

羅丹明 WT、螢光素鈉鹽及葉綠素甲在螢光檢測中的穩定性與靈敏度比較

嚴國維・黃仕豪*

農業部水產試驗所海洋漁業組

摘要

透過光學來定量海中葉綠素濃度已經催生出許多先進科技的商業與研究用途。這些儀器運用了螢光、光吸收和散射等原理，能夠以高時間分辨率和快速採樣率來定量各種物質。然而，實驗所需的葉綠素甲 (Chlorophyll-a, Chl-a) 標準品價格昂貴且需低溫保存，增加了成本與不便性。本研究旨在替葉綠素測定尋找更穩定且經濟的標準品，為此比較三種螢光化學物質-羅丹明 WT (rhodamine WT, RWT)、螢光素鈉鹽 (fluorescein sodium salt, FSS) 和 Chl-a 在不同濃度下的螢光強度表現。本研究使用微孔板分析儀測量這些化合物的螢光反應，並分析其穩定性與靈敏度。結果顯示，FSS 在所有濃度下表現出最佳的穩定性與區分能力，而 RWT 在高濃度下出現輕微重疊，但仍具應用潛力。相比之下，Chl-a 在高低濃度下的螢光反應變異性較大。FSS 的穩定螢光表現顯示出它作為 Chl-a 標準品替代品的潛力。這些發現為未來螢光檢測標準品的選擇提供了指引，特別是在環境科學與生物監測領域的應用中。

關鍵詞：螢光檢測、葉綠素甲、螢光素鈉鹽、羅丹明 WT、穩定性

前言

葉綠素甲 (Chlorophyll-a, Chl-a) 是光合藻類的主要色素，其濃度可以反映水體的生物生產力和生態系統健康狀況 (Holm-Hansen and Riemann, 1978)。測定 Chl-a 涉及從浮游植物中提取色素，這需要過濾水樣並使用適當的溶劑進行提取 (Pinckney *et al.*, 1994, Aminot and Rey, 2000, Ritchie, 2008)。Chl-a 標準品是用於檢測和分析葉綠素含量的參考材料，須具備可靠的標準濃度及穩定性，以利校準儀器和建立檢量線 (Axler and Owen, 1994)。透過 Chl-a 標準品螢光分析在生物、化學及環境研究領域中是一種重要且普遍應用的技術 (Pinckney *et al.*, 1994)，葉綠素含量作為生物指標，用於評估環境健康和生物多樣性，幫助識別生態系統中的潛在問題，能夠提供各項研究關鍵的指標，對於環境科學、農業、漁業和水資源管

理等領域具有重要意義 (Arar and Collins, 1997)。

透過光學來定量海中葉綠素濃度已獲得先進的科技，並催生出許多商業及研究用途。這些儀器利用螢光、光吸收和散射的不同原理，以高時間分辨率和快速採樣率定量溶解和顆粒物質的濃度 (Earp *et al.*, 2011)。目前 Chl-a 螢光分析中常使用 Chl-a (Gall *et al.*, 2024)。然而，由於其價格高昂並且需要嚴格的保存條件，因此對研究經費和便利性帶來挑戰。相對而言，同樣具有類似效果、且可常溫保存的羅丹明 WT (rhodamine WT, RWT) 目前已發現有部分研究採用於取代實驗之上 (Tamburri, 2005)。螢光素鈉鹽 (fluorescein sodium salt, FSS) 皆可在常溫下保存，且成本較低，因此在應用及實驗設計上更具靈活性。

為了確保螢光測量的結果具備可靠性，穩定性和靈敏度是兩個關鍵參數。穩定性指的是測量值在重複試驗中的一致性，而靈敏度則是指螢光訊號能夠區分不同濃度的能力。本研究將評估不同濃度下 RWT、FSS 和 Chl-a 的螢光測量變異性，並比較這三種物質在螢光檢測上的性能。本研究的主要目的是比較三種螢光化合物 (RWT、FSS

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, Tel: (02) 2462-2101 ext. 2322; Fax: (02) 2463-3110; E-mail: shhuang03@mail.tfrin.gov.tw

和 Chl-a) 的螢光強度隨濃度變化的穩定性與靈敏度，並探討其在不同實驗條件下的應用可行性。通過系統性的測量與分析，本研究期望能夠為選擇更具成本效益且保存便利的螢光標準品提供指導，並為材料與方法部分的實驗設計奠定基礎。

材料與方法

一、器材與試劑

本研究利用微孔板分析儀 (Tecan Infinite 200 Pro)，評估不同化學物質的螢光反射強度穩定性。微孔板分析儀經過校正和優化，以確保測量結果的準確性與可重複性。除微孔板分析儀外，還使用了微量天平 (Precisa, XS 225A-SCS) 以精確稱量樣品粉末及試劑，以及微量吸管 (Eppendorf, EPP-3123000055-1EA、EPP-3123000063-1EA、EPP-3123000080-1EA)，包含 10 ml、1 ml 和 200 μ l 的容量，用於準確測量樣品和試劑體積。使用的試藥包括：1. 丙酮：用作葉綠素甲的溶劑；2. RWT：由 Turner 提供的校正標準溶液 (Rhodamine WT, 400 ppb)；3. FSS：由 Sigma 提供的螢光素鈉鹽 (F6377) 與 4. Chl-a：由 Sigma 提供的標準粉末 (96145)。

