

荧光指纹分析法介绍

本应用旨在介绍近几年备受关注的荧光指纹（三维荧光光谱）与荧光现象之间的关系、测定方法及基础知识等。

荧光现象和三维荧光光谱（荧光指纹）

- ✓ 将不同波长的光源照射到样品上，检测化合物受光激发后发射的荧光。
- ✓ 因化合物种类和浓度不同，其激发光波长、荧光波长、荧光强度也不同。
- ✓ 使用荧光分光光度计的三维荧光光谱模式，可获取样品自身特有的荧光指纹。

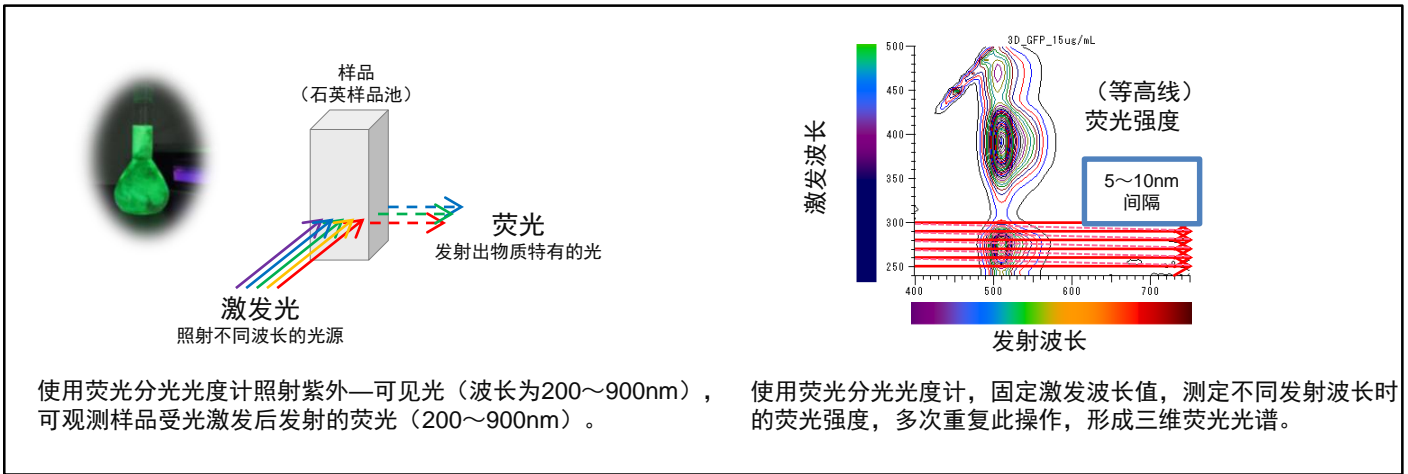


图1 荧光现象说明和三维荧光光谱测定原理

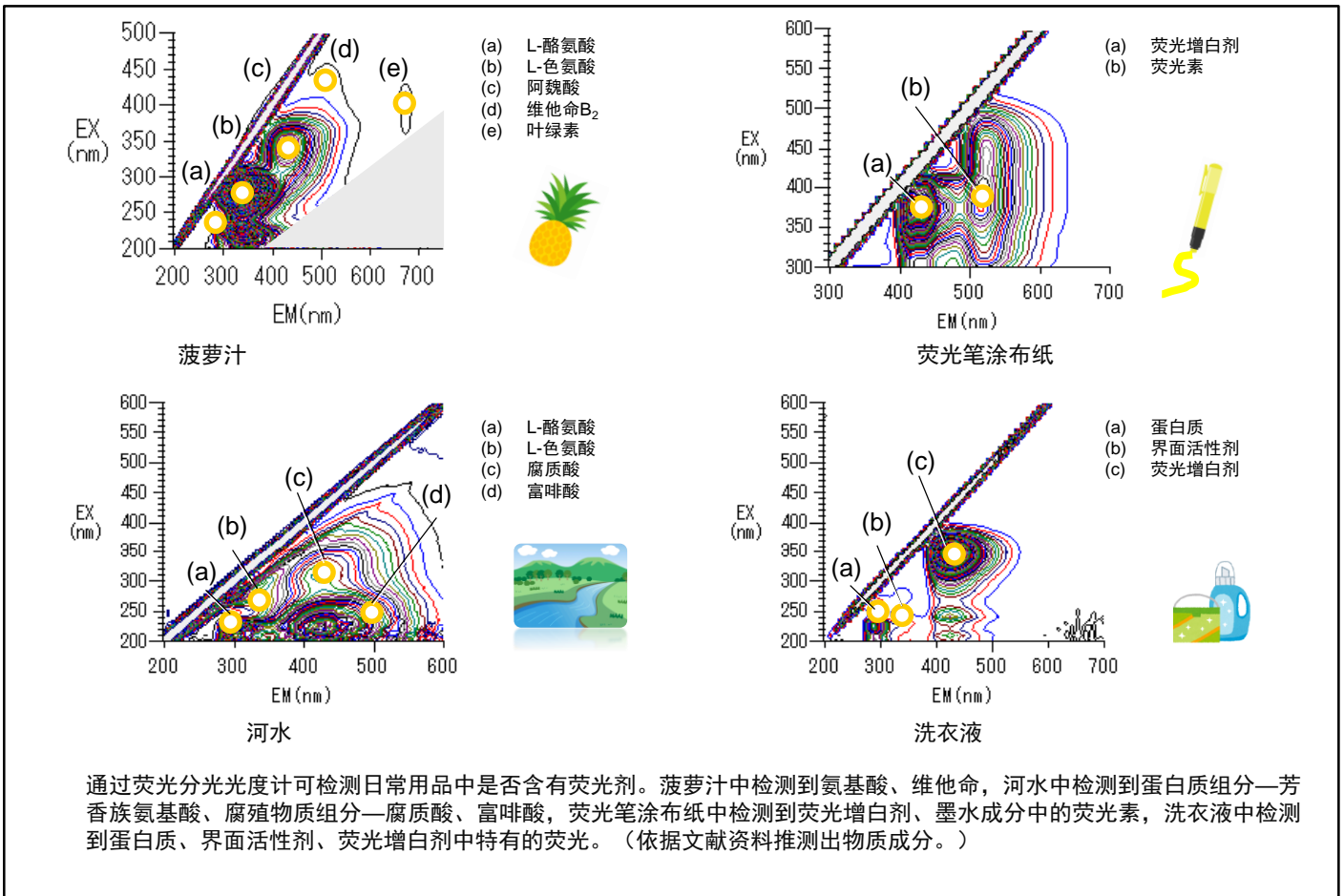
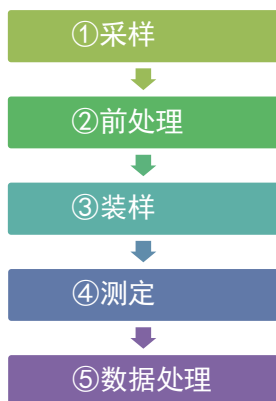


图2 各样品的荧光指纹

荧光指纹的测定步骤

■ 荧光指纹的测定步骤



① 采样

可测定液体样品和固体样品的荧光指纹。
而且还可以处理糊状、粉末、颗粒、片状等多种形态样品。

液体样品

- 溶液（低浓度）：水溶液等
- 溶液（高浓度）：油、鸡蛋、牛奶等
- 糊状：蛋黄酱、奶油等



固体样品

- 粉末：谷物粉、香辛料等
- 颗粒：大米、大豆、保健品等
