

FTIR

TALK

LETTER

vol. **8**

April 2007



赤外分光法による タンパク質の構造機能解析



東京医科歯科大学教養部化学 奈良 雅之

【緒言】

赤外分光法の生体分子への応用は、かつて分散型赤外分光光度計しかなかった時代にはタンパク質、ポリペプチド、脂質などの固体試料の測定が精力的に行われていたが、水溶液中での生体分子の解析は、水の強い吸収による妨害を受けるため測定できないことが多かった。そのために、タンパク質の測定は重水溶液もしくは固体フィルムにする必要があった。フーリエ変換型分光 (FTIR) 計が主流になった今日においては、この問題は解決済みということになっている。すなわち、水の吸収の影響を受けるタンパク質アミドIバンドの解析は、試料の透過光路を10 μ mまでに狭くすれば、溶液のスペクトルと溶媒のスペクトルの差演算を施すことにより、構造解析できるはずである。しかしタンパク質のFTIRが必ずしも一般的に測定されていない理由の一つとして、水蒸気の除去という基本的な操作が意外と難しく、再現性のある質の高いデータを得るために熟練が必要である点が挙げられる。FTIRによるタンパク質の構造研究は、大きく主鎖構造と側鎖構造に分けられるが、アミドIバンドの解析を中心とした二次構造解析がよく知られており、総説¹⁻³⁾や論文がこれまでに数多く報告されている。このアミドIバンドは水蒸気並びに水のバンドと重なる領域であるため、水蒸気の除去や溶媒の差し引きが不完全であるとスペクトルにアーティファクトなバンドが現れる恐れがある。他方、側鎖の構造解析に関してはタンパク質の機能によって着目するバンドが異なり、例えば側鎖の帰属はBarthらの総説にまとめられている⁴⁾。今回FTIR TALK LETTERにこれまでの研究を寄稿するに際して、タンパク質水溶液のスペクトルを得るための基本的な事項も合わせて述べておきたい。

タンパク質の FTIRスペクトルを 得るための水蒸気除去、 水の引き方

低分子化合物
の固体サンプル、
有機溶媒などの
測定では、分光器
のページなどを
それほど気にしな

くても満足できるスペクトルが得られる。しかし、タンパク質水溶液のスペクトルでの基本的な注意点は、光路上の水蒸気の除去と溶媒を差し引く演算処理である。これらの操作をいい加減に行うと、データの解析、特に二次微分演算処理でスペクトルの質を落としてしまう。

〈水蒸気除去〉

乾燥空気供給装置が備わっている分光器であれば、実験前日からページを始めれば、分光器内の水蒸気はかなり除去できる。サンプル部とリファレンス部を備えたデュアルビームの装置であれば、水蒸気のことをそれほど気にしなくても水蒸気の影響の少ないスペクトルが得られる。しかし、乾燥空気供給装置がない場合、たいていは窒素ガスでページすることになり、窒素ボンベを消耗品として使うので、測定の度に前日からページするわけにはいかない。さらに分光器がシングルビームタイプであれば測定時間がずれること

から水蒸気は後から差し引くことになる。分光器メーカーによってはデフォルトとして水蒸気除去プログラムが入っているところもある。実際にこの除去プログラムを使うと、一見スペクトルから水蒸気が消えているように見える。赤外スペクトルに特に演算処理を施さないのであれば、このプログラムを活用したほうが見映えは良くなる。しかし、タンパク質の主鎖ならび側鎖の構造解析においては、このようなプログラムはあまり役に立たないどころか、かえってアーティファクトを生んでしまう原因になる。水蒸気はそのときの温度、湿度などの環境で変化するので、水蒸気のバンドを消すためには、その日に測定した水蒸気のスペクトルを用いることが望ましい。実際に、数時間以内で測定した水蒸気であれば、かなり水蒸気を除去することができる。最終的には、サンプルによるバンドがない2000~1700 cm^{-1} の領域で水蒸気のシャープなバンドが出ていないことで確認できる。最近、マクロの透過型測定よりもATR測定や顕微赤外測定の方がかえって簡便になってきたが、分光器にATRユニットや顕微赤外ユニットを外づけのアクセサリとして用いると、測定はシングルビームになる。しかもアクセサリは意外にページに関する配慮が十分になされていないことが多いので、水蒸気に関しては注意が必要である。

〈水の差し引き〉

重水の場合はDOD変角振動が 1200cm^{-1} 付近に現れるので、アミドI領域($1700\sim 1600\text{cm}^{-1}$)を解析するのにバンドのオーバーラップを気にする必要はない。しかし、軽水の場合は、水のHOH変角振動とタンパク質のアミドIバンドが重なるので、水を引くときは $2300\sim 2000\text{cm}^{-1}$ の水の結合音と考えられるブロードなバンドが平らになるように差をとるのが一般的である。水の差し引きを円滑に行うためには、試料のサンプルの厚みをスペーサーで $15\mu\text{m}$ 以下にすることである。 $20\mu\text{m}$ の厚さで水の吸光度は2近くになるので 1650cm^{-1} 付近のバンドが飽和してしまう。透過法を用いずにATR法を用いると、水の吸収を低く抑えることができるので、タンパク質水溶液の測定には有効である。

今回紹介するカルシウム結合タンパク質の側鎖 COO^- 基の研究では、 COO^- 逆対称伸縮振動バンドを解析するために、アミドIバンドとの重なり避けることが必要となり、重水溶液中での測定が必要になる。タンパク質主鎖のNHはすべてD化し、重水溶液試料を準備した。タンパク質濃度は $1\sim 2\text{mM}$ に調製した。測定はすべて透過型(マクロ)で行った。

アカザラガイトロポニンC (天然型)の金属イオンと の特異的相互作用⁵⁾

トロポニンC(TnC)は筋収縮を制御する Ca^{2+} 結合タンパク質である⁶⁾。脊椎動物の骨格筋や心筋では、

細胞内の Ca^{2+} 濃度に応じて、TnCは最大4つの Ca^{2+} を結合し、立体構造を変化させることにより、筋収縮のonとoffを制御している。一方、無脊椎動物のアカザラガイ閉殻筋TnCは、脊椎動物のTnC同様、4つのEFハンドモチーフ(helix-loop-helix)⁷⁾をもつにもかかわらず、1つしか Ca^{2+} を結合しない⁸⁾。このカルシウム結合部位は最もC端側のEFハンドモチーフ(サイトIV)に位置する。そこで、アカザラガイトロポニンC並びにその変異体の Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 配位構造についてFTIRを用いて解析した。赤外 COO^- 逆対称伸縮振動バンドは金属イオンに結合するグルタミン酸(Glu, E)もしくはアスパラギン酸(Asp,

