

Product Introduction

新製品紹介

蛍光吸光分光装置「Duetta」の紹介

Duetta: A New Fluorescence and Absorbance Spectrometer Providing Unique Two-in-One Benefits, Plus High Speed and NIR Fluorescence Detection

小口 真弘

Masahiro OGUCHI

ケリー ジョセフ デーヴィス

Cary Joseph DAVIES

HORIBAは、2018年3月に蛍光分光光度計の新製品である蛍光吸光分光装置Duettaを発表した。HORIBAはこれまで研究開発向けのハイエンドな蛍光分光測定装置の開発に注力し、世界における蛍光分光市場のトップシェアを獲得してきた。Duettaはミドルレンジ市場向けの製品であり、HORIBAにとって新たな市場を切り開くための新製品である。本報では、Duettaの製品概要、主な特長、およびアプリケーション事例について紹介する。

In 2018, the HORIBA Instruments Fluorescence Division introduced a mid-market analytical spectrometer, called Duetta™, the first such “value, mid-market” instrument from the division. For decades now HORIBA has had a global leading market share of high-end research instruments, and the introduction of this new instrument opens up new market opportunities for HORIBA. The design of this new spectrometer concept, the sales success in the market in just its first year, and the key markets and applications of Duetta are all presented.

はじめに

HORIBAは、2018年3月に蛍光分光光度計の新製品である蛍光吸光分光装置Duettaを発表した(Figure 1)。これまで、HORIBAはハイエンドな蛍光分光測定装置の製品開発を行ってきた。HORIBAが提供する蛍光発光の定常状態および過渡状態を測定する蛍光分光測定装置にはFluorolog-3, FluoroMax Plus, QuantaMaster 8000, DeltaFlexおよびAqualog等があるが、いずれも最先端研究に用いられるハイエンド市場向けの製品であり、この市場においてHORIBAは、リーディングカンパニーとしての地位を確立している。

一方で、ミドルレンジの蛍光分光光度計の市場は、すでに成熟しており、この市場の製品は、低価格でシンプルな装

置構成に加え、光電子増倍管(PMT)を搭載した波長走査型の蛍光分光光度計が一般的である。Duettaは、HORIBAにとって新しい市場であるミドルレンジの卓上分析装置市場に参入するために開発された製品であり、従来の蛍光分光光度計にはない特長を数多く有している。

蛍光分光測定とは

蛍光励起スペクトル測定は、発光波長を固定し、励起波長を走査することで行われる。したがって、蛍光励起スペクトルは、ある特定波長の蛍光発光を誘起するために、蛍光物質が吸収する光量とその波長についての情報を与える。また、蛍光励起スペクトルは、吸収スペクトルに似ているが、溶液または試料中のすべての吸光物質の情報を含む吸収スペクトルとは異なり、試料に含まれる発光物質にのみ由来する。一方で、蛍光発光スペクトル測定は、励起波長を固定し、発光波長を走査することで行われる。一般的に、ある特定分子の蛍光スペクトルおよび励起スペクトルは、互いに鏡像関係となり、蛍光スペクトルは、励起(吸収)スペクトルよりも長波長(低エネルギー)側に現れる(Figure 2)。

蛍光および励起スペクトルを解析することで、蛍光を発する試料の状態やその変化を知ることができる。スペクトル強度やピーク波長は、蛍光物質固有の性質のほかに、温度、



Figure 1 Duetta two-in-one fluorescence and absorbance spectrometer

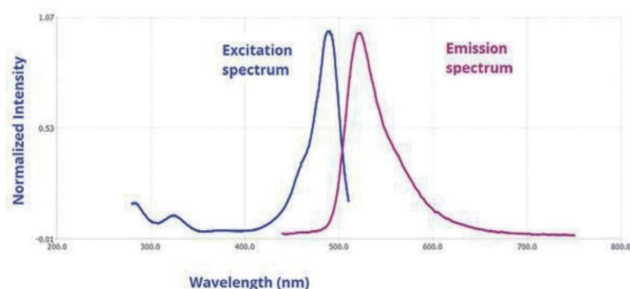


Figure 2 A fluorescence excitation spectrum (blue) and an emission spectrum (purple).

