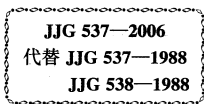


荧光分光光度计检定规程

Verification Regulation of
Fluorescence Spectrophotometer



本规程经国家质量监督检验检疫总局于 2006 年 5 月 23 日批准，并自 2006 年 11 月 23 日起施行。

归口单位：全国物理化学计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：上海三科仪器有限公司

本规程委托全国物理化学计量技术委员会负责解释

目 录

1 范围	(1)
2 概述	(1)
3 计量性能要求	(1)
3.1 波长示值误差与重复性	(1)
3.2 检出极限	(2)
3.3 测量线性	(2)
3.4 荧光光谱峰值强度重复性	(2)
3.5 稳定度	(2)
4 通用技术要求	(2)
4.1 外观与初步检查	(2)
4.2 绝缘电阻	(2)
5 计量器具控制	(2)
5.1 检定条件	(2)
5.2 检定项目	(3)
5.3 检定方法	(3)
5.4 检定结果的处理	(7)
5.5 检定周期	(7)
附录 A 检定用工作标准溶液的配制	(8)
附录 B 汞灯谱线的测量方法	(10)
附录 C 荧光池成套性的测量	(11)
附录 D 最小二乘法计算公式	(12)
附录 E 荧光分光光度计检定记录格式	(13)
附录 F 检定证书背面格式	(15)

荧光分光光度计检定规程

1 范围

本规程适用于荧光分光光度计的首次检定、后续检定和使用中的检验。

2 概述

某些物质受到光照射而被激发之后,会发射出比照射波长稍长的光,这种光称为荧光。荧光强度与该物质的浓度有如下关系:

$$F = k' \Phi I_0 (1 - e^{-\epsilon L c})$$

式中: F ——荧光强度;

k' ——仪器常数;

I_0 ——激发光强度;

ϵ ——荧光物质的摩尔吸收系数;

L ——荧光物质液层的厚度;

c ——荧光物质的浓度;

Φ ——荧光量子效率。

对于给定物质来说,当激发光的波长和强度固定、液层的厚度固定、溶液的浓度较低时,荧光强度与荧光物质的浓度 c 有如下简单的关系:

$$F = kc$$

荧光分光光度计(以下简称仪器)就是根据上述原理,对可发射荧光的物质进行定性、定量测量的分析仪器。

仪器主要由光源系统、激发单色器系统、样品室、发射单色器系统、探测器系统和数据处理系统组成。

仪器的单色器可分为两类:A类是色散型单色器;B类是滤光片单色器。

3 计量性能要求

3.1 波长示值误差与重复性

3.1.1 A类单色器波长示值误差限和波长重复性应符合以下要求:

波长示值误差限:优于 $\pm 2.0 \text{ nm}$;

波长重复性: $\leq 1.0 \text{ nm}$ 。

3.1.2 B类单色器滤光片透光特性

B类单色器配置的玻璃滤光片、干涉滤光片标称值误差应符合以下要求:

玻璃滤光片:标称值 $\pm 10 \text{ nm}$;

