

荧光光谱学

作者：

Steve Upstone

珀金埃尔默公司

英国，Seer Green

荧光分光光度计仪器性能验证 模块—助力药物分析、工业分 析领域的的数据完整性认证

简介

与紫外 / 可见吸收分光光度法相比，荧光法具有更高的灵敏度，因此常被用于特定的分析工

作中。荧光的灵敏度还有进一步提升的空间—前提是研究材料在选用的波长区域内拥有较高的量子效率。由于荧光分子具有特征的激发波长和发射波长，因此可调整仪器设置使其能够检测到目标化合物，故而使用荧光也更加具有选择性。

荧光法是一种相对技术—也就是说，在进行定量测定时，需要对浓度已知的材料进行比较来测定。参比标准物可以是一个，也可以是一组。使用一组参比标准物的好处在于能够验证分析实验是否在线性范围内完成，以及是否存在内滤光效应（荧光被样品自身吸收）。观察到的荧光强度（通常用 RFU—相对荧光单位表示）也与仪器的狭缝宽度、检波器增益（电压）、光源功率等的设置有关。不同的仪器（即使由同一个生产商生产，且使用看上去完全相同的光学系统）会给出不同的结果，并且各个生产商采用的纵坐标尺度不同，因此，RFU 绝对值上存在差异并不能用于仪器的质量的评判。

荧光分光光度计验证

与其它更加绝对的技术相比（例如吸收光谱法），前述提到的技术考虑因素使得仪器性能的验证更具有挑战性。实验室，尤其是承接分析工作的实验室，为了获得资格鉴定（如英国皇家认可委员会 UKAS、国际标准 ISO 17025），需要能够证明他们在分析实验中使用的仪器已经通过验证，且能够完全满足分析实验的要求。不幸的是，制药市场（仪器验证最主要的驱动因素之一）只是一个相对较小（与吸收光谱法相比）的子市场，因此仪器检验所采用的材料、方法范围上有更多局限。这之所以会成为一个问题，也是有原因的。首先，用于调查研究的样品必须能够自主发出荧光，或与其它物质反应并生成（衍生出）荧光物（例如，非荧光组胺与邻苯二甲醛反应产生能发出高度荧光的化合物）。其次，还需要考虑吸光性化合物对荧光造成掩盖和猝灭。这些都限制了荧光在一般性质保 / 质控分析实验中的应用。

《美国药典》方法 <853>（美国药典第 40 节）¹ 就荧光分光光度计性能的测定提供了一些指导。用于 FL6500 和 FL8500 的 Spectrum FL 软件配备了验证模块，能够用于测试仪器的关键规格。

Spectrum FL 验证模块

Spectrum FL 软件配备了验证模块，能够用于测试仪器的关键规格。它们是：

- 拉曼光谱带峰值
- 拉曼光谱带灵敏度
- 发射波长准确性
- 发射波长重现性
- 激发波长精度
- 激发波长重现性
- 杂散光

这一模块很直观，为用户提供全程引导。此外可以选择进行单项测试，无需每次都运行全部检查项一遍。验证模块如图 1 所示。

测定灵敏度

确定灵敏度时，先将激发波长固定在 350 nm 并使用 10 nm 狭缝宽度扫描纯水样品在 397 nm 左右的拉曼峰，然后测定峰值波长处的噪声，由此测定出信噪比，最后得到灵敏度结果。

