

**JJG**

中华人民共和国国家计量检定规程

**JJG 537—88**

---

**荧光分光光度计**

(试 行)

1988年2月22日批准

1989年1月1日实施


---

国家计量局

---

**荧光分光光度计**  
**试行检定规程**

Verification Regulation of  
Fluorescence Spectrophotometer



JJG 537—88

---

本检定规程经国家计量局于1988年2月22日批准,并自1989年1月1日起施行。

**归口单位:** 黑龙江省标准计量管理局

**起草单位:** 黑龙江省计量科学研究所

本规程技术条文由起草单位负责解释。

**本规程主要起草人：**

周孝诚 (黑龙江省计量科学研究所)

**参加起草人：**

叶军安 (黑龙江省计量科学研究所)

陈砂岗 (黑龙江省计量科学研究所)

张秀兰 (黑龙江省计量科学研究所)

# 目 录

一 概述.....	(1)
二 技术要求.....	(1)
三 检定条件.....	(4)
四 检定项目与检定方法.....	(5)
五 检定结果的处理.....	(10)
附录 1 汞灯的参考波长 .....	(12)
附录 2 检定用临时工作标准溶液的配制 .....	(13)
附录 3 检定记录格式 .....	(16)
附录 4 检定结果通知书 (反面) 格式 .....	(20)

## 荧光分光光度计试行检定规程

本规程适用于新制造、使用中和修理后的单光束、双光束荧光分光光度计（以下简称仪器）的检定。仪器分为三类：A类是用滤光片获得激发单色光的单光束仪器；B类是用光栅获得激发单色光的单光束仪器；C类是双光束仪器。

### 一 概 述

某些物质被一种波长的光照射之后，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：

$$F = k' \phi I_0 (1 - e^{-Lc})$$

式中：  $F$ ——荧光强度；  
 $k'$ ——仪器常数；  
 $\phi$ ——量子效率；  
 $I_0$ ——激发光强度；  
 $e$ ——荧光物质的摩尔吸收系数；  
 $L$ ——液层的厚度；  
 $c$ ——荧光物质的浓度。

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：

$$F = kc$$

仪器就是根据上述原理，用来测定荧光物质的性质和含量的分析仪器。

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、探测器系统和显示记录仪组成。

### 二 技 术 要 求

#### 1 外观与初步检查

1.1 仪器应有下列标志：仪器名称、型号、制造厂名、出厂时间和仪器编号。

1.2 仪器应平稳地置于工作台上。各紧固件均应紧固良好。各调节旋钮、按键和开关均能正常工作，无松动现象。电缆线的插接件均应紧密配合，接触良好。外观不应有妨碍正常工作的机械损伤。

1.3 仪器的波长度盘、狭缝带宽刻度，指示仪表度盘的刻线、刻度应粗细均匀清晰。数显仪器的数字显示不应断线和缺线。

1.4 带记录仪的仪器，记录仪的满量程时间应符合出厂要求。记录仪绘图画线应清晰、不间断。

1.5 仪器所配荧光池各透光面应光洁，不得有灰尘、油污、划痕及任何裂纹。

1.6 A类仪器所配滤光片，其透光面不得有灰尘、油污、划痕或斑点。

## 2 波长准确度与重复性

2.1 仪器波长的准确度和重复性应符合表1的要求。

表 1

(nm)

仪器类别	A	B	C
波长准确度	$\leq \pm 2.0$		$\leq \pm 0.5$
波长重复性	1.0		0.3

## 3 分辨率

仪器应能分辨汞 365.02, 365.48, 366.33 nm 三条谱线。

对最小带宽  $\geq 0.5$  nm 的仪器不进行此项检定。

## 4 滤光片的透光特性

A类仪器配置的玻璃滤光片或干涉滤光片，其透光特性应符合出厂说明规定的指标。B、C类仪器不进行此项检定。

## 5 检出极限与信噪比

5.1 用硫酸奎宁标准溶液 (0.05 mol/L 硫酸作溶剂) 测定的检出极限应符合表2的要求。

表 2

仪器类别	A	B	C
检出极限 (g/mL)	$1 \times 10^{-9}$		$5 \times 10^{-11}$

5.2 未测定检出极限的仪器, 必须用二次蒸馏水的拉曼峰进行信噪比 ( $S/N$ ) 的检定, 技术要求参照出厂说明的指标, 已进行检出极限测定的仪器, 不进行此项检定。

