

(4073) 螢光光譜法—原理與實作

1. 原理

發出螢光之程序包含兩個步驟：先進行光線之吸收接著發射出螢光。（註：通則中使用之大部分術語可在「6.附錄：定義」中找到解釋。）螢光光譜為與紫外光-可見光-近紅外光吸收光譜相關之電子光譜法，其與拉曼光譜相似不需要量測背景值，樣品吸收能量後會發射出所有方向之光線。樣品分子經由吸收光子後會促使其電子躍遷至激發態，而激發態之電子則可經由釋放出光子回到基態，此光子之發射為“允許”的電子躍遷，即稱為螢光，這種狀態一般具有相當短的生命期（約1奈秒到10奈秒之間）。若光子之發射為“不允許”的電子躍遷，稱為磷光，這種狀態一般具有較長的生命期（約1毫秒到1秒之間）。在同樣條件下進行時，磷光強度一般比螢光弱。本篇通則討論的是螢光光譜，但文中提到許多內容也可應用到磷光。螢光光譜之基礎概念已經完整的建立了，但是其應用及標準化仍然在持續的擴展及進步，故螢光光譜法是個在發展中的方法。

最常見的螢光樣品是稀釋、透明之溶液，遵照比爾-蘭伯特定律（Beer-Lambert law）吸收光線，再發射出與樣品濃度、吸收率、螢光物質或螢光團之螢光量子產率成比例之螢光。一般的螢光光譜儀同時具有激發光及發射光之波長選擇器，在收集光譜時會固定其中一者之波長再使用另一個選擇器於一個範圍內進行波長之掃描。當激發波長固定，並掃描發射光波長時所得到之光譜稱為發射光譜，而固定發射波長並進行激發波長掃描時得到之光譜稱為激發光譜（圖1）。螢光光譜是以波長為橫軸，相對強度或螢光光子計數為縱軸所繪製而成，其外觀與紫外光-可見光-近紅外光吸收光譜相當類似。實際上對於在溶液中之有機染劑來說，於相同波長範圍內其激發光譜形狀或輪廓，常與其吸收光譜相同。

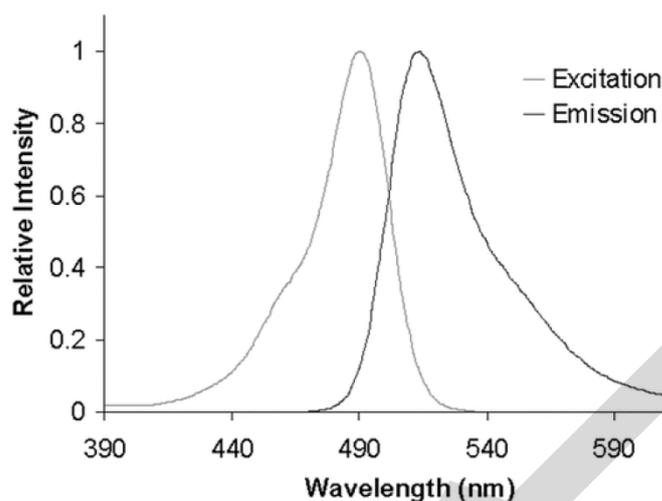


圖1 螢光黃試劑在硼酸鹽緩衝液中之螢光激發及發射光譜，從波長軸可見激發及發射波長。

多原子螢光團在緻密介質中（例如：室溫下之溶液、薄膜及固體）會使得其電子基態或激發態具有分布很廣的振動能階，進而導致激發及發射光譜產生均勻譜線增寬之現象；而在緻密介質中會有微環境或殼層包覆在螢光團四周，每個螢光團間之殼層結構差異便會導致非均勻譜線增寬。這兩種譜線增寬之現象導致螢光光譜相對於某些光譜來說譜線更寬（例如：中波段紅外光或拉曼光譜），標準的螢光譜線寬度在10奈米到100奈米之間。一旦多原子螢光團之電子受到激發，在發射光子之前該基團會經歷振動鬆弛，導致螢光光譜相對於其被激發之波長發生紅移或斯托克斯位移（Stokes shift）。

