

Application News

No. A566

光吸収分析

クロロフィル a の微量測定 – TrayCell を用いた 1 滴測定と サブマイクロセルの利用 –

多くの分野で物質の定量を目的として、吸光度測定が利用されています。しかし、より低濃度の試料を測定する際は、高感度の測定が必要となり、蛍光測定が利用される場合があります。さらにその中で、化学/ライフサイエンス分野では測定に十分な試料量が採取できない場合があり、より微量での測定が求められています。

今回は試料の量が数 μL でも測定できる蛍光測定用の TrayCell™ (Hellma Analytics 社製) とサブマイクロセルを用い、分光蛍光光度計 RF-6000 でクロロフィル a の微量測定を行いましたのでご紹介します。

K. Sobue

■ TrayCell とサブマイクロセル

図 1 に TrayCell とサブマイクロセルの外観を示します。TrayCell は光学系を含むセル部とキャップから成り立っています。TrayCell ではキャップを外しセル上部に試料を滴下し (最小試料容量 2 μL)、キャップをしてセルホルダにセットすることで測定できます。サブマイクロセルの外観は通常の 10 mm 角のセルと同様で、試料室内の形状が異なり、中の寸法によって最小試料容量が異なります。



図 1 セルの外観
左：サブマイクロセル、右：TrayCell

■ クロロフィル a の吸光度測定

河川や湖沼では、クロロフィル量から水質の検査を行う場合があります。しかし、河川等ではクロロフィルの濃度が低いため、感度のよい測定が求められています。クロロフィル a 溶液 (溶媒：エタノール) を 1000~50 ng/mL の異なる濃度で 4 点用意し、表 1 の条件で吸光度測定した結果を図 2 に示します。50 ng/mL の試料において得られた吸光度値は 0.004 Abs 程度と非常に微弱であり、検出下限に近いことがわかります。

表 1 測定条件

装置	: UV-1800
波長範囲	: 350 ~ 800 nm
サンプリングピッチ	: 1.0 nm
スキャンスピード	: 低速
バンド幅	: 1.0 nm

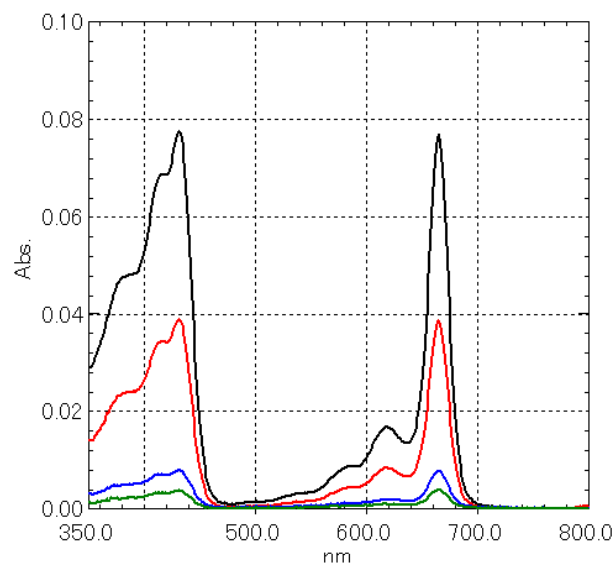


図 2 クロロフィル a 溶液の吸光度スペクトル
黒：1000 ng/mL、赤：500 ng/mL、青：100 ng/mL、緑：50 ng/mL

■クロロフィル a の微量蛍光測定

分光蛍光光度計 RF-6000 と微量測定用セルを用いて、クロロフィル a 溶液を 1000~5 ng/mL の異なる濃度で 6 点用意し、検量線を作成しました。表 2 の条件で TrayCell を用いて測定したスペクトルの結果を図 3 に、検量線の結果を図 4 に、サブマイクロセル (100 μ L) を用いて測定したスペクトルを図 5 に、検量線の結果を図 6 に示します。

表 2 測定条件

装置	: RF-6000
励起波長	: 618 nm
蛍光波長/蛍光波長範囲	: 675 nm/650~760 nm
データ間隔	: 1.0 nm
スキャン速度	: 60 nm/min
積算時間	: 1 sec
バンド幅	: Ex/Em 10.0/10.0 nm (TrayCell) Ex/Em 5.0/5.0 nm (サブマイクロセル)
感度	: High (TrayCell) Low (サブマイクロセル)
繰り返し回数	: 3 回