二、螢光物調配及量測

本研究的主要目標是評估 RWT、FSS 及 Chl-a 三種螢光標準品在不同濃度下的表現，以探討其作為 Chl-a 檢量線標準品的可行性。因此，標準品的配置濃度範圍是根據本所過去進行 Chl-a 檢量線實驗時常用的 Chl-a 濃度範圍對應之螢光值推算而來。同時，為提升實驗操作的精確性與效率，我們選擇整數濃度，減少微量吸管的移液操作數量，以降低人為誤差的影響。此外，由於各標準品的螢光強度存在較大差異，我們根據其螢光響應特性調整配置範圍，使其螢光強度分佈覆蓋 Chl-a 的典型測試範圍，以利於後續比較。

RWT：配置濃度為 400 ppb 的 RWT 標準溶液，然後用蒸餾水依次稀釋得到濃度為 9、18、36、72、180、270 和 360 ppb 的標準溶液。在螢光測量中，取各標準溶液 200 μ l 置於 96 孔微孔

板中，使用微孔板分析儀測量螢光強度。

FSS：取 FSS 標準品 0.1 g，溶於蒸餾水並定量至 1 L，配製成 100 ppm 的標準溶液；取 100 ppm 溶液 10 ml 加入蒸餾水稀釋至 1 L，得到 1 ppm (1000 ppb) 的標準溶液。再用蒸餾水進行系列稀釋，配置成濃度為 14、28、56、112、280、420 和 560 ppb 的標準溶液。取各標準溶液 200 μ l 置於 96 孔微孔板中，測量螢光強度。

Chl-a：取 Chl-a 標準粉末 1 mg，溶於 90% 丙酮中，配製成濃度為 1 ppm 的標準溶液；取 1 ppm 標準溶液 10 ml 加入 90% 丙酮稀釋至 100 ml，得到 100 ppb 標準溶液。用 90% 丙酮進行系列稀釋，配置成濃度為 0.5、1、2、4、10、15 和 20 ppb 的標準溶液。取各標準溶液 200 μ l 置於 96 孔微孔板中測量螢光強度。

所有螢光強度測量所得數據皆繪製成檢量線，並進行後續的統計分析，以評估三種標準品在不同濃度範圍內的穩定性與靈敏度。

三、螢光強度隨時間變化分析

為了研究不同化學物質的螢光強度隨時間的變化，本研究於 2024 年 7 月 4 日至 8 月 30 日期間進行了一系列實驗，並使用微孔板分析儀測量螢光強度。儀器的受控條件包括：固定激發與發射波長、測量環境的溫度控制 ($25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)、避免外部光源影響，以及統一使用黑色透明底 96 孔微孔板。此外，樣品測量前均充分混合，並進行空白校正，以排除背景螢光干擾。

為確保光學系統的準確性與穩定性，本研究使用 SPARK QC 工具校正盤進行光學系統的校準，確認儀器符合原廠允收標準。校正內容包括螢光、吸光度與冷光的光學對準，確保光源與偵測器的準確性。此外，透過標準螢光樣品測試信號強度，以驗證螢光激發與發射光譜的一致性，並確保不同通道間的測量誤差最小化。所有校準均參考原廠校正盤手冊進行，並定期檢測儀器狀態，以確保測量結果的準確性與穩定性。

螢光數據記錄在一個 CSV 檔案中，包含三種類型化學物質 (RWT、FSS 和 Chl-a) 的螢光強度測量值。數據被導入 R 軟體中，並將日期格式設為英文，以方便處理。所有表示螢光強度的欄位均轉

換為數值格式，以確保一致性。分析的內容包括將螢光數據隨時間繪圖，每個濃度的數據均單獨繪製。

數據繪製分為三個單獨的圖形，每個圖形代表一種化學物質。 x 軸顯示測量日期， y 軸表示螢光強度。每條線對應的濃度標籤被放置在圖的左側或右側，以確保標示清晰。此外，為了更好地呈現數據，程式碼將 y 軸的範圍增加了最大值的 20%。所有可視化圖形均被儲存 PDF 檔案，以供進一步分析。

