

利用标准物质对荧光强度进行标准化

前言：荧光强度通常会受到光源亮度，室温变化等因素的影响，而使得不同时间点检测的荧光强度有所差别，干扰实验者的分析。若使用荧光强度标准化功能，可以校正荧光强度的经时变化、日差变化。荧光强度标准化功能是指通过将测试样品的荧光强度与标准样品相比较，换算得到样品稳定荧光强度的方法。本文黄曲霉毒素为例介绍荧光强度标准化功能。

一、荧光强度标准化介绍

- 使用 $210 \mu\text{g/L}$ 的硫酸奎宁 (QS) 作为标准样品；在软件中输入硫酸奎宁浓度，自动计算换算系数 (1.88)；
- 检测 $20 \mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素的荧光光谱，Ex 波长 350nm ；
- 纵坐标代表与 QS 值进行换算后的相对荧光强度值； $20 \mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素的荧光强度相当于 350ppm QS 的强度；
- 检测结果如下图所示， $20 \mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素的荧光光谱如图一所示，荧光强度会随仪器或检测时间的变化产生差异；使用硫酸奎宁进行标准化后，可得到相对荧光强度，如图二所示；

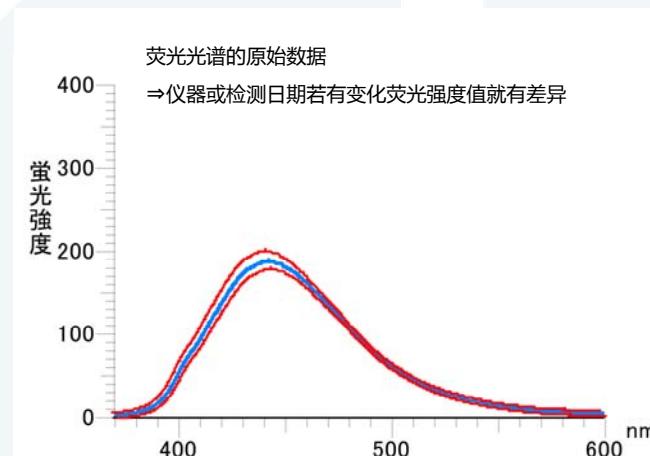


图 1 黄曲霉毒素 $20 \mu\text{g/L}$ 的荧光光谱

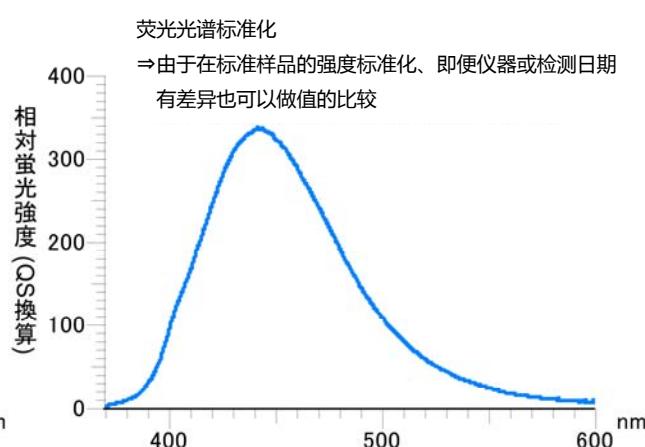


图 2 黄曲霉毒素 $20 \mu\text{g/L}$ 的相对荧光光谱

QS换算

天美(中国)科学仪器有限公司
北京市朝阳区天畅园7号楼(100107)

t 010-64010651
f 010-64060202
e techcomp@techcomp.cn
w www.techcomp.cn

二、日立荧光进行荧光强度标准化的使用步骤

- 以标准样品的荧光强度为基准，把实际样品的检测结果作为相对荧光强度进行自动换算；
- 可以同时确认标准样品的光谱和荧光强度、随后选择标准化所需要的波长，浓度；
- 检测实际样品后、软件会自动显示标准化了的光谱；
- 检测之后也可以显示标准化前的光谱、或改变标准化所使用的波长及浓度；

- ① 从分析条件里选择 general 标签；勾选荧光强度标准化选项（红色方框所示）；

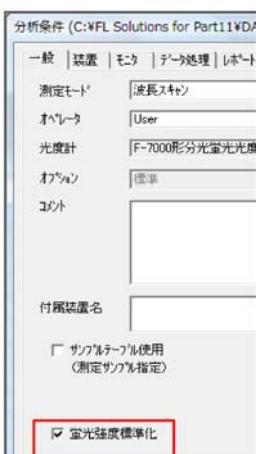


图 3 分析条件

- ② 点击标准样品检测按钮 ，如图 3 窗口显示；选择进行标准样品检测并点击 ；开始测试标准样品（本次为 QS）；



图 4 标准样品检测

- ③ 检测结束后，标准样品(QS)的光谱将会显示出来；

- 点击荧光强度标准化按钮
- 输入希望标准化的波长(WL)，标准样品浓度；这次的基本波长是QS的峰波长450nm，浓度是210 μ g/L；
- 输入后，点击 ，显示出换算系数
- 点击样品检测 ，以这个换算系数为基准，自动的显示换算之后的结果
- 再次点击标准化图标按钮 ，可以变更荧光强度标准化的设定