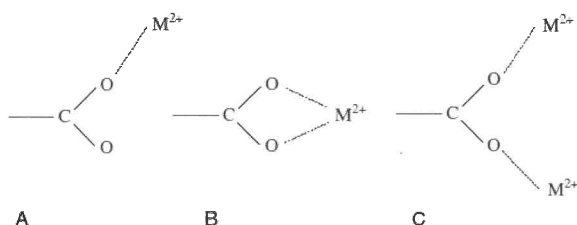


Figure 1

Coordinating structures of the side-chain COO^- groups to M^{2+} in (A) unidentate, (B) bidentate, and (C) bridging modes.

D) 側鎖 COO^- 基の配位様式についての情報を与え、その波数に基づいて、unidentate型、bidentate型、bridging型などの配位様式(図1)を識別することができる^{9), 10)}。bridging型の2つの金属イオンのうち一つが水分子などに置き換わる場合をpseudo-bridging型といい、タンパク質水溶液中ではunidentate型は実際にはpseudo-bridging型になっていると考えられる¹¹⁾。

通常の赤外吸収スペクトルだけでは金属イオンの結合による構造変化を比較することは難しいので、二次微分演算あるいはフーリエセルフデコンボリューションなどの演算処理を施す必要がある。図2にapo型(二価金属イオンフリー型)、 Mg^{2+} 結合型、 Ca^{2+} 結合型の赤外吸収スペクトル、図3に二次微分スペクトルを示す。赤外吸収スペクトルだけを眺めてもよく似ているということぐらいしか議論できない。しかし、

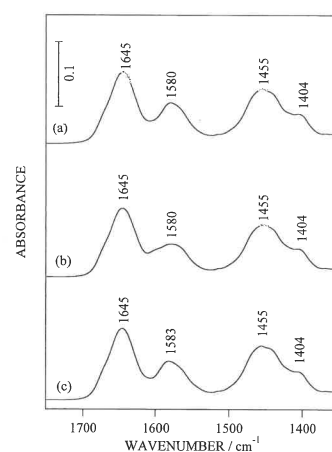


Figure 2

Infrared absorption spectra of (a) apo, (b) Mg^{2+} -bound, and (c) Ca^{2+} -bound Akazara scallop troponin C in solutions containing 40 mM Hepes-NaOD (pD 7.4) and 100 mM KCl.

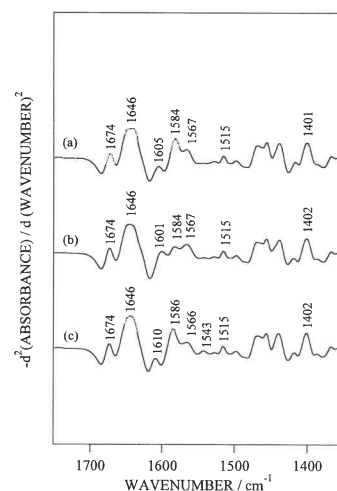
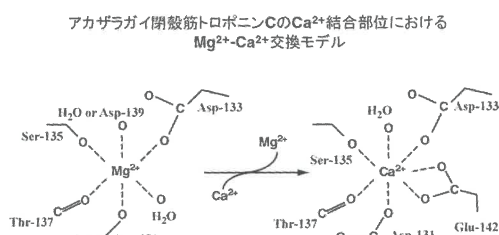


Figure 3

FTIR second-derivative spectra of (a) apo, (b) Mg^{2+} -bound, and (c) Ca^{2+} -bound Akazara scallop troponin C in solutions. Second-derivatives are multiplied by -1 .

二次微分演算を施すと、側鎖に関する詳しい議論ができるようになる。図3において Ca^{2+} 結合型のみで 1543cm^{-1} にバンドが現れたが、これはGlu142の側鎖 COO^- 基が Ca^{2+} と二座配位型で結合したものと解釈した。一方、 Mg^{2+} 結合型の 1600cm^{-1} 及び Ca^{2+} 結合型の 1586cm^{-1} バンド強度の増大は、Asp131とAsp133の側鎖 COO^- 基が Mg^{2+} および Ca^{2+} とpseudo-bridging型で結合したことを示唆した。生理的条件下では、offでは Mg^{2+} がonでは Ca^{2+} がトロポニンCと結合する可能性が考えられるので、on/offの機構として図4に示す配位構造のモデルが考えられる。蛇足ではあるが、もしも水蒸気の引き残りがあると、二次微分演算で水蒸気のピークがエンハンスされて、タンパク質の情報が消されることになったであろう。



A schematic model of changes in coordination structure of the Ca^{2+} binding site of Akazara scallop troponin C accompanying the exchange of Mg^{2+} with Ca^{2+} .

の活性化のon/off機構に直接関わっていることが示唆された。E142D変異体に関しても同様に Ca^{2+} と結合としても 1543cm^{-1} にはバンドが現れなかったが、 Mg^{2+} 結合状態で観測される 1600cm^{-1} のバンドが Ca^{2+} 負荷により消えたことにより、結合サイトIVに Ca^{2+} が入ったことが示された(図5 a-c)。

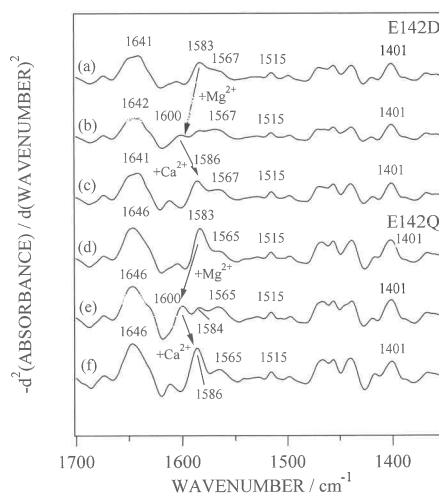


Figure 5

Figure 5 Infrared second-derivative spectra of apo, Mg^{2+} -loaded and $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ loaded E142D and E142Q mutants. Sample solutions were $[\text{TnC}] = 2\text{ mM}$, $[\text{KCl}] = 100\text{ mM}$ for the apo state, $[\text{TnC}] = 2\text{ mM}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 20\text{ mM}$, $[\text{KCl}] = 100\text{ mM}$ for the Mg^{2+} -loaded state and $[\text{TnC}] = 2\text{ mM}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 20\text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 20\text{ mM}$, $[\text{KCl}] = 100\text{ mM}$ for the Mg^{2+} -loaded state.