### 6 线性误差

仪器的线性误差应符合表 3 的要求。

表 3

仪器类别	A	B	C
线性误差	$\leq \pm 3.0\%$		$\leq \pm 2.0\%$

### 7 稳定度

7.1 电源电压 220 V 变化  $\pm 22$  V 时, 所引起荧光强度示值变化应符合表 4 要求。

7.2 在 10 min 内零线漂移应符合表 4 要求。

7.3 荧光强度示值上限在 10 min 内的漂移应符合表 4 要求。

表 4

仪器类别		A	B	C
稳 定 度	电压变化	$\leq \pm 1.5\%$		$\leq \pm 1.0\%$
	零线漂移	$\leq \pm 0.5\%$		$\leq \pm 0.3\%$
	示值上限	$\leq \pm 1.5\%$		$\leq \pm 1.0\%$

### 8 重复性

仪器测量荧光光谱峰值强度的重复性应符合表 5 的要求。

表 5

仪器类别	A	B	C
重复性	$\leq 1.5\%$	$\leq 1.0\%$	

## 9 光谱校正误差

带光谱校正的 B, C 类仪器在指定光谱校正的波长范围内误差不大于  $\pm 2.0\%$ 。

## 10 双光束补偿

C 类仪器的双光束补偿优于  $\pm 5.0\%$ 。

## 11 荧光池的成套性

配套使用的荧光池的配套误差应不大于  $1.0\%$ 。

## 12 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 $\Omega$ 。

## E 检定条件

## 13 检定环境条件

13.1 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  $220 \pm 22\text{ V}$ 。

13.2 仪器应平稳地放在工作台上。无强光直射在仪器上。

13.3 仪器周围无强磁场、电场干扰; 无振动; 无强气流影响。

13.4 检定前仪器应预热 20 min。

## 14 检定设备

14.1 便携式笔型低压石英汞灯或高压石英汞灯。其光谱线波长值见附录 1。

14.2 工作标准荧光池, 其配套误差应不大于  $0.5\%$ 。

14.3 秒表, 分度值 0.1 s。

14.4 调压变压器 (500 VA)。

14.5 试验电压 500 V 的兆欧表。

14.6 配制标准溶液所需的设备及器材见附录 2。



## 15 工作标准溶液

15.1 0.05 mol/L 硫酸溶液。

15.2 以 0.05 mol/L 硫酸作溶剂的硫酸奎宁标准溶液，其浓度分别为： $5 \times 10^{-11}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $2 \times 10^{-7}$ 、 $4 \times 10^{-7}$ 、 $6 \times 10^{-7}$ 、 $8 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6}$  g/mL。

## 四 检定项目与检定方法

16 新仪器应全面进行第 1~12 条的检定。使用中和修理后的仪器，无特殊必要时可不进行第 4, 7.1, 9 和 12 条的检定。

17 外观与初步检查按第 1 条要求进行。

18 波长准确度与波长重复性

18.1 激发单色器波长准确度与重复性

18.1.1 A 类仪器不进行此项检定。

18.1.2 将发射单色器置零级位置，灯室内正确安好笔型汞灯。将漫反射板校正具放入样品室。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。

18.1.3 以附录 1 汞谱线作参考波长。允许从附录表 1-1 中任选分布均匀的五条谱线作参考波长。从短波向长波方向对激发单色器扫描。电表或记录仪最大读数时的波长为测量值，连续测量三次。按

