

中华人民共和国教育行业标准

JY/T 0571—2020
代替 JY/T 025—1996

荧光光谱分析方法通则

General rules for fluorescence spectrometry



2020-09-29 发布

2020-12-01 实施

中华人民共和国教育部 发布



目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 测试或分析方法原理	2
5 分析测试环境要求	4
6 试剂和材料	5
7 仪器	5
8 样品	7
9 分析测试	7
10 结果报告	9
11 安全注意事项	10
附录 A (资料性附录) TCSPC、相调制和 STROBE 方法测定荧光寿命的原理	12





前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 JY/T 025—1996《光栅型荧光分光光度方法通则》。本标准与 JY/T 025—1996 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- 标准名称由《光栅型荧光分光光度方法通则》改为《荧光光谱分析方法通则》;
- 修改了适用范围(见第 1 章,1996 年版的第 1 章);
- 增加了规范性引用文件(见第 2 章);
- 修改和增加了与本标准相关的术语和定义,包括荧光、荧光寿命、磷光、磷光寿命、荧光量子产率、荧光偏振、内滤效应、检出限、准确度、精密度、不确定度(见第 3 章,1996 年版的第 2 章);
- 修改和扩充了“方法原理”部分内容,增加了荧光量子产率分析、荧光偏振分析、荧光寿命和时间分辨荧光光谱分析的原理(见第 4 章,1996 年版的第 3 章);
- 增加了分析测试环境要求(见第 5 章);
- 增加了试剂和材料的内容,按照溶剂、常规试剂和常规材料分类(见第 6 章);
- 修改了仪器组成,增加了瞬态荧光光谱仪和校准的内容(见第 7 章,1996 年版的第 5 章);
- 补充并修改了试样制备方法的分类及相应内容,完善了“样品”中固体样品的内容(见第 8 章,1996 年版的第 6 章);
- 修改并完善了分析测试部分的内容,增加了测试前准备工作,具体测试按照定性分析、定量分析、量子产率测试、寿命测试和时间分辨发射光谱测试分类(见第 9 章,1996 年版的第 7 章);
- 修改并完善了结果报告部分,按照基本信息、定性分析、定量分析、荧光寿命分析和分析方法与测定结果的评价分类(见第 10 章,1996 年版的第 8 章);
- 修改完善了安全注意事项(见第 11 章,1996 年版的第 9 章);
- 在附录中增加了荧光寿命测试原理。

本标准由中华人民共和国教育部提出。

本标准由全国教育装备标准化技术委员会化学分技术委员会(SAC/TC 125/SC 5)归口。

本标准起草单位:四川大学、北京大学、东华大学、兰州大学。

本标准主要起草人:吴鹏、陈明星、徐洪耀、巨正花、蒋小明、田云飞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- JY/T 025—1996。



荧光光谱分析方法通则

1 范围

本标准规定了用荧光光谱仪进行定性或定量分析荧光物质的测试或分析方法原理、分析测试环境要求、试剂和材料、仪器、样品制备、分析步骤、结果报告和安全注意事项。

本标准适用于波长范围为 200 nm~1 700 nm 的荧光光谱和荧光寿命分析,本标准不包含原子荧光光谱。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 13966—2013 分析仪器术语

GB/T 19267.3—2008 刑事技术微量物证的理化检验 第 3 部分:分子荧光光谱法

GB/T 27411—2012 检测实验室中常用不确定度评定方法与表示

JJG 537 荧光分光光度计检定规程

JJF 1059.1 测量不确定度评定与表示

《中华人民共和国药典》(2015 年版)(四部)0405 荧光分光光度法

3 术语和定义

GB/T 27411—2012 和 GB/T 13966—2013 规定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荧光 fluorescence

物质吸收合适波长的光辐射后,电子可跃迁到激发态,以光辐射的形式再返回基态时,所发射的光。

3.2

荧光寿命 fluorescence lifetime

τ

当物质吸收合适波长的光辐射后,该物质电子从其基态跃迁到某一激发态上,再以辐射跃迁的形式回到基态发出荧光。当激发停止后,物质的荧光强度降到激发时最大强度的 $1/e$ 所需的时间,通常称为激发态的荧光寿命。