- 片状（切开）：肉、果实、玻璃、塑料等



② 前处理

荧光指纹分析尽可能不进行前处理，直接对样品本身特有的荧光进行测定。
尽可能减少不必要的过滤、离心、稀释、均匀研磨等前处理操作。

液体样品

- 过滤
- 离心
- 稀释



⇒ 样品表面均匀

固体样品

- 均匀研磨：研磨机⇒臼
- 颗粒化处理：研磨机⇒药片成型机
- 切开



⇒ 无应力切割样品



③ 装样

一般将液体样品放在10mm石英材质的方形容器内，测定样品侧面发射的荧光。高浓度液体样品或固体样品需倾斜放置，以测定其表面的荧光。测定不均匀样品时，可采用积分球，提高进样重现性。

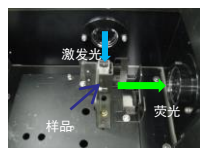
液体样品

- 溶液（低浓度）：10mm方形容器
- 溶液（高浓度）：大样品池+固体样品支架
- 浆糊：大样品池+固体样品支架

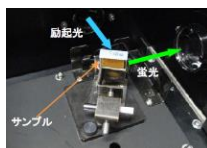


固体样品

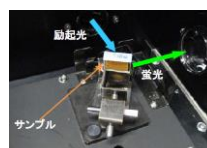
- 粉末：粉末样品池+固体样品支架
- 颗粒：大样品池+积分球
- 片状（切开）：石英板+固体样品支架



