

垂直フロー法を用いた生体分子水溶液ラマンスペクトルの 高感度測定

¹台湾 國立交通大學 応用化学系
廖令宜¹, 濱口宏夫¹, ○平松弘嗣¹

Sensitive Detection and Analysis of Raman Spectrum of Aqueous Solution of Biomolecules Using Vertical Flow Method

Ling-I Liao¹, Hiro-o Hamaguchi¹, ○Hirotugu Hiramatsu¹

¹ *Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University, Taiwan*

【Abstract】 Combining a portable Raman spectrometer with 785 nm-excitation beam and vertical sample flow method, we recorded Raman spectrum of human urine as an aqueous solution of biomolecules with high signal-to-noise ratio. The vertical flow method enabled 12-times magnification of the signal. Based on a calculation of intensity distribution of the excitation beam and the signal in the laminar flow column of liquid sample, we showed that the magnification ratio was dependent on the diameter of pinhole, the length of laminar flow, and degree of attenuation of the excitation beam. Concentration of each biomolecule in urine was quantitatively analyzed with the aid of the Hypothetical Addition Multivariate Analysis with Numerical Differentiation (HAMAND) method and the concentration of urea, creatinine, and uric acid were respectively determined. Our approach provides the spectroscopic method for detailed, fast and quantitative analysis of biomolecules in aqueous solution. (141/150)

【序】 タンパク質をはじめとする生体分子に関し、構造及び構造変化と機能の関連を明らかにすることは、生体分子が協同的に働くことで実現する生命現象を理解するための重要なアプローチである。ラマン分光法は生体分子構造に関するユニークな情報をもたらすこと、微細な構造変化を検出しうること、という利点を持つことから、生体分子の構造解析に幅広く利用されてきた。

実験結果に基づく議論をより説得力のあるものとするために、信号雑音比の高いスペクトルを得ることが重要である。我々はラマン散乱光検出の効率化のために垂直フロー法[1]を開発した。本研究では垂直フロー法を用いて生体分子水溶液のラマンスペクトル測定を行ない、どの程度の定量的な議論が可能か検討した。

【方法】 健常人の尿 50 mL を試料とし、分画分子量 5,000 のフィルター(Vivaflow50R, Sartorius)を用いて「低分子量画分 (42.5 mL)」「高分子量画分 (7.5 mL)」に分離した。各々に関してラマンスペクトルを測定した。またモデル化合物として尿素、クレアチニン、尿酸を用い、各々10.1 g/dL, 504 mg/dL, 20.4 mg/dL のリン酸バッファー(pH 7.4) 溶液としてラマンスペクトルを測定した。スペクトル測定に光ファイバプローブ型ラマン分光計(BaySpec, 光ファイバーの開口数 0.33)を用いた。励起波長と励起光強度はそれぞれ 785 nm、300 mW である。試料スペクトルの測定条件を露光時間 1 秒、積算 60 回とした (測定時間 1 分)。垂直フロー装置はピンホール直径を 0.2 mm とし、試料流速を 12 mL/min とした。

【結果と考察】 試料水溶液 (屈折率 1.33) を垂直に射出すると、層流部分と空気(屈折率 1.00)の界面で全反射が起こる。入射励起レーザー光強度は液柱内で不均一に分布することになる。このとき液柱内部の各点でラマン散乱光が発生する。散乱強度は入射励起光の強度に比例する。ラマン散乱光の一部は気液界面での全反射を経て出射 (=入射) ピンホールに至る。この時の試料液柱の中心軸を含む平面内の各点での「励起光強度」「発生したラマン信号のうち全反射によりピンホールに到着する強度」の空間分布、をモデル計算により求めた。入射励起光強度(Fig. 1、各図左側)及びピンホールに到達する信号強度(Fig. 1、各図右側)はそれぞれ特徴的な空間分布パターンを示した。ピンホール直径が大きいほど励起光強度と信号強度が低下すること