濃度、またはその周囲の分子との相互作用などによって変化する。この周囲の分子には、消光剤やエネルギーを吸収するアクセプター分子が含まれる。蛍光物質の中には、溶媒の特性(pH, 極性, および特定のイオン濃度など)に敏感なものもある。

蛍光吸光分光装置Duettaの特長

Duettaは、従来の蛍光分光光度計にはない多くの特長を有している (Table 1)。本報では、蛍光・吸光度測定, CCD検出器搭載による高速かつ広波長範囲測定, そして、これら

Table 1 Key specifications of Duetta

項目	内容
測定モード	吸光度法および蛍光分光法
光源	75 Wキセノンアークランプ
波長走査速度	510,000 nm/min
蛍光測定用検出器	CCD検出器
蛍光測定波長範囲	250-1100 nm
吸光度測定用検出器	シリコンフォトダイオード
励起/吸収測定波長範囲	250-1000 nm
外形寸法(W×D×H)	432 mm×518 mm×366 mm
質量	20.4 kg

を組み合わせた独自の3次元励起蛍光マトリックス測定の応用例について紹介する。

蛍光・吸光度測定を組み合わせた正確な蛍光スペクトル測定

蛍光測定と吸光度測定は相補的な測定技術である。実際、蛍光分光光度計を使用するほとんどの研究室は、吸光度測定を行うための紫外可視分光光度計も所有している。吸光度測定は、蛍光を発しない試料も測定することができるため、より多くの試料に適用可能な測定手法である。一方で、蛍光測定は吸光度測定に比べてはるかに高感度な測定手法である。Duettaは、従来の簡易型の蛍光分光光度計と同じ価格水準で、蛍光測定と吸光度測定の機能を1台に集約した製品となっている (Figure 3)。

1台で蛍光と吸光度測定ができることは、一般的な蛍光分光光度計と比較してすでに大きな価値があるが、Duettaの特長はそれだけにとどまらない。蛍光測定では、濃度の高い試料を測定する際に、内部遮蔽効果(IFE)と呼ばれる試料による励起光の吸収(Primary IFE)と蛍光の再吸収(Secundary IFE)による影響が問題となる (Figure 4)。Duettaは、蛍光スペクトルと同時に得られる吸収スペクトル(各波長における吸光度情報)を用いて、IFEの影響を補正した蛍光スペクトルを得る機能を有している。Figure 4にIFE補正ありと補正なしの場合のフルオレセインの吸光度に対する蛍光強度の関係を示す。IFE補正された蛍光スペクトルは、吸光度情報を使用して次式のように与えられる。

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}}$$

ここで、 F_{corr} はIFE補正された蛍光強度、 F_{obs} は実際に測定された蛍光強度、 A_{ex} は励起波長における吸光度、 A_{em} は発

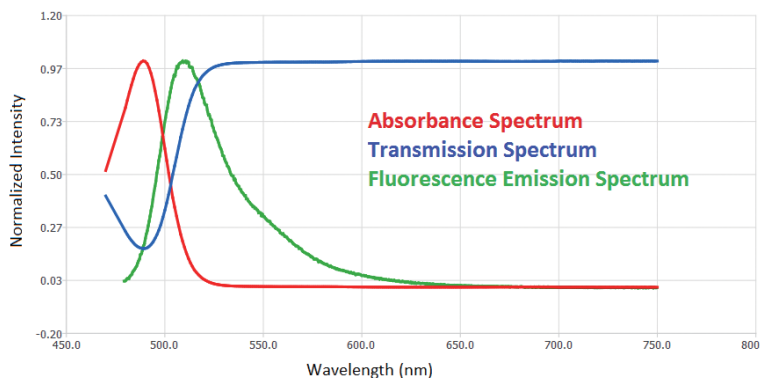
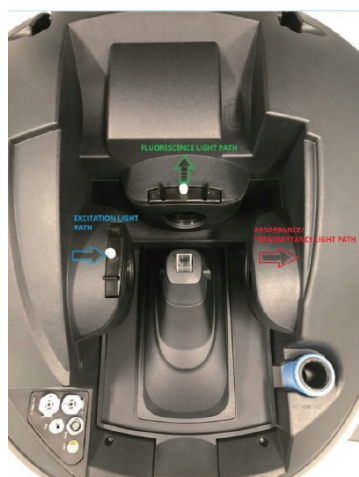