18.1.4 计算波长准确度和重复性。

18.1.4 按下式计算波长准确度：

$$\Delta_{\lambda} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^5 \lambda_i - \lambda_r \quad (\text{nm}) \quad (1)$$

式中： $\lambda_i$ ——波长测量值； $\lambda_r$ ——汞灯参考波长值。

按下式计算波长重复性：

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

按下式计算波长准确度：

$$U_{\lambda} = \Delta_{\lambda} \pm \delta_{\lambda} \quad (\text{nm}) \quad (3)$$

## 18.2 发射单色器波长准确度与重复性

18.2.1 将激发单色器波长置零级位置。其余条件同 18.1.2。

18.2.2 检定方法参照 18.1.3。

18.2.3 计算方法参照 18.1.4。

## 19 分辨率

## 19.1 激发单色器的分辨率

19.1.1 检定条件同 18.1.2。

19.1.2 扫描激发单色器应能分辨出汞三线 365.02、365.48 和 366.33 nm 所对应的测量峰值。

## 19.2 发射单色器的分辨率

19.2.1 检定条件同 18.1.2。

19.2.2 扫描发射单色器应能分辨出汞三线 365.02、365.48 和 366.33 nm 所对应的测量峰值。

## 20 滤光片的透光特性

用波长准确度高于 1 nm 的分光光度计，测定滤光片在各波长的透射比。绘制透射比-波长特性曲线（见图 1）。曲线的峰值  $T_M$  所对应的波长  $\lambda_M$  即为中心波长的测量值。

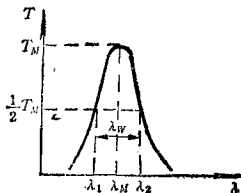


图 1

滤光片峰值波长误差：

$$\Delta_2 = \lambda - \lambda_M \quad (\text{nm}) \quad (4)$$

式中：  $\lambda$  —— 滤光片峰值波长的标称值。

对应  $T_M/2$  的波长为  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$ , 则滤光片的半宽度为:

$$\lambda_W = \lambda_2 - \lambda_1 \quad (\text{nm}) \quad (5)$$

## 21 检出极限与信噪比

### 21.1 检出极限

21.1.1 以 0.05 mol/L 硫酸溶液作空白, 根据仪器类别选取对应浓度的硫酸奎宁标准溶液作样品。灵敏度置高档, 选择适当的狭缝宽度。将激发波长置于 350 nm, 扫描发射波长找出测量峰值对应的  $\lambda_{EM}$ 。将发射波长固定在  $\lambda_{EM}$ 。

21.1.2 分别对空白溶液和标准样品溶液连续交替十一次测定。如果测量中有一次被认为是由于外界干扰或操作失误而引起粗大误差, 必须将该测量数据剔除。

21.1.3 由下式计算每次测定的荧光强度:

$$F_i = F_{i1} - F_{i0} \quad (6)$$

式中:  $F_{i1}$  ——标准溶液的荧光强度;

$F_{i0}$  ——空白溶液的荧光强度。

由下式计算荧光强度测量平均值:

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

式中:  $n$  ——测量次数。

由下式计算单次测量的标准偏差:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}{n-1}} \quad (8)$$

式中:  $n$  ——测量次数。

由下式计算检出极限:

$$DL = \frac{c}{\bar{F}} \times 2S \quad (9)$$

式中: DL ——检出极限, 指仪器能给出的二倍于标准偏差读数的标准溶液浓度。

o——标准溶液的浓度。

## 21.2 信噪比 (S/N)

置激发波长 350 nm, 激发和发射狭缝宽度 10 nm。用二次蒸馏水, 调节灵敏度使发射波长为 397 nm 时, 仪器示值在 40% 左右。发射波长退回到 300 nm, 调仪器零位。扫描发射单色器, 记录 300—430 nm 发射光谱曲线。发射波长 397 nm 附近的峰值即为 S。然后在峰值处记录 2 min, 记录噪声曲线波动最大的峰-峰值即为 N。

