

高感度反射法 1回反射ATR法による タンパク質薄膜の測定

Measurement of Protein thin film by Reflection Absorption
Spectroscopy & Single Reflection ATR

アプリケーションニュースNo.A362, A377では透過法
や1回反射ATR法を用いて行なったシリコンウェハ表面の
SiO₂薄膜や水素終端の分析についてご紹介しました。

今回は金属表面及び無機物表面有機薄膜の測定例として、

金表面及びハイドロキシアパタイト表面のタンパク質薄
膜を高感度反射法と1回反射ATR法にて測定した結果につ
いてご紹介します。

T.Tsuchibuchi

金メッキ上フィブリノーゲン薄膜の測定

Measurement of Fibrinogen thin film on Gold

フィブリノーゲンは血液に含まれる水溶性タンパク
で分子量は約34万、直径9 nm、長さ45 nmの棒状分子です。
このフィブリノーゲンの金メッキ上1分子膜を入射角度
80°の高感度反射法で測定しました。測定結果をFig.1に
示します。1666, 1545 cm⁻¹付近のアミドⅠ, アミドⅡや
3312 cm⁻¹付近のN-H伸縮振動などがはっきりと確認でき
ます。

Fig.2は金メッキ上にハイドロキシアパタイト(厚さ
10 nm程度)とフィブリノーゲン1分子膜を積層(金/ハ
イドロキシアパタイト/フィブリノーゲン)した試料の
測定結果です。ハイドロキシアパタイトと(1100 cm⁻¹付近)
フィブリノーゲンのピークが明瞭に現われています。こ
の試料の測定では、試料に照射された赤外光はフィブリノー
ゲン表面やフィブリノーゲンとハイドロキシアパタイト
との界面でも反射します。しかし金からの反射光に比べ
るとその量はきわめて小さいため、得られたスペクトル
はフィブリノーゲン層とハイドロキシアパタイト層を透
過し金表面で反射した光による反射吸収スペクトルと考
えることができます。

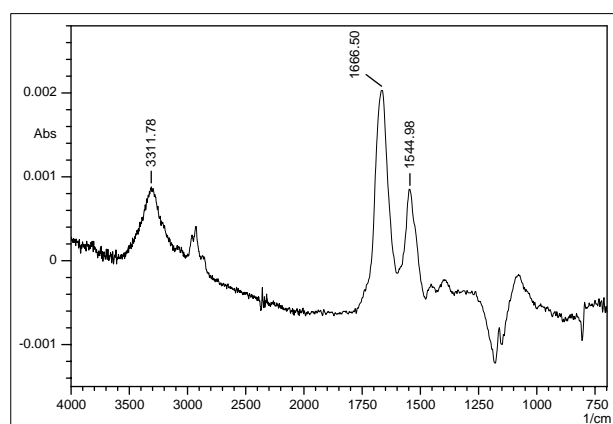


Fig.1 金メッキ上フィブリノーゲン薄膜の高感度反射スペクトル
RA Spectrum of Fibrinogen thin film on Gold

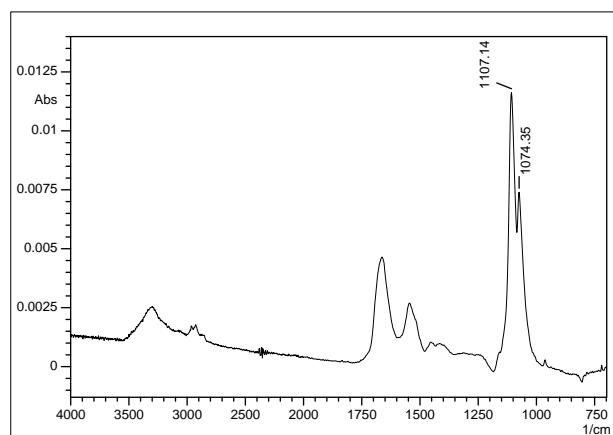


Fig.2 金メッキ上ハイドロキシアパタイト フィブリノーゲン積層薄膜の
高感度反射スペクトル
RA Spectrum of Hydroxyapatite & Fibrinogen laminate thin
film on Gold

ハイドロキシアパタイト上フィブリノーゲン薄膜の測定

Measurement of Fibrinogen on Hydroxyapatite

ハイドロキシアパタイト上フィブリノーゲン1分子膜を、前述と同様に入射角度80°の高感度反射法で測定した結果をFig.3に示します。ハイドロキシアパタイトは表面を鏡面研磨した焼結板を用いました。また、リファレンスにも同様のハイドロキシアパタイトを用いました。