Figure 3 (Left) Duetta sample compartment shows the transmission/absorbance (red) detection optical path and the simultaneous fluorescence optical path (green) at 90 degrees from the excitation beam (blue). (Right) Duetta acquires multiple types of data in a single instrument.

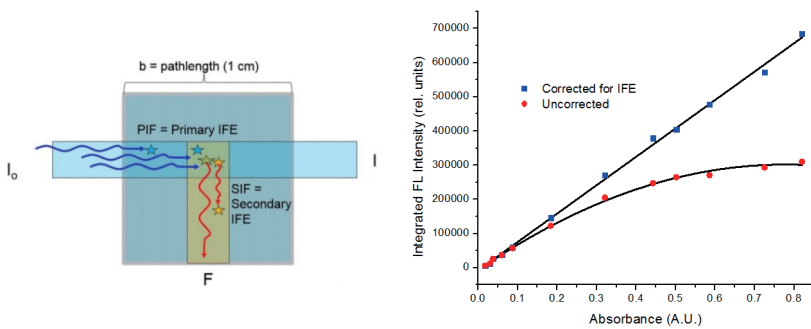


Figure 4 (Left) Top view diagram of a cuvette with sample solution inside, showing incident light (I_0), transmitted light (I) and the path of fluorescence detection at 90 degrees (F). Primary and secondary IFEs on the detected fluorescence intensity are shown with blue and yellow stars, respectively. (Right) The IFE is a well-known physical phenomenon. This experiment shows that the fluorescence of fluorescein at varying concentrations exhibits a non-linear response due to IFE reabsorption (red), and the corrected linear response of Duetta (blue) when IFE correction is implemented. Thus, extending the concentration range wherein the fluorescence signal is quantitative.

光波長における吸光度である。

IFE補正なしでは、吸光度が0.1以上の濃度のときにIFEの影響により蛍光強度が見かけ上は低くなるのに対して、IFE補正ありでは、吸光度が0.1以上の濃度であっても蛍光強度は、吸光度に正比例する。このように、IFE補正によって、広い濃度範囲に対して正確な定量測定が可能となる。

CCD検出器による高速かつ広波長範囲測定

ミドルレンジ市場では、蛍光分光光度計に波長走査型検出器としてPMTが搭載されていることが一般的である。一方、DuettaにはCCD検出器が搭載されており、HORIBAのマルチチャンネル検出技術を駆使することで、従来の蛍光分光光度計で、場合によっては数分かかっていた蛍光スペクトル測定をわずか50ミリ秒で行うことができる。したがって、従来の波長走査型の蛍光分光光度計では実現できない