3.3

磷光 phosphorescence

物质吸收合适波长的光辐射后,电子可跃迁到激发单重态,经系间窜越至亚稳的激发三重态能级,然后经辐射跃迁返回至基态时所发出的光。

注:与荧光寿命类似,磷光寿命定义为当激发停止后,物质的磷光强度降到激发时最大强度的 $1/e$ 所需的时间。与荧光相比,磷光更容易受到氧等的淬灭。

3.4

校正荧光光谱 corrected fluorescence spectrum

由于荧光仪器自身的特性(包括光源的能量分布、单色器的衍射效率和检测器的响应性能等)随波长

变化而变化,同一荧光物质在不同仪器上会得到不同且失真的光谱,且彼此之间无类比性。要使同一荧光物质在不同仪器上能得到具有相同特性的荧光光谱,则需要对仪器的上述特性进行校正,经过校正后的荧光光谱称为校正荧光光谱。在缺少自动校正的仪器上,可使用标准灯(已知光谱分布)和标准荧光物质进行校正。本标准下文中如无特殊说明,所有的光谱均指校正荧光光谱。

3.5

荧光量子产率 fluorescence quantum yield

荧光物质吸收合适波长的光辐后所发射的荧光光子数与所吸收的激发光光子数之比,通常情况下总是小于1。

3.6

荧光偏振 fluorescence polarization

当用偏振光(一定方向传播的光)激发荧光物质时,荧光物质发射偏振光的现象。这种偏振发射是由荧光物质对激发光子取向的选择和发射光子的取向引起的。

3.7

内滤效应 inner filter effect

当荧光物质浓度较大或与其他吸光物质共存时,由于荧光物质或其他吸光物质对于激发光或发射光的吸收而导致荧光减弱的现象。

3.8

检出限 limit of detection(LOD)

仪器能确切响应的输入量的最小值。通常定义为两倍或三倍噪声与灵敏度之比。

[GB/T 13966—2013,定义 2.73]

3.9

准确度 accuracy

被测量的测得值与其真值的一致性程度。

[GB/T 27411—2012,定义 3.4]

3.10

精密度 precision

无穷多次重复测量所得量值的平均值与一个参考量值间的一致程度。

[GB/T 27411—2012,定义 3.5]

3.11

不确定度 uncertainty

根据所用到的信息,表征赋予被测量量值分散性的非负参数。

[GB/T 27411—2012,定义 3.3]

4 测试或分析方法原理

4.1 荧光定性定量分析原理

荧光分析主要是指利用某些物质在特定波长光的激发下,产生特定波长和特定强度荧光等的特性进行物质的定性和定量的分析方法。

注:定量分析仅限于稀溶液样品,一般不直接用于固体样品定量分析。

4.1.1 定性分析

常采用直接比较法,将样品的激发和发射光谱峰的数目、位置、强度以及光谱形状(极值和拐点)、发射光谱寿命等特征,与标准物的谱图作比较,以确定物质种类。

4.1.2 定量分析

定量分析原理参见 GB/T 19267.3 和《中华人民共和国药典》(2015 年版)(四部)0405 荧光分光光度法,包括标准对照法和标准曲线法。

注:在实际应用中,应考虑内滤效应对荧光强度的影响。

4.2 荧光量子产率分析原理

荧光量子产率的测定有参比法和绝对法两种。

4.2.1 参比法

也称相对法,是用已知量子产率的荧光标准物质作为参比对待测荧光试样进行量子产率的测试。在相同激发条件下,分别测定待测荧光试样和参比荧光标准物质两种稀溶液的积分荧光强度(即校正荧光光谱所包括的面积),以及对该激发波长入射光的吸光度,再将这些值分别代入公式(1)进行计算:

$$QY_U = QY_{ST} \times \frac{F_U \times A_{ST}}{F_{ST} \times A_U} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- QY_U ——待测物质的荧光量子产率;
- QY_{ST} ——参比物质的荧光量子产率;
- F_U ——待测物质的积分荧光强度;
- F_{ST} ——参比物质的积分荧光强度;
- A_U ——待测物质在特定激发波长的入射光的吸光度;
- A_{ST} ——参比物质在特定激发波长的入射光的吸光度。

