

JJG

中华人民共和国国家计量检定规程

JJG 538—88

荧 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


目 录

一 概述	(1)
二 技术要求	(1)
三 检定条件	(3)
(一) 检定用设备	(3)
(二) 检定环境条件	(3)
四 检定项目和检定方法	(4)
五 检定结果的处理和检定周期	(8)
附录1 检定用临时工作标准溶液的配制	(9)
附录2 关于计算机程序	(11)
附录3 检定记录格式	(12)
附录4 检定结果通知书(反面)格式	(14)

荧光光度计试行检定规程

Verification Regulation of
Fluorescence Photometer

JJG 538—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：

叶军安（黑龙江省计量科学研究所）

参加起草人：

周孝诚 陈砂岗 张秀兰（黑龙江省计量科学研究所）

荧光光度计试行检定规程

本规程适用于以滤光片获得单色光的、作非连续取样定量分析用的新制造、使用中和修理后的荧光光度计的检定。

一 概 述

荧光光度计（以下简称仪器）是根据某些物质被一种波长的光（如紫外光）照射后，会在极短的时间内发射出比照射波长稍长的光（如可见光）的原理，测量物质的性质和含量的分析仪器。

荧光强度与物质的浓度存在以下关系：

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

式中： F ——荧光强度；

k' ——仪器常数；

ϕ ——量子效率；

I_0 ——激发光强度；

ϵ ——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。

对于给定的物质来说，当激发光的波长和强度以及液层的厚度给定，溶液的浓度较低时，荧光强度与荧光物质的浓度，有以下简单关系：

$$F = kc$$

仪器主要由光源系统、单色器系统、样品室、探测器系统和显示仪表组成。

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 仪器应能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。电缆线的接插件应接触良好。外观不应有明显的机械损伤。

1.3 指示器应工作正常。刻线应清晰、粗细均匀。指针的宽度不大于刻线的宽度,并应与刻线平行。

1.4 旋动“调零”和“满度”旋钮时,电表指针应平稳无跳动现象。

1.5 仪器所配荧光池表面应光洁,不应有划痕、斑点及任何裂纹。

1.6 滤光片透光面不得有灰尘、油污或影响透光特性的斑点存在。

2 检出极限

用硫酸奎宁标准溶液检定仪器的检出极限应优于 $1 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$ 。

3 线性误差

仪器的线性误差不大于 $\pm 4.0\%$ 。

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。

4 稳定度

4.1 电源电压为 $220 \pm 4.4 \text{ V}$ 时,3 min 内,仪器示值的正、反向漂移应不大于 1.5%。

4.2 输入电压 $220 \pm 22 \text{ V}$ 时,仪器示值变化量应不大于 1%。

5 重复性

仪器的重复性不大于满度值的 0.8%。

6 荧光池成套性

配套使用的荧光池间的示值差应不大于 1%。

7 滤光片透光特性

仪器上配置的玻璃滤光片、干涉滤光片的峰值波长应符合以下要求。

玻璃滤光片:标称值 $\pm 10 \text{ nm}$;

干涉滤光片:标称值 $\pm 5 \text{ nm}$ 。

其他指标应符合出厂说明的规定。

8. 绝缘电阻

仪器在不工作状态下, 在符合规定的环境条件下, 试验电压 500 V, 电源输入电路与外壳之间的绝缘电阻不小于 20 M Ω 。

三 检定条件

(一) 检定用设备

9 检定设备见表 1。

表 1

序 号	名 称	规 格	备 注
1	交流稳压电源	220 V 0.5 kVA 稳定度 0.5 %	
2	调 压 器	0.5 kVA	
3	兆 欧 表	试验电压 500 V	
4	交流电压表	150/300 V, 准确度 1.0 级	
5	秒 表	分度值不大于 0.1 s	
6	荧 光 池	光径 10 mm	工作标准荧光池, 其配对误差 不大于 0.5 %
7	分光光度计	300—400 nm $\Delta\lambda$ ± 0.7 nm 400—500 nm $\Delta\lambda$ ± 1.1 nm 500—600 nm $\Delta\lambda$ ± 1.5 nm	需经汞灯校准 的紫外-可见分 光光度计
8	配制溶液设备		配制标准溶液 所需设备及器材 见附录 1

10 工作标准溶液

10.1 0.05 mol/l 硫酸溶液。

10.2 硫酸奎宁标准溶液 (溶剂 0.05 mol/l 硫酸), 其浓度分别为 1×10^{-6} 、 2×10^{-7} 、 4×10^{-7} 、 6×10^{-7} 、 8×10^{-7} 、 1×10^{-6} g/ml。