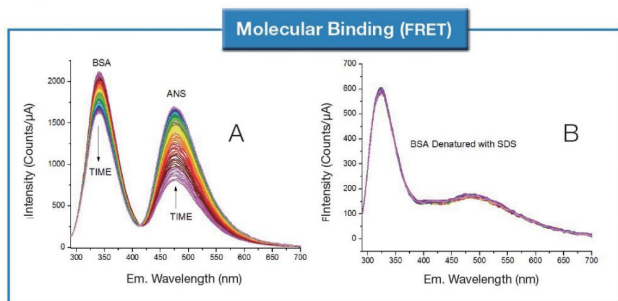


Figure 5 On the left, Image A, Kinetic spectral scans of native BSA protein with rapidly added ANS (3×10^{-6} M). Spectra taken every 100 ms after ANS addition. As ANS binds to native BSA, the BSA Trp emission decreases and the ANS emission increases as a result of Förster resonance energy transfer (FRET), due to proximity of excited Trp and ANS. On the right, Image B, Kinetic spectral scans of SDS-denatured BSA after addition of ANS. Much higher ANS concentration (4×10^{-5} M) is required to affect binding to denatured BSA; no FRET is observed due to increased distances between ANS and Trp.

高速な蛍光測定が可能となった。高速測定の例として、Figure 5に牛血清アルブミン(BSA)とアニリノナフトレンスルホン酸(ANS)の相互作用による時間変化測定の結果を示す。この測定では、BSA溶液にANSを添加することにより、BSAとANSが時間経過に従って相互作用し、BSAからANSにエネルギーが移動することによる蛍光スペクトルの変化をリアルタイムで追跡することができている。

またCCDを検出器として搭載することにより、近赤外(NIR)領域まで測定ができるという特長がある。PMT検出器を搭載した当社の蛍光分光光度計でも、オプションとしてNIR領域に測定波長を拡張

することができるが、標準的な仕様では850-900 nmを超える波長域では蛍光測定を行うことはできない。これに対して、Duettaでは標準仕様で、1,100 nmまで蛍光測定を行うことができる。Figure 6に、レーザーガラスの蛍光を蛍光分光光度計(標準的なPMT搭載)とDuettaで測定した結果を示す。Duettaでは、標準的なPMTの感度の限界波長(約850 nm)を超えてレーザーガラスの蛍光を測定できている。また、NIR領域における蛍光研究は、新規プローブ開発、ナノ材料、半導体、およびライフサイエンス分野において活発に行われており、測定ニーズが高まっている。

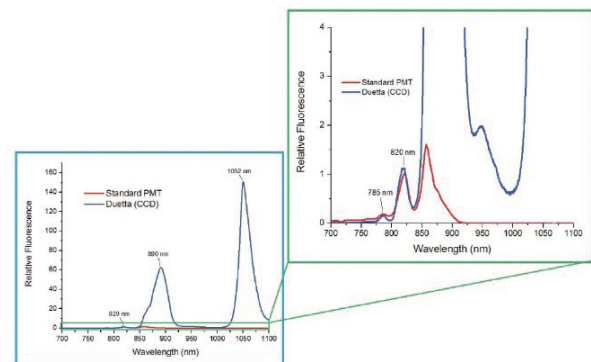


Figure 6 Neodymium laser glass emission spectrum. Ex: 575 nm, 5 nm band pass, Em: 700-1100 nm on fluorometer with PMT (red) and Duetta (blue). Standard PMT sensitivity falls off around 850 nm, while the Duetta CCD detector has sensitivity up to 1100 nm.

HORIBA独自の3次元励起蛍光マトリックス測定：A-TEEM

蛍光スペクトルは、蛍光物質、溶媒、周囲の環境によっても変化する。したがって、励起波長を変えながら一連の波長を順次走査しながら蛍光強度を測定し、得られたデータセットを3次元的に再構成する3次元励起蛍光マトリックス

(Excitation Emission Matrix : EEM)測定は、「蛍光指紋」測定とも呼ばれ、蛍光分光分野では重要な測定手法となっている。EEMデータは、励起波長、蛍光波長、蛍光強度をそれぞれX、Y、Z軸で示した3次元データセットであり、フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、および質量分析装置(MS)などの他の分析手法で行われているように、成分分析用に市販の多変量解析ソフトウェアで解析を行うことが可能である。これまで、食品科学、水質分析、および医薬品分析の分野で、EEM測定を用いた蛍光成分分析の例が報告されている。