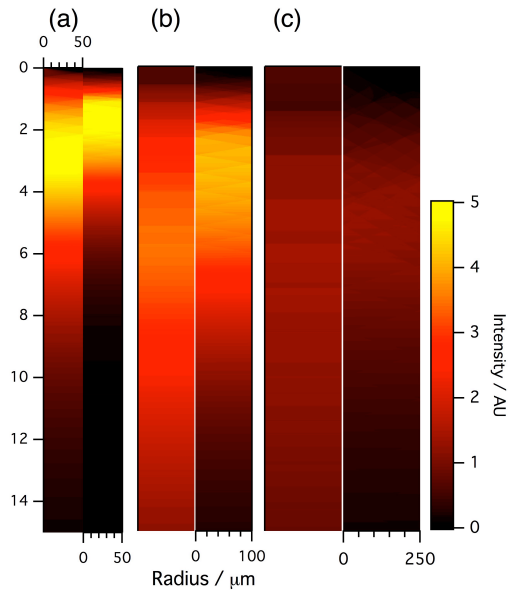


Fig. 1. Light intensity in laminar flow column with pinhole diameter of 100 μm (a), 200 μm (b), and 500 μm (c). Left and right parts of each illustrate the intensity of excitation beam and Raman signal, respectively.

とがわかった。この結果は実験結果と一致する。ピンホールから 2–4 mm 離れた点からの信号光が特にピンホールに到着しやすいこと、光強度の減衰を抑えることで信号強度増大が期待できること、を意味する結果が得られた。

今回の実験ではピンホール直径 200 μm 、層流長さを約 15 mm とした。垂直フロー法を用いたことによるラマン信号強度増大率は約 11 倍であった。全尿を低分子量画分と高分子量画分に分離し、各々の測定結果の線形結合により「低分子量成分」のラマンスペクトルを求めた (図 2(a); 5 倍に拡大した図を図 2(b)に示す)。最大の強度を持つ尿素のラマンバンド(1000 cm^{-1})の他に多数のラマンバンドが高い信号雑音比で測定されたことがわかる。尿に含まれる代表的な低分子量分子 (尿素 (図 2(b))、クレアチニン (図 2(c))、尿酸 (図 2(d))) に関して、各スペクトルの強度を H_2O のラマンバンド(1640 cm^{-1})で規格化し、仮想添加多変量解析法(HAMAND) [2]を用いて濃度の解析を行った結果、それぞれの物質の濃度が 5.19 g/dL, 50.5 mg/dL, 69.9 mg/dL と決定された。今後さらに S/N 比を改善することで、さらに低濃度の溶質に関して濃度決定が実現すると期待される。このように、垂直フロー法を用いた分光測定法に関して、精密、迅速かつ定量的な解析のための新規手法としての利用可能性が示された。

【参考文献】

- [1] H. Hiramatsu and T. Saito, *J. Raman Spectrosc.* **45**, 208 (2014).
- [2] 安藤正浩、濱口宏夫、*分光研究* **64**, 1 (2015).

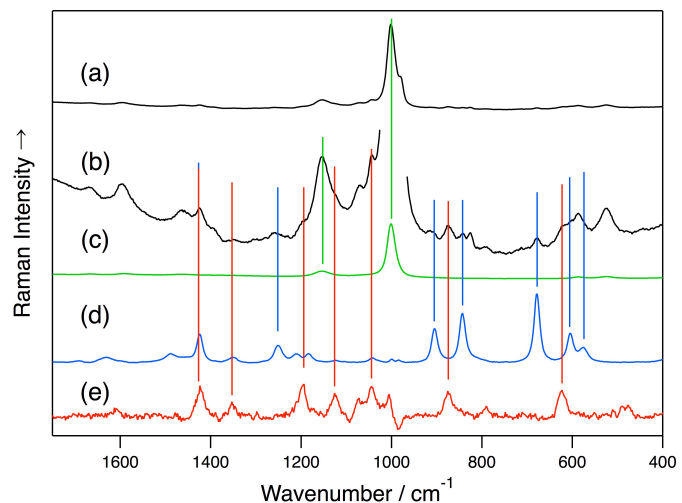


Fig. 2. Raman spectra of low-molecular weight fraction of urine (a) and (b)[$\times 10$ magnification of (a)], urea (c), creatinine (d), and uric acid (e). Vertical lines indicate correspondence.