四、螢光強度密度圖分析

為了確定不同濃度的個別化學物質螢光強度的獨特性，本研究使用 R 軟體的 `ggplot2` package 生成密度圖以觀察可能的重疊情況。重疊的存在表明不同濃度的螢光強度變異可能導致型一錯誤或型二錯誤。為檢測不同濃度密度曲線間的重疊情況，首先計算並繪製每條曲線的最大密度值。設置一個閾值來識別重疊區域，定義為兩條曲線密度值之間差異小於 0.01 的區域。如果發現重疊，則在圖中繪製灰色長方形來標示這些重疊區域。此外，本研究進一步透過 R 軟體的 `corrplot` package 來分析不同濃度間的重疊程度，建立 濃度相關矩陣 (correlation matrix)，以可視化不同濃度螢光信號的重疊程度。藉由 `corrplot` 以熱圖 (heatmap) 的方式呈現不同濃度之間的重疊面積，以圓圈大小、數字及顏色深淺顯示不同濃度間的螢光強度重疊程度，範圍從 0 (無重疊) 至最大 0.17，反映螢光強度隨濃度變化的可區分性。

五、可視化與趨勢分析

為了評估不同化學物質在不同濃度下重複螢光測量的穩定性，本研究分析了以下三個參數。(一) 密度最高值 vs 螢光平均值 (對數刻度)：為了更清楚地觀察密度最大值的變化， Y 軸被設置為對數刻度；(二) 標準差 (SD) vs 螢光平均值：將標準差與螢光平均值對比，以檢查測量的穩定性；(三) 變異係數 (CV) vs 螢光平均值：將變異係數與螢光平均值對比，以了解濃度增加時的相對變異性。數據的處理與可視化是使用 R 軟體的 `ggplot2` package 進行，並產生圖形以展示這些參數隨螢光平均值的變化趨勢。計算出的參數與

每種化學物質的螢光平均值進行對比，生成了三個獨立的圖形。

結果與討論

一、多種濃度下螢光強度隨時間變化趨勢

根據分析結果，三種化學物質的螢光強度隨濃度變化表現出不同波動的趨勢 (Fig. 1)。RWT 螢光表現主要受限於材料本身的螢光強度，即便使用原液，仍無法完全應對高濃度葉綠素的反應 (Fig. 1A)。因此，RWT 在低葉綠素濃度的環境中仍具可行性，但在高濃度條件下，其檢量線無法滿足樣品需求。Fig. 1B 顯示 FSS 的分析結果，研究顯示其螢光反射在不同濃度下隨時間波動較為平緩，且其範圍涵蓋超過 20 ppb 的葉綠素甲濃度。進一步觀察傳統使用的 Chl-*a* 標準品 (Fig. 1C)，其穩定性關鍵濃度在 10 ppb，當濃度低於該值時穩定性較高，超過此濃度則穩定性下降。此外，自 8 月 15 日以後，Chl-*a* 的螢光反應顯著隨時間增加。

在進行實驗前，研究團隊已大致掌握這三種化學物質各自的限制。RWT 的限制主要在其檢量範圍，FSS 則擔心螢光反射過強導致測量困難，而 Chl-*a* 標準品的螢光來源於有機物，因此擔心其穩定性及隨時間衰退的問題。然而，研究結果顯示，RWT 是一個不錯的標準品選擇，但其檢量範圍限制依然存在。Chl-*a* 的穩定性在時序分析中確實表現出些許波動，且波動幅度略高於其他化學物質。原本擔心生物螢光會隨時間衰退，但實驗結果顯示螢光反應反而隨時間增加，這一點相當出乎意料。三種標準品的螢光強度存在顯著差異，RWT 的螢光強度僅為 FSS 的 1/7，而 Chl-*a* 的螢光強度則介於兩者之間。雖然 RWT 的螢光強度相對較低，但仍可作為低螢光強度環境中的校正標準。然而，若應用於高通量分析或高濃度測試時，FSS 更能確保測量結果的一致性。

二、化學物質螢光密度曲線

根據 Fig. 2 的螢光強度機率密度曲線分析，發現了三種化學物質 (Rhodamine WT、Fluorescein Sodium Salt 以及 Chlorophyll a) 的濃度與螢光強度之間具有以下共同趨勢和特性：