Duettaでは、EEMデータを吸光度情報でIFE補正することにより、従来のEEMよりも正確な蛍光指紋情報を得ることができる。HORIBAでは、この独自のEEM測定技術をA-TEEM(Absorbance-Transmission Excitation Emission Matrix)と呼んでいる。そして、A-TEEMによって得られるデータを多変量解析することにより、一般的な蛍光分光光度計で得られる単純なEEMデータよりもはるかに正確な成分分析の結果を得ることができるようになった。

蛍光吸光分光装置Duettaを用いたアプリケーション

蛍光分子・材料の形や大きさは、じつに様々である。葉緑体(クロロフィル)およびアミノ酸残基であるトリプトファン(Trp)、フェニルアラニン(Phe)、およびチロシン(Tyr)のように、それ自体が蛍光性を有している分子のほかに、非蛍光性の分子や材料を標識するために特別に合成された有機色素や蛍光タグ分子などがある。典型的には、蛍光性有機分子はその化学構造の中に芳香族環や π 共役電子を有

しており、それらの大きさや構造に依存して、有機色素は紫外(UV)からNIR波長で蛍光を発する。

蛍光を発する分子や材料の例を以下に示す。

- ・アミノ酸(Trp, Phe, Tyr)
- ・塩基対誘導体(2-AP, 3-MI, 6-MI, 6-MAP, pyrrolo-C, tC)
- ・葉緑体(クロロフィル)
- ・蛍光タンパク質
- ・有機色素(フルオレセンイン、ローダミン、N-アミノクマリンとそれらの誘導体)
- ・希土類元素(ランタノイド)
- ・半導体材料
- ・量子ドット
- ・単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)
- ・太陽電池材料
- ・顔料・光沢剤
- ・蓄光剤

このように、蛍光測定は様々な研究・産業分野で行われている。本報では、その中から典型的な蛍光色素である硫酸キニーネ、バイオメディカルイメージング用の銀クラスター、および医学分析・イメージング用途のNIR発光を示すランタノイドの測定例を紹介する。

まず、2つの濃度の異なる硫酸キニーネ溶液(14 μ Mと86 μ M)をそれぞれ、EEM測定とA-TEEM測定した結果を示す(Figure 7)。測定に用いた硫酸キニーネ溶液は、14 μ Mと86 μ Mで、349 nmにおける吸光度は、それぞれ0.08と0.49であった。EEM測定では、濃度の異なる硫酸キニーネ溶液でその形状に差異が生じている。一方で、DuettaのA-TEEM測定では、吸光度の高い硫酸キニーネ溶液においても、吸光度の低い硫酸キニーネ溶液のEEMおよびA-TEEMと同じ形状を示した。これは、A-TEEMのIFE補正機能により、吸光度(濃度)の高い溶液試料においても、物質本来の蛍光指紋が得られることを示唆している。

