



中华人民共和国国家标准

GB/T 19267.3—2008
代替 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

www.docin.com

2008-08-14 发布

2009-03-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

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/X 射线能谱法；
- 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 的第 3 部分。

本部分代替 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》。

本部分与 GB/T 19267.3—2003 相比主要变化有：

- 增删了术语和定义的内容(本部分的 3.2~3.5、3.10,GB/T 19267.3—2003 的 3.2)；
- 修改了关于仪器的内容(本部分的 5.2.1~5.3.3)；
- 增加了实例的内容(本部分的 6.3.3)。

本部分由中华人民共和国公安部提出。

本部分由全国刑事技术标准化技术委员会理化检验标准化分技术委员会(SAC/TC 179/SC 4)归口。

本部分起草单位：中国刑事警察学院。

本部分主要起草人：张振宇。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- 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

1 范围

GB/T 19267 的本部分规定了分子荧光光谱法的检验方法。
本部分适用于刑事技术领域中微量物证的理化检验,其他领域可参照使用。

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 分析仪器术语

GB/T 19267.2—2008 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

分子(也可以是原子或离子)吸收能量跃迁至某电子激发单重态,后又回到总自旋量子数不变的基态时所发出的电磁辐射。

3.2

荧光激发光谱 fluorescence excitation spectrum

在固定发射波长条件下,荧光强度随激发波长变化的曲线。

3.3

荧光发射光谱 fluorescence emission spectrum

在固定激发波长条件下,荧光强度随发射波长变化的曲线。通常意义上的荧光光谱即指荧光发射光谱。

3.4

激发波长 excitation wavelength

激发样品使其产生荧光的入射光波长,用 λ_{ex} 表示。

3.5

发射波长 emission wavelength

物质所发射的荧光的波长,同时也是检测样品荧光时所采用的测定波长,用 λ_{em} 表示。

3.6

斯托克斯位移 stockes shift

物质的发射波长与激发波长的差值(物质的发射波长总是大于激发波长)。

3.7

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。

3.8

同步扫描光谱 **synchro-scan spectrum**

保持激发波长与发射波长的某种关系,同时扫描激发波长和发射波长所得到的物质的荧光光谱。根据激发波长与发射波长在扫描过程中彼此所保持的关系种类,同步扫描光谱分为固定波长差、固定能量差和可变波长三种类型,其中最基本的是固定波长差的同步扫描荧光光谱。

3.9

荧光强度 **fluorescence intensity**

物质发射荧光的相对强度,用符号 I 表示。它与仪器性能、激发光强度、溶液浓度及荧光物质的量子产率等因素有关,其关系为:

$$I = K\Phi_f I_e (1 - e^{-\epsilon bc})$$

式中:

I ——荧光强度;

K ——常数;

Φ_f ——量子产率;

I_e ——激发光强度;

ϵ ——摩尔吸光系数;

b ——光路长度;

c ——溶液浓度。

3.10

导数荧光光谱 **derivative fluorescence spectrum**

荧光强度对波长的一阶或高阶导数随波长变化的曲线。如以荧光强度(I)随波长(λ)改变的速率 $dI/d\lambda$ 为纵坐标,波长 λ 为横坐标所记录的荧光光谱,即为一阶导数荧光光谱,以此类推,纵坐标为 $d^2 I/d\lambda^2$ 时,即为二阶导数荧光光谱。一定条件下,荧光强度对波长的导数值与分析物的浓度成正比。

3.11

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关系的图谱。

3.12

时间分辨荧光光谱 **time resolved fluorescence spectrum**

同时固定激发波长和发射波长的条件下,荧光强度随时间变化的曲线。

3.13

荧光寿命 **fluorescence lifetime**

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

3.14

荧光猝灭 **fluorescence quenching**

荧光物质分子与溶剂或溶质分子发生作用导致物质荧光强度下降的现象。

3.15

荧光效率 **fluorescence efficiency; fluorescence yield**

荧光物质吸光后所发射的荧光的光子数与所吸收的激发光的光子数之比值,也称荧光产率。

3.16

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,所发生的散射光频率与激发光频率相同的散射。

3.17

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,所发生的散射光频率与激发光频率不同的散射。拉曼散射光的波长通常要比激发光的波长长一些,且随激发波长的改变而改变。