E142Q変異体の Mg^{2+} , Ca^{2+} 配位構造^{12),13)}

結合サイトIVの12番目のグルタミン酸をグルタミン(Gln, Q)で置き換えた変異体をE142Qと呼ぶこと

にする。E142Qの赤外二次微分スペクトルを調べると、 Mg^{2+} 負荷状態で 1600cm^{-1} のバンド強度が増加したことにより、Asp131, Asp133の側鎖 COO^- 基はpseudo-bridging型で Mg^{2+} と結合したものと考えられる。この結果は、これまで天然型の Mg^{2+} 結合に伴うスペクトル変化の結果とほぼ一致した。そこで、 Mg^{2+} 滴定を行って 1600cm^{-1} のバンドの強度変化を調べたところ、 Mg^{2+} の親和性は天然型とE142Qでほぼ同じであることがわかった。したがって、天然型のGlu142側鎖 COO^- 基は Mg^{2+} 配位に関与していないことが結論づけられた。また、E142Qの Mg^{2+} 結合の影響についてCDや蛍光スペクトルでも調べたところ、天然型と同じ挙動を示した。一方、 Ca^{2+} 負荷による影響は、12位の側鎖 COO^- 基がなくてもAsp131とAsp133の側鎖 COO^- は Ca^{2+} と結合することがわかった(図5d-f)。しかし、CDや蛍光スペクトルを測定すると Ca^{2+} 結合の効果は天然型のものとは異なり、Glu142側鎖 COO^- 基がアカザラガイトロポニンC

合成ペプチドアナログ によるアプローチ^{13),14)}

タンパク質の側鎖の帰属には、アミノ酸やペプチドなどのモデル化合物のスペク

トルと比較するのが常套手段である。ウサギ骨格筋トロポニンCのサイトIIIに関してNMRによる報告¹⁵⁾が1980年代にされていたので、まずこのペプチドに焦点を当てて解析を行った。その結果、カルシウム結合部位に相当するペプチドは Ca^{2+} と結合せず、 COO^- 基の二座配位のバンドが観測されるためにはカルシウム結合サイト12残基の他に少なくともC端側に5残基のばしたものの、すなわち17残基の鎖長が必要であることがわかった¹⁴⁾。そこで、アカザラガイトロポニンCのサイトIVについても17残基の合成ペプチドアナログを用いて赤外測定を行った。結合部位の12位のグルタミン酸を他のアミノ酸で置き換えたペプチドを用いて、 COO^- 逆対称伸縮振動領域を調べたところ、天然型のモデルペプチドでは 1545cm^{-1} 付近にバンドが観測されたが、置換型のモデルペプチドでは観測されなかった(図6)。この結果、これまでアカザラガイトロポニンCで帰属した 1543cm^{-1} のバンドは142位のグルタミン酸が Ca^{2+} と二座配位型で結合したこと

に由来することを裏付けることができた。また、グルタミン酸をアスパラギン酸で置換したE142DペプチドでもCOO⁻逆対称伸縮振動バンドの低波数シフトが観測されなかったということは、側鎖のメチレン基が1つ欠けただけでも配位構造に重大な影響を与えることを示唆するものであり、タンパク質の構造機能相関を理解するために興味深いデータと考えられる。

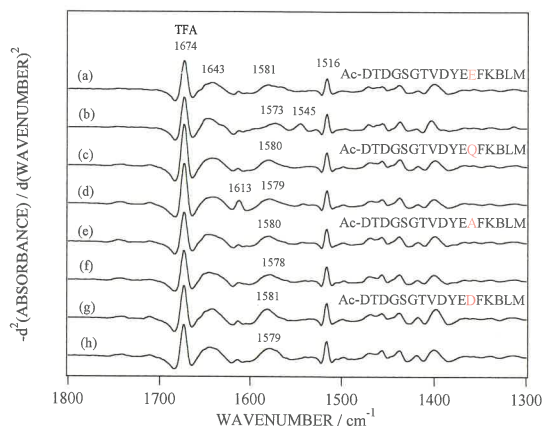


Figure 6

Infrared second-derivative spectra for synthetic 17-residue peptide analogues for the calcium binding Site IV of Akazara scallop TnC (wild type) (a, b) and site directed mutated ones (E142D (c, d), E142Q (e, f) and E142A (g, h)) in the apo and Ca²⁺-loaded states.

結語

カルシウム結合タンパク質と金属イオンとの特異的相互作用を調べ

る方法として、FTIRが有用なアプローチであることを紹介した。特に変異体やモデルペプチドを利用することにより、カルシウム結合タンパク質の活性化のon/off機構を直接的に解明できることが期待される。

タンパク質構造に関してX線結晶構造解析や多次元NMRで得られる情報量に比べればFTIRで得られる情報量ははるかに少ない。しかし、構造と機能との相関に関わる情報がピンポイントで得られるという点がFTIRの特徴と考えられる。今後FTIRが活躍しそうな研究テーマとしてintactな状態でのタンパク質構造解析が挙げられる。不溶性タンパク質や不均一な生体システムはX線結晶構造解析やNMRといった構造生物学の常套手段が苦手とする研究対象である。それに対してFTIRは基本的にサンプルの状態によらず測定可能である。例えば、ウシ卵子の表層部に存在する透明帯タンパク質を非破壊的に測定できる手段としてATR/FTIRが有用であることを明らかにした¹⁶⁾。このように生物システムのintactなタンパク質に焦点を当てていくと、FTIRの有用性はさらに高まるものと期待できる。

謝辞

アカザラガイトロポニンCのFTIRに関する研究は、東京大学大学院農

学系研究科の田之倉優教授の協力でここまで発展してきた。タンパク質の精製、調製では湯本史明博士の協力を得た。また、カルシウム結合部位の合成ペプチドアナログは産業技術総合研究所の森井尚之博士に提供していただいた。

