

## 紫外可視分光光度計と分光蛍光光度計の 定量可能な濃度範囲の違い

紫外可視分光光度計と分光蛍光光度計はともに定量評価に使われています。紫外可視分光光度計での定量はランバート・ベールの法則に基づいて、濃度に比例する吸光度を測定します。一方で、分光蛍光光度計では、蛍光強度を用います。低濃度の場合、蛍光強度は濃度と比例するので、定量評価に利用できます。

今回、紫外可視分光光度計と分光蛍光光度計の両装置でローダミンB溶液を測定しました。ローダミンBは繊維や皮革の染色に使われる蛍光物質です。測定結果について、両機種における定量・検出下限値と検量線の線形性を比較しましたので、ご紹介します。

Y. Tange

### ■ ローダミンB溶液の吸光度測定

吸光度測定には紫外可視分光光度計 UV-2600iを使用しました。測定条件を表1に示します。粉末のローダミンBを蒸留水に溶解し、0.003~5 µg/mlの標準溶液を調製しました。

ローダミンBの標準溶液における吸光スペクトルを図1に、544 nmの吸光度値から作成した検量線を図2および図3に示します。図2では0.31~5 µg/mlの6点とブランク試料（蒸留水）で作成し、線形性の良好な検量線が得られました（相関係数の二乗値は0.9999）。一方、図3に示した低濃度領域ではノイズの影響が相対的に大きくなり、線形性が低い結果となりました。

表1 吸光度の測定条件

装置	: 紫外可視分光光度計 UV-2600i
測光値の種類	: 吸光度
測定波長範囲	: 300~700 nm
スキャン速度	: 中速
データ間隔	: 1.0 nm
光源切替波長	: 340 nm
スリット幅	: 1.0 nm

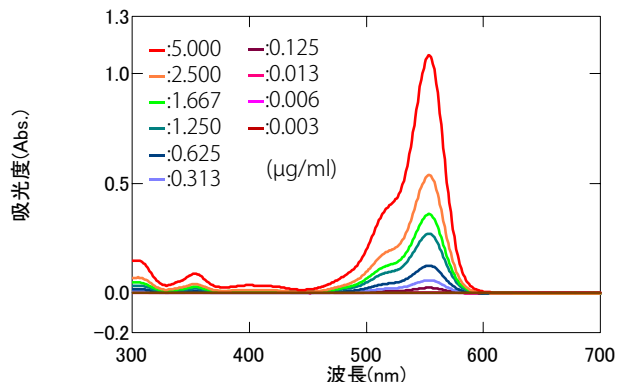


図1 吸光スペクトル (UV-2600i)

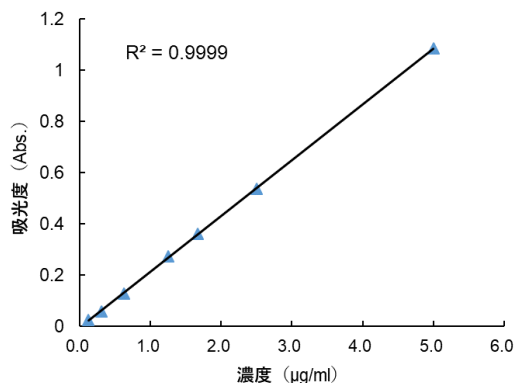


図2 検量線 (UV-2600i)

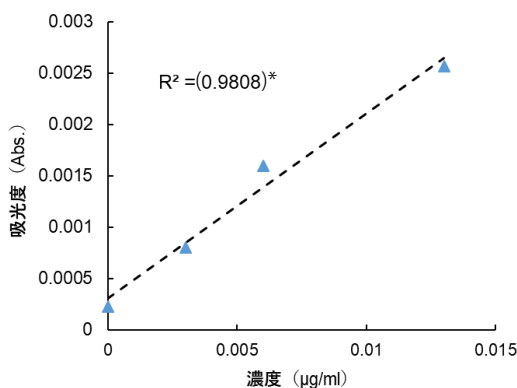


図3 低濃度領域の検量線 (UV-2600i)  
\*定量下限値未満の濃度範囲であるため参考値

### ■ ローダミンB溶液の蛍光強度測定

蛍光強度測定には分光蛍光光度計 RF-6000を使用しました。測定条件を表2に示します。

表2 蛍光強度の測定条件

分光蛍光光度計	RF-6000
スペクトルの種類	蛍光スペクトル
励起波長	544 nm
蛍光波長範囲	540~700 nm
スキャン速度	600 nm/min
データ間隔	1.0 nm
バンド幅	Ex. 5.0 nm、Em. 5.0 nm

ローダミンBの標準溶液の蛍光スペクトルを図4に示します。標準溶液の濃度が高くなるとともにピークトップが長波長側に変化するのは、短波長側の蛍光が再吸収されることによる影響です。577 nmの蛍光強度値から作成した検量線を図5および図6に示します。図5を見ると、0.125 µg/ml (0.025 Abs.) 以上の高濃度領域では検量線が曲がっていますが、図6の低濃度領域では線形性の良好な検量線が得られました。

