

ICS 13.310
A 92



中华人民共和国国家标准

GB/T 19267.3—2003

刑事技术微量物证的理化检验 第3部分：分子荧光光谱法

Physical and chemical examination of trace evidence in forensic sciences—
Part 3: Molecular fluorospectrometry

2003-08-19 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

GB/T 19267《刑事技术微量物证的理化检验》分为 12 个部分：

- 第 1 部分：红外吸收光谱法；
- 第 2 部分：紫外-可见吸收光谱法；
- 第 3 部分：分子荧光光谱法；
- 第 4 部分：原子发射光谱法；
- 第 5 部分：原子吸收光谱法；
- 第 6 部分：扫描电子显微镜法；
- 第 7 部分：气相色谱-质谱法；
- 第 8 部分：显微分光光度法；
- 第 9 部分：薄层色谱法；
- 第 10 部分：气相色谱法；
- 第 11 部分：高效液相色谱法；
- 第 12 部分：热分析法。

本部分为 GB/T 19267 第 3 部分。

本部分由全国刑事技术标准化技术委员会(CSBTS/TC179)提出并归口。

本部分的起草单位：中国刑事警察学院。

本部分起草人：王彦吉。

刑事技术微量物证的理化检验

第3部分:分子荧光光谱法

1 范围

本部分规定了分子荧光光谱的检验方法。

本部分适用于刑事技术领域微量物证的理化检验,其他领域亦可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 19267 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 13966—1992 分析仪器术语

GB/T 19267.2—2003 刑事技术微量物证的理化检验 第2部分:紫外-可见吸收光谱法

3 术语和定义

GB/T 13966 中确立的以及下列术语和定义适用于本部分。

3.1

荧光 fluorescence

一个原子、分子或离子吸收一个光子接着又转变为总自旋量子数不变的基态时发生的电磁辐射。此电磁辐射的延续时间(余辉时间)与温度无关,一般小于 10^{-8} s。

3.2

荧光光谱 fluorescence spectrum

包括荧光发射光谱和荧光激发光谱

a) 荧光发射光谱:在固定激发波长条件下,荧光强度随发射波长变化的分布曲线。

b) 荧光激发光谱:在固定发射波长条件下,荧光强度随激发波长变化的分布曲线。

3.3

荧光光谱法 fluorospectrometry

根据获得的荧光激发光谱、发射光谱等参数对物质进行定性、定量和结构分析的方法。

3.4

同步扫描光谱 synchro - scan spectrum

是指在荧光物质的测定中,选择适当的激发光谱和发射光谱的波长差(通常选用 $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ 与 $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ 之差),同时扫描激发波长和发射波长所得的光谱。

3.5

三维荧光光谱 three - dimensional fluorescence spectrum

描述荧光强度同时随激发波长和发射波长变化的关系图谱。

3.6

时间分辨荧光光谱 time resolution fluorescence spectrum

同时固定激发光和发射光波长的条件下,荧光强度随时间变化的曲线。

3.7

荧光强度 fluorescent intensity

指荧光的相对强度,单位是任意的。物质的相对荧光强度与仪器性能、入射光强度、溶液浓度及该物质的量子产率等因素有关。可用下式表示:

$$\text{荧光强度 } I = K\Phi_f I_e (1 - e^{-bc})$$

式中:

I ——荧光强度;

Φ_f ——量子产率;

I_e ——激发光强度;

b ——光路长度;

c ——溶液浓度;

ϵ ——摩尔吸光系数,与激发光波长相对应;