自然界中少有生物物質具有很強的螢光性質，然而在一系列用於與離子結合、指示pH值或極性螢光指示劑之發展過程中，研究者們對於使用直接或間接螢光技術之興趣逐漸提高（例如：螢光共振能量轉移），許多螢光探針本身不具有很高的量子產率，但可藉由與其他物質結合或溶液化學之控制來大幅改變螢光性質。例如樣品溶液之pH值便是一個影響螢光之重要因素，除了會影響探針之螢光性質也會影響其他跟螢光染劑結合物質之潛在螢光性質。部分螢光探針，例如螢光黃（與pH值相關）及玫瑰紅與其衍生物具有很高的吸收力且量子產率接近於一（這些探針發射之螢光中其光子數量與其吸收的幾乎相同）。螢光方法因為只有很少量之激發光會達到偵測器而被稱為不需背景值之方法。這些優點讓螢光偵測之靈敏度很高，在某些例子中甚可做到單分子偵測之程度。

螢光光譜法對樣品一般而言不具有破壞性，且可以快速地完成測量（約數秒到數分鐘即可）。

測量稀薄溶液及透明樣品時，經常使用直角或 $0^\circ/90^\circ$ 之幾何構型，樣品受光線之激發後，偵測螢光為其光束 90° 角之位置（圖2a）。測量光學緻密性較高之樣品時會使用到前端面位（front-face geometry），此時激發光束會從小於 90° 角之位置入射並在不於 90° 之位置收集產生之螢光（圖2b）。落射螢光構型（epifluorescence geometry）是一個前端面位中之特例，一般被用於螢光顯微鏡及光纖螢光計。在落射螢光構型中，激發光束及螢光收集兩者皆與樣品在同側，形成一個 $0^\circ/0^\circ$ 之幾何構型。而 $0^\circ/180^\circ$ 之幾何構型，一般使用於顯微技術中（圖2c）。

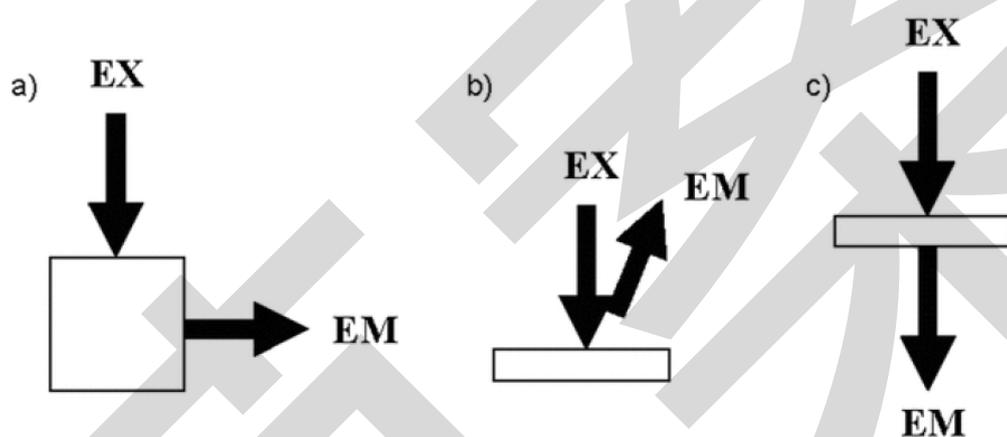


圖2 圖解激發光束（EX）及發射光偵測（EM）之位向（a） $0^\circ/90^\circ$ 直角透射、（b）前端面位（Front-face）、（c） $0^\circ/180^\circ$ 透射幾何構型

利用螢光偵測法來進行化學含量測定及篩選之方法持續在增加，導致對於螢光測量標準化之需求越來越高。目前為止只有少數幾個標準方法及參考物質已經建立完整使用方法，並可於螢光測量系統示性化中被簡便的使用。國家度量衡機構（national metrology institutes）及國際標準化組織皆致力於提供新的螢光標準物質及測量方法。本篇通則簡要論述了螢光測量儀器之使用者想要達到高品質測量結果需要注意之事項、標準方法、物質之適當使用時機及指引與建議。本篇通則之內容主要是針對非專家級螢光光譜儀之使用者所提供。