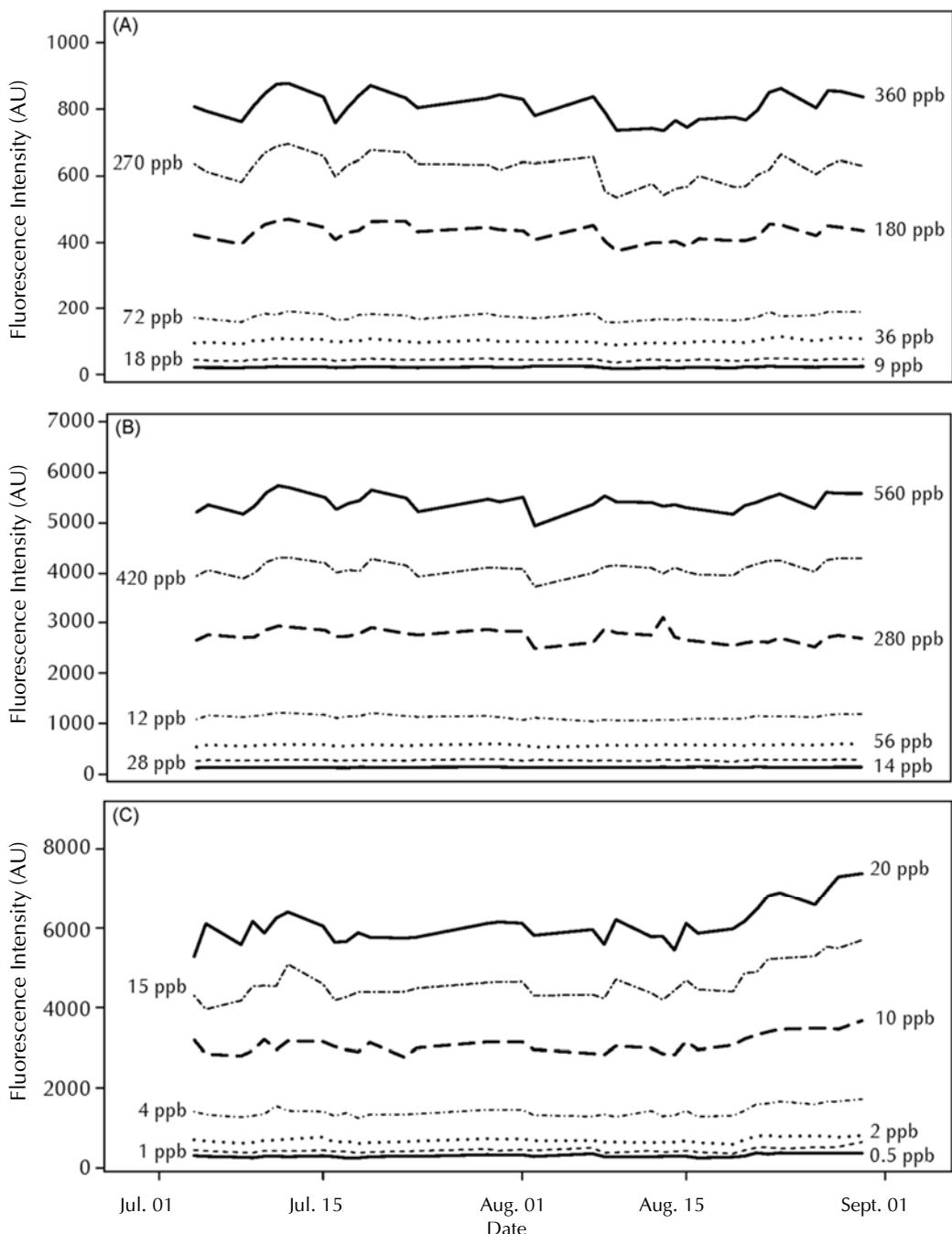


Fig. 1 Trends in Fluorescence intensity of different chemical substances (July 4 - August 30, 2024). The X-axis represents the study period, and the Y-axis represents fluorescence intensity. Each panel shows measurement results for a different chemical substance: (A) Rhodamine WT, (B) Fluorescein Sodium Salt, and (C) Chlorophyll a. Curves in each graph indicate fluorescence intensity trends at various concentrations.

首先，三張圖中皆顯示出濃度較小的化學物質，其螢光強度的集中趨勢較高，顯示出較為穩定的分佈曲線。而濃度較高時，集中趨勢減弱，曲線的分佈範圍變得更為分散，表示高濃度下的螢光反射變異性增大。針對 Rhodamine WT (RWT) (Fig. 2A)，高濃度的螢光曲線呈現明顯的重疊現象。隨著濃度的增加 (180 ppb、270 ppb 和 360

ppb)，重疊的螢光強度範圍逐漸擴大，顯示出高濃度下不同濃度的螢光反應較難區分，這樣的重疊會對分析精度產生影響。Fluorescein Sodium Salt (FSS) (Fig. 2B) 的螢光強度分佈顯示了穩定之特