文献

- 1) H. H. Mantsch, H. L. Casal, D. M. Moffat, In *Spectroscopy of Biological Systems*, R. J. H. Clark, R. E. Hester, Eds. Wiley Chichester, pp. 1-46 (1986).
- 2) J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F. M. Göni, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56 (1991).
- 3) A. Barth, C. Zscherp, *Q. Rev. Biophysics*, 35, 369-430 (2002).
- 4) A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141-173 (2000).
- 5) F. Yumoto, M. Nara, H. Kagi, W. Iwasaki, T. Ojima, K. Nishita, K. Nagata, M. Tanokura, *Eur. J. Biochem.*, 268, 6284-6290 (2001).
- 6) A. S. Zot, J. D. Potter, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 16, 535-539 (1987).
- 7) R. H. Kretsinger, C. E. Nockolds, *J. Biol. Chem.*, 248, 3313-3326 (1973).
- 8) T. Ojima, K. Nishita, *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 344-349 (1992).
- 9) M. Nara, M. Tasumi, M. Tanokura, T. Hiraoki, M. Yazawa, A. Tsutsumi, *FEBS Lett.*, 349, 84-88 (1994).
- 10) M. Nara, H. Torii, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.*, 100, 19812-19817 (1996).
- 11) M. Mizuguchi, M. Nara, K. Kawano, K. Nitta, *FEBS Lett.* 417, 153-156 (1997).
- 12) M. Nara, F. Yumoto, K. Nagata, M. Tanokura, H. Kagi, T. Ojima, K. Nishita, *Biopolymers*, 74, 77-81 (2004).
- 13) M. Nara, M. F. Yumoto, K. Nagata, M. Tanokura, H. Kagi, T. Ojima, K. Nishita, H. Morii, *Vib. Spectrosc.* 42 188-191 (2006).
- 14) M. Nara, H. Morii, F. Yumoto, H. Kagi, M. Tanokura, *Biopolymers*, 82, 339-343 (2006).
- 15) G. S. Shaw, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Biochemistry*, 30, 8339-8347 (1991).
- 16) M. Nara, N. Yonezawa, T. Shimada, K. Takahashi, M. Tanokura, F. Yumoto, H. Nakagawa, K. Ohashi, S. Hamano, M. Nakano, *Exp. Biol. Med.* 231, 166-171 (2006).

分解とアパーチャ

分析計測事業部 スペクトロビジネスユニット 太田 宏

1. 分解とは

FTIRでスペクトルを測定する場合、その測定パラメータとして、"分解"があります。

"分解"は、 16cm^{-1} 、 8cm^{-1} 、 4cm^{-1} 、 2cm^{-1} ……などから選択することが出来ますが、これは測定するデータの細かさ(分解できる最小ピーク間隔)を示すものです。

例えば、 4cm^{-1} を選択すると、得られるスペクトルはおよそ 2cm^{-1} ごとになっており、よりシャープ(分解の高い)なスペクトルを得るためには、 2cm^{-1} や 1cm^{-1} などの値を設定します。

ただし、これは気体など試料の場合に成り立ちますが、固体や液体などの試料の場合は、高分解な設定にしても得られるデータの分解は向上しない場合があります。これは、固体や液体の分子が周りの分子の影響を受けてピーク自身が広がっているためです。

また、分解を高くすると、後述するように小さなアパーチャが選択され、検出器に入る光量が減少するために、スペクトル上のノイズが増えるために、必要以上に分解を高くすることは好ましくありません。

このため、固体や液体などの試料の場合は、一般的には 4cm^{-1} 程度に、気体などの場合には 1cm^{-1} や 0.5cm^{-1} の設定にします。なお、気体の場合でも定量目的などの場合には、低い分解で測定することもあります。

2. FTIRをカメラにたとえるならば

少々乱暴かもしれませんが、FTIRの"分解"の設定は、カメラの絞りやシャッタースピードの設定に例えると分かり易いと思います。

FTIR	カメラ
赤外光源	被写体からの光
アパーチャ(分解)	絞り
積算回数	露光時間 (シャッタースピード)
ゲイン設定 (通常は"AUTO") 検出器設定 (TGS検出器やMCT検出器など)	フィルムのISO感度

表1 FTIRとカメラの設定

カメラの"絞り"は、被写体から入射する光を一度、"絞り"の位置で集光し、その量を調節する機構です。鮮明な写真を得るためには、"絞り"を絞ればよいわけですが、フィルムに入る光量が減るために、暗い写真になります。

これをより明るくするためには、シャッタースピードを遅くし、フィルムに入る積算光量を増やします。

一方FTIRでは、カメラの"絞り"に対応する"アパーチャ"の選択により、得られるスペクトルの鮮明さ(ピークのシャープさ)を変えることができます。

カメラでは、被写体からの光をフィルムに映すことになりませんが、FTIRでは、装置内部に赤外光源を組み込んで、試料に照射し、検出器でその光量変化を収集します。

光源の大きさを変更することは容易でないために、一度光源の像をアパーチャ位置で集光し、アパーチャの大きさを変えることにより、擬似的に光源の大きさを変えています。

3. アパーチャとは

装置の光源は、理想的には点(光源)ですが、そのような光源は存在せず、また、赤外検出器面で十分な光量を確保するために、ある大きさを持った光源を使います。光源が点光源でないと干渉計に入る光は平行な光だけでなく斜めに入る(斜入射)光も試料に照射され、最終的に赤外検出器で受光され、測定する信号として取り込まれます。

この斜入射の光は、直進する光と同様に扱われますので、波長の長い成分が斜めに入る角度分だけ波長の長い成分としてデータに組み込まれます。

この斜入射の成分は、光源の大きさに応じて増減するために、測定する"分解"が、斜入射によるピークの広がりの影響を受けない程度になるようにアパーチャ径を選択すればよいわけです。

