

円二色性分散計 (日本分光 J-820)

薬学部 薬物動態制御学分野 末永綾香 ; 内線 4153

§1 はじめに

1817年、Biotは種々の天然物に旋光性のあることを見出し、その旋光角は測定光の波長によって変化するという旋光分散 (optical rotatory dispersion: ORD) の現象を発見した。その後、測定波長領域で光を吸収しない物質では短波長になると、一般に旋光度の絶対値が増加し、光吸収する物質ではその吸収帯の近くの波長領域で、旋光度の値が一つまたは二つ以上の極大と極小をそれぞれ示すこと (コットン効果) が判明した。しかしながら、測定上の問題のため、ほとんど応用されることがなく、光電子増倍管を用いた光電子分光偏光計が1955年、H.Rudolphによって完成されてはじめて、旋光分散および円二色性の測定技術が急速に進歩し、分子の絶対配置、配座解析および反応速度などの研究に有力な手段として応用されるようになった。現在では163-1100 nmの波長領域での測定が可能となり、旋光分散、円二色性 (circular dichroism: CD)、温度変化、磁気旋光分散、磁気円二色性の測定も容易になっている。

§2 原理

2.1 理論

平面偏光は左巻きおよび右巻きの円偏光からなっており、この両成分が媒体を通過する速度が等しければ旋光度は測定されない。しかし、左と右円偏光に対するある波長での媒体の屈折率が異なれば、両成分は異なった速度で媒体を通過する。したがって、左および右の円偏光が媒体を通過して再び一緒になった時には、位相に「ずれ」を生じることになり、透過光の偏光面は回転させられたことになる。さらに、左右の円偏光が異なった割合で媒体に吸収されると、透過光は図1のように楕円偏光となる。この不等吸収の現象が円二色性 (CD) と呼ばれる。吸収の度合いの相違と左右円偏光の透過速度とが重なって同時に起こるのが、コットン効果 (cotton effect) である。円二色性は楕円性 によって表される。ただし、 は楕円の短軸と長軸の関係を表したもので、 $\tan \theta = (A_L - A_R) / (A_L + A_R)$ である。一般に、左右円偏光の吸収係数の差は極めて小さく、平面偏光からのずれは小さいので、この効果が問題となるのは、吸収帯の付近においてである。左右円偏光に対する分子吸光係数 (ϵ_R , ϵ_L) と分子楕円率 [θ] とは次の関係がある。

$$[\theta] = \frac{1}{2} \cdot 180^\circ / \pi \cdot 10 \cdot M / c \cdot 3300 (\epsilon_L - \epsilon_R) = 3300 \cdot$$

Mは分子量、cは濃度 (g/mL) である。 $l - r > 0$ のときは右楕円偏光で分子楕円率は正の値を持ち、 $l - r < 0$ のときは左楕円偏光となって分子楕円率は負の値を持つと定義する。ORDとCDの関係は図2に示すように、CDの極大および極小の波長はUVの極大にほぼ一致し、旋光分散の極大と極小の波長の間にある。また、その符号はコットン効果の符号と一致する。すなわち、ORDにおいて、短波長にいくにつれて最初に極大が現れるものを正のコットン効果曲線、極小が現れるものを負のコットン効果曲線という。