2. 儀器配置

所有現代的螢光測量法皆包含以下內容，使用從適當光線來源產生之光束照射樣品、選擇激發光波長、收集產生之螢光、去除雷

利散射光 (Rayleigh-scattered light)、選擇發射光波長及偵測螢光訊號。這些內容會在下文中與用來達到這些目標之市售儀器共同討論：

- 激發光來源
- 激發波長選擇器
- 樣品裝置
- 發射波長選擇器
- 偵測器

2.1. 激發光來源

許多燈泡、雷射光、發光二極體皆可用來當作激發光來源。持續性之光源可用於穩態式儀器；脈衝式之光源則可用於時間解析式儀器。氬氣燈因為具有相對高強度及寬廣之波長範圍（紫外光到近紅外光波段）而成為最常用之光源；雷射光具有最高之能量強度而應用於少量樣品或收集時間短之狀況，例如：流式細胞測量術或微陣列實驗。

2.2. 激發光波長選擇器

在激發光波長下之散射光強度（如雷利散射光）有可能相當接近樣品之螢光甚至大於其螢光，因此激發光之波長範圍不應與欲偵測之發射光波長範圍互相重疊。此問題在燈泡上可藉由在燈泡與樣品之間放置激發光波長選擇器來解決（例如：一個已知最大穿透波長及頻帶寬度之濾光片或單色光器），而雷射光或發光二極體其本身之頻帶寬度較低，故不需要使用激發光波長選擇器，使用選擇器也可以使螢光激發光譜能夠被解析。

2.3. 樣品裝置

樣品裝置包含全部光學及其他設備，這些設備之功能用於傳遞激發光束至樣品、收集樣品之發射光、將樣品固定等，擺放樣品之裝置包含光析管、微孔盤、微陣列、顯微鏡玻片及流動系統。此裝置常會搭配各種光線傳遞及收集之系統，包含傳統透射系統、前端面位系統、落射螢光系統及光纖探針。

2.4. 發射光波長選擇器

發射光波長選擇器與激發光選擇器相似，可以確保偵測到之發射光波長區域不會與激發光波長有重疊之現象。此方法在有多個螢

光譜帶時使得個別之譜帶可以被偵測到，進而解析螢光發射光譜，發射光波長選擇器還有一個重要功能便是用於去除雜散光。濾光片、單色光器、光柵分光儀皆常用作發射光波長選擇器。

2.5. 偵測器

光電倍增管或電荷耦合器件陣列一般會安置於發射光波長選擇器之後，以偵測發射光。若要監控激發光束之強度則會於樣品前面設置量子計數偵測器或光電二極體，此裝置會將小部分激發光束分離並進行監測。

3. 影響定量之因素

3.1. 儀器因素

螢光儀器之測量需要事先設定許多儀器參數，如波長、頻帶寬度、檢測器增益等，這些參數之設定都會因使用之儀器差異而有不同程度之再現性及準確度。當需要比較不同儀器之測量值時，這些因素導致之測量偏差就變得相當重要。例如測量出兩個分析物之發射譜帶之波峰位置在不同儀器中可能會因為波長偏差而有差異。在不同儀器間之相關偏差可能是導因於兩個特定發射波長之螢光強度比例。

激發光束之強度會因為下列因素而隨著激發波長或時間有重大之變化，包含光源強度、激發光波長選擇器之穿透性、光源強度隨時間之相依性。因此分析者應該要監測激發光束之強度，並依照這些變化對於測量到之螢光強度進行修正，尤其是在收集激發光譜時此項監測就變得特別重要，因為使用如氙（Xe）燈類之光源時激發強度圖譜上常常會出現很尖銳之波峰或波谷。

偵測系統之結果不會在所有強度下都呈現線性，故分析者應該要知道此系統之線性範圍，大部分偵測系統其線性範圍都是由偵測極限一直到增加強度就會增加非線性結果的界限強度為止。分析者應該要在校準螢光檢測系統之反應度（responsivity）之前建構出該系統之線性範圍。

偵測系統之反應度也會導因於發射光波長選擇器穿透性之波長相依性及偵測器本身之反應度，這些因子都會影響測量出來之發射光譜形狀。

光柵之繞射效率及偵測器之反應程度常與極化性有關，改變儀器

之極化設定會造成激發強度及偵測系統反應度之改變，即使在設備中沒有使用偏光鏡，激發光束本身也可能會被光學系統極化並且影響偵測系統之反應度，但這些性質是因設備而異的。除此之外發射光極化之影響不只會造成強度變化，也會導致光譜校正因子（spectral correction factor）之改變。