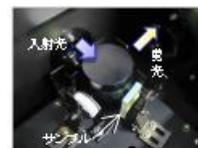
侧面测光系统



表面测光系统



表面测光系统

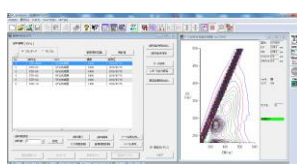


积分球测光系统

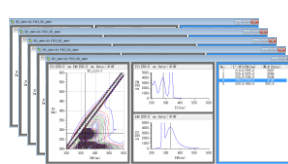
④ 测定

⑤ 数据分析

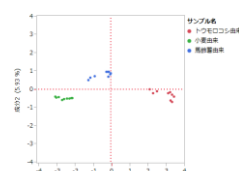
设置测定条件，在样品信息列表内输入样品名称等。然后，系统将根据列表信息进行测样。最后，使用多变量分析软件分析测定数据。



样品测定



测定数据



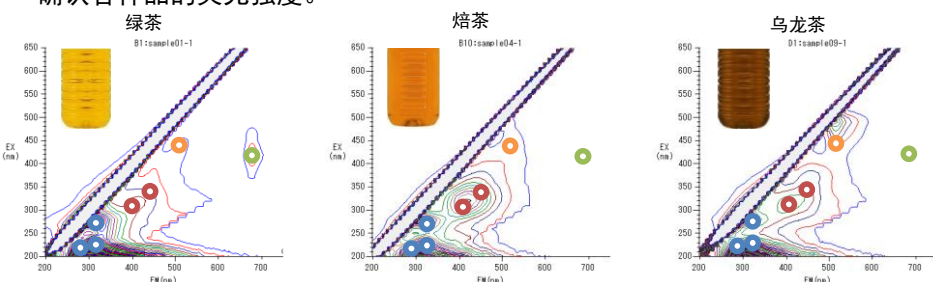
数据分析

采用荧光指纹进行多变量分析的应用实例

- ✓ 根据样品列表信息，对多个样品进行测定。多变量分析法可用于品质和工序管理。
- ✓ 使用多变量分析软件可一次性输出所有荧光指纹数据。
- ✓ 利用多个样品的荧光指纹，进行样品分类和产品合格判定。
- ✓ 通过读取模型系数，计算出测试过程中的多变量函数值，测试后可立即判别产品是否合格。

茶叶的荧光指纹分析得出的分类结果（主成分分析）

向微孔板分别加入300μL茶样品，通过EEM Multi系统扫描并自动生成荧光指纹。确认各样品的荧光强度。



- EX/EM
- 210/270
 - 220/315
 - 280/315
 - 310/400
 - 360/450
 - 410/675
 - 470/515
- 含氨基酸
 - 含阿魏酸
 - 含维生素B₁₂
 - 含叶绿素

茶叶工艺对比

工序	绿茶	焙茶	乌龙茶
发酵	—	—	△ (半发酵)
蒸	○	○	○
揉	○	○	○
干燥	○	○	○
烘焙	—	○	—

图3 每种茶叶的荧光指纹

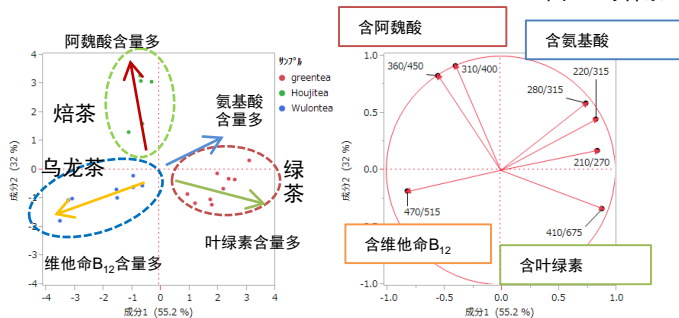


图4 多变量分析（主成分分析）结果

要点

根据茶叶特有的荧光成分检测荧光指纹。然后，利用多变量分析的主成分分析法处理荧光指纹数据。将荧光光谱中变化显著的波长作为主成分值（成分1、成分2），直观对比各工序的成分变化。这里，X轴表示氨基酸、叶绿素含量，Y轴表示阿魏酸含量。由此可知，绿茶的主要成分是氨基酸、叶绿素；焙茶的主要成分是阿魏酸；乌龙茶的主要成分是维生素B₁₂。这种方法对于工序的管理、相似产品的判别以及测试结果的判断尤为重要。

橄榄油的等级判定（判别分析）

目前市场上，以普通橄榄油冒充萃取橄榄油事件屡见不鲜。橄榄油中可检测到过氧化物（红圈）和叶绿素（蓝圈）的荧光指纹。利用多变量分析法分析这些荧光强度值，以区分普通橄榄油和萃取橄榄油。