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级的单重态电子激发态,再经振动弛豫和(或)内转换衰变到单重态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,从而发射出荧光。由于不同物质的分子结构不同,或同一物质的溶液的浓度不同,所吸收光及发射荧光的波长和强度不同,据此可进行荧光物质的定性和定量分析。

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

荧光分光光度计的光源早期使用的主要是汞灯,目前使用最广泛的是高压氙灯。高压氙灯属于短弧气体放电灯,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 atm(非法定单位,1 atm=1.013 25×10⁵ Pa),工作时压力约为 20 atm。高压氙灯无论在平时或工作时都处于高压之下,存在爆裂危险,安装时要小心,应戴上安全眼睛,防止意外。

5.2.2 单色器

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。荧光分光光度计中使用最多的是光栅单色器。荧光分光光度计需要两个单色器:激发单色器和发射单色器。为了避免激发光导致的瑞利散射的影响,一般激发单色器所在的激发光路和发射单色器所在的发射光路以样品池为中心互成直角。

5.2.3 样品池

荧光分光光度计的样品池使用四面透明的无荧光的石英玻璃池。

5.2.4 检测器

目前几乎所有的普通荧光分光光度计都采用光电倍增管作为检测器。

5.2.5 数据处理和显示系统

早期的荧光分光光度计都是用记录仪扫描和记录荧光光谱。使用较多的是 *x-y* 记录仪,*x* 轴表示荧光强度,*y* 轴表示波长。目前已普遍使用电子计算机及软件系统对仪器的运行进行控制,并对获得的数据进行处理,得到的荧光光谱图通过显示器、打印机显示和打印出来。

5.3 校正与调试

5.3.1 波长校正

5.3.1.1 发射单色器波长校正

把一个汞灯放在样品池中,点燃,选择狭缝为 2 nm(若谱线强度弱,可以增大狭缝)。调解光栅和光路准指系统,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,调解单色器使发出的荧光强度最大。

表 1 汞灯的主要辉线波长

单位为纳米

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
253.7	296.5	302.2	312.2	313.2	365.0	365.5	366.3	404.7	435.8	546.1	577.0	579.0

5.3.1.2 激发单色器波长校正

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

应在紫外和可见光区分别选择波长进行校正。13 条汞线可以全选,也可以选几条甚至一条,选择的波长点越多,则在整个工作范围内的波长精度越高。实际检测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 条汞线的真值与实测值之差作为修正波长的校正值。

5.3.2 发射光谱和激发光谱的校正

5.3.2.1 光量子计-微机校正法

把罗丹明 B 乙醇溶液(3 g/L)的石英三角柱池光量子计放入样品室,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(罗丹明 B 的最大激发波长 $\lambda_{ex,max}$)荧光通过,把单色器的发射波长设置在 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,即激发光强度与波长的关系,应为恒定值。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测同步扫描荧光强度。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: 1×10^{-2} mol/L $\sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L 酚-甲醇、 1×10^{-2} mol/L $\sim 1 \times 10^{-4}$ 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。 1×10^{-5} mol/L 的 2-氨基吡啶-硫酸溶液(0.05 mol/L)常作为 300 nm ~ 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-硫酸溶液的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的实际波长的差值不应大于 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不应大于 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 S/N 应大于等于 25。

6 样品制备

6.1 试样

测定试样的荧光光谱须在透明溶液中进行,应选择合适的溶剂将试样溶解为浓度适宜的溶液。选择溶剂的原则有以下几点:

- a) 溶剂本身无荧光；
- b) 溶剂不与被测物质发生化学反应；
- c) 溶剂对试样有良好的溶解能力；
- d) 被测组分在溶剂中具有良好的峰形；
- e) 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试样浓度相近的溶液，待测。