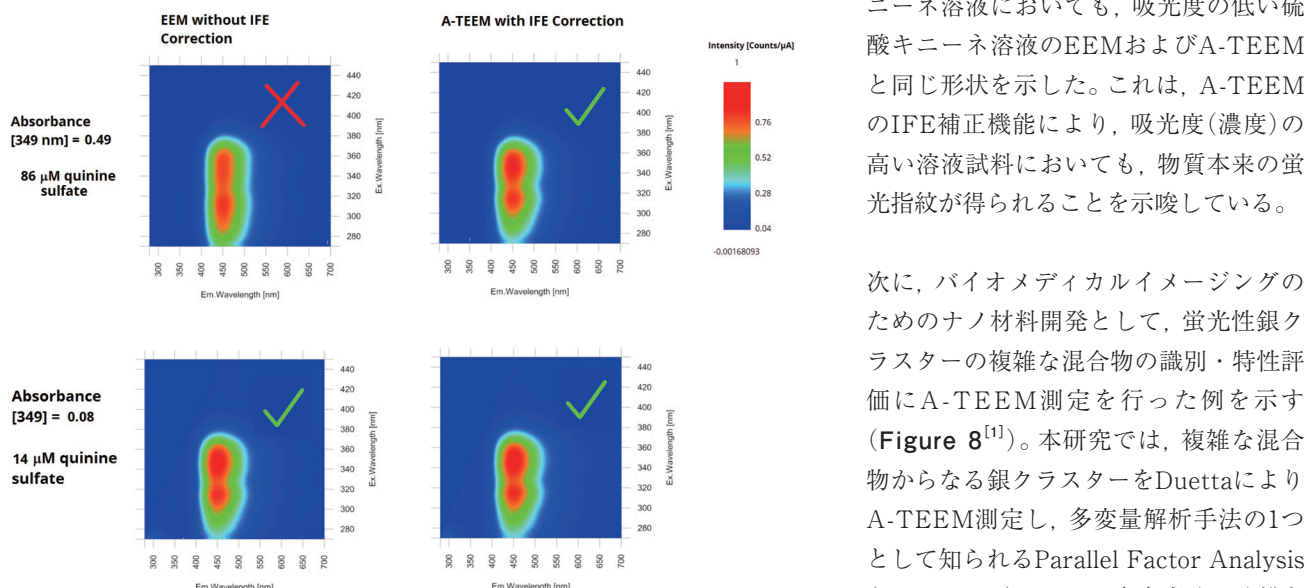


Figure 7 Fluorescence EEMs of two different concentrations of quinine sulfate in tonic water diluted in 0.1 M perchloric acid (aq.) with and without IFE corrections applied.

次に、バイオメディカルイメージングのためのナノ材料開発として、蛍光性銀クラスターの複雑な混合物の識別・特性評価にA-TEEM測定を行った例を示す(Figure 8^{[1])}。本研究では、複雑な混合物からなる銀クラスターをDuettaによりA-TEEM測定し、多変量解析手法の1つとして知られるParallel Factor Analysis (PARAFAC)によって含有成分の分離を行っている。PARAFACの結果、銀クラスター試料の蛍光発光は3つの区別可能

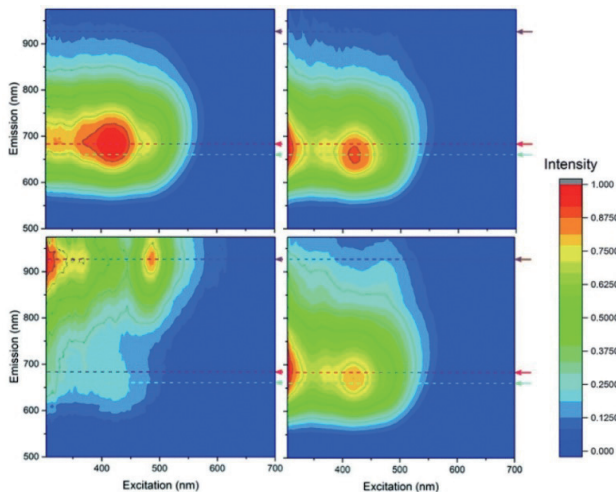


Figure 8 Fluorescence EEM spectra of Ag_A (top left), Ag_B (top right), Ag_C (bottom left) and the crude sample (bottom right). Dotted lines/arrows indicate the relative position of observed emission maxima. All plots are normalized to an intensity of 1 and were corrected for IFEs. The quantum yields of emission for Ag A, B and C are 0.323%, 0.232% and 0.083%, respectively. Reprinted with permission from [1] H. Ramsay, D. Simon, E. Steele, A. Hebert, R. D. Oleschuk and K. G. Stamplecoskie, RSC Adv., 8, 2018, 42080, Copyright 1999 the Royal Society of Chemistry.

