

紫外可见分光光度计和荧光分光光度计的 可定量浓度范围的差异

紫外可见分光光度计和荧光分光光度计都经常用于样品定量。使用紫外可见分光光度计进行定量时基于朗伯比尔定律，测定的吸收值一定范围内与样品浓度成正比。另一方面，利用荧光分光光度计时，使用荧光强度。在低浓度时，荧光强度与浓度成正比，所以，可以用于定量。

本次使用紫外可见分光光度计和荧光分光光度计两台仪器分别测定了罗丹明 B 溶液。罗丹明 B 是用于纤维和皮革的染色的荧光物质。关于测定结果，对两个机种的定量、检测下限值和标准曲线的线性度进行了比较，下面将进行介绍。

Y. Tange

■ 罗丹明 B 溶液的吸光度测定

使用了紫外可见分光光度计 UV-2600i 测定样品吸光度。测定条件如表 1 所示。将粉末状的罗丹明 B 溶解在蒸馏水中，调配 0.003 ~ 5 μg/ml 的标准溶液。

罗丹明 B 的标准溶液的吸光光谱如图 1 所示，根据 544 nm 的吸光度值创建的标准曲线如图 2 和图 3 所示。在图 2 中，用 0.31 ~ 5 μg/ml 的 6 点和空白样品（蒸馏水）创建，得到了线性度良好的标准曲线（相关系数的平方值是 0.9999）。在图 3 所示的低浓度区域中，噪声的影响相对较大，导致线性较差。

表 1 吸光度的测定条件

装置	: 紫外可见分光光度计 UV-2600i
测定方式	: 吸光度
测量波长范围	: 300 ~ 700 nm
扫描速度	: 中速
采样间隔	: 1.0 nm
光源切换波长	: 340 nm
狭缝宽度	: 1.0 nm

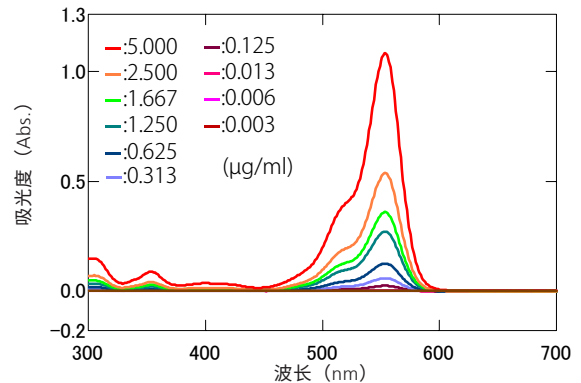


图 1 吸光光谱 (UV-2600i)

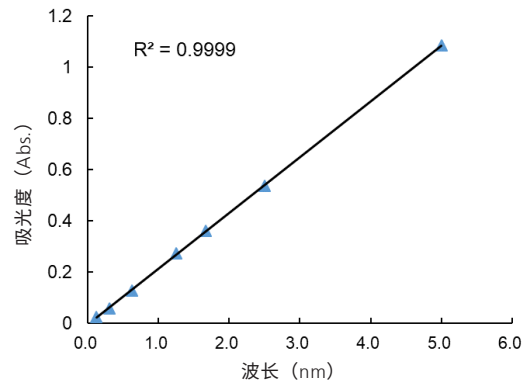


图 2 标准曲线 (UV-2600i)

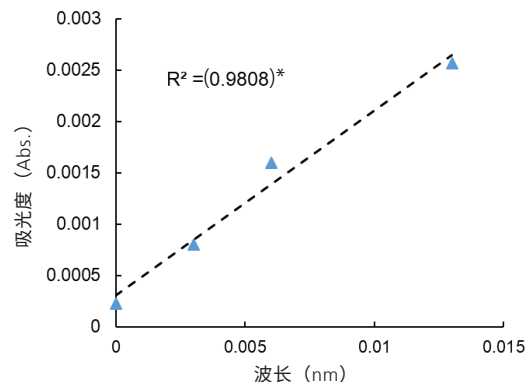


图 3 低浓度区域的标准曲线 (UV-2600i)

* 由于浓度范围未达到定量下限值，所以为参考值

■ 罗丹明 B 溶液的荧光强度测定

使用了荧光分光光度计 RF-6000 测定了样品荧光强度。测定条件如表 2 所示。

表 2 荧光强度的测定条件

光谱类型	: 分光荧光光度计 RF-6000
激发波长	: 544 nm
荧光波长范围	: 540 ~ 700 nm
扫描速度	: 600 nm/min
采样间隔	: 1.0 nm
带宽	: Ex. 5.0 nm、Em. 5.0 nm