注:运用参比法测定荧光量子产率只适用于液体样品,一般要求吸光度 A_{ST}、A_U 低于 0.05,在选择参比标准样时,应选择与待测荧光物质激发光谱和发射光谱相近的参比物质,且激发和发射谱不重叠。

4.2.2 绝对法

采用积分球对荧光量子产率进行测量,适用于液体、固体、薄膜和粉末样品,目前一般测试波长范围为 300 nm~800 nm。待测样品各个方向的发射光经过积分球均匀化后从出射口出来,并经过单色器最后被检测器所检测。测定时,分别测定待测荧光试样和空白试样的荧光峰面积和激发峰面积(均为校正后)再将这些值分别代入公式(2)进行计算:

$$QY = \frac{F_U - F_B}{A_B - A_U} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- QY ——待测物质的绝对荧光量子产率;
- F_U ——待测物质的积分荧光强度;
- F_B ——空白样品的积分荧光强度;
- A_B ——空白样品的激发积分强度;
- A_U ——待测物质的激发积分强度。

注:运用绝对法测试时,必须加上积分球的校正曲线。测试液体样品时,一般要求待测物质在其最大吸收波长处吸光度低于 0.1,以尽可能降低荧光内滤效应影响。

4.3 荧光偏振分析原理

荧光偏振(P)和荧光各向异性(r)定义为公式(3)和公式(4)。

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \dots\dots\dots(3)$$

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \dots\dots\dots(4)$$

式中：

$I_{//}$ ——激发偏振器与发射偏振器取向互相平行时所测得的垂直偏振发射光强度；

I_{\perp} ——激发偏振器与发射偏振器取向互相垂直时所测得的水平偏振发射光强度。

由于单色器和光电倍增管等对垂直和水平两个偏振成分的敏感度可能不同,因而严格的测定需要引入校正因子 G ,定义 G 为水平偏振光激发样品时,仪器对垂直偏振光的响应强度与对水平偏振光响应强度之比。

$$G = I_{HV}/I_{HH} \dots\dots\dots(5)$$

式中：

I_{HV} ——激发侧偏振器水平取向而发射侧偏振器垂直取向时测得的荧光强度；

I_{HH} ——激发侧偏振器和发射侧偏振器均为水平取向时测得的荧光强度。

仪器或者波长不同, G 值都可能不同,应分别测定,部分仪器带有 G 因子自动校正功能。

经校正后的荧光偏振度：

$$P = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + GI_{\perp}} \dots\dots\dots(6)$$

经校正后的荧光各向异性：

$$r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \dots\dots\dots(7)$$

4.4 荧光寿命分析原理

荧光寿命的测试一般采用时间相关单光子计数法(time correlated single photon counting),简称“TCSPC法”;或相调制技术,也称为“频域法(frequency-domain method)”;或频闪分时法,简称“STROBE”法。TCSPC、频域法和 STROBE 的具体原理参见附录 A。在当今实际应用中,TCSPC 法和 STROBE 方法互为补充。

4.5 时间分辨荧光光谱分析原理

获得时间分辨激发/发射光谱(time-resolved excitation/emission spectra, TRES)的常用技术有：

- 采用多波长扫描获得一系列的衰减曲线,而后对应特定时间宽度做时间切片后,获得时间分辨激发/发射光谱;对应的测试技术有 boxcar(取样积分技术)、TCSPC 等;
- 直接测量方法,采用可以采集光谱的多道检测器,比如 ICCD(intensified charge-coupled device)、条纹相机、微通道板(multiple channel tube, MCP)等,经过光谱仪色散后,直接获得一系列设定时间宽度的瞬时光谱。

5 分析测试环境要求

荧光光谱仪实验室应满足如下环境条件指标：

- a) 仪器工作台:应平稳地放置在工作台上,无振动和强光直射仪器;
- b) 环境温度:所处环境温度应在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- c) 相对湿度:不大于 70%;
- d) 电源:电源稳定 $220\text{ V} \pm 22\text{ V}$,频率为 $50\text{ Hz} \pm 0.5\text{ Hz}$,具有良好接地的独立地线,接地电阻不超过仪器厂家要求;
- e) 其他:无强磁场、电场干扰;无振动,无强气流影响。