(二) 检定环境条件

11 检定环境条件应符合以下要求

11.1 温度 $20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ ；相对湿度不大于 85%。

11.2 电源电压 $220 \pm 22\text{ V}$ 。

11.3 仪器应置于水平面无震动的工作台上，操作时不得有摇动现象。检定处不得有强光直射。

11.4 仪器周围无强磁场、电场干扰，无强气流影响。

11.5 仪器电源必须接地良好。仪器接通电源之前，必须安装好滤光片，更换滤光片必须先切断光源。

11.6 检定前，仪器应预热 20 min。

四 检定项目和检定方法

12 新仪器应全面进行第 1—8 条的检定，使用中修理后的仪器，原则上进行第 1、2、3、5、6、7 和 4.1 款的检定，必要时可增加第 4.2 款和第 8 条的检定。

13 外观与初步检查按第 1 条要求进行。

14 检出极限

14.1 用 0.05 mol/L 硫酸溶液作空白溶液，选取浓度为 $1 \times 10^{-8}\text{ g/mL}$ 硫酸奎宁标准溶液。灵敏度旋钮放在最高挡。根据激发滤光片波长在 350 nm、发射滤光片波长在 450 nm 左右的原则，选择滤光片。例如：使用玻璃滤光片的仪器，激发滤光片可选用“330”号（带通型），发射滤光片选用“420”（截止型）与“500”号（带通型）滤光片组合。

14.2 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。

14.3 由下式计算每次测量的荧光强度：

$$F_i = F_{i1} - F_{i0} \quad (1)$$

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：

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

式中: n ——测量次数。

检出极限指能给出二倍于标准偏差读数的物质浓度。用符号 DL 来表示。

$$DL = \frac{c}{\bar{F}} \times 2 S (\text{g/mL}) \quad (3)$$

式中: \bar{F} ——11 次测量的平均荧光强度;

c ——标准溶液的浓度;

S ——单次测量的标准偏差。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}{n-1}} \quad (4)$$

式中: n ——测量次数。

15 线性误差

15.1 用 0.05 mol/L 硫酸溶液作空白溶液, 适当选择灵敏度倍率挡、满度旋钮, 使表 2 中浓度最大的溶液示值接近满量程的 80% 处。滤光片选用按 14.1 款。

表 2

g/mL

标准溶液编号 (j)	1	2	3	4	5
标准溶液浓度 (c_j)	2×10^{-7}	4×10^{-7}	6×10^{-7}	8×10^{-7}	1×10^{-6}

15.2 分别对表 2 中 5 种浓度工作标准溶液与空白溶液进行连续交替三次测量。

由式 (1)、(2) 计算每次测量的荧光强度及测量平均值。

平均荧光系数 k ;

$$k = \frac{1}{5} \sum_{j=1}^5 \frac{\bar{F}_j}{c_j} \quad (5)$$

式中: c_j ——标准溶液浓度;

\bar{F}_j ——浓度为 c_j 的溶液对应的三次荧光强度测量值的平均值
仪器的线性误差由下式计算。

$$\alpha_j = \frac{\bar{F}_j - kc_j}{kc_j} \times 100\% \quad (6)$$

16 稳定性

16.1 滤光片选用同 14.1 款, 测量 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 硫酸奎宁溶液。调节满度旋钮使仪器示值在 90% 处, 历时 3 min, 记录仪器示值的变化量。

17 重复性

滤光片选用同 14.1 款, 测量 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 硫酸奎宁溶液, 调节满度旋钮, 使仪器示值在 90% 处。连续测量三次 (每次测量前允许调零), 分别记录仪器示值。重复性用下式计算:

$$\delta_r = \max \left| F_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_i \right| \quad (7)$$

式中: F_i ——荧光强度;

n ——测量次数。

18 荧光池成套性

滤光片选用同 14.1 款, 荧光池中装入 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 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, 将其中一只放入其它检定项目合格的被检仪器光路中。仪器示值调至 90% 处, 测量其它荧光池, 记录荧光池间的仪器示值差。

19 滤光片的透光特性

19.1 带通型滤光片

用表 1 中规定的仪器测量被检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)。由曲线求出最大透射比 T_M 对应的波长

λ_M 和透射比为 $\frac{1}{2} T_M$ 时对应的波长 λ_1 、 λ_2 , 则滤光片峰值波长误差:

$$\Delta\lambda = \lambda - \lambda_M \quad (8)$$

式中: λ ——滤光片峰值波长标称值。

滤光片半宽度:

$$\lambda_W = \lambda_2 - \lambda_1 \quad (9)$$

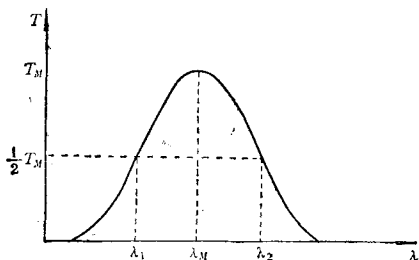


图 1

19.2 干涉滤光片

干涉滤光片的检定同 19.1 款。检定时应注意光束与滤光片平面垂直。

19.3 截止型滤光片

截止滤光片的透光特性用半高波长和陡度 H 表示。测量方法按照 19.1 款，由图 2 所示曲线求出最大透射比 T_M ， $\frac{1}{2}T_M$ 所对应的波长 λ_s 为半高波长。