## 22 线性误差

22.1 置激发波长 350 nm, 发射波长 450 nm。以 0.05 mol/L 硫酸溶液作空白, 调节仪器灵敏度和狭缝宽度, 使表 6 中浓度最大的溶液示值在 90% 附近。

表 6 硫酸奎宁标准溶液 (g/mL)

标准溶液编号 <i>j</i>	1	2	3	4	5	6
标准溶液浓度 $c_j$	$1 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-7}$	$6 \times 10^{-7}$	$8 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$

22.2 交替测定空白和各浓度标准溶液的荧光强度。每种溶液重复测量三次。

22.3 由式 (6)、(7) 计算每次测量的荧光强度及测量平均值。由下式计算平均荧光系数  $k_j$ 。

$$k = \frac{1}{6} \sum_{j=1}^6 \frac{\bar{F}_j}{c_j} \quad (10)$$

式中:  $\bar{F}_j$ ——浓度为  $c_j$  的溶液对应的荧光强度测量平均值;  
 $c_j$ ——标准溶液的浓度。

由下式计算线性误差:

$$a_j = \left( \frac{\bar{F}_j - kc_j}{kc_j} \right) \times 100\% \quad (11)$$

## 23 稳定度

23.1 置激发波长和发射波长为 450 nm。放入漫反射板, 调节灵敏度和狭缝使示值为 90%。用调压变压器改变输入电压  $220 \pm 22$  V,

记录仪器示值的变化。

23.2 调节灵敏度中等程度。关闭光闸门，高压 500 V 时调节示值为零。调记录笔读数为 10% 左右。记录 10 min 内的曲线漂移。非记录仪器，观察电表示值的变化。

23.3 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，调高压 750 V，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。对记录式仪器，记录其曲线的变化。

#### 24 光谱峰值强度的重复性

置激发波长 350 nm，激发和发射狭缝宽度为 10 nm。用  $1 \times 10^{-7}$  g/mL 的硫酸奎宁溶液，调节灵敏度，使发射波长为 450 nm 时，示值在 80% 左右。见光 3 min 后，对发射波长从 365 nm 至 500 nm 重复扫描三次。

由下式计算重复性：

$$\delta_r = \max \left\{ F_i - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 F_i \right\} \quad (12)$$

式中：  $F_i$  —— 每次测量荧光峰值。

#### 25 光谱校正误差

##### 25.1 激发光谱校正

按仪器光谱校正说明书进行光谱校正误差检定。

##### 25.2 发射光谱校正

按仪器光谱校正说明书进行光谱校正误差检定。

#### 26 双光束补偿

26.1 将  $1 \times 10^{-8}$  g/mL 硫酸奎宁标准溶液装入配对的荧光池中。仪器状态：工作方式“能量”，光谱校正“表观”，响应“中”。置激发波长 350 nm，狭缝宽度 10 nm。置发射波长 450 nm。

26.2 放好样品室挡光板，将一只荧光池放入样品室。打开样品室盖，调节记录笔至 50% 处。将工作方式改为“示差”，使高压指示为 600 V。盖上样品室盖，打开光门。调灵敏度和发射狭缝宽度，使示值为 90% 左右。扫描 355—560 nm 发射光谱曲线。

26.3 将另一只荧光池放入参考室。测量条件同26.2,重新扫描355—560 nm 发射光谱曲线。

26.4 由图2中  $a$ ,  $b$  值按下式计算双光束补偿误差:

$$\Delta F = \frac{|a - 50|}{b - 50} \times 100\% \quad (13)$$

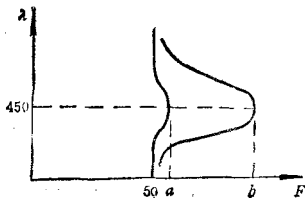


图 2

## 27 荧光池的成套性

27.1 用检定合格的荧光分光光度计进行荧光池成套性的检定。

27.2 置激发波长350 nm, 发射波长450 nm。荧光池中装入  $1 \times 10^{-6}$  g/mL 硫酸奎宁, 放入光路时带有标志的一面正对进光方向。将仪器示值调至95%, 测量其它各荧光池的示值。凡示值差不大于1.0%的荧光池可以配成一套。

