

モジュール型蛍光分光測定装置 SPEX Fluorolog-3

Stephen M. Cohen

要旨

SPEX Fluorolog-3は、ジョバンイボン社が開発したモジュール型蛍光分光測定装置である。研究者は、実験の目的に応じて光源、分光器、検出器、アクセサリを自由に選択することができる。本装置は、究極の感度、速度、及び自動化を実現し、量子化学や材料科学、生物学、分析及び品質管理の分野において、あらゆる種類の定常蛍光の研究に用いられている。Fluorolog-3はコンピュータにより完全に制御されており、紫外、可視、近赤外の広い波長領域で、高品質の蛍光分光情報を提供する。

1 はじめに

ルミネッセンスは、蛍光と燐光の2つに分類することができる。蛍光とは、試料の励起中に誘起・放射される光である。一方、燐光は励起終了後(およそ 10^{-6} 秒以上)も持続する光を指す(ヤブロンスキー・ダイアグラム 図1)。蛍光と燐光は、共に分子の形状や大きさ、動きに関する科学的情報の解明に使われる。通常、両者を一まとめにして蛍光分光法と呼ばれている。蛍光分光法は、高い感度(10^{-12} mol以下)と特定性の点で他の分光方法より優れている。蛍光分光法は、分子の微小領域の状況(約10 nmの距離まで)に敏感で、分子運動に依存する。例えば、たんぱく質や膜結合分子の回転拡散、分子と消光物質との衝突、並進拡散、錯体の形成、励起状態の変化等の動的過程が、試料の蛍光スペクトルに影響する。

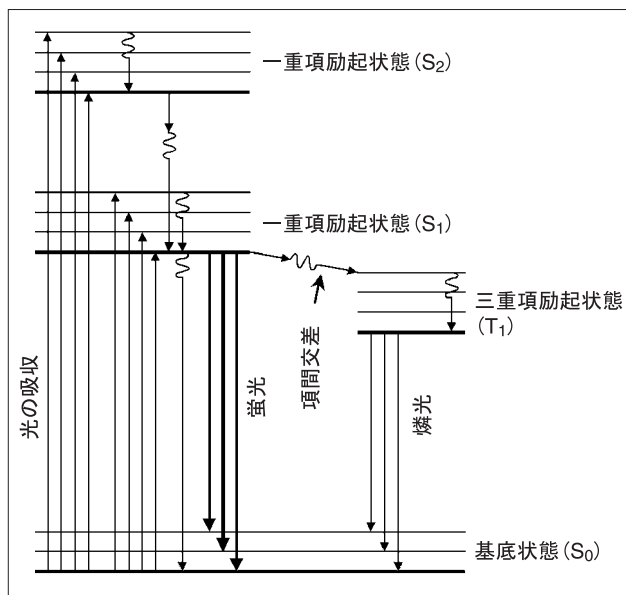


図1 ヤブロンスキー・ダイアグラム
(分子の励起と発光のエネルギー概念図)
燐光は分子が励起三重項から基底に戻るときに生じる。蛍光に比べてゆっくりとした発光となる。

蛍光分光法には次のような用途が広がっている。たんぱく質のコンフォメーションと輸送、生物活性化合物及び発がん物質の微量分析、医薬品の品質保証、ドラッグデリバリー及び相互作用のモニタリング、巨大分子とナノ粒子の特性解析、有機化合物の光反応性の評価、化学反応の検出、構造と特性の関係、空気中、水中、土壌中の汚染物質の監視、フォトルミネッセンスとフォトルミネッセンス励起、製品の品質管理などである。Fluorolog-3(図2)は、これらのすべての分野において、蛍光と燐光の両方の測定に優れた性能を発揮する。

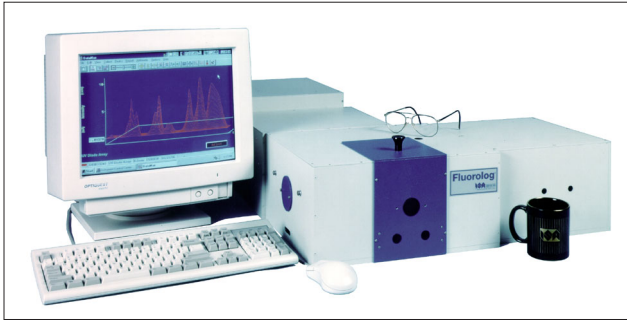


図2 モジュール型蛍光分光測定装置 SPEX Fluorolog-3

2 測定原理

一般的に、蛍光分光測定装置は、光源、励起波長の選択機構、試料ホルダ、発光側モノクロメータ、及び検出器から構成されている。Fluorolog-3には通常、励起源として使われる450 Wの連続光源(CW)キセノンアークランプ、励起光の波長を選択するためのルールド平面グレーティングを搭載したモノクロメータ、交換可能なT型試料室、試料から放出されるルミネッセンスを選択するためのもう一つのモノクロメータ、及び光子計数モードで光を検出する光電子増倍管から構成されている。この他、特殊測定用のアクセサリも別途用意されており、これらは後で詳しく説明する。