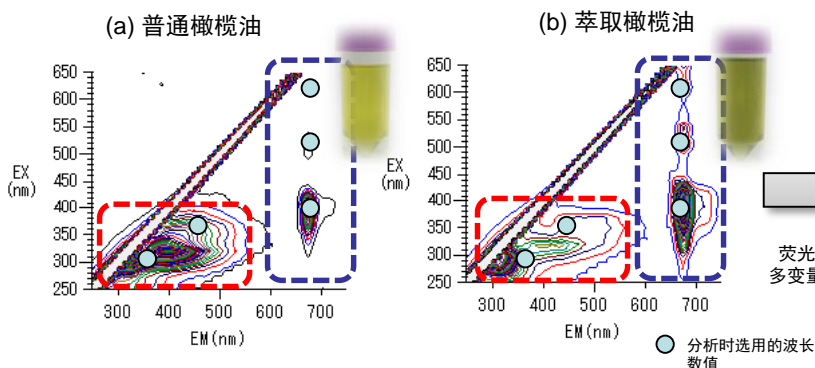


图5 橄榄油的荧光指纹

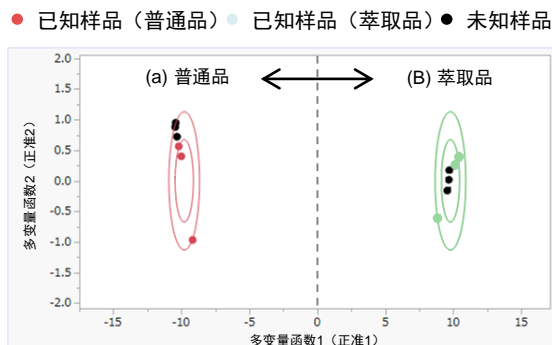


图6 多变量分析（判别分析）结果

要点

使用多变量分析软件读取已知样品的测试结果，计算出模型系数。通过EEM辅助软件读取模型系数后，再测试未知样品，可自动判别样品是否合格。图上的每个点代表各样品的荧光指纹数据。这里，多变量分析结果（计算数值）为正数时，样品为萃取橄榄油，负数时为普通橄榄油。

EEM[®] Basic ~自动滤光器附件~

- ✓ 标准配置F-7100荧光分光光度计的基础上加装自动滤光器附件。
- ✓ 每个样品仅需2~3分钟左右即可获取荧光指纹。

■ 仪器外形



自动滤光器附件



F-7100荧光分光光度计

■ 系统组成示例

- 〈主机〉
F-7100荧光分光光度计
- 〈选配件〉
 - 自动滤光器附件
 - 固体样品支架
- 〈选配程序〉
 - EEM辅助程序
 - 专用分析软件

EEM[®] Multi ~微孔板附件~

- ✓ 通过使用微孔板附件，可支持连续测试多个样品的荧光指纹。
- ✓ 测量液体样品时，可使用微孔板连续对96个样品进行测试；测量粉末样品时，可根据粉末样品操纵盘连续对18个样品进行测试。

■ 仪器外形



96孔微孔板



粉末样品操纵盘



F-7100荧光分光光度计
(配置微孔板附件)

■ 系统组成示例

- 〈主机〉
F-7100荧光分光光度计
- 〈基本选配件〉
 - 自动滤光器附件
 - 微孔板附件
 - 粉末样品操纵盘
- *向自动分析用取样量杯(0.25mL)倒入粉末样品。
- 〈选配程序〉
 - EEM辅助程序
 - 专用分析软件

EEM[®] Direct ~光纤附件~

- ✓ 使用光纤附件，可直接测试不能放进样品仓内的特殊形状样品或大型样品。
- ✓ 光纤发射出的激发光点仅约5mm，可对微小面积进行测试。

■ 仪器外形



样品安装位置



F-7100荧光分光光度计
(配置光纤附件)

■ 系统组成示例

- 〈主机〉
F-7100荧光分光光度计
- 〈基本选配件〉
 - 光纤附件
- 光纤：带1根双分支光纤(2m)
测定波长范围：250~700nm (使用R928F时 250~800nm)
- 强度规格：固体样品架的荧光比例 1/100及以上
- 〈选配程序〉
 - EEM辅助程序
 - 专用分析软件

【KEY WORDS】

荧光分光光度计、F-7000、F-7100、F-2700、洗涤剂、橄榄油、荧光涂料、食用油、多变量分析、主成分分析、判别分析、PARAFAC、荧光指纹、EEM、Excitation Emission Matrix

* “EEM”是日立高新科学公司在日本的注册商标。

* “JMP”是美国SAS Institute公司在日本和其他国家的注册商标。