干涉滤光片：标称值 ± 5 nm。

3.2 检出极限

用硫酸奎宁标准溶液检定仪器的检出极限：

配置 A 类单色器的仪器，其检出极限为 5×10^{-10} g/mL；

配置 B 类单色器的仪器，其检出极限为 1×10^{-8} g/mL。

在一台仪器上同时配置 A、B 两类单色器的，可参照 B 类单色器的指标。

3.3 测量线性

仪器测量结果的线性 $\gamma \geq 0.995$ 。

对指针式直读电表仪器，若配套指示仪表准确度低于 0.5 级，此项可不检定。

3.4 荧光光谱峰值强度重复性

仪器测量荧光光谱峰值的重复性 $\leq 1.5\%$ 。

3.5 稳定度

3.5.1 在 10 min 内零线漂移 $\leq 0.5\%$ 。

3.5.2 荧光强度示值上限在 10 min 内的漂移不超过 $\pm 1.5\%$ 。

4 通用技术要求

4.1 外观与初步检查

4.1.1 仪器应有下列标志：仪器名称、型号、制造厂名、标志、出厂时间和仪器编号。

4.1.2 仪器的各紧固件应紧固良好，各调节旋钮、按键和开关均能正常工作。电缆线的接插件应接触良好，外观不应有明显的机械损伤。

4.1.3 仪器的指示仪表应工作正常，刻线应清晰、均匀。指针的宽度不大于刻线的宽度，并应与刻线平行。

4.1.4 旋动指示仪表的“调零”和“满度”旋钮时，电表指针应平稳无跳动现象。

4.1.5 仪器配置的滤光片附件不得有灰尘、油污或影响透光性的斑点存在。

4.2 绝缘电阻

仪器在不工作的状态下，试验电压 500 V 时，电源进线与壳体之间的绝缘电阻不小于 20 M Ω 。

5 计量器具控制

计量器具控制包括：首次检定、后续检定和使用中检验。

5.1 检定条件

5.1.1 环境条件

环境温度 $(20 \pm 10)^\circ\text{C}$ ，且相对稳定；

相对湿度不大于 85%；

电源电压 $(220 \pm 22)V$ 。

5.1.2 检定设备

工作标准荧光池：其配套误差不应大于 0.5%。

紫外-可见分光光度计：波长示值误差 $\pm 1.0 \text{ nm}$ 。

秒表：分度值 0.1 s。

交流电压表：150/500 V，准确度 1.0 级。

兆欧表：试验电压 500 V。

配制标准溶液所需的设备及器材见附录 A。

5.1.3 标准物质

5.1.3.1 硫酸奎宁荧光标准物质：国家二级标准物质。

5.1.3.2 萘-甲醇溶液：国家二级标准物质。

5.1.4 工作标准溶液

5.1.4.1 0.05 mol/L 硫酸溶液。

5.1.4.2 以 0.05 mol/L 硫酸作为溶剂的硫酸奎宁标准溶液，其质量浓度分别为： 1×10^{-9} ， 1×10^{-7} ， 4×10^{-7} ， 8×10^{-7} 和 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 。

5.2 检定项目

表 1 检定项目表

检定项目	首次检定	后续检定	使用中检验
外观检查	+	+	-
单色器波长示值误差与重复性	+	+	-
滤光片透光特性	+	+	-
检出极限	+	+	+
测量线性	+	+	-
重复性	+	-	+
稳定度	+	-	-
绝缘电阻	+	-	-

注：1. “+”为需检项目；“-”为不需检项目。

2. 经安装及维修后可能对仪器有较大影响时，其后续检定按首次检定项目进行。

5.3 检定方法

仪器应平稳地放在工作台上，无强光直射在仪器上；仪器周围无强磁场、电场干扰；无振动；无强气流影响。检定前仪器应预热 20 min。配置滤光片的仪器，必须安装好滤光片，更换滤光片应先切断电源。

5.3.1 外观与初步检查按 4.1 的要求进行。

5.3.2 A类单色器仪器波长示值误差与波长重复性

5.3.2.1 氙灯亮线方法

注：氙灯亮线方法，一定要依据仪器使用说明书的方法进行。以下方法只是测量步骤的一般性描述。

(a) 激发侧单色器波长示值误差与波长重复性

将发射侧单色器置零级位置，将漫反射板（或无荧光的白色滤纸条）放入样品室，仪器的响应时间设置为“快”，扫描速度设置为“中”或采用手动方式，使用实际可行的最窄狭缝宽度，对激发侧单色器在（350~550）nm的波长范围进行扫描，在所得到的谱图上寻找450.1 nm附近的光谱峰，并确定其峰值位置。连续测量三次，按公式（1）和（2）分别计算波长示值误差和重复性。

波长示值误差：

$$\Delta_{\lambda} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \lambda_i - \lambda_r \quad (\text{nm}) \quad (1)$$

式中： λ_i ——波长测量值；

λ_r ——参考波长值（氙灯亮线参考波长峰值：450.1 nm）。

波长重复性：

$$\delta_{\lambda} = \max \left| \lambda_i - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \lambda_i \right| \quad (\text{nm}) \quad (2)$$

(b) 发射侧单色器波长示值误差与波长重复性

将激发侧单色器置零级位置，将漫反射板（或无荧光的白色滤纸条）放入样品室，仪器的响应时间设置为“快”，扫描速度设置为“中”或采用手动方式，使用实际可行的最窄狭缝宽度，对发射侧单色器（350~550）nm的波长范围进行扫描，在所得到的谱图上寻找450.1 nm附近的光谱峰，并确定其峰值位置。连续测量三次，按公式（1）和（2）分别计算波长示值误差和重复性。