6 试剂和材料

6.1 溶剂

6.1.1 用纯净水测量仪器的信噪比,纯净水的电阻率应不小于 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

6.1.2 其他溶剂参见 GB/T 19267.3 和《中华人民共和国药典》(2015 年版)(四部)0405 荧光分光光度法。

6.2 常规试剂

6.2.1 硫酸奎宁

CAS 号 530-66-5, $1.00 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ (配置在 0.05 mol/L 硫酸中),用于可见区波长($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$)和绝对荧光量子产率($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, QY 约为 54%)确认。

6.2.2 硅溶胶(Ludox)

30%硅胶水溶液,用于荧光寿命测试中仪器响应函数(IRF)测定。

6.2.3 1,4-双(5-苯基-2-恶唑)苯(POPOP)

1,4-双(5-苯基-2-恶唑)苯(CAS 号 1806-34-4)的甲醇溶液,用于荧光寿命测试确认($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm} \sim 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$, τ 约为 1.32 ns)。

6.2.4 氯化铕(III)(EuCl₃)

CAS 号 10025-76-0,用于磷光寿命测试确认($\lambda_{\text{ex}} = 394 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 592.3 \text{ nm}$, τ 约为 117.5 μs)。

6.3 常规材料

6.3.1 钕铝石榴石晶体(Nd-YAG)

用于近红外区发射波长($\lambda_{\text{ex}} = 557 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 1064 \text{ nm}$)和寿命(237.3 μs)确认。

6.3.2 毛玻璃

作为散射体提供散射光,可以作为激发波长和发射波长精度的确认。

6.3.3 滤光片、衰减片

根据波长截止需要(如消除光栅的二级衍射),选择低通、高通或带通滤光片;根据强度衰减需要,选择不同衰减能力的衰减片。

6.3.4 截止滤光片(低通、高通、带通)

根据波长截止需要(如消除光栅的二级衍射),选择低通、高通或带通滤光片。

7 仪器

7.1 稳态荧光光谱仪

通常使用的稳态荧光光谱仪为光栅型,其光源与检测器成直角方式排列,具体构成包括光源、单色

器、样品室、检测器等。

7.1.1 光源

稳态荧光光谱仪的光源有高压汞蒸气灯、氙弧灯、连续激光器、LED(light-emitting diode)灯等。氙弧灯能发射出强度较大的连续光谱,故较常用。

7.1.2 单色器

置于光源和样品室之间的为激发单色器,置于样品室和检测器之间的为发射单色器。常采用光栅分光单色器,根据不同测试需求,可配备单光栅单色器或双光栅单色器。也有一些仪器配备滤光片作为单色器进行较为粗略的分光。

7.1.3 样品室

通常由液体样品架及石英比色皿(液体样品用)或可调角度固体样品支架及前表面样品架(粉末或片状样品)等组成。测量液体样品时,激发光路和发射光路分别垂直通过比色皿相邻面;测量固体样品时,固体样品支架需偏转一定角度(如测试面与探测器成 30° 或 60° 夹角),达到尽量使荧光信号通过而避开瑞利散射信号干扰的目的。绝对荧光量子产率测试需配备积分球,磷光样品需要仪器配有斩波器或者门控装置,测试时根据样品的性质不同需通惰性气体保护或除氧。

7.1.4 检测器

一般用光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)或 CCD(charge-coupled device)作检测器。PMT 检测器有模拟信号方式和光子计数方式,并可扩展 TCSPC 功能。

7.1.5 参比检测器(非必须)

可以对激发光的能量变化进行实时监控,满足激发光谱测试需要,也用于动态测试过程中减少光源能量的波动对测试的影响。

7.2 瞬态荧光光谱仪

瞬态荧光光谱仪的组成与稳态荧光光谱仪类似,具体构成包括光源、样品室、检测器和单色器。

7.2.1 光源

具有脉冲发射的光源,常用脉冲激光、闪烁氙灯、脉冲 LED 灯、纳秒闪光灯、微秒闪光灯等光源。对于脉冲激光和 LED 光源,在进行荧光寿命测试时应根据所测荧光寿命的长短选择合适的脉冲频率。