な成分(Ag_A, Ag_B, およびAg_C)に分離することができ、それらの蛍光量子収率は、それぞれ0.323%, 0.232%, および0.083%と計算されている。このように、A-TEEMは、他の分析手法では適切な特性評価を行うことができないような複雑な混合物の純度を決定するための強力な分析手法となり得る。

最後に、分子内エキシマを介したランタノイド(イッテルビウムとネオジウム)の溶媒依存増感の研究報告^[2]を示す。ランタノイドイオンはNIRで蛍光発光を示すことから、医学や光通信の分野で注目されている。イッテルビウムは1,000 nm付近に、ネオジウムは890 nmと1,050 nm付近に蛍光発光を有する。しかし、それらの蛍光発光は、低い吸光係数によって抑制されているため、有機・無機配位子を集光アン

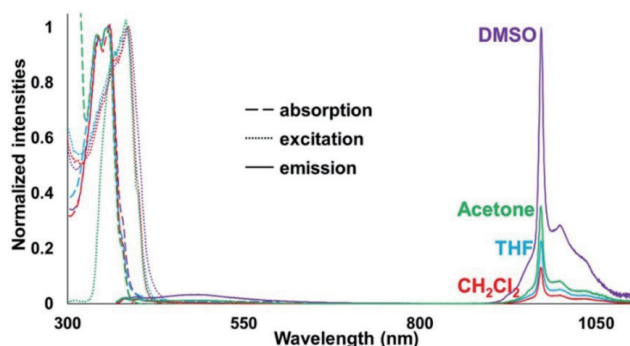


Figure 9 Absorption (dashed), excitation (dotted) and emission (solid) spectra of (Pyr₂POAc)₃Yb(thf) in various solvents (2.6×10^{-6} mol L⁻¹). Excitation collected for emission centered at 970 nm. Emission collected with excitation at 355 nm. Slit widths: 5 nm (excitation/emission). Reprinted with permission from [2] Min Deng, Nathan D. Schley, and Gael Ung, Inorg. Chem., 57,15399(2018), Copyright 2018 American Chemical Society

テナとして用いることでランタノイドイオンを増感する研究が行われている。Figure 9に、配位子としてピレンを用いたイッテルビウム錯体の蛍光強度の溶媒依存測定結果を示す。試料は、342 nmと355 nmに吸収の極大値、365 nmと380 nmに励起スペクトルの極大値、および970 nmに蛍光スペクトルの極大値を示し、その蛍光強度は周囲の溶媒の種類に依存した結果となった。このように、UV領域の蛍光励起測定および吸光度測定からNIR領域の蛍光発光測定を1台の装置で行うことができる。

おわりに

蛍光分光装置Duettaは2018年にHORIBAが発表したミドルレンジ市場向けの蛍光分光光度計である。HORIBAはこれまで何十年もの間、研究開発向けのハイエンドな蛍光分光測定装置を開発し、蛍光分析分野に貢献してきた。Duettaは、一般的な蛍光分光光度計にはない革新的な特長を有している。本報では、数あるDuettaの特長の中から蛍光・吸光度測定およびCCD検出器による高速かつ広波長範囲測定、さらに、これらを組み合わせたHORIBA独自の測定手法であるA-TEEMについて紹介した。また、それらの特長を活かしたアプリケーション事例を示した。本製品が、蛍光分析分野の様々な科学的な課題を解決するために活用されることを願っている。

* 本内容は特段の記載がない限り、本誌発行年時点での自社調査に基づいて記載しています。

参考文献

- [1] H. Ramsay, D. Simon, E. Steele, A. Hebert, R. D. Oleschuk and K. G. Stamplecoskie, RSC Adv., 8, 42080(2018)
- [2] M. Deng, N. D. Schley, and G. Ung, Inorg. Chem., 57, 15399(2018)



小口 真弘

Masahiro OGUCHI

株式会社 堀場製作所
開発本部 科学・半導体開発部 博士(理学)
Scientific & Semiconductor Instruments
R&D Dept. HORIBA, LTD.
Ph. D.



ケリー ジョセフ デーヴィス

Cary Joseph DAVIES

Global Product Line Manager,
Fluorescence Division,
HORIBA Instruments Inc.