注：对一些型号的仪器，其发射侧单色器波长示值误差与波长重复性的测量，可以用测量汞灯谱线的方法。具体测量方法见附录B或仪器使用说明书。

5.3.2.2 萘峰位置方法

(a) 激发侧单色器波长示值误差与波长重复性

将发射侧波长设定在331 nm处，将盛有萘-甲醇溶液（ 1×10^{-4} g/mL）的荧光池放入样品室，仪器的响应时间设置为“快”，扫描速度设置为“中”或采用手动方式，使用实际可行的狭缝宽度（1~3）nm，对激发侧单色器（240~350）nm的波长范围进行扫描，在所得到的谱图上寻找290 nm光谱峰，并确定其峰值位置。连续测量三次，按公式（1）和（2）分别计算波长示值误差和重复性。

(b) 发射侧单色器波长示值误差与波长重复性：

将激发侧波长设定在290 nm处，将盛有萘-甲醇溶液（ 1×10^{-4} g/mL）的荧光池放

入样品室,仪器的响应时间设置为“快”,扫描速度设置为“中”或采用手动方式,使用的狭缝宽度(1~3) nm,对发射侧单色器(240~400) nm的波长范围进行扫描,在所得到的谱图上寻找 331 nm 的光谱峰,并确定其峰值位置。连续测量三次,按公式(1)和(2)分别计算波长示值误差和重复性。

5.3.3 单色器滤光片的检定

5.3.3.1 带通型滤光片的透光特性

用紫外-可见分光光度计测量被检仪器的滤光片在各波长处的透射比,绘制透射比-波长特性曲线(见图 1)。由曲线求出最大透射比 $T_{\max}$ 对应的波长 $\lambda_{\max}$ 和透射比为 $T_{\max}/2$ 时对应的波长 λ_1, λ_2 , 则滤光片峰值波长误差:

$$\Delta\lambda = \lambda - \lambda_{\max} \quad (3)$$

式中: λ ——滤光片峰值波长标称值。

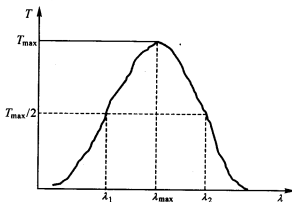


图 1

5.3.3.2 截止型滤光片

截止型滤光片的透射光特性用半高波长表示。测量方法按照 5.3.3.1, 由图 2 所示曲线求出最大透射比 $T_{\max}$, $T_{\max}/2$ 所对应的波长 λ_3 为半高波长。

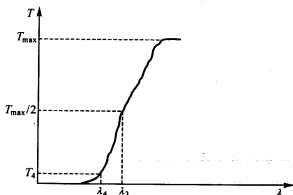


图 2

5.3.4 检出极限

用 0.05 mol/L 硫酸溶液做空白溶液, A 类单色器选取质量浓度为 1×10^{-9} g/mL, B

类单色器选取质量浓度为 1×10^{-7} g/mL 硫酸奎宁标准溶液。灵敏度置最高挡, 选择适当的狭缝宽度。根据激发波长在 350 nm、发射波长在 450 nm 左右的原则, 设定两侧的波长或选择滤光片。对空白溶液与标准溶液进行连续交替 11 次测量。如果在测量中, 有 1 次数据确认是由外界干扰或操作引起的粗大误差, 应将该次数据剔除。

由下式计算每次测量的荧光强度:

$$F_i = F_{i1} - F_{i0} \quad (4)$$

式中: F_{i1} ——标准溶液的荧光强度;

F_{i0} ——空白溶液的荧光强度。

荧光强度测量值的平均值为:

$$\bar{F} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_i \quad (5)$$

式中: n ——测量次数。

检出极限指二倍于标准偏差读数的物质浓度。用符号 DL 来表示:

$$DL = \frac{c}{\bar{F}} \times 2s \quad (\text{g/mL}) \quad (6)$$

式中: $\bar{F}$ ——11 次测量的平均荧光强度;

c ——标准溶液的质量浓度;

s ——单次测量的标准偏差。

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}{n-1}} \quad (7)$$

5.3.5 测量线性

用 0.05 mol/L 硫酸溶液作空白溶液, 适当选择灵敏度挡和狭缝, 依次测量下面表 2 中的各质量浓度硫酸奎宁标准溶液。根据激发波长在 350 nm、发射波长在 450 nm 左右的原则, 设定两侧的波长或选择滤光片。

表 2 硫酸奎宁标准溶液

g/mL

标准溶液编号 (j)	1	2	3	4
标准溶液质量浓度 (c_j)	1×10^{-7}	4×10^{-7}	8×10^{-7}	1×10^{-6}

分别对表 2 中 4 种质量浓度工作标准溶液与空白溶液进行连续交替三次测量, 计算每次测量的荧光强度平均值。用最小二乘法对 4 种标准溶液的质量浓度和荧光强度测量平均值进行处理, 得到线性相关系数 γ , 即为测量线性的检定结果 (最小二乘法公式见附录 D)。