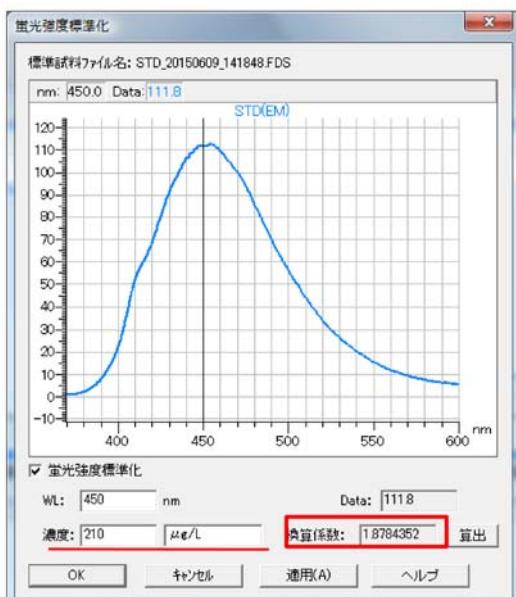


图 5 标准样品检测

三、硫酸奎宁和黄曲霉毒素的3维荧光光谱

- 使用QS对黄曲霉毒素的三维荧光光谱进行标准化；
- 确认激发波长350 nm，发射波长 450 nm的荧光峰；
- 为了避免仪器的波长依赖性，选择的标准品与待测样品的发射波长要尽量接近；并推荐使用光谱校正功能；

样品：

- ① 样品：硫酸奎宁二水和物（和光纯药株式会社）
溶剂：0.05 mol/L 硫酸溶液
浓度：210 µg/L
- ② 样品：黄曲霉毒素标准溶液(B1、BN2、G1、G2 混合溶液)（和光纯药株式会社）
溶剂：甲醇（和光纯药株式会社）
浓度：20 µg/L

分析条件：

激发侧狭缝	5 nm
荧光侧狭缝	5 nm
扫描速度	60,000 nm/min
响应	自动
光电倍增管电压	500V
光谱校正	ON
过滤器	CF35

结果：

- 不同待测样品需要选择不同的标准物质，如腐蚀物质或1-丁醇的检测，QS可作为基准来做评价；在做水中的叶绿素检测时，可用荧光素为基准；
- 由于硫酸奎宁与待测样品黄曲霉毒素的发射波长接近，所以是合适的标准样品；
- 通过三维光谱测试QS和黄曲霉毒素在450nm的荧光峰；

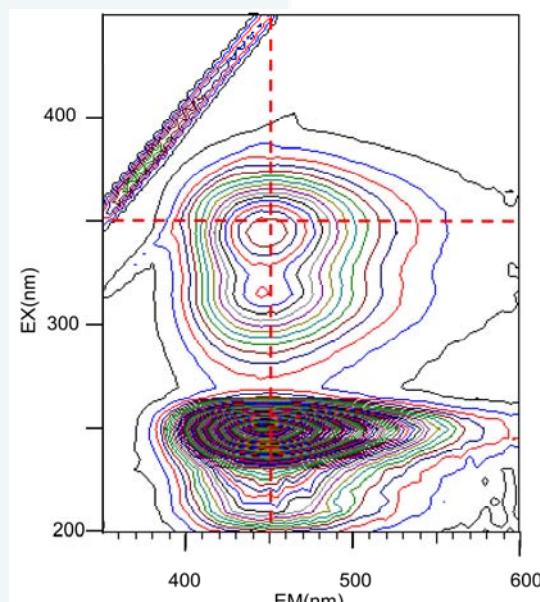


图6 QS的3维荧光光谱

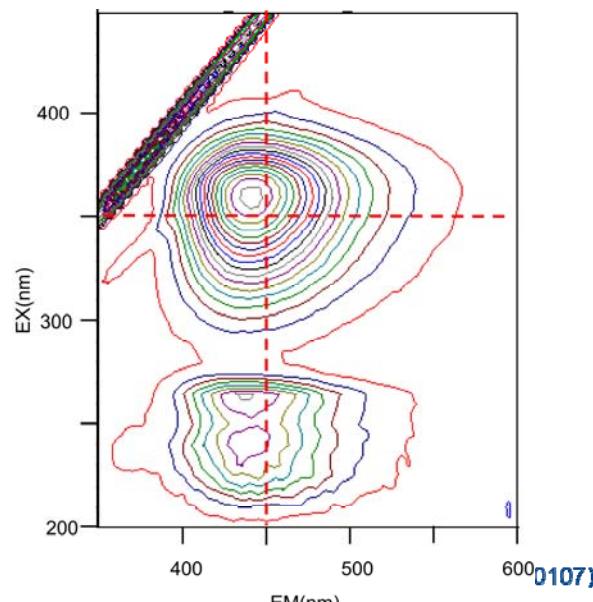


图7 黄曲霉毒素的3维荧光光谱