为了方便起见，纯水参比标准品封存在比色皿中出售（防止随时间滋生微生物），某些具有水质（电导率）认证。类似地，有些参比标准品有序列号，而有些则没有。

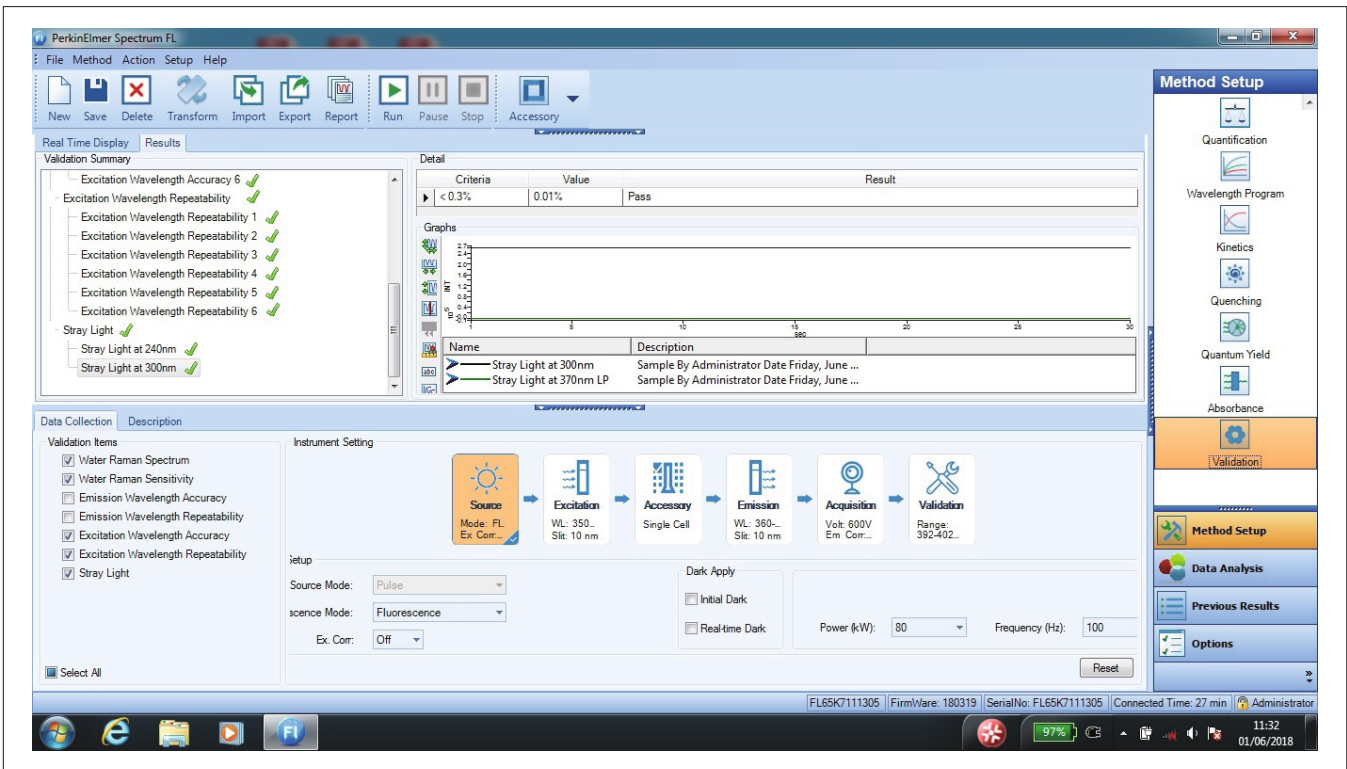


图 1、Spectrum FL 验证模块。



图 2、密封的纯水参比标准品 (L2251293)。

测定发射波长准确性和重复性

测定仪器灵敏度最常用的方法是使用密封纯水的石英池，并检查瑞利—廷德尔峰位置 (Rayleigh-Tyndall) 和拉曼峰位。这种方法非常简单，但是同时也最不严谨，因为观察到的峰位取决于两个单色器的位置，并且存在两个单色器同时出错的可能性。尽管如此，这仍然不失为一种快速检查仪器波长准确性的实用方法。

最好的方法是采用经过校准的带有锐线发射的光源（如汞 (Hg) 灯或汞氙灯）。汞氙灯在长波长端有额外的锐线。采用这种光源的主要优势在于，谱线不受干扰（即保持固定不动），且正因为是线光源，因此不会受到发射校正不充分导致的误差的影响——特别是波长大于 650 nm 的波段，在这种情况下，由于检测器对峰截止，可导致非线光源的峰位发生明显偏移。若波峰为宽峰，则偏移值可达到 50 nm 或以上。

使用光源的主要缺点是相对校准参比标准品成本高，但这是测定波长准确性和重复性最好的方法。

测定激发波长精度和再现性

一旦顺利完成发射波长的校准后，激发波长的校准工作就会相对容易些。要校准激发波长，可将聚四氟乙烯漫射附件（随仪器一同提供）插入样品的位置，然后设置发射光单色器到达一系列波长，通过使用激发光单色器扫描，即可完成校准。

两个单色器达到相同波长时会出现高强度的瑞利—廷德尔散射峰。这一位置应该与固定的发射波长相对应（达到指定的单色器的波长准确性时）。

测定杂散光

从广义上来说，杂散光是指出现在光束中用户选定波长以外的光。杂散光最大的可能来源之一是由强烈的氙灯光源产生（脉冲或连续）的复色光，能够从激发光单色器中“漏出”，然后以杂散光的形式出现。杂散光能够引起光谱假象，例如在光谱中出现微小的肩峰或其它类似特征。

可以使用充满高浓度罗丹明 101 的三角池（部件号：L2251366）杂散光滤光器，测得波长为 240 nm 和 300 nm 的杂散光。

荧光块套装

我们提供了一套荧光材料。这些材料并非参比标准物，且不带证书，但在检查仪器是否正常工作仍然非常实用。

荧光块在美国药典 USP<853> 中有所涉及，因此是允许作为验证体系的一部分在美国药典保护下的制药实验室中使用的。荧光块由聚甲基丙烯酸甲酯掺入少量多种化合物制成，如蒽、对三联苯、卵苯、罗丹明、铕等（后者用于时间分辨延迟荧光和磷光测定）抛光而成。



图 3、六块装荧光盒块套装（部件号：52019600）。

未来趋势

一些团队正在研究用于校准荧光分光光度计的替代性材料。德国的联邦材料研究所 (BAM)² 正在研究使用量子点（材料的纳米粒子，如碲化镉 CdTe，将其设计为特定尺寸后，能够得到精确的发射波长）。

参考文献

1. US Pharmacopoeia, USP<853> (Part of USP 40).
2. Resch-Genger, Ute (ed.) Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements 1: Techniques, Springer Science and Business Media (2008).