Fluorolog-3のモジュール構成を図3に示す。どの構成を選択するかは、お客様が必要とする感度や選択性、また試料の種類によって決定される。例えば、偏光走査、表面測光、高速データ収集などお客様の要望によって異なる。

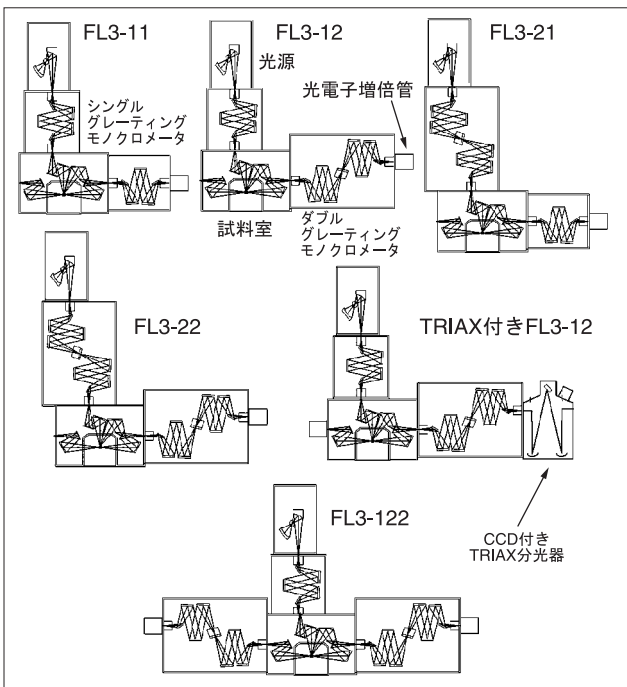


図3 SPEX Fluorolog-3のモジュールシステムの構成例

3 SPEX Fluorolog-3の特長

3.1 特長

蛍光分光測定における光路の開始点で、Fluorolog-3に標準装備されているCWキセノンアークランプは、垂直に取り付けている。これにより、入射スリット上に円弧を描くことができ、またランプ寿命が長くなる。モノクロメータ内には、光を分散するためにルールド平面グレーティングが取り付けられている。このグレーティングは全波長に渡って焦点が合うようになっている(可変屈折率型のレンズとは異なる)。ルールドグレーティングには、ホログラフィックグレーティングが持つ偏光異常がない。Fluorolog-3のすべての光学素子は反射型で、これによりレンズを用いた場合に生じる歪みが排除される。光路の最後には光子計数型検出器が置かれ、ノイズ成分を取り除いて微弱な信号を検出している。ソフトウェアは、JY独自のWindows™対応のカスタムソフトが使われており、データ収集と解析に際してシステム全体を制御している。図3にはSpectrAcqコントローラとホストコンピュータが示されていないが、SpectrAcqコントローラは蛍光分光装置との間の低いレベルの命令を扱い、ホストコンピュータにはSpectrAcq用の高いレベルの制御ソフトが格納されている。Fluorolog-3は自己校正型で、スリットや波長、積算時間及び温度のすべてを、このソフトウェアから設定し制御することが可能である。Fluorolog-3からのデータは、広く使われている表計算ソフトに転送して、報告書などを作成することが可能である。

3.2 測定モード

Fluorolog-3は汎用性が高く、表1のような各種のモードで測定することができる。

表1 SPEX Fluorolog-3の測定モード

測定モード	測定方法
蛍光スペクトル測定	励起波長を固定した状態で、発光側モノクロメータを走査する。
励起スペクトル測定	発光波長を固定した状態で、励起側モノクロメータで入射光を変化させる。
シンクロ測定	励起側モノクロメータ及び発光側モノクロメータ間の波長差(オフセット)を一定に保った状態で、両方のモノクロメータを同期させて走査する。
時間ベース測定	光の減衰と反応速度の研究のために時間ベースのデータを収集する。この時励起波長、発光波長は共に固定しておく。
探索スキャン	励起波長及び発光波長を変化させながら、未知の試料を予備的に測定する。
バッチスキャン	一つまたは複数の試料に対して、一定の測定下で一連の繰り返し測定を行う。
マトリックススキャン	励起波長と発光波長の両方を走査し、励起及び発光スペクトルの三次元マトリックスを作成する。
温度スキャン	試料の温度をモニタリングし、変化させながら測定する。
偏光スキャン	励起側及び発光側の偏光素子を変えながらスペクトルを記録。
マイクロプレートスキャン	蛍光プレートリーダーMicroMaxを用いて、最大384個の異なる試料のスペクトルを記録する。