FTIR装置内部では、"アパーチャ"を"AUTO"に設定した場合、設定された"分解"に応じて、自動的に"アパーチャ"が設定されます。

各分解で必要なアパーチャ径A(cm)は、

$$A \leq 2f_c \sqrt{(\Delta\lambda / \lambda_{\max})}$$

f_c : コリメータ焦点距離

$\Delta\lambda$: スペクトル分解

$\lambda_{\max}$: 測定最大波数

で計算することができます。

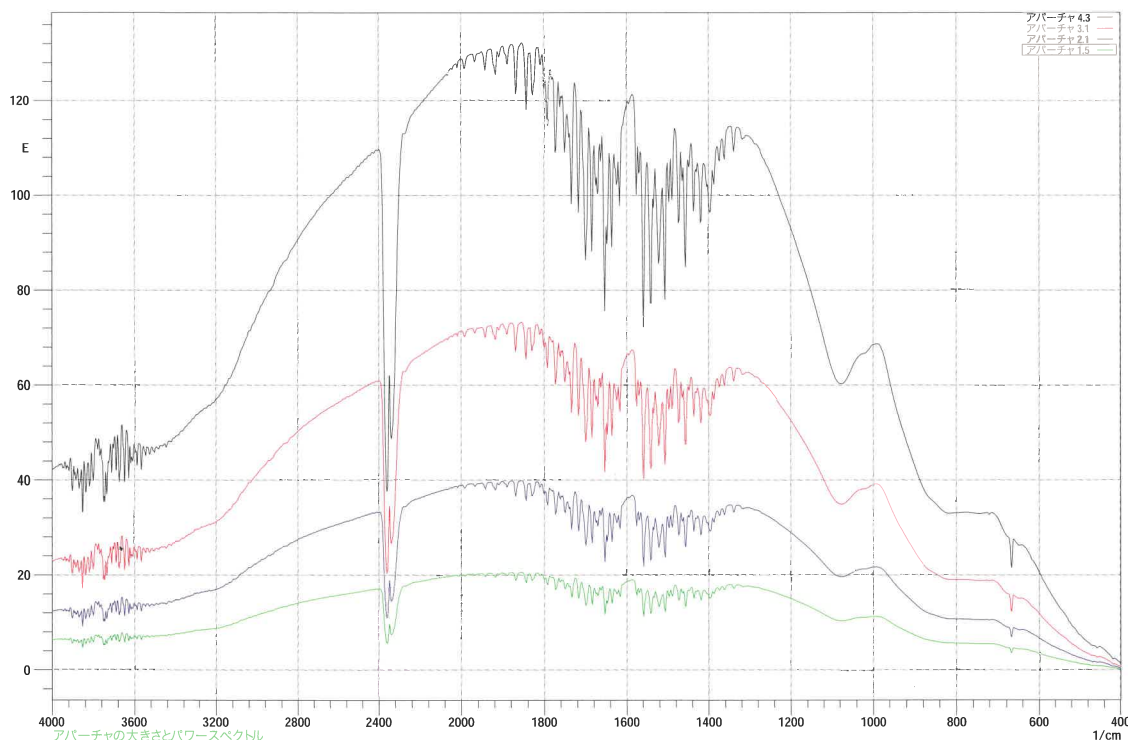


図1 各アパーチャの光量の違い

図1は、各アパーチャの光量の違いをパワースペクトル強度により表示したものです。

FTIRでは、高速フーリエ変換(FFT)を用いてインターフェログラム(干渉波形)をパワースペクトルに変換しているために、各分解のデータ点数は2のべき乗となります。(表2参照)

この図から分かるように、分解が倍良くなると、アパーチャによる光量は1/2程度になります。光量が減少した分、見かけ上のノイズは増えますから、高分解測定の場合、積算回数を十分大きく設定しないと鮮明なスペクトルは得られないことになります。

4. 分解とデータ点数

汎用的な赤外分光光度計では、一般的に 16cm^{-1} から 0.5cm^{-1} 程度までの分解を選択することが可能ですが、装置内では、実際に分解を設定すると次のような変更を行います。

設定分解に応じた移動鏡の駆動距離(光路差)を設定する。

設定分解に応じたアパーチャを設定する。

島津IRPrestige-21では次のように設定を行っています。

分解	16	8	4	2	1	0.5
光路差	0.075	0.125	0.25	0.5	1	2
データ点数	2048	4096	8192	16384	32768	65536
データ間隔(補1)	7.72	3.86	1.93	0.96	0.48	0.24
アパーチャ径	open	open	open	3.8	2.4	1.5

表2 分解と各種パラメータの設定値

(補1)記載値は計算上の値

実際は選択したアパーチャ径ごとのパラメータで補正している

FTIRでは、一般的に 632.8nm の波長のヘリウムネオンレーザーを使って、その干渉フリンジ位置でデータをサンプリングしています。

He-Neレーザーの波長 632.8nm を波数に変換すると 7901cm^{-1} で、これをデータ点数の1/2で割った値(FFTでは負側にもデータが現れるため)がデータの波数間隔になります。