K ——常数。

3.8

峰位 peak position

激发峰和发射峰的波长所在位置,分别用 λ_{ex} 、 λ_{em} 表示

3.9

谱带宽度 spectral bandwidth

在检测辐射功率峰值的二分之一处,从单色器出口狭缝射出的辐射能量的波长区间。

3.10

荧光寿命 fluorescence lifetime

停止激发后,荧光强度降到激发时最大荧光强度的 $1/e$ 所用时间,用 τ 表示。

3.11

荧光猝灭 fluorescence quenching

处于激发态的分子,通过内部能量转移或碰撞失去能量,回到基态的过程。

3.12

斯托克斯位移 Stokes shift

荧光的发射波长大于激发波长,发射峰位和激发峰位的波长差称为斯托克斯位移。

3.13

荧光效率 fluorescence yield

荧光效率也称量子产率,用 Φ_f 表示,等于发射荧光的量子数与吸收激发光的量子数之比值。

3.14

瑞利散射 rayleigh scattering

激发光的光子与作为散射中心的分子相互作用时,光子发生方向改变形成散射,散射光的频率与激发光的频率相同。

3.15

拉曼散射 Raman scattering

激发光的光子与作为散射中心的分子相互作用时发生能量交换,分子吸收了频率较低的激发光,上升到基态中较高的振动能级,再返回到稍高或稍低于原来的能级,形成不同于激发光频率的散射。

4 原理

分子吸收紫外或可见光后,基态分子跃迁到各个不同振动能层的单线态电子激发态,再经振动弛豫和(或)内转换衰变到第一电子激发态的最低振动能级,然后再跃迁到基态的各个不同振动能级,并发射

相应的光量子。由于物质分子结构不同,所以吸收光及发射荧光的波长和强度不同,即不同物质具有不同的荧光激发光谱和发射光谱,而且对于同一物质,浓度不同,荧光强度也不同,从而可用来进行定性和定量分析。

5 仪器

5.1 仪器名称

荧光分光光度计。

5.2 仪器组成

5.2.1 激发光源

常用的光源是氙灯及高压汞灯。其中,高压汞弧灯是目前荧光分光光度计中应用最广泛的一种光源,属短弧气体放电灯,在 250 nm~800 nm 光谱区呈连续光谱,外套为石英,内充氙气,室温时压力为 5 标准大气压,工作时压力约为 20 标准大气压。

5.2.2 单色器

是一种能把复合光分解为单色光并能从中选出所需波长的装置。荧光分光光度计有两个单色器,即激发单色器和发射单色器。光栅是单色器的主要色散元件,另外单色器还含有狭缝、透镜和反射镜系统。

5.2.3 吸收池

石英无荧光池,四面透明。

5.2.4 检测器

接收光信号,并将其转变为电信号的装置,目前应用较多的是光电倍增管。

5.2.5 记录仪

大部分采用自动记录仪,并可配有数据处理系统。

5.3 校正与调试

5.3.1 波长校正

5.3.1.1 发射单色器校正

把一个汞灯放在样品室中,点燃,选择狭缝为 2 nm(若谱线强度弱,可以增大狭缝)。调节光栅和光路准直系统,直至仪器输出的 13 条谱线的波长与表 1 中的标准值一致。也可将发射单色器固定在表 1 中 13 条谱线中的任一波长,调节单色器使发射出的荧光强度最大。

5.3.1.2 激发单色器校正

把汞灯放在激发光源的位置,将发射单色器的波长调至零,在样品室中放一块漫散射板或高散射的溶液,根据表 1 中 13 条主要谱线校正激发单色器波长。

5.3.1.3 波长校正的精度

应在紫外及可见光区分别选择波长进行校正。13 条汞线可以全选,也可选几条,也可以选一条。选择的波长点越多,则在整个工作范围内的波长精度越高。实际检验中经常采用加校正值的方法,即在误差不大的情况下,将表 1 中 13 条汞线的真值与实际测量值之差作为修正波长的校正值。

表 1 汞灯的主要辉线波长

辉线波长/nm	253.7	296.5	302.2	312.2	313.2	365.0	365.5
辉线波长/nm	366.3	404.7	435.8	546.1	577.0	579.0	