7.2.2 样品室

同 7.1.3。

7.2.3 检测器

采用时间相关单光子计数(TCSPC)检测器或 STROBE 技术的检测器,可进行多通道扫描。

7.2.4 单色器

同 7.1.2。

7.3 校准

荧光光谱仪性能指标主要包括波长准确度、波长重复性、信噪比等,应能满足实际测试工作要求。荧

光光谱仪在投入使用前,需要按规定对其进行校准。在使用过程中,还需按计划对仪器的整体状态进行校准,以确认其是否满足检测分析的要求。对于可见区测试,需用纯净水的拉曼峰位置和强度,来校准仪器的状态;对于近红外区测试,需用 Nd-YAG 进行波长确认;对于寿命测试,需用 POPOP(荧光寿命)或者 EuCl_3 溶液(磷光寿命)以确认其是否满足检测分析的要求。检定或校准应按有关检定规程(如 JJG 537)、校准规范或校准方法进行。

8 样品

8.1 液体样品

测定荧光光谱应在透明溶液中进行,根据用户提供的技术指标,检查浓度范围是否合适,如果需要稀释,应考虑所需溶剂类型和稀释倍数(溶剂选择参见 GB/T 19267.3)。测试绝对荧光量子产率液体样品用溶剂作为空白。

8.2 固体样品

均匀粉末、片状(包含膜样品)或具有光滑平面的块状样品,均可直接测定。测试绝对荧光量子产率固体样品应使用特制的聚四氟样品或石英片作为空白。

8.2.1 粉末样品

测定时将粉末样品用称量纸移至样品槽内,使槽内充满粉末并用药匙压平,保持测试面与检测器成 30° 或 60° 夹角即可测定。

8.2.2 膜样品

片状和膜样品可直接置于样品架上进行测定,保持测试面与检测器成 30° 或 60° 夹角即可测定。

9 分析测试

9.1 测试前准备工作

根据说明书要求启动仪器和计算机,检测前仪器应预热至少 20 min,且应在 20 天内进行至少一次激发校准和发射校准。根据样品的特性及荧光强度,选择合适的仪器工作条件(如狭缝宽度、PMT 增益、CCD 积分时间等)。如发射波长范围包含激发波长的 n ($n=2,3,4,\dots$) 倍处,需选择合适滤光片,以消除倍频影响。

9.2 测定

9.2.1 定性分析

荧光定性分析按以下步骤:

- 荧光激发光谱:设置仪器参数,扫描找到最大发射波长 λ_{em} ,并以此扫描样品得到激发光谱。
- 荧光发射光谱:设置仪器参数,扫描找到最大激发波长 λ_{ex} ,并以此扫描样品得到发射光谱。
- 磷光光谱与荧光光谱方法类似,但测试磷光需要仪器配备闪烁氙灯作为激发源,或在一般仪器激发端配备斩波器。磷光测试时,先进行荧光寿命和磷光寿命表征,参考寿命数据进行门控时间或斩波器设置,从而进行磷光测试。
- 荧光偏振测试:将偏振片放置于光路上(或者将偏振附件拨到指定位置),设置参数后进行测试,运用仪器软件自动计算。

- e) 同步荧光测试:选择同步荧光模式,设置 $\Delta\lambda$ (激发和发射波长的差值)进行同步扫描,即可得到同步荧光光谱。
- f) 三维荧光光谱测试:设置仪器参数,在不同激发波长位置连续扫描发射光谱。CCD 采谱技术也是获取三维荧光光谱的方法。