徵，低濃度下的集中趨勢最為明顯。該化學物質在不同濃度下 (從 0 ppb 到 400 ppb) 沒有出現重疊現象，這顯示出在各濃度之間，螢光強度的區

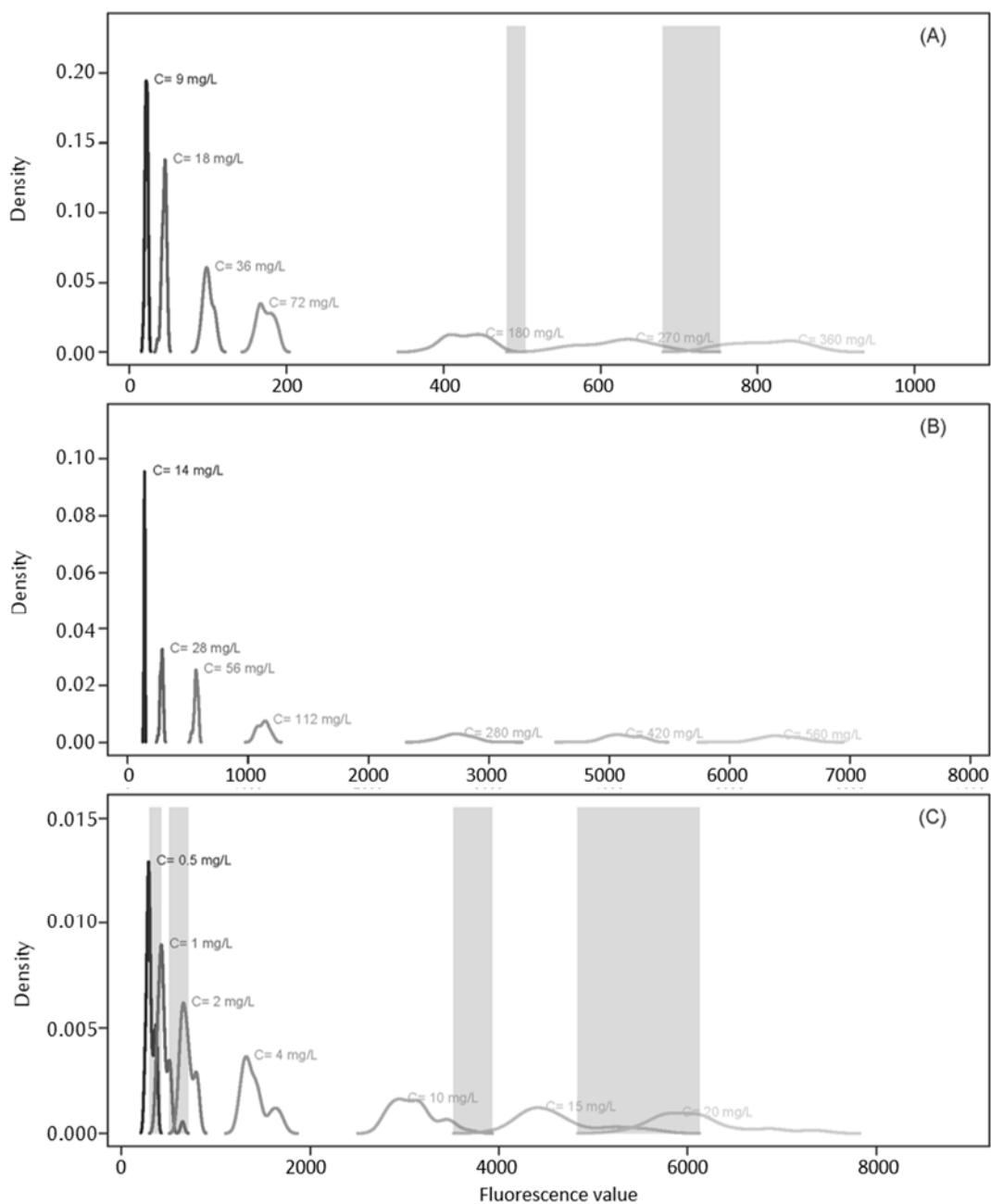


Fig. 2 Fluorescence intensity probability density distributions for different chemical substances. This figure displays the probability density distribution curves of fluorescence intensity for: (A) Rhodamine WT, (B) Fluorescein Sodium Salt, and (C) Chlorophyll a. Each curve within a panel corresponds to the fluorescence intensity probability density distribution at a different concentration. The gray shaded areas highlight regions where the probability density curves of different concentrations overlap, indicating the distinguishability of fluorescence responses under high-concentration conditions.

分較為明確。因此，FSS 在不同濃度下的螢光反射變化具可預測性，對於精確測量具有潛力。最後，Chl-a (Fig. 2C) 的曲線顯示出類似於 RWT 的重疊現象。除了濃度為 4 ppb 的曲線與其他濃度曲線沒有重疊外，其他濃度下 (10 ppb 和 16 ppb) 的