5.3.2 发射光谱和激发光谱的校正

5.3.2.1 量子计—微机校正法

把盛罗丹明 B 乙醇溶液(3 g/L)的石英三角柱池量子计放入样品室,在发射单色器的入口处插入一红色滤光片以滤去杂散光,保证仅让 630 nm 荧光(罗丹明 B 的 $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$)通过,把单色器的发射波长设

置于 630 nm,扫描激发单色器,检测到的信号存入微机并进行归一化处理。经微机处理后的输出信号,即激发光强与波长的关系,应为恒定的值,此时绘制的激发光谱,即为经过样品校正的激发光谱。

5.3.2.2 微机—散射光法

把散射光板插入样品室,在波长差为零的条件下作同步扫描荧光强度。在无波长误差的情况下,激发光谱和发射光谱应完全重合。若存在发射单色器的波长误差,利用微机使之校正到一致,并作归一化处理,输出信号应为恒定的值。

5.3.3 灵敏度校正

常用来进行灵敏度校正的标准荧光物质有: 10^{-2} mol/L $\sim 10^{-4}$ mol/L 酚—甲醇、 10^{-2} mol/L $\sim 10^{-4}$ mol/L 吡啶—乙醇、0.1 mol/L ~ 0.3 mol/L 喹啉—硫酸(0.05 mol/L)、荧光素—水(或乙醇)、2-氨基吡啶—硫酸等。 10^{-5} mol/L 的 2-氨基吡啶—硫酸溶液(0.05 mol/L)常作为 300 nm \sim 400 nm 范围的标准溶液,有关数据见表 2。

表 2 10^{-5} mol/L 的 2-氨基吡啶—硫酸溶液荧光波长及相对强度

λ/nm	$I\%$	λ/nm	$I\%$	λ/nm	$I\%$
320	2.5	368	100.0	410	37.0
330	9.5	370	99.5	420	26.5
340	33.0	380	91.8	430	17.5
350	66.5	390	26.0	440	10.8
360	94.0	400	53.5	450	7.5

5.4 性能指标

5.4.1 波长准确度

仪器显示的波长与激发单色器和发射单色器单色光的实际波长值之间的差值均应小于等于 2.0 nm。

5.4.2 光度重现性

相同条件下重复测得的荧光强度的变动性小于等于 2.5%。

5.4.3 信噪比

蒸馏水的拉曼峰强度值 S 与噪音 N 的关系应符合 S/N 大于等于 25。

6 样品制备

6.1 试样

待测试样的荧光光谱测定须在透明溶液中进行。应选用合适的溶剂溶解待测样品为浓度适宜的溶液,选择溶剂的原则是:

- 溶剂本身无荧光;
- 溶剂不与被测物质发生化学反应;
- 对试样有良好的溶解能力;
- 被测组分在溶剂中具有良好的峰形;
- 溶剂的极性要尽量小。

6.2 比对样品

将比对样品用相同溶剂溶解成与待测样品浓度相近的溶液,待测。

6.3 实例

6.3.1 纺织纤维上染料

选取若干相同长度的单根纤维,分别加入相同体积的不同溶剂,必要时可适当加热。比较各类溶剂对染料的提取能力,同时用体视显微镜观察纤维形态的变化以确定提取溶剂是否合适,要求萃取剂仅能溶胀而不溶解和分解纤维。提取时应视检材的多少采用不同方法。如单根纤维达 1 cm 长度,采用微量

提取器进行提取(见 GB/T 19267.2—2003 的 6.2.3)。检材量较多,也可以直接在具塞试管中提取、测定。大多数纤维上染料只需数分钟即可提取完全。

6.3.2 油脂

选取合适的溶剂将附着在不同载体上的油脂溶解下来。为避免载体组分被溶解,不要长时间浸泡检材。若提取液含水分、颜色深、或有泥浆等固体杂质,可分别用无水硫酸钠脱水、活性炭脱色、玻璃纤维过滤等方法处理。