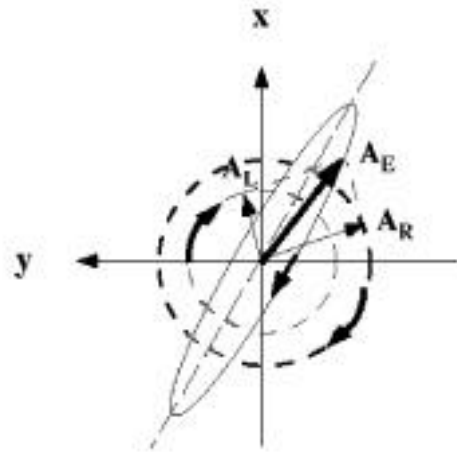


図 1. 円二色性による楕円偏光の生成

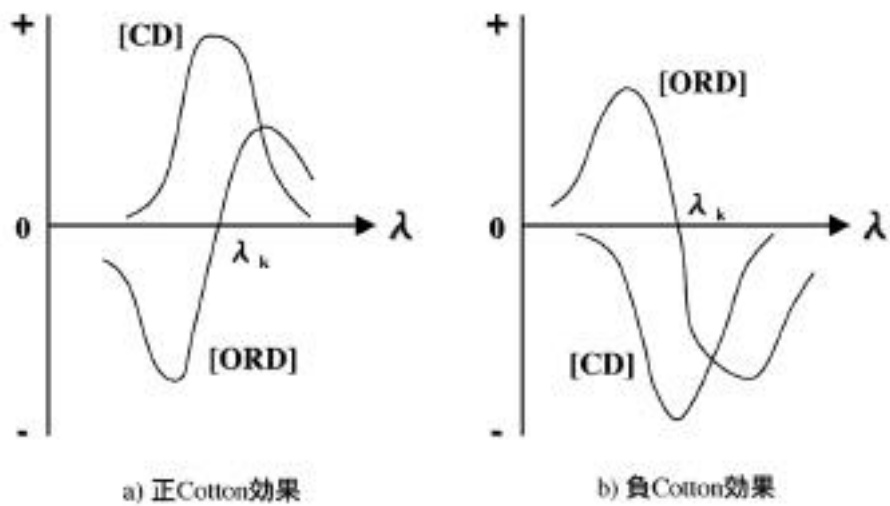


図 2. 旋光分散 (ORD) と円二色性 (CD) スペクトル

2.2 測定方法とデータ整理の方法

[測定する前に]

1. 窒素ガスを流す。(通常**の測定 (200 nm まで)**では 3~5 L/min 程度流す。この流量で光学系内部を窒素置換するには、大体 5 分程度かかる。また、**測定波長が 185 nm までの時は 5~15 L/min、180 nm までの時は 15~20 L/min、180nm 以下までの時は 20 L/min 以上で流すなど、200nm より短波長の時は流量を増やすことに注意する**。流量計で確認すること)
2. 冷却水循環装置の水量を確認し、“Power”スイッチを ON にする。
3. 本体前面左下の“Power”スイッチを ON にする。(“Power”スイッチを ON にしただけでは光源は点灯しない。通常、測定プログラムの起動と同時に自動的に光源が点灯する。)
4. 窒素を流し始めてから 5 分以上経過していることを確認後、PC およびディスプレイの電源スイッチを投入する。
5. Windows の起動手順に従って[jasco]の[スペクトルマネージャ]を起動する。
6. 表示されるメニューの中から、目的のプログラムをダブルクリックするとプログラムが起動し、目的のウィンドウが現れる。
7. 測定プログラムを起動すると、円二色性分散計が自動的に起動し、光源が点灯する。円二色性分散計の起動には約 2 分かかる。起動中の動作はメッセージで表示される。

[スペクトル測定]

1. [スペクトルマネージャ]の[スペクトル測定]をダブルクリックする (スペクトル測定プログラムが起動する)。
2. [測定]メニューの[測定条件]をクリックし、測定条件を設定する。
* 詳細な測定条件の設定および測定条件の変更法などは、「取り扱い説明書」を直接お読み下さい。
3. 試料をセルに入れ、セルホルダーに固定する。
4. [測定]メニューの[開始]をクリックすると、試料が測定され、測定の様子が画面に表示される。測定が終了すると、スペクトル解析プログラムが自動的に起動し、新しく View を開いてスペクトルを表示する。

[スペクトル保存]

1. [ファイル]メニューの[名前を付けて保存]をクリックし、スペクトルを保存する場所を選択する。
2. [ファイル名]テキストボックスにファイル名を入力し、“OK”をクリックするとスペクトルがディスクに保存される。

[スペクトル解析]

スペクトル解析プログラムを使うことで、測定したスペクトルの保存をはじめ、データ処理（光学定数演算、ノイズ除去、ピーク検出、微分、差スペクトル計算など）表示スタイルの変更（表示、色、線種など）などのスペクトルに関連した機能を実行できる。

ここでは、ディスクに保存したスペクトルをスペクトル解析プログラムの View に読み込んで光学定数（分子楕円率）の計算、ノイズ除去を行う方法について説明する。

光学定数演算

1. [データ処理]-[CD オプション]-[光学定数演算]をクリックすると、新しいダイアログボックスが現れる。
2. [光学定数]ドロップダウンリストから[分子楕円率]を選択する。
3. [セル長]および[濃度]を入力する。
4. “OK”をクリックすると、分子楕円率が計算され、新しい View で表示される。この新しいデータを保存する場合は、前述の方法と同様に行うこと。