讓多個波長通過繞射光柵可以使螢光光譜之波峰變得相當尖銳，因此入射光應該在期望之波長進行繞射，可用一個光柵方程式依入射光設定光柵之角度：

$$m\lambda = d(\sin \alpha + \sin \beta), m = 0, 1, 2, \dots$$

m ：繞射級。

d ：光柵上之溝槽空間。

α ：入射光波前相對於光柵垂直線之角度。

β ：繞射光波前相對於光柵垂直線之角度。

$m\lambda$ 值是固定的，其中 m 是一個稱為繞射級之整數，因此光柵方程式可以在單一光柵位置填入超過一個波長。舉例來說，如果有一個在發射光單色光器之光柵被設定為在繞射一級時通過500奈米之光，其也會在繞射二級通過250奈米之光。故除非在光束中插入一個合適之光學濾光片，否則250奈米之激發光束中之散射光也會在測量時被視為500奈米發射光波長之波峰。

3.2. 樣品因素

因光學緻密樣品（例：在光徑1公分時吸收度 $A > 0.05$ 者）會顯著的吸收激發光束及／或發射光（再吸收），造成其螢光強度不會呈現線性增加。這些內濾效應（inner filter effect）會強烈的減少到達偵測器之螢光量，尤其是在使用直角透射構型之情況。螢光強度會受到樣品位置及光學構型之影響，若使用更高之樣品濃度，螢光團常常會聚集在一起導致其螢光光譜之形狀變得與稀薄樣品時不同，也會出現非線性之現象。

樣品之螢光強度會因為光漂白及光降解而隨著暴露至光源之時間增加而減弱，這狀況在廣泛作為螢光探針使用之有機染劑中特別容易發生，因此分析者們應該要限制樣品暴露至光源之時間來得到具有再現性的螢光強度，在某些狀況下須獲得具有再現性的光譜形狀。

螢光強度具有溫度相依性質，一般來說若在溶液中碰撞淬滅等螢光淬滅過程之速率會隨著溫度而增加並且導致螢光強度之下降，可以使用特定螢光團螢光強度之溫度係數來校正此溫度相依性。

就激發光之極化作用而言，樣品吸收之偶極躍遷指向會對於樣品吸收及螢光強度產生相依性。螢光之極化現象與螢光物質發射光之偶極躍遷方向相當近似，同時也與螢光物質發射光之偶極躍遷指向十分相近。螢光異向性 (r) 常被用於描述發射光極化之現象，並且由以下公式定義：

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

I_{\parallel} ：當螢光計之發射光極化器其方向與被極化之激發光方向互相平行時觀察到之螢光強度。

I_{\perp} ：當螢光計之發射光極化器其方向與被極化之激發光方向互相垂直時觀察到之螢光強度。

當一個樣品螢光團之指向是非隨機的且旋轉週期長度與螢光生命期相近時便會發射出異向性螢光，光譜之形狀及強度會跟觀看之角度及設備之極化因子相關。

螢光團之螢光強度、波峰位置及光譜形狀有時候會受到環境影響，這些影響包括溶劑之選擇、溶液之酸鹼值或螢光團鍵結之物質等，以上這些因素在進行新的實驗方法設計時都應該考量，同時也要注意基質之使用是否符合參考物質及未知物質之需求。

拉曼訊號會在螢光光譜造成波峰之出現，最常見的是由樣品溶液或基質所造成。例如：水的拉曼波峰會從選擇的激發波長處紅移至 3382 cm^{-1} ，此現象一般會在受到紫外光或藍光激發之水溶液之螢光光譜出現。

4. 螢光儀器校正

一共有兩種螢光儀器校正方法可以使用。第一種也是最常見的需用於特定之分析物，可決定儀器（螢光強度）之反應及特定分析物數量間之關聯性。第二種與分析物無關，其目標是用於校正光譜儀器，在此方法中發射光及激發光之波長準確度及偵測系統之光譜反應性會在儀器整體或連續部分之波長範圍內進行校正。

4.1. 分析物濃度—校正曲線

儀器反應(螢光強度)與分析物濃度間之校正曲線是使用包含待測分析物之參考物質決定的,例如:一系列不同濃度之已知分析物溶液其螢光強度可藉由選擇適當濃度範圍後與其相應之螢光值進行繪製,此結果一般來說可帶入多項式後繪製出一條直線。最後得到之校正曲線只能用於特定分析物及分析儀器上,該曲線可用來決定未知樣品之分析物濃度,若參考物質及未知樣品螢光團周圍之微環境不同,則此校正結果可能不準確。因為一般使用的有機染劑經常具有光漂白之性質,校正時需確保樣品在進行激發及測量時之結果具有良好再現性,且螢光量不會隨著時間減少。