螢光強度曲線存在明顯的重疊現象，並且隨著濃度增加，重疊範圍變得更大。這表明在高濃度下，Chl-a 標準品的螢光反應不易區分不同的濃度，可能導致分析準確性降低。

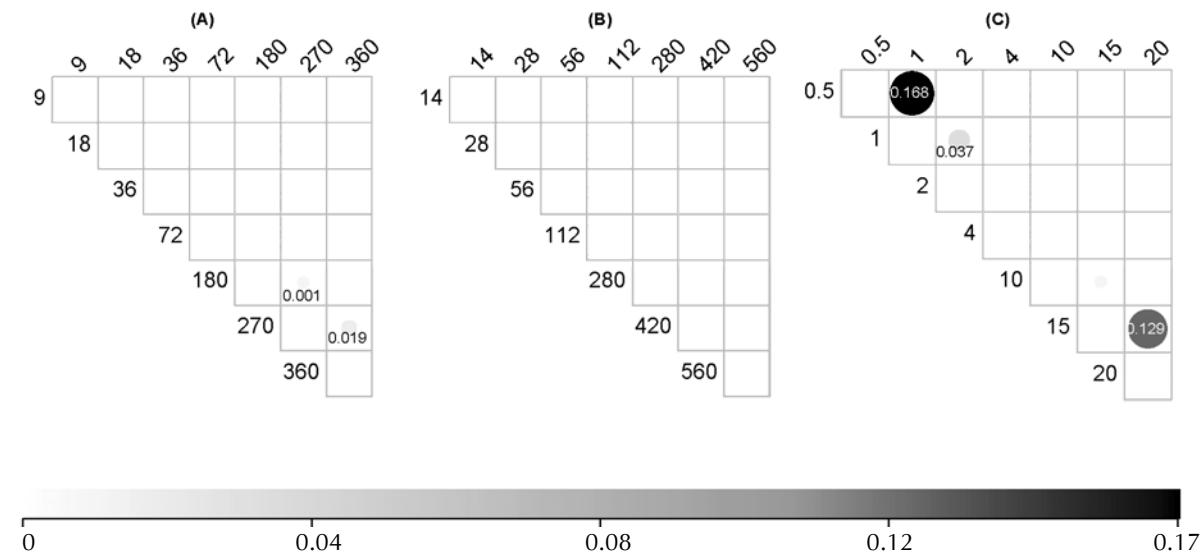


Fig. 3 Fluorescence intensity overlap density matrices for three chemical substances at different concentrations. This figure presents the fluorescence intensity overlap density matrices for: (A) Rhodamine WT, (B) Fluorescein Sodium Salt, and (C) Chlorophyll a. In each matrix, the size and color of the circles indicate the degree of fluorescence intensity overlap between different concentrations, ranging from 0 (no overlap) to a maximum of 0.17. This reflects the distinguishability of fluorescence intensity as a function of concentration.

綜合上述結果，可以得出結論：低濃度的化學物質螢光反應較為穩定，具有較高的集中趨勢，而高濃度時，重疊現象較為明顯，可能會影響測量的分辨能力。RWT 和 Chl-a 在高濃度下的重疊現象值得進一步探討，以改善分析的準確性。而 FSS 在所有濃度下均無重疊，顯示其在螢光反射測量中具有良好的潛力。

三、統計分析與穩定性評估

如 Fig. 3 所示，RWT 在高濃度區域有重疊現象，但與 Chl-a 相比，重疊面積相對較小。這意味著 RWT 在高濃度下的螢光反應仍具區分能力，儘管會出現輕微的重疊。FSS 在不同濃度之間完全沒有重疊現象。這表明 FSS 的螢光強度在不同濃度下表現出良好的區分度，使其成為螢光分析中波動平穩的物質。Chl-a 在高濃度與極低濃度下均出現重疊現象。值得注意的是，重疊面積並沒有隨著濃度增加而顯著變大，這表示即使濃度提升，Chl-a 的螢光強度區分度在部分濃度範圍內仍然存在挑戰。有關 RWT 在高濃度區域的重疊現象與前人研究結果一致，且該研究還發現，RWT 之螢光訊號可能受環境影響而容易出現變化 (Earp *et al.*, 2011)。

Figure 4 展示了三個關鍵指標：(A) 最大密度值、(B) 標準差 (SD) 以及 (C) 變異係數 (CV) 與螢光平均值之間的關係。研究結果顯示，三種化學物質的最大密度值都隨著螢光強度的增加而降低。三種化學物質之中，FSS 的數值最高，RWT 次之，Chl-a 的最低。這個數值可以從另外一種角度說明不同濃度的集中趨勢及產品穩定性。這個現象同樣可以從標準差 (Fig. 4 B) 發現，因為在此圖中三種化學物質在高螢光強度下的標準差顯著增加，這意味著螢光反射的變異性更大。但是 FSS 的標準差較為穩定，顯示出該化學物質在不同濃度下的穩定性較高。本研究經過標準化後的變異係數 (Fig. 4C) 成功移除掉螢光值增加所產生的變異性，由圖同樣可以發現 FSS 同樣是三種產品中變異性最低的一個產品，由此可見其產品的穩定性相當高。

四、與前人研究比較

標準品材質之穩定性是非常重要的選材考量。例如 Ritchie (2008) 為了優化葉綠素 a、b、c 和 d 的光譜測定方法，採用藍綠藻及英國菠菜 (*Spinacia oleracea*) 來建立標準品，研究結果顯示，這些產品容易因樣品劣化或溶劑干擾導致測量誤

