


図5 過酸化水素の還元応答の変化

過酸化水素の還元電流は酸素と同様大きく酸化側へシフトしており、電流値も増加した。そこで、過酸化水素の濃度を変えて測定を行い感度の評価を行ったところ、窒素濃度 9 at % のカーボン薄膜では、約 5 倍の感度が得られ、過酸化水素の濃度と電流値の間に良い直線性が得られ、窒素ドープカーボン膜がバイオセンサ用電極として特性が優れていることが分かった。次に、遺伝子の各塩基の定量によるバイオセンサを実現する試みとして、アデノシンとグアノシンの測定をピュアカーボン電極と窒素濃度 9 at % のカーボン電極を用いて評価した。測定は、矩形波ボルタメトリを用いて行った。図 6 に結果を示す。

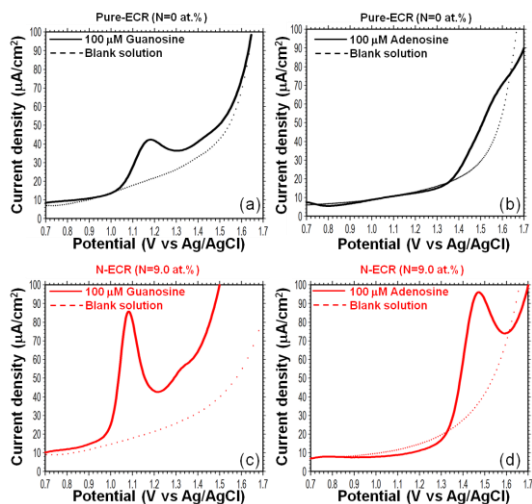


図6 アデノシンおよびグアノシンの測定結果

窒素濃度 9 at % の電極では、アデノシン、グアノシン共にピークは、0.1V 以上低電位側にシフトし電流値も 2~3 倍に増加した。この結果は、窒素ドーピングカーボン薄膜が遺伝子の構造変化を各塩基の応答性の変化を指標として検出する電極として従来のカーボン膜と比較し優れていることを示唆しており、非標識バイオセンシングを目的とした電極材料として極めて優れていることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① 鎌田智之、加藤大、廣野滋、丹羽修、Structure and electrochemical performance of nitrogen-doped carbon film formed by electron cyclotron resonance sputtering, *Analytical Chemistry*, 85, 9845-9851 (2013). 査読有
- ② 鎌田智之、丹羽修、梅村茂、廣野滋、The structure and bonding state for fullerene-like carbon nitride films with high hardness formed by electron cyclotron resonance plasma sputtering, *Japan Journal of Applied Physics*, 51, 125602-1~125602-10 査読有
- ③ 丹羽修、加藤大、鎌田智之、栗田僚二、廣野滋、ナノカーボン薄膜を利用した機能性電極創成とバイオセンシング、*Electrochemistry*, 81(1), 36-42 (2013). 査読なし

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 丹羽修、神経伝達分子計測に向けた新電極材料やマイクロ流路デバイスの開発、日本化学会 94 回春季年会 (招待講演)、2014 年 3 月 29 日、名古屋大学 (愛知県)
- ② 丹羽修、加藤大、鎌田智之、アンバランスマグネトロンスパッタ法を用いたカーボン薄膜電極の構造と電気化学特性、

2014 年電気化学会第 81 回大会、2014 年 3 月 29 日、関西大学 (大阪府)

- ③ 丹羽修、鎌田智之、加藤大、廣野滋、窒素ドーピング ECR スパッタカーボン膜の構造と電気化学特性、第 40 回炭素材料学会年会、2013 年 12 月 4 日、京都教育文化センター (京都府)
  - ④ 丹羽修、加藤大、上田晃生、栗田僚二、廣野滋、Nanocarbon film based electrochemical biosensors, 第 10 回アジア化学センサ国際会議 (基調講演)、2013 年 11 月 13 日、チェンマイ (タイ)
  - ⑤ 丹羽修、New carbon film electrode towards in vivo and in vitro electroanalysis, International symposium on in vivo analysis (招待講演)、2013 年 10 月 22 日、中国科学院化学研究所 (中国)
  - ⑥ 丹羽修、スパッタカーボン薄膜をベースにした生体分子検出、バイオセンサ開発、第 51 回炭素材料夏季セミナー (招待講演)、2013 年 8 月 27 日、幕張 (千葉県)
  - ⑦ 丹羽修、鎌田智之、加藤大、廣野滋、Structure and electrochemical performance of nitrogen-containing carbon film formed by electron cyclotron resonance sputtering, 14<sup>th</sup> ISEAC (招待講演)、2013 年 8 月 19 日、長春 (中国)
  - ⑧ 丹羽修、加藤大、栗田僚二、廣野滋、ナノカーボン材料を利用したバイオセンシング法の開発、電気化学会第 80 回大会 (招待講演)、2013 年 3 月 30 日、仙台 (宮城県)
  - ⑨ 鎌田智之、加藤大、丹羽修、梅村茂、廣野滋、生体分子高感度検出のための窒素ドーピング ECR カーボン膜の最適化、第 39 回炭素材料学会年会、2012 年 11 月 30 日、長野 (長野県)
  - ⑩ 丹羽修、鎌田智之、加藤大、上田晃生、吉岡恭子、梅村茂、廣野滋、Nanostructured and hybrid carbon films for electrocatalytic reaction with biomolecules, PRiME 2012, 2012 年 10 月 10 日、ホノルル (米国)
  - ⑪ 鎌田智之、加藤大、丹羽修、梅村茂、廣野滋、生体分子高感度検出のための窒素ドーピング ECR カーボン膜の最適化、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 20 日、金沢 (石川県)
- 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/biomed-ri/ci/rg/nbd-niwa/nbd-top.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

丹羽 修 (NIWA OSAMU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・総括研究主幹

研究者番号：70392644

### (2)研究分担者

加藤 大 (KATO DAI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：80533190

### (3)連携研究者 なし