5.3.6 光谱峰值强度的重复性

根据激发波长在 350 nm、发射波长在 450 nm 左右的原则, 设定两侧的波长或选择

滤光片。用 1×10^{-7} g/mL 的硫酸奎宁溶液，见光 3 min 后，对发射波长从 365 nm 至 500 nm 重复扫描三次或记录仪器示值。

光谱峰值强度的重复性由下式计算：

$$\delta_F = \frac{\max \left| F_i - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 F_i \right|}{\frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 F_i} \times 100\% \quad (8)$$

式中： F_i ——光谱峰值强度读数。

5.3.7 稳定度

5.3.7.1 调节灵敏度中等程度。关闭光闸门，记录 10 min 内的漂移。

5.3.7.2 置激发波长和发射波长为 450 nm。置激发和发射狭缝宽度为 10 nm。漫反射板放入样品室，调节灵敏度，使示值为 90%，见光 3 min 后，观察 10 min 内示值的变化。

5.3.8 绝缘电阻

仪器的电源插头不接通电源，仪器的电源开关置于接通状态，用 500 V 兆欧表在仪器电源输入电路与外壳之间施加 500 V 直流试验电压，稳定 5 s 后测量绝缘电阻。

5.3.9 其他

对测量方法没有完全包括在规程范围内的其他类型荧光分光光度计，其主要技术指标可参照上述检定方法进行检定。技术要求可参考仪器说明书注明的指标。

5.4 检定结果的处理

5.4.1 以上检定数据均须记录在检定记录纸上，其中有关项目应填写完整或注明在检定证书或检定结果通知书上。

5.4.2 经检定符合本规程规定的仪器，发给检定证书（检定证书背面格式见附录 F；不符合本规程规定的仪器，发给检定结果通知书（检定结果通知书背面格式同附录 F，指出不合格项目）。

5.5 检定周期

检定周期为 1 年，在此期间，当条件改变（例如更换光源灯、光电管等重要维修项目）或对测量结果有怀疑时，都应进行检定。

附录 A

检定用工作标准溶液的配制

A.1 试剂

表 A.1 试剂及标准物质

试剂名称	硫酸奎宁	硫酸
化学式	$(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$	H_2SO_4
相对分子质量	782.93	98.03
纯度	国家二级标准物质	分析纯

A.2 设备与器材

使用滴定管、移液管、无分度吸管、容量瓶须经计量部分校正。

表 A.2 设备及规格

名称	规格	名称	规格
烘箱	$(0 \sim 220)^\circ\text{C}$	容量瓶	100, 250, 1 000 mL
滴定管	10 mL	量筒	500 mL
移液管	5 mL	称量瓶	20 mL
分析天平	分度值 0.01 mg	单标线吸管	1, 10, 25 mL

A.3 0.05 mol/L 硫酸溶液的配制

将 1 000 mL 的容量瓶中加入适量的二次蒸馏水。用滴定管取浓硫酸 2.7 mL，注入容量瓶中。用二次蒸馏水稀释至刻度，并混合均匀后放置备用。

A.4 硫酸奎宁标准溶液的配制

A.4.1 配制 500 mL 1×10^{-5} g/mL 硫酸奎宁溶液

将硫酸奎宁固体试剂在干燥器中放置 24 h 以上。在分析天平上准确称取 5.00 mg 的硫酸奎宁标准物质于 500 mL 容量瓶中。用适量 0.05 mol/L 的硫酸溶液溶解之，然后用 0.05 mol/L 硫酸稀释至刻度线，并混合均匀。

A.4.2 配制 250 mL 1×10^{-6} g/mL 硫酸奎宁溶液

用单标线移液管取 25 mL 1×10^{-5} g/mL 硫酸奎宁溶液，倾入 250 mL 容量瓶中加 0.05 mol/L 硫酸溶液至刻度线，并混合均匀。

A.4.3 依此类推配制其他浓度的硫酸奎宁标准溶液。所需标准母液的体积与质量浓度见表 A.3。为了清楚明了，将 1×10^{-6} g/mL 标准溶液也列入表内。