ノイズ除去

5. [データ処理]-[補正]-[FFT フィルター]をクリックすると、新しいダイアログボックスが現れる。
6. “適用”をクリックするとノイズ除去が実行される。“OK”をクリックすると、結果が確定され、新しい View で表示される。この新しいデータを保存する場合は、前述の方法と同様に行うこと。

[測定後には]

1. スペクトル解析プログラムを終了するには、[ファイル]-[終了]をクリックする。未保存のデータが存在する場合、またはディスクのデータを変更した場合、その旨メッセージが現れる。メッセージに従って処理すること。
2. スペクトル測定プログラムを終了するには、[測定]-[終了]をクリックする。
3. スペクトルマネージャを終了するには、[アプリケーション]-[終了]をクリックする。[スペクトルマネージャ]ウィンドウを閉じて Windows の画面に戻ることに。
4. Windows を終了させる。
5. 試料室に試料がないことを確認後、本体の”Power”スイッチを OFF にする。
本体横のプレーカーの電源は常時 ON にしておくため、触らないこと！！
6. PC とディスプレイの両方の電源を切る。
7. 冷却水循環装置の電源を OFF にする。
8. 窒素ガスを止める。

§3 装置の仕様

JASCO J-820 の特徴

真空紫外域（163 nm）から近赤外波長域（1100 nm）までを高いS/Nと安定性でカバーする。

多チャンネル測定により、4チャンネルまでの同時データ入力が可能である。

日本分光のUV、蛍光、FTIRデータと共通に扱える測定解析システム「スペクトルマネージャ」の採用により、これらの機種間とのデータ交流が容易になった。

最高スキャンスピードが10,000 nm/minになり、ストップドフロー波長スキャンにも利用可能である。

その他以下の豊富なオプションが用意されている。

ORD、MCD、LD、ストップドフロー、ペルチェ式温度コントローラ（単セル、6連）FDCD、自動滴定装置、マイクロアタッチメント、タンパク質二次構造解析プログラム、マクロコマンド他

[仕様]

光源	: 450W Xe ランプ水冷方式
検出器	: ヘッドオン型光電子増倍管
変調器	: ピエゾエラストックモジュレータ
測定可能領域	: 163 ~ 1100 nm
バンド幅	: 0.01 ~ 15 nm
スリット幅	: 1 ~ 3000 μ m
レスポンス	: 0.5 msec ~ 32sec
スキャン方式	: 連続スキャン ステップスキャン
スキャンスピード	: 1 ~ 10000 nm/min (連続スキャンのとき)
データ間隔	: 0.025 ~ 10 nm (連続スキャン) 0.1 ~ 100 nm (ステップスキャン) 0.5 msec ~ 60 min (時間変化)
CD フルスケール	: ± 10 、200、2000 mdeg
CD 分解能	: 0.0005 mdeg (フルスケール ± 10 mdeg のとき) 0.01 mdeg (フルスケール ± 200 mdeg のとき) 0.1 mdeg (フルスケール ± 2000 mdeg のとき)
迷光	: 0.0003%以下 (200 nm)
RMS ノイズ	: 185 nm 0.045 mdeg 200 nm 0.035 mdeg

	500 nm 0.035 mdeg (測定条件 バンド幅 1nm、レスポンス 16 sec)
ベースライン安定性	: 0.03 mdeg/hr (測定条件 バンド幅 1nm、レスポンス 32 sec、波長 290 nm)
UV 測定	: シングルビーム測定 測光レンジ 0~5 Abs 測光正確さ ±0.01 Abs
外部入力端子	: 2チャンネル
シャッタ	: 試料前で開閉
試料室	: 寸法 305(W) × 420(D) × 270(H) mm 試料台脱着可能、各種付属品取付可能 恒温水用出入り口付き
窒素ガス置換	: 光源部、分光器部、試料室内を窒素ガスにより置換
温度	: 20 ± 5
湿度	: 70%以下
寸法	: 1270 (W) x 570 (D) x 410 (H) mm
重量	: 106kg
電力	: 100V × 50/60Hz 670W (電圧変動10%以内)

§4 利用上の注意事項

使用するにあたって、熊本大学ホームページの熊本大学生命資源研究・支援センター「機器分析施設」の”予約フォーム”にて、使用機器名・予約者名・使用日時・詳細・連絡先を記入し、予約を行ってから使用すること。なお、予約登録する際には、必ず予約状況を確認し、使用日時が重複しないよう気をつける。使用日時が重複している場合でも予約登録を受付けるので注意すること。