ハイドロキシアパタイトの反射率は金などの金属よりも低いいため、ハイドロキシアパタイト上膜の反射スペクトルはハイドロキシアパタイト表面での反射光だけでなく膜表面での反射光の影響も受けることになります。Fig.3の1250～1000 cm⁻¹付近にピーク状のものが見られますが、これらはハイドロキシアパタイトの反射スペクトルの残差です。ハイドロキシアパタイトの吸収領域において、BKG測定とサンプル測定とで反射スペクトルが一致していれば相殺されますが、フィブリノーゲン膜表面での反射による影響のため両者は一致しません。その結果、残差となってスペクトル上に現われています。

Fig.3中の図は1900～1300 cm⁻¹付近の拡大図です。アミドⅠ、Ⅱのピークが逆転していることがわかります。ハイドロキシアパタイトは1800～1400 cm⁻¹の領域に大きな吸収を持たないため、その反射率に大きな変動はありません。しかし、フィブリノーゲンは大きな吸収を持つため、この波数域において反射率が大きく変動します。その結果、アミドⅠ、Ⅱのピークが逆転したと考えられます。

Fig.4は同じ試料をGeプリズムを用いた1回反射ATR法で測定した結果です。1084, 1016, 962 cm⁻¹付近のピークはハイドロキシアパタイトによるピークです。Fig.4中の図は1900～1300 cm⁻¹付近の拡大図です。高感度反射法では逆転したアミドⅠ、Ⅱのピークが正常に得られていることがわかります。

高感度反射法は金属表面薄膜を簡便かつ非接触で測定できる大変有効な方法です。しかし、基材が金属以外の場合は、ピーク強度が弱い、ピークが歪む・逆転する、等の問題が起こりえます。1回反射ATR法は試料とプリズムとの接触が不可欠ですが、基材が金属以外の場合でも測定することが可能です。

今回ご紹介した測定試料は、独立行政法人 物質材料研究機構 生体材料研究センター 生駒俊之様、紋川亮様よりご提供いただきました。

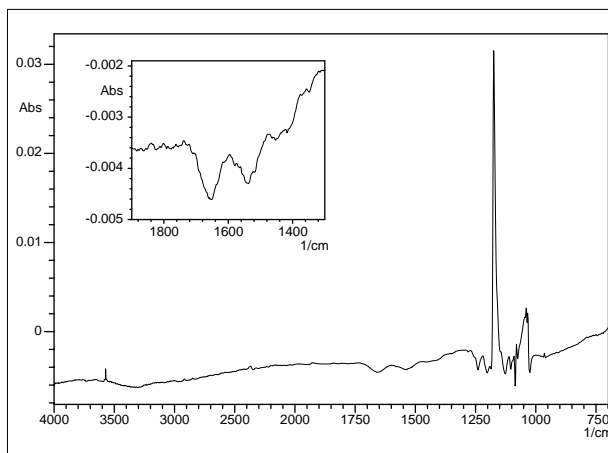


Fig.3 ハイドロキシアパタイト上フィブリノーゲン薄膜の高感度反射スペクトル
RA Spectrum of Fibrinogen thin film on Hydroxyapatite

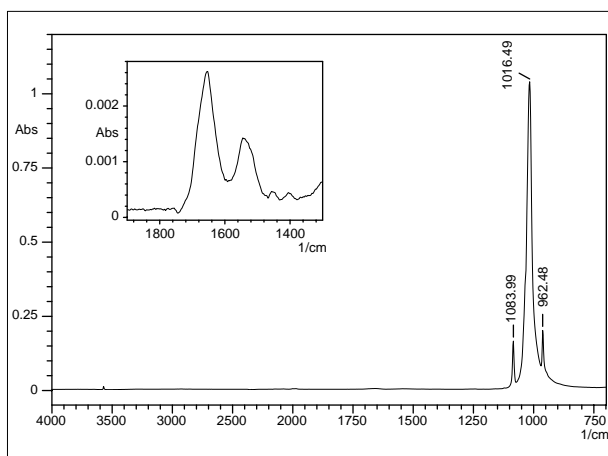


Fig.4 ハイドロキシアパタイト上フィブリノーゲン薄膜のATRスペクトル
ATR Spectrum of Fibrinogen thin film on Hydroxyapatite

Table 1 測定条件
Analytical Conditions

Attachment	: VeeMAX(RAS), MIRacke-Ge(ATR)
Resolution	: 4cm ⁻¹
Accumulation	: 400(RAS), 200(ATR)
Detector	: MCT(RAS), DLATGS(ATR)

 **島津製作所** 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

初版発行：2006年6月

●東京 ☎(03)3219-1691
●京都 ☎(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は右に示す島津WEBで閲覧できます。

会員制情報提供サービス「Shim-Solutions Club」にご登録下さい。
<http://solutions.shimadzu.co.jp/>
いろいろな情報提供サービスが受けられます。

3100-06601-11A-IK
2006.6