表 A.3 硫酸奎宁标准溶液配制方法

欲配标准溶液		所取标准母液	
质量浓度/(g/mL)	配制体积/mL	质量浓度/(g/mL)	所取体积/mL
1×10^{-6}	250	1×10^{-5}	25
1×10^{-7}	100	1×10^{-6}	10
4×10^{-7}	100	1×10^{-5}	4
8×10^{-7}	100	1×10^{-5}	8
1×10^{-9}	100	1×10^{-7}	1

A.4.4 在深色的玻璃瓶中贮存高浓度的标准溶液。溶液应避光、低温、密封保存。稀标准溶液应现用现配。浓溶液有效期时间为半年。

附录 B

汞灯谱线的测量方法

B.1 发射侧单色器波长示值误差与重复性

将激发单色器置零级位置,在样品室内正确安好笔型汞灯。将漫反射板放入样品架上。响应时间“快”,扫描速度“慢”或手动,使用实际可行的最窄狭缝宽度。

以汞谱线作参考波长,允许从中任选分布均匀的谱线作参考波长。从短波向长波方向对发射单色器扫描。电表或记录仪表最大读数时的波长为测量值,连续测量三次。按式(B.1)和(B.2)分别计算波长示值误差和重复性。

$$\Delta_{\lambda} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \lambda_i - \lambda_r \quad (\text{nm}) \quad (\text{B.1})$$

$$\delta_{\lambda} = \max \left| \lambda_i - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \lambda_i \right| \quad (\text{nm}) \quad (\text{B.2})$$

式中: λ_i ——波长测量值;

λ_r ——汞灯参考波长值。

B.2 汞灯的参考波长

低压汞灯光谱曲线的参考波长及相对近似强度列在表 B.1 中。高压汞灯也具有表 B.1 中的全部谱线。

表 B.1 低压汞灯光谱曲线的参考波长

波长/nm	相对强度	波长/nm	相对强度	波长/nm	相对强度
253.65	130	365.02	25	435.83	85
296.73	10	365.48	10	546.07	50
312.57	10	366.33	5	576.96	15
313.15	15	404.66	45	579.07	10

附录 C

荧光池成套性的测量

选择合适的滤光片，荧光池中装入 1×10^{-6} g/mL 的硫酸奎宁溶液，将荧光池带有标记的一面正对进光方向，然后，将其中一只放入其他检定项目合格的被检仪器光路中。仪器示值调至 90% 处，测量其他荧光池，记录荧光池间的仪器示值差。

附录 D

最小二乘法计算公式

$$Y = a + bX$$

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx}S_{yy}}}$$

$$S_{xx} = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}$$

$$S_{yy} = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}$$

注：表 2 中的 c_j 作为 X ，式 (5) 中的 $\bar{F}$ 作为 Y ，即可进行计算。

附录 E

荧光分光光度计检定记录格式

送检单位		联系电话	
仪器型号		制造厂	
出厂编号		检定日期	
原始记录号		证书编号	
温 度		湿 度	
检 定 员		核 验 员	

1 外观与初步检查

2 波长示值误差与波长重复性

2.1 激发单色器

λ_i	测量值			$\bar{\lambda}$	Δ_i	δ_i

2.2 发射单色器

λ_i	测量值			$\bar{\lambda}$	Δ_i	δ_i

3 滤光片透光特性

滤 光 片			
波长/nm	透射比/%	波长/nm	透射比/%
λ_M	Δ_i	λ_M	Δ_i

4 检出极限

$$\bar{F} = \quad s = \quad DL = \quad \text{g/mL}$$

$n \backslash F$	F_{i0}	F_{i1}	F_i	$n \backslash F$	F_{i0}	F_{i1}	F_i
1				7			
2				8			
3				9			
4				10			
5				11			
6				注: $c =$			

5 线性

质量浓度/(g/mL)	F_{10}	F_{11}	F_1	F_{20}	F_{21}	F_2	F_{30}	F_{31}	F_3	$\bar{F}$
1×10^{-7}										
2×10^{-7}										
4×10^{-7}										
6×10^{-7}										
8×10^{-7}										
1×10^{-6}										
线性相关系数	$\gamma =$									

6 稳定度

项目	零线	示值上限
稳定度/%	10 min	

7 重复性

测量次数	1	2	3	$\bar{F}$	δ_k
荧光强度/%					

8 绝缘电阻

$$R = \quad \text{M}\Omega$$

附录 F

检定证书背面格式

检 定 结 果

外观检查 _____
波长示值误差 _____
波长重复性 _____
滤光片的透光特性 _____
检出极限 _____
测量线性 _____
重 复 性 _____
绝缘电阻 _____