在一些狀況下,可能無法使用適當參考物質來配製已知濃度之校正樣品。首先作為螢光探針之有機染劑常常無法買到足夠用於製備參考溶液之純度品質;其次,若螢光團鍵結到大分子、細胞或微珠上,螢光團在溶液或懸浮液中之濃度會相當難以測定,此情況下可改用等溶性螢光基團(molecules of equivalent soluble fluorophore, MESF)來製作校正曲線,以定量特定分析物之螢光強度。

4.2. 發射波長及光譜狹縫寬度

許多參考標準品被指出可用於測定發射波長之準確度,包含原子燈及無機或有機之螢光團。最廣泛使用且具有最佳特性的是低壓原子燈,一般被稱為筆燈,其種類之選擇(例如:汞、氬等)是以其輻射出之原子線不超過所需之波長範圍來決定。原子燈會放在樣品位置使得光線在儀器偵測系統光徑之中間,若燈的位置沒有擺放正確則此方法之準確度可能會下降。發射光波長選擇器-偵測器會測量在選擇波長範圍內之訊號,接著比較測得尖峰之波長位置與已知波長位置來計算波長準確度。

發射光波長選擇器之光譜狹縫寬度準確度,可藉由測量筆燈單一原子線之光譜頻帶寬度(定義為最高波峰之半高寬)來確認,對於有激發單色光器及發射單色光器之螢光光譜來說,當其中一個單色光器之掃描位置蓋過另外一者時,可使用替代方案。

4.3. 激發波長及光譜狹縫寬度

許多用於測定發射波長準確度之參考樣品也可適用於激發波長準確度,例如:筆燈可置於激發光源位置,故激發光波長選擇器

可經由使用儀器之參考偵測器得出光譜。在測量激發光波長時因為其訊號相對來說較弱，會導致可使用之原子線數量受到限制，故其位置選擇之重要性比發射光波長準確度測量來得高。

發射光波長選擇器之準確度一旦被確定，便可在樣品位置使用擴散式散射物質（例如：散射溶液或漫反射體）來散射一部分之激發光束進入偵測系統，進而測定激發波長之準確度。其中一個選擇器固定波長，另一個則不斷微調成相同波長以得到光譜，兩個波長選擇器間之波長偏差會與設定波長位置及收集光譜中波峰位置間之差異相同。許多其他方法會受限於選擇之參考物質，使得只能使用數量有限的激發波長，此方法則可用於任何波長進行測量。測量發射光波長選擇器之光譜狹縫寬度準確度所使用之方法，也可應用於測量激發光波長選擇器之光譜狹縫寬度準確度。

4.4. 偵測系統之線性

用於測定偵測系統線性強度範圍之方法，可依照達到偵測器之光源強度區分成三種：雙孔洞法、光學濾光片及／或極化器法、螢光團濃度法。雙孔洞法是最完整，當正確操作時應該是準確度最高之方法，但也是最難進行之方法。另外在文獻中有許多使用濾光片、極化器或結合兩者使用之方法，這些方法需要高品質、昂貴材料及專家操作才能達成。螢光團濃度法是最受歡迎且最簡便之方法，此法使用一系列序列稀釋螢光儲備液得到之溶液來測定，這些溶液應該要與用於獲得分析物濃度校正曲線之溶液性質相近，分析者在使用此方法時應使用低濃度之溶液（於光徑為1 cm 光析管獲得之吸光值 $A < 0.05$ ），然而在極低濃度下可能會因光析管壁吸附螢光物質而影響測量結果。因一般使用之有機染劑經常具有光漂白之性質，校正時要確保樣品在進行激發及測量時之結果，具有良好再現性且螢光量不會隨著時間減少。

4.5. 訊號強度（相對發射光）

當不同發射波長之強度比率相近，或必須得知發射光譜之真實形狀，或最大波峰位置時，必須使用發射波長來校正發射光偵測系統之相對反應率（也稱作發射光譜校正）。因為偵測系統之相對光譜反應率會因其波長範圍而有很大的變化，進行校正便成為必要的事前工作（圖3）。分析者應該要知道進行正確定量所需要光度精確性之程度。偵測系統之線性範圍須於進行此校正前先進