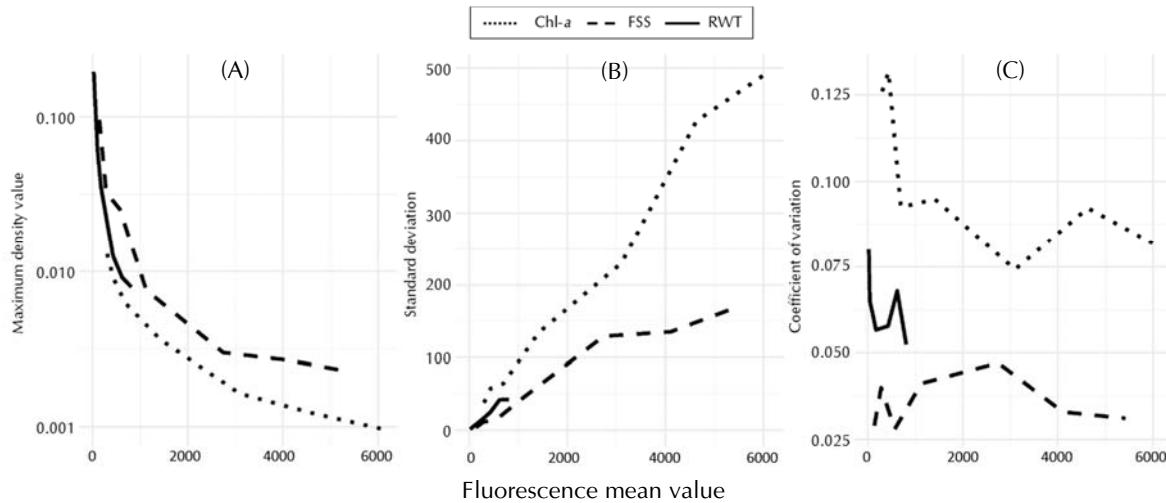


Fig. 4 Relationship between mean fluorescence and three key indicators. This figure illustrates the relationship between the mean fluorescence value and three key indicators: (A) maximum density value, (B) standard deviation, and (C) coefficient of variation. These panels show the trends of key indicators for three chemical substances - Chlorophyll *a*, fluorescein sodium salt, and rhodamine WT - in relation to fluorescence intensity changes. This assessment evaluates the stability and sensitivity of each chemical substance across different concentrations.

差。此外，本研究與 Earp *et al.* (2011) 皆探討螢光標準品在環境監測中的適用性。Earp *et al.* (2011) 評估標準品在 Chl-*a* 感測器校正中的應用，發現 Fluorescein 作為 Chl-*a* 校正標準品具穩定性。然而，Fluorescein 難以溶於水，通常需藉助有機溶劑。本研究採用 FSS，其具有高水溶性，使樣品製備更加簡單並減少有機溶劑干擾。實驗結果顯示，FSS 在高低濃度範圍內均表現出穩定的螢光強度，靈敏度優於 RWT 及 Chl-*a*，提供了一種更具操作便利性與可靠性的標準品選擇。相較於 Earp *et al.* (2011) 需要多種標準品測試與環境條件調整，本研究透過標準化的微孔板分析技術，確保螢光測量的一致性，並簡化了標準品的選擇與應用流程，使螢光測量技術更適用於長期監測與高通量分析。低成本是目前科學研究的重要方向之一 (Hagh *et al.*, 2024)。本研究證實 FSS 在水溶性、螢光穩定性及靈敏度方面優於傳統 Chl-*a* 標準品和 RWT，可作為更可靠的標準品應用於監測設備。透過 FSS 作為標準品，可降低環境因素對數據穩定性的影響，使感測系統能夠更準確地測量水體中葉綠素濃度，提升數據的時空連續性。

結論

本研究探討三種化學物質 (RWT、FSS、Chl-*a*)

在不同濃度與螢光強度下的表現，提供了有關穩定性和區分能力的重要見解。

首先，FSS 在本研究中的表現尤為突出。Fig. 3 顯示 FSS 在各濃度範圍內完全沒有重疊，這說明其螢光強度具備良好的區分度。即使在螢光強度提高的情況下，FSS 依然能保持穩定的螢光反應，這在 Fig. 4 的標準差 (SD) 和變異係數 (CV) 中得到了強化支持。FSS 的標準差和變異係數在螢光強度變化中變動較小，顯示其具有優異的穩定性和較低的變異性。這些結果表明 FSS 在螢光分析應用中是一個波動平穩且可靠的標準品，適合不同濃度範圍的螢光測試。

RWT 的表現與 FSS 相比稍顯不足，但仍然具備一定的區分能力。在高濃度下，RWT 的螢光強度有輕微的重疊現象，但與 Chl-*a* 相比，重疊面積相對較小，說明 RWT 在高濃度下仍然能夠保持部分區分度。從 Fig. 4 可以看出，RWT 的標準差和變異係數在高螢光強度下逐漸增加，顯示其在高濃度下穩定性有所降低。因此，在高濃度條件下使用 RWT 時，需要謹慎考慮其重疊效應。