## 28 绝缘电阻

在仪器电源输入电路与外壳之间, 用500 V 兆欧表测定绝缘电阻。

29 对于测量方式没有完全包括在本规程范围内的其他类型的荧光分光光度计, 其主要指标参照上述检定方法进行检定。技术要求参照仪器说明书给出的指标。

## 五 检定结果的处理

30 上述检定的各项数据均应记录在检定记录纸上。

31 经检定符合本规程规定的仪器发给检定证书；不符合本规程规定的仪器发给检定结果通知书，并写明不合格项目的数据。

32 检定周期为一年。在此期间，当条件改变（例如更换光源灯、光电倍增管等）或对测量结果有怀疑时，都应进行检定。

## 附 录

## 附录 1

## 汞灯的参考波长

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

表 1-1

波长(nm)	相对强度	波长(nm)	相对强度	波长(nm)	相对强度
253.65	100	365.02	25	435.83	85
296.73	10	365.48	10	546.07	50
312.57	10	366.33	5	578.98	15
313.15	15	404.66	45	579.07	10



## 附录 2

## 检定用临时工作标准溶液的配制\*

## 1 试剂

表 2-1

试剂名称	硫 酸 奎 宁	硫 酸
分子式	$(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$	$H_2SO_4$
分子量	782.93	98.08
纯度	分析纯	分析纯

## 2 设备与器材

使用的滴定管、移液管、无分度吸管、容量瓶须经计量部门校正。

表 2-2

名称	规格	数量	名称	规格	数量
烘箱	0~200℃	1	容量瓶	250、500、1 000 mL	各 1
滴定管	50 mL	1	量筒	500 mL	1
移液管	5 mL	1	称量瓶	20 mL	1
烧杯	100、500、5 000 mL	若干	磨口瓶	1 000、10 00 mL	各 1
分析天平	最大称量 20 g 分度值 0.01 mg	1	无分度 吸管	50、100 mL	各 1

## 3 0.05 mol/L 硫酸溶液的配制

\* 一旦国家计量部门发布了荧光标准物质，即应采用。

5 000 mL的烧杯中加入足够量的二次蒸馏水。用滴定管取浓硫酸 13.6 mL, 注入烧杯中。添加二次蒸馏水至 5 000 mL, 搅拌均匀后放置备用。配两次共 10 000 mL 0.05 mol/L 硫酸溶液以备用。

#### 4 硫酸奎宁标准溶液的配制

##### 4.1 配制 1 000 mL 浓度为 $1 \times 10^{-6}$ 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。在分析天平上用称量瓶精确称取 10.00 mg 的硫酸奎宁。用少量 0.05 mol/L 硫酸溶液溶解后, 倾入 500 mL 的烧杯中。再用 0.05 mol/L 硫酸溶液冲洗三次, 冲洗液也倾入烧杯。将烧杯中的溶液倾入 1 000 mL 的容量瓶。用 0.05 mol/L 硫酸溶液冲洗三次, 冲洗液也倾入容量瓶。然后用 0.05 mol/L 硫酸稀释至刻度线, 并摇动均匀。

##### 4.2 配制 5 000 mL 浓度为 $1 \times 10^{-6}$ g/mL 硫酸奎宁溶液

用无分度吸管取 50 mL  $1 \times 10^{-6}$  g/mL 硫酸奎宁溶液, 倾入 500 mL 容量瓶中 加 0.05 mol/L 硫酸溶液于刻度线, 并摇动均匀。

4.3 依次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浓度见表 2-3。为了清楚明了, 将  $1 \times 10^{-6}$  g/mL 标准溶液也列入表内