4cm^{-1} で測定する場合、8192点のデータを収集するので、

$$7901 \div 8192 / 2 \div 1.93\text{cm}^{-1}$$

ごとにデータが生成されます。これは計算上の値で、実際には、選択されたアパーチャ径ごとに設定された補正値を掛けて、光学的な波数のズレを補正しています。

移動鏡の駆動距離(光路差の1/2)とサンプリング点は比例しますが、各分解に必要なデータ点数は、表2に示す値となります。

5. 実際の測定における注意点

図2は、分解を変えて、空気中の水蒸気のスペクトルを測定したものです。

高分解測定になるにしたがって、水蒸気の細分化された吸収ピークが現れてくることが分かります。

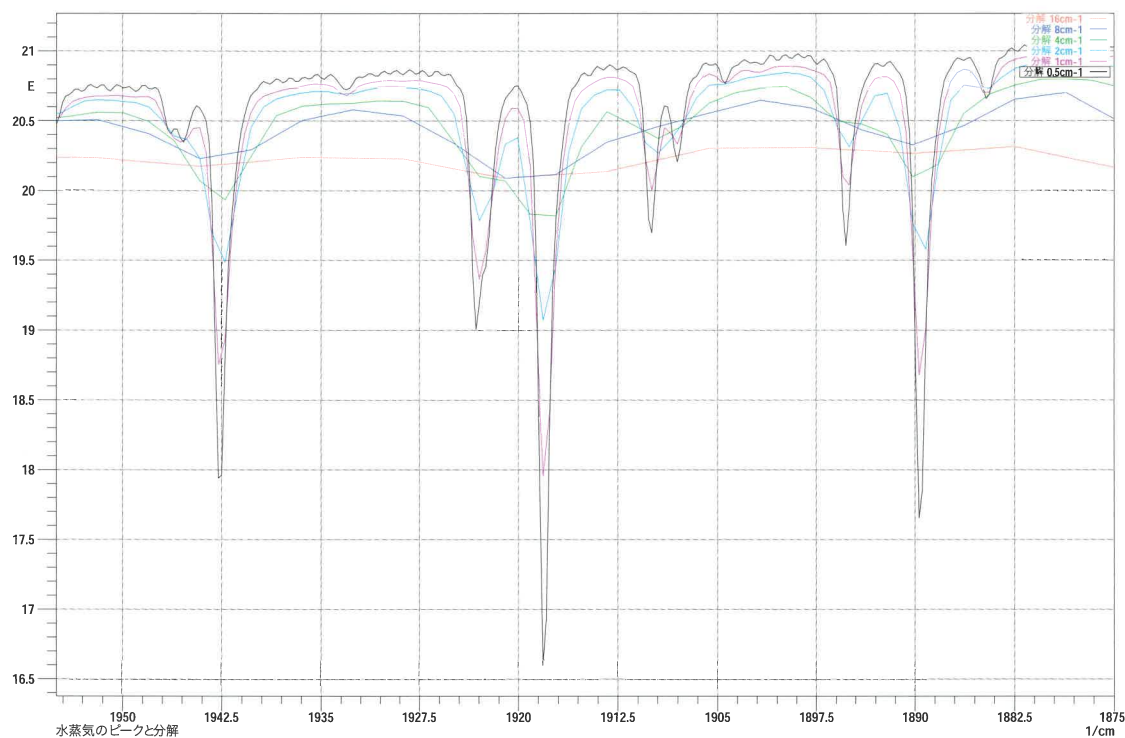


図2 各分解で測定した水蒸気のスペクトル

アパーチャは、光源の結像位置に配置されていますが、試料室の集光位置も光源の結像位置となります。

このために、試料室において、サンプルホルダなどが、アパーチャと同様な光量を制限する場合、波数がずれたり、波形が乱れたりする場合があります。

例えば、バックグラウンド測定時は、サンプルホルダが無い状態で測定し、サンプル測定時に光束径を大きく変えるホル

ダによりサンプルを測定するとこのような不具合が生じます。(図3参照)

バックグラウンド測定を、サンプルを搭載しない状態でサンプルホルダを使っておこなうか、測定時のアパーチャ径の設定を1.5や2.4などに固定しておこなうとこのような不具合を回避することができます。(図4参照)

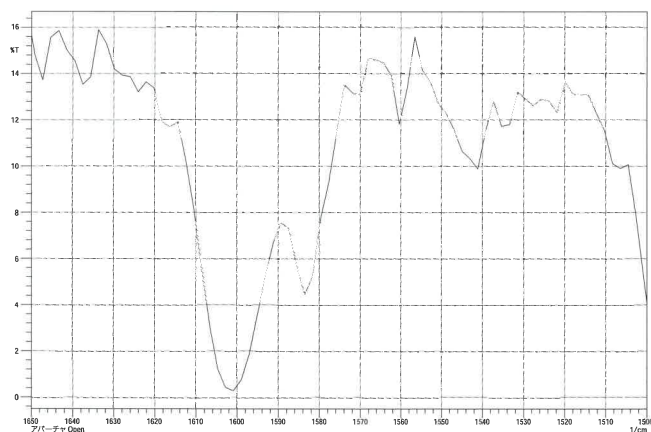


図3 バックグラウンドをサンプルホルダ無しに測定した異常スペクトル

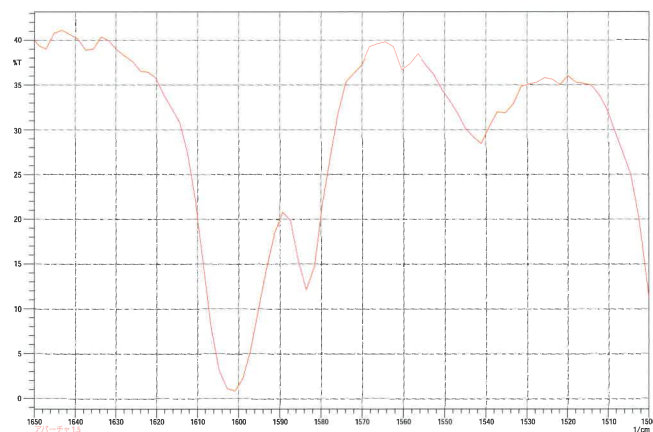


図4 図3と同じ条件でアパーチャを1.5に設定して測定したスペクトル

1回反射ATR法による フィルムの偏光測定

分析計測事業部 応用技術部 京都カスタマーサポートセンター 武内 誠治

延伸されたポリマーは延伸方向と同じ向きに分子の長軸が並ぶ傾向があり、その度合いを偏光測定によって求めることができます。フィルム状の試料では、偏光子を用いた透過法が一般的な測定方法ですが、ここではATR法による偏光測定の例をご紹介します。

1. 透過法による偏光測定

偏光測定には、光の電場が一定の方向にしか振動しない直線偏光と呼ばれる光を用います。この直線偏光を作り出すためには、偏光子 (polarizer) と呼ばれる光学素子が必要です。偏光子としては、KRS-5などの窓板にワイヤーグリッドが刻まれたものが一般的によく使用されます。

透過法での偏光測定の手順は以下の通りです。まず、偏光子の設置角度を0° (電場の向きは垂直方向) としてBKG測定を行なった後、試料の延伸方向を縦方向にあわせてサンプル測定をします。(このとき偏光方向と延伸軸の方向は平行になっています。) 次に試料の角度を90°回転させて試料の延伸軸と偏光方向を垂直にした状態でサンプル測定を行ないます。試料の延伸軸に対して平行な偏光と垂直な偏光で得られた二つのスペクトル $A_{\parallel}$ 、 $A_{\perp}$ の吸光度比をとったものが、二色比として表されます。

$$R = A_{\parallel} / A_{\perp}$$

2. ATR法による偏光測定

透過法の場合は、フィルムの膜厚が厚くなりすぎるとピークが飽和して測定できない場合がありますが、ATR法の場合は膜厚を気にせずに測定できるメリットがあります。

さらに1回反射ATR法の場合は、多重反射ATR法に比較すると、プリズムサイズが小さいため、試料の回転がしやすく、また密着性にもすぐれていることから、再現性のよいスペクトルを得ることができます。