9.2.2 定量分析

荧光定量分析包括标准对照法和校准曲线法,一般分析步骤参见 GB/T 19267.3 和《中华人民共和国药典》(2015 年版)(四部)0405 荧光分光光度法,使用仪器为稳态荧光光谱仪。同时,在测量溶液的荧光强度时,通常应注意溶剂的散射光(瑞利散射和拉曼散射)、胶粒的散射光(丁铎尔效应)以及容器表面的散射光的影响。除拉曼散射以外,上述几种散射光均具有与激发光相同的波长。拉曼散射光的波长与激发波长不同,通常要比激发波长稍长一些,且随激发波长的改变而改变,但与激发波长维持一定的频率差(随溶剂变化而变化)。散射光的干扰常是提高荧光灵敏度的主要限制因素,在实际工作中要注意加以克服。选择适当的激发波长和测定波长,可以大大降低或排除散射光的影响。在测量微弱的荧光强度时,常要加大狭缝宽度以获得足够的荧光强度测量值,但狭缝加大后散射光的影响也将加大,因而实际测定时应选择合适的狭缝宽度。通过空白测定,可对散射光的影响进行校正。

校准曲线法需配制 5 个浓度以上的系列标准溶液,在仪器最佳条件下按浓度从低到高依次测定,每个校准浓度至少测定 3 次取平均值,绘制校准曲线、计算回归方程,扣除背景信号或以干扰系数法修正干扰。试样溶液中待测物质浓度由公式(8)计算得出,见图 1。当试样中待测物质浓度高于校准曲线范围时,应将样品稀释至校准曲线范围内重新测定。

$$c_{\text{检}} = \frac{I_{\text{检}} - b}{a} \dots\dots\dots (8)$$

式中:

- $c_{\text{检}}$ —— 试样溶液中待测物质浓度;
- $I_{\text{检}}$ —— 试样溶液中待测物质响应信号;
- a, b —— 回归方程参数。

注:此方法只适用于无基体干扰情况下的测定,在使用校准曲线法时应注意:

- a) 尽量消除试样溶液中的干扰;
- b) 标准溶液与试样溶液基体尽可能保持一致;
- c) 如果存在基体干扰,应采用其他方法进行检测。

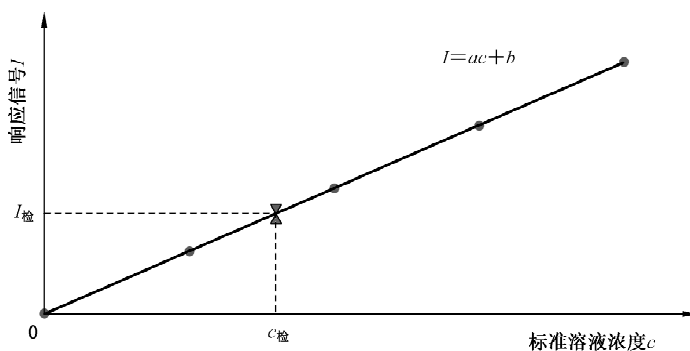


图 1 标准曲线法校准曲线

9.2.3 荧光量子产率的测定

荧光量子产率的测定按以下步骤:

- a) 相对荧光量子产率:在相同激发条件下,分别测定待测荧光试样和参比荧光标准物质两种稀溶

液的积分荧光强度(即校正荧光光谱所包括的面积),以及对该激发波长入射光的吸光度;

- b) 绝对荧光量子产率:安装积分球,设置合适的参数,测试包含瑞利散射峰在内的空白和样品光谱图,并且应进行光谱校正。注意:对于发光偏弱的样品,应考虑结合使用衰减片(中性密度滤光片)将瑞利散射和样品发射分开扫描来进行测试;对于使用不同检测器来进行荧光量子产率测试时,还需要计算不同检测器之间的响应系数,绝对荧光量子产率由仪器软件或手工计算得到。

9.2.4 荧光寿命测试

设置合适的参数,包括设置 λ_{ex} , λ_{em} ,调节光源频率,仪器狭缝,选择检测通道数,时间范围,设置停止条件,然后采集数据。寿命接近光源衰减的样品还需要做IRF(instrument response function),以便后续的数据处理。

9.2.5 时间分辨发射光谱测试

用脉冲时间或时间门检测;通过时间相关单光子计数(TCSPC)获得;一般由波长依赖型衰变得到TRES,设置仪器参数,在预设的激发和发射波长范围内进行一系列的衰减测试。

10 结果报告

10.1 基本信息

至少应包括:委托单位信息、样品信息、仪器设备信息、环境条件、制样方法、检测方法(依据标准)、检测结果、检测人、校核人、批准人、检测日期等。

一般分析结果需记录以下内容:

- a) 检测项目;
- b) 检测依据;
- c) 使用仪器的名称和型号;
- d) 仪器主要工作参数,如激发波长和发射波长范围;
- e) 室内的温度、湿度;
- f) 检测前后的仪器状况。

10.2 定性分析

根据用户要求,需给出荧光激发光谱、发射光谱、荧光偏振、同步荧光光谱、磷光激发和发射光谱、反Stokes 荧光光谱,这些谱图由软件直接给出,三维荧光光谱由仪器软件以等角三维投影图或等高线光谱等形式图像化表现。

10.3 定量分析

根据标准对照法或标准曲线法(参见GB/T 19267.3和《中华人民共和国药典》(2015年版)(四部)0405 荧光分光光度法,得到未知溶液浓度。同时需给出线性范围、线性方程、测试步骤即测量过程、测试结果。除了定量分析结果外,标准对照法需给出标准和用户样品的测试谱图,标准曲线法需给出相应的标准曲线。荧光量子产率的相对法和绝对法均需给出测试时得到的谱图。

10.4 荧光寿命分析

荧光寿命由仪器软件拟合(一般为解卷积运算)得到,对于远大于光源衰减的寿命可以忽略光源衰减影响;对于接近光源衰减的寿命,需要结合仪器IRF进行拟合。通过拟合可得到荧光寿命、各个荧光寿命的权重以及各个寿命对光强的贡献百分比等。时间分辨发射光谱由仪器的数据处理系统绘出;波长依赖

型衰变得到的 TRES 由计算机软件以等高线视图模式显示或进行“裁剪”。荧光寿命测试需要给出激发波长、发射波长、衰减谱图、以及拟合后的寿命值及其权重、以及各寿命对光强的贡献百分比。

10.5 分析方法与测定结果的评价

分析方法用方法检出限、精密度和准确度(正确度与精密度)来评定,测量结果一般用测量不确定度评定。

10.5.1 方法检出限

方法检出限一般是采用样品独立全流程空白溶液连续 11 次测定值的 3 倍标准偏差所获得的分析物浓度。

10.5.2 精密度

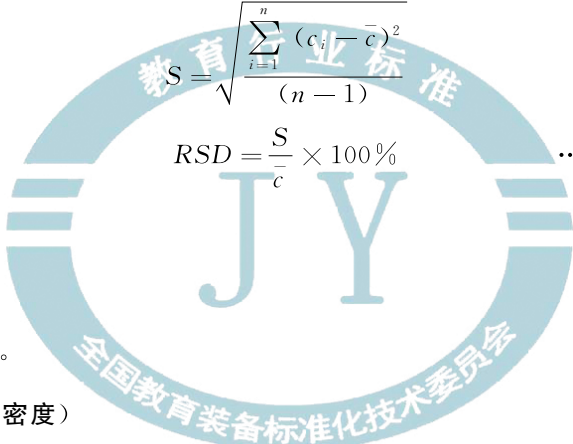
精密度通常用多次重复测量同一量时的标准偏差 S (可按公式(9)计算出)或相对标准偏差 RSD (可按公式(10)计算出)来表示。精密度与浓度有关,报告精密度时应指明获得该精密度的被测元素的浓度。同时,也要标明在相同实验条件下重复测量次数(n =测量次数)。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}{(n-1)}} \dots\dots\dots (9)$$

$$RSD = \frac{S}{\bar{c}} \times 100\% \dots\dots\dots (10)$$

式中:

- c_i ——第 i 次测量值;
- n ——测量次数;
- \bar{c} —— n 次测量平均值。



10.5.3 准确度(正确度和精密度)

用“正确度”和“精密度”两个术语来描述一种测量方法的准确度。精密度反映了偶然误差的分布,而与真值或规定值无关;正确度反映了与真值的系统误差,用绝对误差或相对误差表示。在实际工作中,可用标准物质或标准方法进行对照试验,计算误差;或加入被测定组分的纯物质进行回收试验,计算回收率 R ,并按公式(11)计算。

$$R = \frac{c_t - c_0}{c_a} \times 100\% \dots\dots\dots (11)$$

式中:

- c_0 ——初始检出浓度;
- c_a ——加入量;
- c_t ——加入 c_a 检出浓度。

10.5.4 不确定度评定

按 JJF 1059.1 中的评定方法和原则进行分析结果测量不确定度的必要评定与表示。

11 安全注意事项

11.1 开机时,应先点亮光源后,再启动计算机;关机时,应先关闭氙灯光源待氙灯冷却后再关电源。

11.2 打开样品室更换样品时,应关好检测器端的光闸,保护仪器。

11.3 如果仪器配备了纳秒闪光灯,实验过程中可能用到氢气,应确保实验室内无明火,且排气扇必须打开。

11.4 激光或脉冲 LED 等光源的光易对人眼造成损伤,实验时应严格执行安全规则,避免激光或脉冲 LED 等光源的光直接射入眼睛。对于脉冲激光和 LED 光源,在进行荧光寿命测试时应根据所测荧光寿命的长短选择合适的脉冲频率。

11.5 应遵守仪器说明书上的规定。



附录 A
(资料性附录)

TCSPC、相调制和 STROBE 方法测定荧光寿命的原理

TCSPC 的基本原理是,在某一时间 t 检测到发射光子的概率,与该时间点的荧光强度成正比。具体的检测原理是当脉冲光源激发样品后,样品发出荧光光子信号,每次脉冲后只记录某一波长单个光子消失的时间 t ,经过多次计数和累计,测得荧光光子出现的几率分布 $P(t)$,也就是荧光发射光子在时间轴上的分布概率曲线,即荧光衰减曲线(见图 A.1)。

相调制与 TCSPC 不同之处在于样品被正弦调制的激发光激发,发射光是激发光的受迫响应,因此发射光和激发光有着相同的圆频率(ω),但是由于激发态的微小时间停滞—荧光寿命,调制发射波在相上滞后激发波一个相角。另外,相对于激发波,发射波被部分解调,其振幅比激发波的振幅小。利用实验测定的相角和解调参数 m (发射波振幅与激发波振幅之比)可计算出相寿命(τ_p)和调制寿命(τ_m),对于单指数衰减, τ_p 与 τ_m 相等。

在 STROBE 中,样品被脉冲光源激发,与脉冲光源同步,电压脉冲启动或按一定方式延迟启动光电倍增管,光电倍增管按预设时间门检测样品的荧光强度(见图 A.2)。相调制技术测定速度比 TCSPC 快,但实验所能选择的频率数有限,因此测量精度较差。

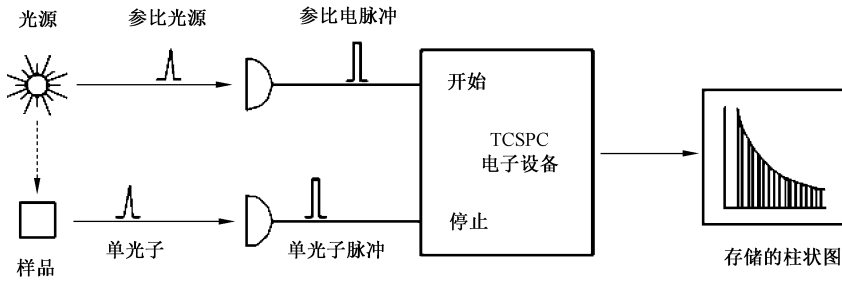
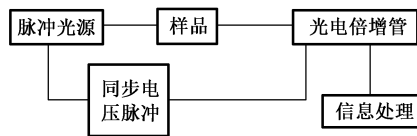


图 A.1 时间相关单光子计数(TCSPC)法的原理图



(a)

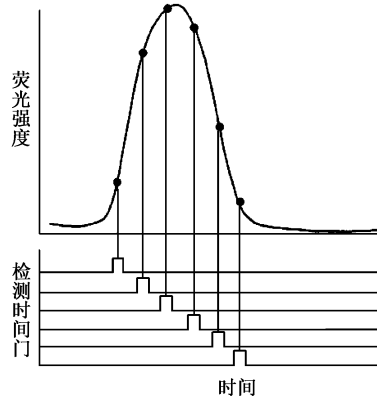


图 A.2 频闪分时(STROBE)法的原理图