Chl-*a* 標準品的表現較為不穩定。在 Fig. 3 中，Chl-*a* 的重疊現象發生在高濃度和低濃度兩端，且這種重疊現象並沒有隨著濃度的增加而顯著改善。這意味著 Chl-*a* 在不同濃度範圍內區分度較差，特別是在極端濃度下更為明顯。此外，Fig. 4

中的標準差和變異係數數據顯示，Chl-*a* 的螢光反應變異性較大，這進一步說明了其在不同螢光強度下的穩定性較低。

總結來說，本研究證實了 FSS 的穩定性和可靠性，特別適合用於不同濃度下的螢光分析。RWT 雖然在高濃度下存在輕微重疊，但仍具一定的應用潛力。而 Chl-*a* 標準品雖然是過去慣用的物質，但其區分度和穩定性則相對較差，在實際應用中可能需要進一步優化，以提高其分析性能。這些發現將為螢光分析的標準物質選擇提供有價值的依據，尤其是在高濃度測試中的應用。

參考文獻

- Aminot, A. and F. Rey (2000) Standard procedure for the determination of chlorophyll *a* by spectroscopic methods. ICES Tech. Mar. Envir. Sci., 112 (25): 1-2.
- Arar, E. J. and G. B. Collins (1997) Method 445.0: In vitro determination of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in marine and freshwater algae by Fluorescence. U.S. Envir. Prot. Age., Washington, DC.
- Axler, R. P. and C. J. Owen (1994) Measuring chlorophyll and phaeophytin: Whom should you believe? Lake Reser. Manag., 8 (2): 143-151.
- Earp, A., C. E. Hanson, P. J. Ralph, V. E. Brando, S. Allen, M. Baird, L. Clementson, P. Daniel, A. G. Dekker, P. R. C. S. Fearn, J. Parslow, P. G. Strutton, P. A. Thompson, M. Underwood, S. Weeks and M. A. Doblin (2011) Review of fluorescent standards for calibration of in situ fluorometers: Recommendations applied in coastal and ocean observing programs. Opt. Express, 19 (27): 26768-26782.
- Gall, M., J. Zeldis, K. Safi, S. Wood and M. Pinkerton (2024) Vertical stratification of phytoplankton biomass in a deep estuary site: Implications for satellite-based net primary productivity. Front. Mar. Sci., 10: 1250322.
- Hagh, S. F., P. Amngostar, W. Chen, J. Sheridan, C. J. Williams, A. M. Morales-Williams, D. Huston and T. Xia (2024) A low-cost lora optical fluorometer-nephelometer for wireless monitoring of water quality parameters in real time. IEEE Sens. J., 24 (13): 21511-21519.
- Holm-Hansen, O. and B. Riemann (1978) Chlorophyll *a* determination: Improvements in methodology. Oikos, 438-447.
- Pinckney, J., R. Papa and R. Zingmark (1994) Comparison of high-performance liquid chromatographic, spectrophotometric, and fluorometric methods for determining chlorophyll *a* concentrations in estuarine sediments. J. Microbiol. Methods, 19 (1): 59-66.
- Ritchie, R. J. (2008) Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. Photosynthetica, 46 (1): 115-126.
- Tamburri, M. (2005) Protocols for verifying the performance of in situ chlorophyll fluorometers. Solomons, MD, ACT, 31 pp. (ACTPV05-01). DOI <http://dx.doi.org/10.25607/OPB-346>.

Comparison of the Stability and Sensitivity of Rhodamine WT, Fluorescein Sodium Salt, and Chlorophyll *a* in Fluorescence Detection

Kuo-Wei Yen and Shih-Hao Huang*

Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Optical methods for quantifying chlorophyll-*a* (Chl-*a*) concentrations in marine environments are crucial for commercial and research applications. Instruments leveraging fluorescence, light absorption, and scattering offer high temporal resolution and rapid sampling for dissolved and particulate matter. However, calibrating with Chl-*a* standards is costly and requires cold storage, posing significant experimental challenges. This study compares the fluorescence intensity performance of three compounds – Rhodamine WT (RWT), Fluorescein Sodium Salt (FSS), and Chl-*a* – at various concentrations. Using a microplate reader under controlled conditions, we measured their fluorescence responses, analyzing stability and sensitivity. FSS demonstrated superior stability and distinguishability across all concentrations. While RWT showed slight overlap at high concentrations, it remains a promising candidate. In contrast, Chl-*a* exhibited greater variability in fluorescence response at both high and low concentrations. The stable fluorescence performance of FSS suggests its strong potential as a substitute for Chl-*a* standards. These findings offer valuable guidance for selecting fluorescence standards, particularly in environmental science and biological monitoring.

Key words: Fluorescence detection, Chlorophyll *a*, Fluorescein Sodium Salt, Rhodamine WT, stability

*Correspondence: 199 Hou-Ih Road, Keelung 20246, Taiwan. Tel: (02) 2462-2101 ext. 2322; Fax: (02) 2463-3110; E-mail: shhuang03@mail.tfrin.gov.tw