3.3 仕様

Fluorolog-3(標準タイプ)の主な仕様を表2に示す。

表2 SPEX Fluorolog-3(標準タイプ)の主な仕様

モジュール	詳細
光源	450Wのショートアーク・キセノンランプ(空冷式ハウジングに垂直に取り付けられている) 燐光測定用パルスランプはオプション
分光器	シングル・グレーティング、ツェルニターナーマウント(全反射系) 分解能 = 0.2 nm 精度 = ±0.5 nm 速度 = 150 nm/s 波長範囲 = 0-1300 nm ダブル・グレーティングモノクロメータはオプションで選択可能
グレーティング	キネマティックマウント、ルールド・グレーティング 励起側ブレード波長: 330 nm (波長200-700 nm) 発光側ブレード波長: 500 nm (波長300-1000 nm) この他グレーティングをオプションとして用意
試料室	T型、脱着式ギャップ台(オプション)
リファレンス検出器	励起補正用の校正済みフォトダイオード(240-1000 nm)
検出器	光電子増倍管R928P(光子計数モード) 波長範囲240-850 nm 赤外領域オプションを用意
検出感度	S/N=4000:1 FL3-11の場合に397 nmピークを使用、5 nmバンドパス、積分時間1秒、450 nmで測定された時のバックグラウンドの標準偏差にて
ソフト	Windows対応のJY製カスタムソフト すべての実験パラメータ、アクセサリ、データ収集、分析を制御

4 アクセサリ

Fluorolog-3には、性能と機能を更に向上拡張するために各種の周辺パーツが用意されている。

(1) 光源

発光寿命の長い燐光(1 μs以上)を測定するために燐光ユニットを備えている。燐光ユニットは、ハウジング内のキセノンフラッシュランプと電気制御系から構成される。

(2) モノクロメータ

モノクロメータは、特定の波長の光だけを取り出す機能を有する。高い分解能を持つ2つのグレーティングを備えたダブル・モノクロメータと、1つのグレーティングを持ったシングル・モノクロメータが

ある。更に、3つのグレーティングを搭載できる分光器TRIAXをFluorolog-3に取り付けて、特殊な研究に使ったり、CCDアレイ検出器と組み合わせて走査速度を上げることもできる。

(3) 光学素子

多くの場合、蛍光測定では二次光やレイリーバンド等による干渉影響が問題となる。カットオン/カットオフ光学フィルタを使うことで、干渉影響を除去することができる。このフィルタと専用ホルダを用意している。更に、自動偏光子を用いた偏光測定も可能である。また、広い波長範囲に対応できるように交換可能なルールドグレーティングが提供される。

(4) 試料ホルダ

結晶や薄膜、ペレット、粉体、繊維、細胞等を保持することができる試料ホルダ(モデル 1933)は、蛍光の研究に便利である。試料の前面から蛍光を観察するためには、表面測光アクセサリ FL-1001が必要になる。複数のセルを載せることができる温度調節付き試料ホルダを使えば、液体温度を一定に保ちながら、試料を連続的に測定することができる。

(5) 温度制御

反応速度や分子運動(これらに伴うルミネッセンス)は温度に依存する。このため、試料の温度を制御するための付属品が各種用意されている。循環式ウォーターバスやペルチェ式恒温槽は広く使用されている。液体窒素デューワー瓶は、試料の分子運動を低温(液体窒素温度77 K)で“フリージング”するために使われる。

(6) 時間ベース測定

自動滴定インジェクタは、試料中に試薬を分割して注入するために使われる。精度は全シリンジ容量の0.1%で、すべて自動的に制御される。インジェクタポートとトリガーボックスが用意されている。反応速度測定用のストップフローアクセサリ MicroFlowは、試料を自動的に攪拌・制御する。

(7) 複数試料

蛍光プレートリーダー MicroMax を使うと、複数試料に対して、複数波長の走査を1回の作業で行うことができる。MicroMaxはコンピュータ制御され、励起光及び蛍光は、光ファイバーでFluorolog-3へ伝送される。プレートは最大384個のウェルを有する。

(8) 検出器

Fluorolog-3では、用いる検出器を替えることで、800 nm以上の近赤外領域にまで検出波長域を拡張することができる。InGaAs固体素子検出器、NIR光電子増倍管などから選択できる。走査分光器付きのCCDアレイ検出器は、全スペクトル領域を一度に記録することができるため、計測時間を大幅に短縮する。

(9) 寿命測定

Fluorolog-3をSPEX Fluorolog-Tau3にアップグレードするとピコ秒領域の蛍光寿命が測定できる。これには、周波数領域を用いて蛍光寿命を測定するために、ポッケルスセル・モジュレータボックスと制御回路を追加する必要がある。分子内及び分子間運動や、たんぱく質の動態力学、溶剤緩和(solvent-relaxation)、結合、二重層粘度等にてピコ秒(10^{-12} 秒)領域の測定が可能になる。レーザー励起源を使用できるように、レーザーポートが1つ内蔵されている。

5 おわりに

Fluorolog-3は、性能の高さはもちろん非常に柔軟性に富んでいる。初心者、経験豊富な研究者にかかわらず、お客様のニーズに合わせて計測システムをカスタマイズすることができる。迅速に計測し、より多くのデータを提供すると共に、蛍光測定の際に生じやすい試料の劣化や、退色を防止することができる。Fluorolog-3は、世界中の蛍光研究分野における主力装置として、そのモジュール方式、感度、信頼性が高く評価されている。今後とも、より良い、使いやすい製品を提供していきたい。



Stephen M. Cohen, PhD

Jobin Yvon Inc.
Fluorescence Division
Technical Writer