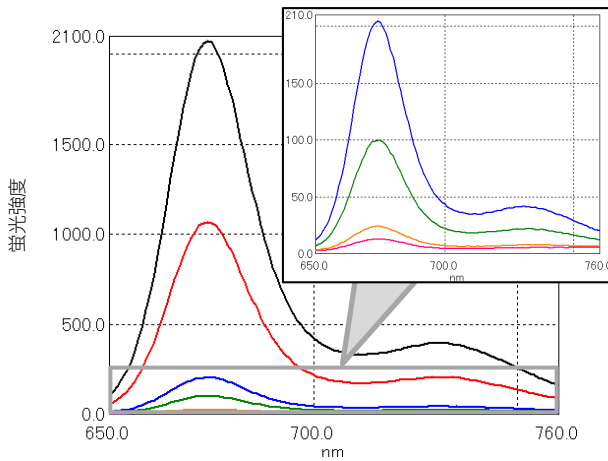


図 3 TrayCell を用いたクロロフィル a 溶液の蛍光スペクトル
黒 : 1000 ng/mL、赤 : 500 ng/mL、青 : 100 ng/mL、
緑 : 50 ng/mL、オレンジ : 10 ng/mL、ピンク : 5 ng/mL

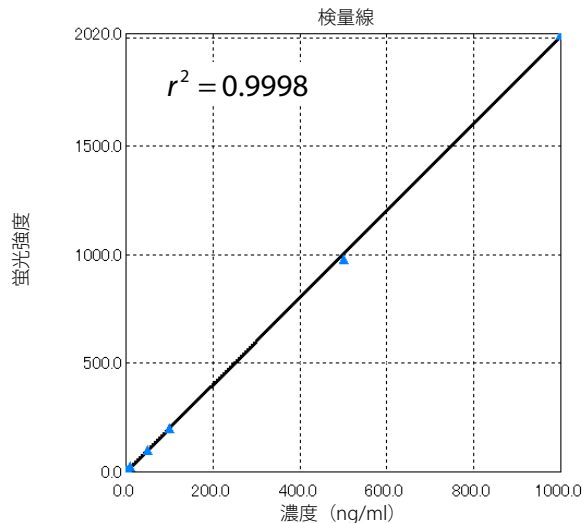


図 4 TrayCell を用いたクロロフィル a 溶液の検量線

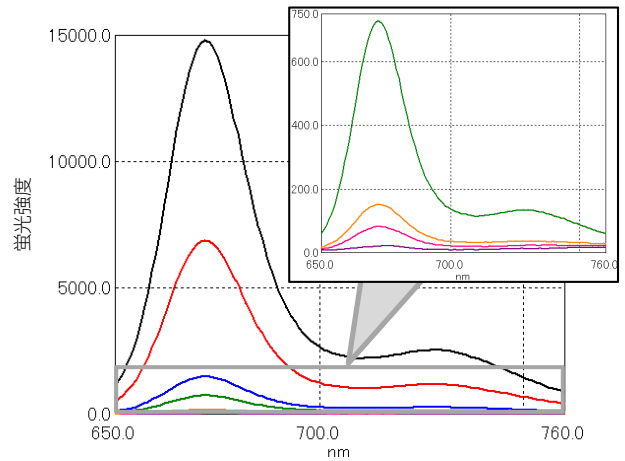


図 5 サブマイクロセルを用いたクロロフィル a 溶液の蛍光スペクトル
黒 : 1000 ng/mL、赤 : 500 ng/mL、青 : 100 ng/mL、
緑 : 50 ng/mL、オレンジ : 10 ng/mL、ピンク : 5 ng/mL、紫 : 1 ng/mL

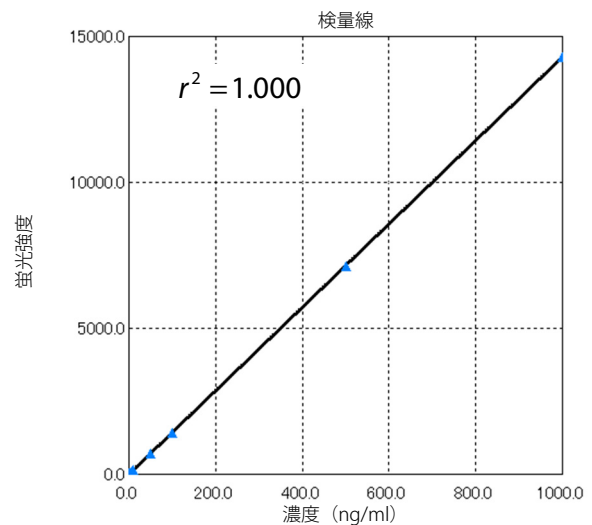


図 6 サブマイクロセルを用いたクロロフィル a 溶液の検量線

吸光度法では検出が難しいと思われる低濃度の試料においても、ノイズの少ないスペクトルが得られていることがわかります。

定量精度に関しては、試料量が微量ながら TrayCell では 5 ng/mL まで直線性のある検量線が得られました。また、サブマイクロセルでは、TrayCell より溶液量が多いため、信号も大きく、1 ng/mL まで直線性のある検量線が得られました。

■まとめ

分光蛍光光度計 RF-6000 と TrayCell もしくはサブマイクロセルを用いることで、数 μ L~数百 μ L といった微量試料測定が可能になるだけでなく、低濃度試料でも精度良く測定できることがわかりました。

TrayCell は、Hellma GmbH の商標です。