6.3 实例

6.3.1 纺织纤维上的染料

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进行提取，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的形态变化以确定提取溶剂是否合适。要求提取剂仅能溶胀而不能溶解和分解纤维。提取时应视检材的多少采用不同的方法。如是单根纤维（长度需达到 1 cm），采用微量提取器进行提取（见 GB/T 19267.2—2008 的 6.2.3）；检材量较大时，也可以直接在具塞试管中提取。大多数纤维上的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、色料，或有泥浆等固体杂质，可分别用无水硫酸钠脱水、活性炭脱色或玻璃纤维过滤等方法处理。

6.3.3 纸张上的印泥、印油色痕

用微型打孔器（孔的内径不超过 1 mm）在纸张上的印泥、印油色痕上打孔取样（一般取 3 个～5 个圆片），置于小试管中，选取适当的溶剂（建议用氯仿）提取色痕，浸提时间不超过 60 min。

7 样品测定

7.1 实验条件选择

7.1.1 波长

定量分析应选择最强发射峰的波长（ $\lambda_{em,max}$ ）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时，应选择灵敏度稍低、不受干扰的次强峰的波长为测量波长。

7.1.2 波长扫描范围

定性分析时，对已知光谱特征的样品，可不进行大范围扫描，对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。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。

7.1.3 狭缝宽度

一般定性测定，狭缝宽度可设定为 1 nm～5 nm；定量测定狭缝宽度可设定为 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，而发射狭缝可设定为 2 nm～5 nm。

7.1.4 横、纵坐标范围

横坐标的刻度一般选择为 1 cm/100 nm～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。

7.2 测定

将试样或比对样品的溶液装入样品池，放入仪器的光路中，按选定的实验条件测定样品的荧光谱图。

7.2.1 定性分析

测定试样的荧光光谱，获得谱图上峰的数目、位置、强度以及光谱的形状（极大、极小值和拐点）等光谱特征，并与标准物的谱图作比较，以确定物质的种类。

7.2.2 比对分析

测定试样的荧光光谱,获得谱图上每个峰的峰位、峰数、形状以及各峰之间的相对强度,并与比对样品的谱图作比较,以确定试样和比对样品的成分是否相同。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。

7.2.3 定量分析

7.2.3.1 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的溶液(两者的浓度要尽量接近),分别测定其荧光强度。用下式计算试样中分析物的浓度:

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

式中:

$C_{\text{试样}}$ ——试样中分析物浓度;

$I_{\text{比对}}$ ——比对样品的荧光强度;

$I_{\text{试样}}$ ——试样的荧光强度;

$C_{\text{比对}}$ ——比对样品中分析物浓度。

7.2.3.2 标准曲线法和回归直线法

配制一系列浓度不同的标准溶液,在相同实验条件下测定其荧光强度,然后以标准溶液的浓度为横坐标,相应的荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线。在符合 Beer 定律时该标准曲线为一直线。

在标准曲线的条件下测出试样溶液的荧光强度,从标准曲线上查出试样溶液的浓度,此即标准曲线法。

由直线的回归方程计算出试样溶液的浓度,此即回归直线法。直线的回归方程为:

$$I = bC + a$$

式中:

I ——某波长下的荧光强度;

C ——分析物浓度;

a ——直线截距;

b ——直线斜率。

7.2.3.3 导数光谱法

在常规荧光光谱法中,一定条件下荧光强度与分析物的浓度成正比。在导数荧光光谱法中,一定条件下荧光强度对波长(λ)的导数值也与分析物的浓度成正比:

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

以导数 $d^n I/d\lambda^n$ 对浓度 C 作图,在符合 Beer 定律时可获得一直线。利用前述的标准对照法、标准曲线法或回归直线法均可求得试样溶液的浓度。

8 结果表述

比对分析时,将在相同实验条件下测得的试样与比对样品的荧光谱图(或标准谱图)进行比较,给出试样与比对样品成分是否相同的结论。定量分析时,给出待测组分的含量范围。

www.docin.com

中华人民共和国
国家标准
刑事技术微量物证的理化检验
第3部分：分子荧光光谱法
GB/T 19267.3—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码：100045

网址 www.spc.net.cn

电话：68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2008年12月第一版 2008年12月第一次印刷

*

书号：155066·1-34850 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话：(010)68533533



GB/T 19267.3—2008