表 2-3

欲配标准溶液		所取标准母液	
浓度 (g/mL)	配制体积 (mL)	浓度 (g/mL)	所取体积 (mL)
$1 \times 10^{-6}$	500	$1 \times 10^{-5}$	50
$1 \times 10^{-7}$	1 000	$1 \times 10^{-6}$	100
$1 \times 10^{-8}$	500	$1 \times 10^{-7}$	50
$1 \times 10^{-9}$	500	$1 \times 10^{-8}$	50
$2 \times 10^{-7}$	250	$1 \times 10^{-6}$	50
$4 \times 10^{-7}$	250	$1 \times 10^{-6}$	100
$6 \times 10^{-7}$	250	$1 \times 10^{-6}$	150
$8 \times 10^{-7}$	250	$1 \times 10^{-6}$	200
$6 \times 10^{-11}$	500	$1 \times 10^{-9}$	25

---

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。浓溶液有效期为半年。

## 附录 3

## , 检定记录格式

仪器名称		型 号	
制 造 厂		出 厂 编 号	
送 检 单 位		证书或通知书编号	
温 度		湿 度	
检 定 员		检 定 日 期	

- 1 外观与初步检查
  - 2 波长正确度与波长重复性
- 2.1 激发单色器

$\lambda_r$	测 量 值		$\bar{\lambda}$	$\Delta_{\lambda}$	$\sigma_{\lambda}$

## 2.2 发射单色器

$\lambda_r$	测 量 值		$\bar{\lambda}$	$\Delta_{\lambda}$	$\sigma_{\lambda}$

- 3 分辨率
- 激发单色器:

发射单色器:

## 4 滤光片透光特性

滤 光 片 号

波长 (nm)		透射比 (%)		波长 (nm)		透射比 (%)	
$\lambda_M$		$\Delta\lambda$		$\lambda_W$		$\Delta\lambda$	$\lambda_W$

## 5 检出极限与信噪比

## 5.1 检出极限

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

$F$	$F_{t0}$	$F_{t1}$	$F_t$	$F_{t0}$	$F_{t1}$	$F_t$
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						

## 5.2 信噪比

S	N	S/N

## 6 线性

k = \_\_\_\_\_

浓 度	$F_{10}$	$F_{11}$	$F_1$	$F_{20}$	$F_{21}$	$F_2$	$F_{30}$	$F_{31}$	$F_3$	$\bar{F}_j$	$\alpha$
$1 \times 10^{-7}$											
$2 \times 10^{-7}$											
$4 \times 10^{-7}$											
$6 \times 10^{-7}$											
$8 \times 10^{-7}$											
$1 \times 10^{-6}$											

## 7 稳定度

项 目	零 线	示值上限	电 压 变 化	
		10 min		220—198 V
稳定度 (%)				

## 8 重复性

次 数	1	2	3	$\bar{F}$	$\delta_F$
荧光强度 (%)					

## 9 光谱校正误差

激发: \_\_\_\_\_ %      发射: \_\_\_\_\_ %

## 10 双光束补偿

a	b	$\Delta F$ (%)

## 11 荧光池的配套性

荧光池号	1	2	3	4
荧光示值(%)				
差值(%)				

## 12 绝缘电阻

 $R = \underline{\hspace{2cm}} M\Omega$

## 附录 4

## 检定结果通知书（反面）格式

## 检 定 结 果

外 观 \_\_\_\_\_

波 长 准 确 度 \_\_\_\_\_

分 辨 率 \_\_\_\_\_

滤光片的透光特性 \_\_\_\_\_

检出极限与信噪比 \_\_\_\_\_

线 性 误 差 \_\_\_\_\_

稳 定 度 \_\_\_\_\_

重 复 性 \_\_\_\_\_

光 谱 校 正 误 差 \_\_\_\_\_

双 光 束 补 偿 \_\_\_\_\_

荧 光 池 的 配 套 性 \_\_\_\_\_

绝 缘 电 阻 \_\_\_\_\_