7 试验方法

7.1 清除光路中可能遗留的干扰物,打开主机。

7.2 试验条件选择

7.2.1 波长

定量分析应选择最强发射峰的波长($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$)为测量波长。当共存杂质干扰、待测组分浓度过大或吸收峰太尖锐,应选用灵敏度稍低、不受干扰的次强峰的波长为测量波长。

7.2.2 波长范围

定性分析时对已知光谱特征的样品,不需进行大范围扫描。测试未知光谱特征的样品,激发光谱和发射光谱的扫描范围应宽一些。如扫描发射光谱时应在短波方向多扫描一段,以观察瑞利散射和拉曼散射的影响。

7.2.3 狭缝

一般定性测定狭缝宽度可设定为 1 nm~5 nm,定量测定狭缝宽度设定为 5 nm~10 nm。测发射光谱时,激发狭缝可设为 5 nm~10 nm,甚至 15 nm,而发射狭缝设定为 2 nm~5 nm。

7.2.4 横、纵坐标的范围

横坐标的刻度一般选择为(1 cm~5 cm)/100 nm。纵坐标的选择要兼顾荧光强度和噪声,一般在 2^8 以下。如果数据累加降低噪声,纵坐标还可以放大。

7.2.5 选择扫描速度

7.3 测定

检测试样或比对样品溶液,绘制谱图。

7.4 定性分析

7.4.1 光谱特征测定

测定试样的荧光光谱,获得发射峰的数目、位置、强度以及激发光谱和发射光谱的形状(极大、极小值和拐点)等光谱特征,并与比对样品的谱图或标准谱图作比较。

7.4.2 比对实验

同时比较试样和比对样品的激发光谱和发射光谱每个峰的峰位、峰的数目、形状以及各峰之间的相对强度,只有完全相同时才有可能为同一物质。如果是单峰的话,试样和比对样品需在相同的浓度条件下进行比较。

7.4.3 联合试验

将荧光光谱法与其他光谱方法配合使用,可用于检测含有共轭链、芳环等官能团的化合物。

7.5 定量分析

7.5.1 标准对照法

用于单组分测定。在相同条件下配制比对样品和试样溶液,分别测定荧光强度。用下式计算:

$$C_{\text{样品}} = \frac{C_{\text{比对}} \times I_{\text{样品}}}{I_{\text{比对}}}$$

式中:

$C_{\text{样品}}$ ——待测物的浓度;

$I_{\text{比对}}$ ——比对样品荧光强度；

$I_{\text{样品}}$ ——样品荧光强度；

$C_{\text{比对}}$ ——比对溶液浓度。

7.5.2 标准曲线法和回归直线法

7.5.2.1 标准曲线法

配制一系列浓度不同的标准溶液,在相同实验条件下,测定荧光强度,然后以标准溶液的浓度为横坐标,以相应的荧光强度为纵坐标,绘制关系图,在符合 Beer 定律时,可获得一直线。在工作曲线的条件下测出样品溶液的荧光强度,从标准曲线上查出样品的浓度。

7.5.2.2 回归直线法

用回归直线方程计算样品的浓度

$$I = bC + a$$

式中:

I ——某波长下的荧光强度；

C ——待测组分浓度；

a ——校准曲线截距；

b ——校准曲线斜率。

7.5.3 导数光谱法

$$\frac{d^n I}{dA^n} \propto C$$

式中:

$\frac{d^n I}{dA^n}$ —— n 阶导数,以振幅值表示, n 可取 1、2、3、4……；

C ——样品浓度。

在导数光谱中以振幅($d^n I/d\lambda^n$)与相应的浓度作图,在符合 Beer 定律时,可获一直线。按照线性范围的关系,求得待测物浓度。

分析结果要求相对标准偏差小于 1%。

8 结果表述

检材或试样的谱图与比对样品的谱图(或标准谱图)在相同实验条件下进行定性比较或定量测定后,应给出检材与比对样品是否相同或含量范围的结论。