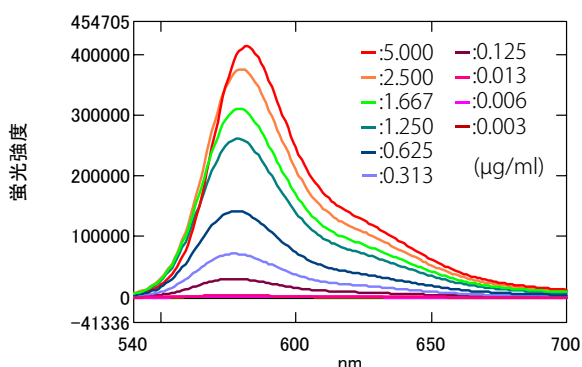


図4 蛍光スペクトル (RF-6000)

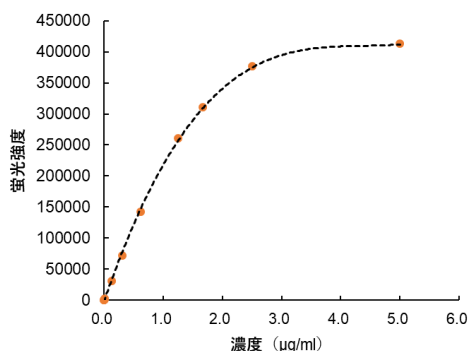


図5 検量線 (RF-6000)

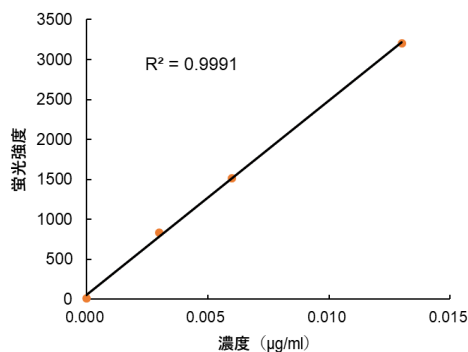


図6 低濃度領域の検量線 (RF-6000)

## ■ 検出・定量下限値による感度の比較

アプリケーションニュース No. A606と同様に、検量線とブランクの10回測定で得られた標準偏差σを用いて定量下限値(10σ)と検出下限値(3σ)を算出しました。なお、検量線には最も線形性が高いものを採用しました。

表3にUV-2600iとRF-6000の定量下限値と検出下限値を示します。本実験で算出した定量下限値の比から、RF-6000ではUV-2600iに比べて400倍以上感度が高いことがわかりました。図3と図6の低濃度領域の検量線を比較しても、図6(RF-6000)の結果の方がばらつきが抑えられた検量線が得られています。試料に吸収されなかった照射光を検出する吸光度法とは異なり、蛍光光度法ではゼロを基準に蛍光を検出するため、ノイズレベルが小さく、高い感度が得られます。

表3 定量下限値と検出下限値

UV-2600i	定量下限値	1.9×10 <sup>-2</sup> µg/ml
	検出下限値	5.6×10 <sup>-3</sup> µg/ml
RF-6000	定量下限値	4.3×10 <sup>-5</sup> µg/ml
	検出下限値	1.3×10 <sup>-5</sup> µg/ml

## ■ 濃度範囲ごとの線形性の比較

UV-2600iとRF-6000の検量線における相関係数の二乗値と濃度範囲との関係を表4に示します。なお、UV-2600iではブランク以外の定量下限値を下回る点は除外しました。

UV-2600iの定量下限値未満の領域(0~0.013 µg/ml)であってもRF-6000では線形性の良好な検量線が取得できています。

一方、RF-6000では濃度の高い標準溶液を用いて作成した検量線は線形性が低くなりました。濃度が高い場合、消光が起り、想定される蛍光強度よりも測定値が低くなることがあります。

表4 検量線の相関係数の二乗値と濃度範囲

範囲(µg/ml)	R <sup>2</sup> (UV-2600i)	R <sup>2</sup> (RF-6000)
0~5.000	0.9999	0.8091
0~1.667	0.9990	0.9924
0~0.013	(0.9808)*	0.9991

\* 定量下限値未満の濃度範囲であるため参考値

## ■ まとめ

紫外可視分光光度計UV-2600iと分光蛍光光度計RF-6000の定量評価の結果を比較しました。RF-6000では、UV-2600iの定量下限値未満の低濃度領域で定量評価ができました。一方、UV-2600iでは、RF-6000で消光が起きる高濃度領域で定量が可能であることがわかりました。

紫外可視分光光度計と分光蛍光光度計を適切に使い分ければ、様々な濃度範囲での定量評価に対応可能です。