罗丹明 B 的标准溶液的荧光光谱如图 4 所示。短波长侧的荧光被再次吸收，导致标准溶液的浓度变高的同时峰顶向长波长侧变化。根据 577 nm 的荧光强度值创建的标准曲线如图 5 以及图 6 所示。如图 5 所示，在 0.125 μg/ml (0.025 Abs。) 或更高的高浓度区域，标准曲线是弯曲的，但在图 6 的低浓度区域，可获得线性度良好的标准曲线。

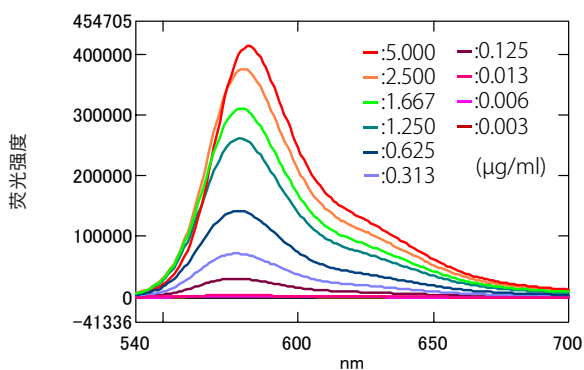


图 4 荧光光谱 (RF-6000)

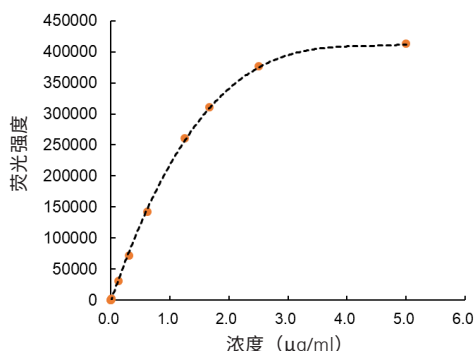


图 5 标准曲线 (RF-6000)

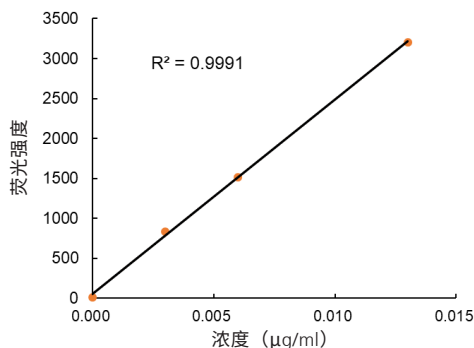


图 6 低浓度区域的标准曲线 (RF-6000)

■ 根据检测、定量下限值来比较灵敏度

与应用报告 No.A606 类似，使用标准曲线和 10 次空白测定中计算得的标准偏差 σ ，计算出了定量下限值 (10σ) 和检测下限值 (3σ)。另外，采用了线性度较高的标准曲线。

UV-2600i 和 RF-6000 的定量下限值和检测下限值如表 3 所示。从通过本实验算出的定量下限值的比可知，RF-6000 的灵敏度较高，是 UV-2600i 的 400 倍以上。即使对图 3 和图 6 的低浓度区域的标准曲线进行比较，图 6 (RF-6000) 的结果中得到了离散较小的标准曲线。与对未被样品吸收的照射光进行检测的吸光度法不同，荧光光度法以零为标准检测荧光，因此，噪声水平低，可得到较高的灵敏度。

表 3 定量下限值和检测下限值

UV-2600i	定量下限值	$1.9 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$
	检测下限值	$5.6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$
RF-6000	定量下限值	$4.3 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$
	检测下限值	$1.3 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$

■ 各浓度范围的线性度的比较

UV-2600i 和 RF-6000 的标准曲线的相关系数的平方值与浓度范围的关系如表 4 所示。另外，使用 UV-2600i 时，低于空白以外的定量下限值的点除外。

即使在未达到 UV-2600i 的定量下限值的区域 ($0 \sim 0.013 \mu\text{g/ml}$)，使用 RF-6000 也可以得到线性度良好的标准曲线。

另一方，使用 RF-6000 时，使用浓度高的标准溶液创建的标准曲线的线性度变低。浓度高时，有时会发生消光，测定值低于设想的荧光强度。

表 4 标准曲线的相关关系的平方值和浓度范围

范围 ($\mu\text{g/ml}$)	R^2 (UV-2600i)	R^2 (RF-6000)
0 ~ 5.000	0.9999	0.8091
0 ~ 1.667	0.9990	0.9924
0 ~ 0.013	(0.9808)*	0.9991

* 由于是未达到定量下限值的浓度范围，所以为参考值

■ 总结

对紫外可见分光光度计 UV-2600i 和荧光分光光度计 RF-6000 的定量评价结果进行了比较。使用 RF-6000 时，可以在不到 UV-2600i 的定量下限值的低浓度区域内进行定量评价。另一方面，可知在使用 UV-2600i 时，可以在使用 RF-6000 可能发生消光的高浓度区域进行定量。

适当地区分使用紫外可见分光光度计和分光荧光光度计，可以对应各种浓度范围内的定量评价。

岛津应用云