偏光ATR法の特徴は、図1に示されたように、フィルム状の試料で2軸対称性の場合、分子がX、Y、Zの軸方向に対してどのように配向しているかについての情報が得られる点です。この図ではY軸が延伸方向、X軸は面内における延伸軸と垂直な方向、Z軸は試料面に対して垂直方向で厚さ方向を示します。測定は、試料の延伸方向に光の進行方向を合わせて、平行偏光と垂直偏光を照射する場合と、試料の向きを90°回転して

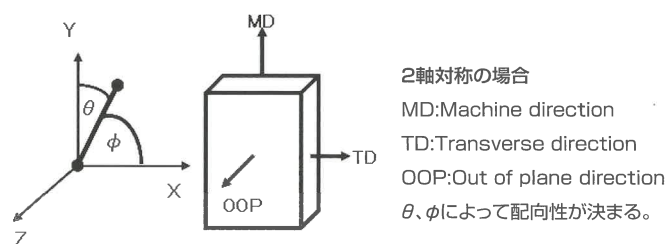


図1 分子配向の表現

同様に平行偏光と垂直偏光を照射する場合の合計4回が必要となります。ここで平行偏光とは入射光と反射光を含む面に平行な電場を持つ直線偏光のことで、垂直偏光は平行偏光とは垂直な面に電場を持つ直線偏光のことを意味します。このとき反射点でのエバネッセント波は、図2に示したように垂直偏光の場合はX軸方向にベクトルを持ちます。また平行偏光の場合はY軸、Z軸方向にベクトルを持ちます¹⁾。

したがって上の手順で得られたスペクトルは、X、Y、Z軸方向の分子振動の情報を含んだものになります。3軸方向の配向性を示す詳細な方法は文献¹⁾に譲ることとして、ここでは実際に測定したPET（ポリエチレンテレフタレート）フィルムのスペクトルをご紹介します。

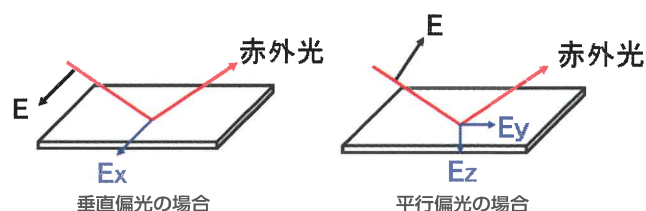


図2 偏光方向とエバネッセント波の方向

3. 延伸PETフィルムの偏光ATR測定

図3は、無延伸のPETフィルムを4つのモードで測定した結果を示したものです。無延伸の場合は、いずれの場合もスペクトルにはほとんど変化がなく、これより、分子の配向性がないことがわかります。図4は同じPETフィルムの3倍延伸したものを同様に測定した結果です。

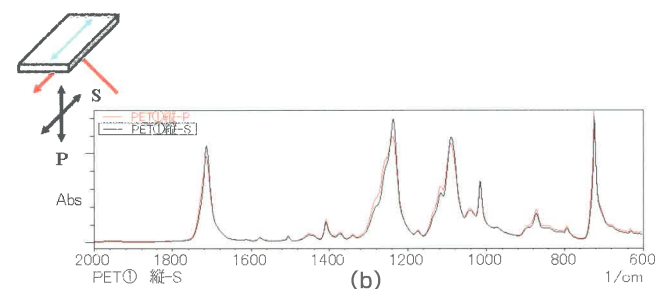
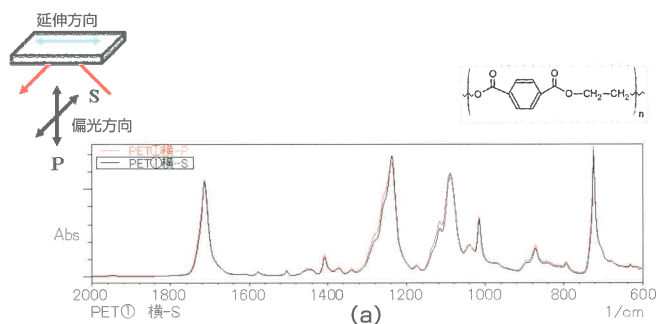


図3 1回反射ATRによる偏光測定
無延伸PETフィルム

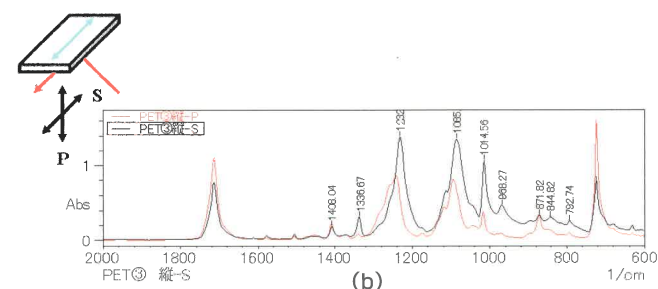
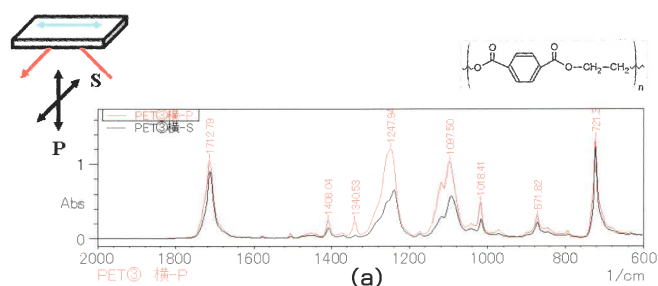


図4 1回反射ATRによる偏光測定
3倍延伸PETフィルム

延伸軸の向きを90°変えたそれぞれの場合で、平行偏光と垂直偏光によるスペクトルに違いが確認できます。たとえば、1340cm⁻¹付近のピークはCH₂縦ゆれ振動によるもので分

子の長軸方向に振動するモードですが、これは図4(a)では平行偏光(P)で強く、垂直偏光(S)ではかなり弱くなっています。一方、図4(b)ではその逆になっており、分子が延伸方向に配向していることを示しています。

図4の1410cm⁻¹のピークは、ベンゼン環の面内変角振動で、非二色性バンドとされることから、このピークで規格化した後、図4(a)、(b)において、並行偏光と垂直偏光の結果で差スペクトルを求めたものを図5(a)、(b)に示しました。赤外二色性を示すバンドが試料の向きと偏光の向きによって変化している様子がわかります。