また、使用後は、[スペクトル測定画面]-[制御]-[光源制御]から、光源使用時間の表示を行い、備え付けの”使用記録簿”に、氏名、所属(内線)、光源使用時間、測定時間(測定終了時のカウンター値が表示されるので、測定開始時のカウンター値から測定時間を算出する)、測定波長、窒素ガスの流量、使用したセルのセル長を必ず明記すること。

§ 5 応用例

5.1 蛋白質

CDのコットン効果が蛋白質の高次構造を鋭敏に反映することが明らかになって以来、これまでに多くの測定がなされている。ここに、変性による高次構造の変化についてポリ-L-グルタミン酸を用いて測定した例を示す。pH4.3におけるポリ-L-グルタミン酸のCDを400~200nmで測定すると、225nm付近に負のコットン効果を示し、このピークの大きさが、 α -ヘリックス含量の目安として用いられる。さらに短波長領域には、強い正のコットン効果が現れる(図3 実線)。ポリ-L-グルタミン酸はpH6以上ではランダムコイルになった状態で存在するため、この効果は著しく変化し、符号の逆点が起こる(図3 点線)。

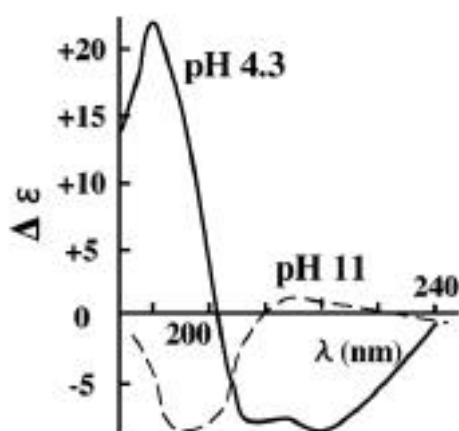


図 3. ポリペプチドのCD

5.2 核酸

核酸の構成単位はプリンあるいはピリミジン塩基にD-ribose(RNA)、2'-deoxyD-ribose(DNA)からなるヌクレオシドで、これがリン酸を介して多分子結合してヌクレオチドを形成している。天然ヌクレオチドは右巻き二重らせんを形成し、220~300nmにコットン効果を示す。図4に示すように、エナンチオおよびメソDNAはそれぞれ対応する天然型DNAとは逆および平坦なCDスペクトルを与える。塩基としてシトシン(C)を持つ12量体のエナンチオ-DNA [(L-dC)₁₂のよう]は対応する天然型DNA [(D-dC)₁₂]の鏡像体である左巻きらせんを形成するため、逆のCDスペクトルを示し、メソDNA { [(L-dC)(D-dC)]₆、以後(LD-dC)₆ }は平坦なスペクトルを与えている。同様のことが、相補エナンチオ-DNAどうしの等量混合物 [(L-dC)₁₂ · (L-dC)₁₂]

が対応する天然型右巻き二重らせん [(D-dC)₁₂ · (D-dC)₁₂] と逆のCDスペクトルを呈することからも示される。

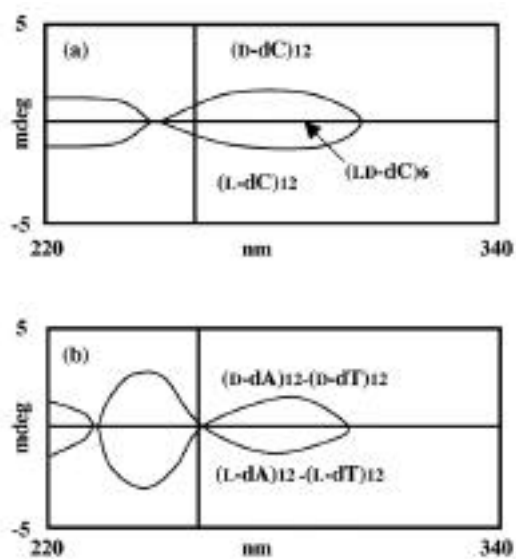


図 4. 合成したオリゴマーのCD

(a)(L-dC)₁₂, (D-dC)₁₂ および(LD-dC)₆,
 (b)(L-dA)₁₂ · (L-dT)₁₂ および(D-dA)₁₂ · (D-dT)₁₂