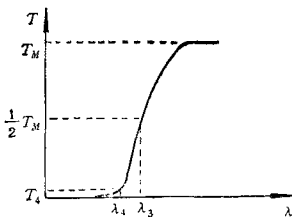


图 2

$$H = A_{\lambda_4} - A_{\lambda_s} \quad (10)$$

式中： H ——陡度；

A_{λ_3} ——波长为 λ_3 时的吸光度；

A_{λ_4} ——波长为 $\lambda_3 - 20 \text{ nm}$ 时的吸光度（透射比为 T_4 ）。

20 绝缘电阻

在仪器电源输入电路与外壳之间用 500 V 兆欧表测量绝缘电阻。

21 对于测量方法没有完全包括在本规程范围内的其它类型荧光光度计，其主要技术指标可参照上述检定方法进行检定。技术要求可按仪器说明书注明的指标。

五 检定结果的处理和检定周期

22 以上检定的各项数据均须记录在检定记录纸上，其中有关项目应填写或注明在检定证书或检定结果通知书上。

23 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，并填写注明不合格项目的数据。

24 检定周期为一年，在此期间中，当条件改变（例如：更换光源灯、光电管、指示器经修理等）或对测量结果有怀疑时，都应进行检定。

附 录

附录 1

检定用临时工作标准溶液的配制*

1 试剂

表 1

试剂名称	硫 酸 奎 宁	硫 酸
分 子 式	$(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2 H_2O$	H_2SO_4
分 子 量	782.93	98.08
纯 度	分 析 纯	分析纯

2 设备及器材

表 2

名 称	规 格	数 量	名 称	规 格	数 量
烘 箱	0—200℃	1	容量瓶	250、500、 1000 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 5000 mL	若干	磨口瓶	1000、 10 000 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

使用的滴定管、移液管、容量瓶须经计量部门校准。

3 0.05 mol/L 硫酸溶液的配制

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。配

* 一旦国家计量部门发布了荧光标准物质，即应采用。

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 1×10^{-6} g/mL 硫酸奎宁溶液

将硫酸奎宁固体试剂放置在干燥器中 24 h 以上,配制溶液时,先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 硫酸溶液冲洗三次以上,冲洗液也倾入烧杯,将烧杯中的溶液倾入 1 000 mL 的容量瓶中,用 0.05 mol/L 硫酸溶液冲洗三次也倾入容量瓶,然后用 0.05 mol/L 硫酸稀释至刻度线,并摇动均匀。

4.2 配制 500 mL 浓度为 1×10^{-6} g/mL 硫酸奎宁溶液

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

4.3 依此类推配制其它浓度的硫酸奎宁标准溶液。所需标准母液的浓度及体积见表 3。为清楚明瞭,将 1×10^{-6} g/mL 标准溶液也列入表内。

表 3

配 制 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)
1×10^{-6}	500	1×10^{-5}	50
1×10^{-7}	1 000	1×10^{-6}	100
1×10^{-8}	500	1×10^{-7}	50
2×10^{-7}	250	1×10^{-6}	50
4×10^{-7}	250	1×10^{-6}	100
6×10^{-7}	250	1×10^{-6}	150
8×10^{-7}	250	1×10^{-6}	200

4.4 高浓度标准溶液需在深色的玻璃瓶中避光、低温、密封保存,有效期为半年。低浓度溶液不易贮存,现用现配制。

附录 2

关于计算机程序

本规程配有计算机程序，考虑到计量部门的特点，有时到用户单位检定、测试。所以该程序主要是针对 PC-1 500 小型计算机编制的，这种型号的计算机使用非常方便，去掉打印部分后，只与一般计算器一样大，需要程序的单位，请与规程起草单位联系。

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		温 度	
检 定 员		检 定 日 期	

1 外观与初步检查

2 检出极限

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_{10}											
F_{11}											
F_1											
\bar{F} _____ S _____ DL _____											

3 线性误差

F	F_{10}	F_{11}	F_1	F_{20}	F_{21}	F_2	F_{30}	F_{31}	F_3	\bar{F}_j	a (%)
$c_i(\text{g/mL})$											
2×10^{-7}											
4×10^{-7}											
6×10^{-7}											
8×10^{-7}											
1×10^{-6}											

4 稳定度

电 压	电 源 电 压		电 压 变 化	
	220±4.4V(3 min内)		220V→198V	220V→242V
光强度示值(%)	初 值	终 值	90→	90→
稳定度(%)	90			

5 重复性

n	1	2	3	\bar{P}	δ_T
$F(\%)$					

6 荧光池成套性

池 号				
$F(\%)$				
$\Delta F(\%)$				

7 滤光片透光特性

[illegible]

3 维维市阳

R_____

附录 4

检定结果通知书（反面）格式

检 定 结 果

外观_____

检出极限_____

线性误差_____

稳 定 度_____

重 复 性_____

荧光池成套性_____

滤光片透光特性_____

绝缘电阻_____

附加说明：

本检定规程经国家计量局委托黑龙江省标准计量局主持的规程审定会审定通过。