Everallら¹⁾によると、延伸率を1.0~3.5倍まで変化させて実験を行なった結果、延伸率が大きくなるにしたがって、延伸方向の配向度が高くなるのに対して、TD(フィルム面内の延伸軸と垂直な方向)および深さ方向の配向度が低下するという結果が観測されています。

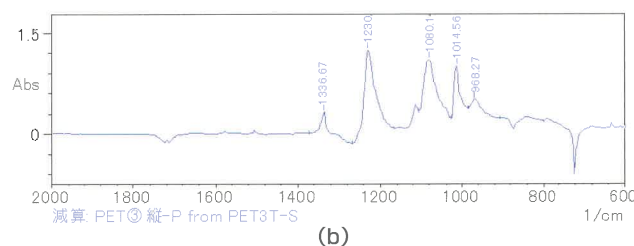
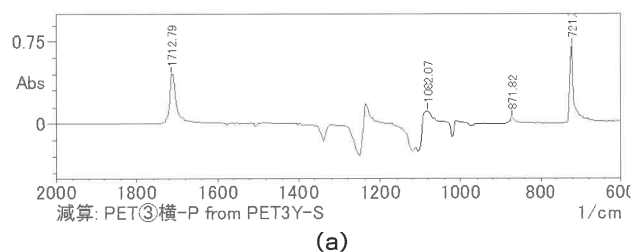


図5 差スペクトル

4. まとめ

ここでご紹介したように、フィルム表面の配向性を調べる方法としては、偏光ATR測定が非常に有効であることがわかります。ただし、ダイヤモンドプリズムによる1回反射ATR法では、局所的に強い力が加わることにより、圧力が分子配向に及ぼす影響が懸念されたり、屈折率が高いポリマーでは、吸収の強いバンドにおいてピークに歪が生じるなどの問題があります。したがって、偏光ATR測定で配向性の評価を行う場合は、これらのことを考慮して二色性を示す最適なピークを選択することが必要となります。

参考文献

1) Neil J.Everall and Arran Bibby Appl.Spectrosc.51,1083 (1997)

Q &

A

今回のQ

KBr錠剤法、拡散反射法で測定しているのですが サンプル濃度はどれくらいがよいのでしょうか

A

KBr錠剤法の場合一般的にKBrの量に対して1%前後がよいとされています。実際にはサンプルによって分子吸光係数が異なりますので透過率や吸光度を目安にしながら調整します。

スペクトルの一番大きなピーク強度が透過率で10%程度(吸光度で1 Abs程度)になるようにするとよいとされています。例として乳糖を測定したスペクトルを示します。(図1参照)

最大ピークの強度が透過率100%に近い場合は、ピークと比較してノイズがより大きく見えます。

それに対して最大ピークの強度が0%に近づいていくと吸収ピークが飽和していきます。このため正確なスペクトルが得られませんので特に気をつけてください。(図2参照)

拡散反射法ではKBrに対して濃度は5%前後がよいとされていますが、やはり最大ピークの強度を目安にして濃度を調整します。ただ拡散反射法の場合、サンプルの表面反射の影響で反射率10%でも吸収が飽和することがあります。より高めの反射率に調整したほうがいいでしょう。(図3参照)

フィルム法や液膜法、顕微鏡透過測定などの透過測定法においても最大ピークの透過率(10%前後)を参考にサンプル厚さや光路長を調整するとよいでしょう。

微量成分のピークを確認したい場合には、意図的にサンプル濃度を高めにして測定することもあります。

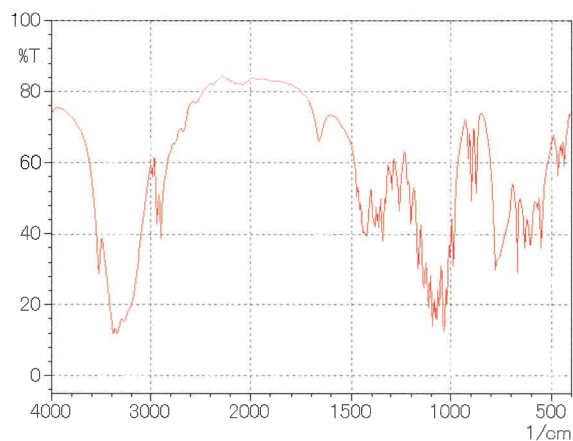


図1 KBr錠剤法で適正濃度のスペクトル

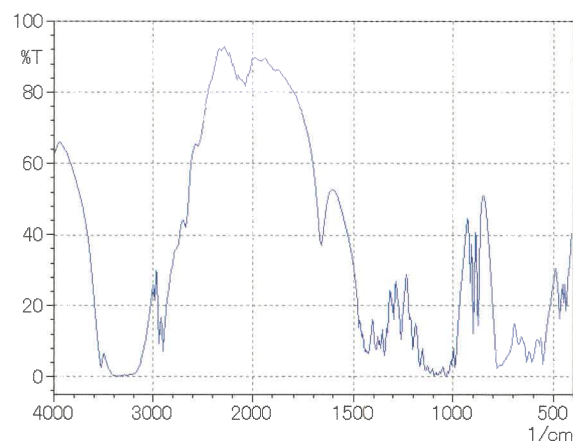


図2 KBr錠剤法でピークの飽和したスペクトル

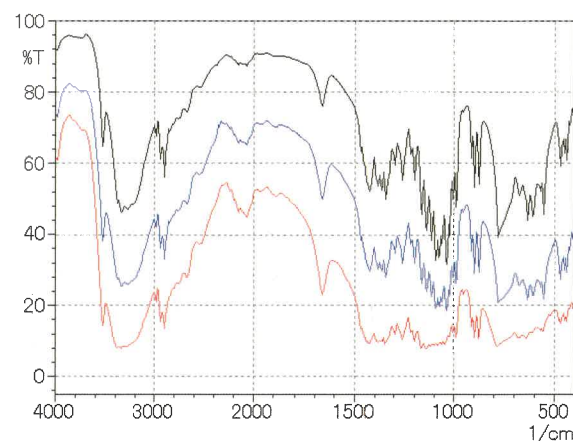


図3 拡散反射法で濃度を変えた場合のスペクトル