行測定，如此才能進行適當之步驟（例如：使用衰減器），以確保所有在進行校正時測出之強度皆在線性範圍之內。當使用發射光極化器時，發射光譜之校正則會與極化器之設定有相依性。

校正光度反應率時有兩個方法可以使用：（方法一）使用校準來源（calibrated source，CS）之光、（方法二）使用檢定參考物質（certified reference materials，CRMs），兩方法得出結果之標準皆來自國家度量衡機構（national metrology institute）。方法一常使用校準白色鎢光光源，此光源可包含從350 nm至近紅外光之波長範圍；方法二則可使用美國國家標準技術協會提供的標準參考物質或者德國聯邦材料研究與測試機構（German Federal Institute for Materials Research and Testing）提供的檢定參考物質。文獻中也曾報告可使用一些常見之染劑來校正發射光譜。方法一相對於方法二在執行上更加困難，並需要定期對來源校正過之光源進行重新驗證。方法三則是使用校準偵測器及校準漫反射體，此方法相對於前兩方法有較高之不確定性，但在前兩方法未包含之紫外光及近紅外光範圍則建議使用方法三來測定。

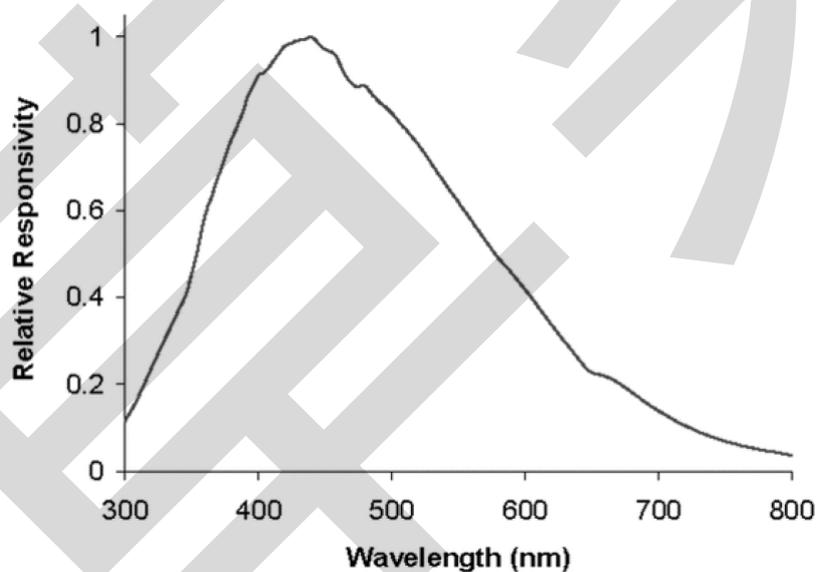


圖3、發射光偵測系統（光電倍增管之光柵的單色光器）之相對光譜反應率之例子，欲得到真實之光譜形狀（相對強度）則必須進行發射光譜之校正。

方法一—

進行方法一之測量時，分析者將校準來源放在樣品位置，再將光源導入發射光偵測系統中。若校準來源過大而無法放在樣品位置，

可改成在該處放置校準漫反射體 (CR)，以將校準來源之光反射進發射光偵測系統。接著使用與測量樣品時相同之發射光波長選擇器掃描欲測量之範圍，以收集訊號通道輸出值 (S'')，校準來源入射於偵測系統上之輻射量 (L) 可用於計算相對校正因子 (C_{CS})，計算公式如下：

$$C_{CS} = L/S''$$

C_{CS} ：相對校正因子。

L ：校準來源入射於偵測系統上之輻射量。

S'' ：訊號通道輸出值。

校正過之發射光強度會與樣品及相對校正因子之訊號輸出值相等。

方法二—

進行方法二之測量時，分析者將螢光標準品放在樣品位置，收集完光譜後再依據附帶檢定書之指引將其與檢定光譜作比較，如此便可取得儀器之光譜校正因子。

方法三—

方法三之測量包含兩個步驟：步驟一會在樣品位置使用校準偵測器 (calibrated detector, CD) 測量激發光束之流量以作為激發光波長之函數，步驟二使用校準漫反射體來反射已知比例之激發光束流量進入偵測系統。假設測量儀器呈現 $0^\circ/90^\circ$ 幾何構型，則可把校準偵測器放在 45° 角之位置，接著於進行訊號輸出及參考值輸出時，對激發光及發射光波長選擇器進行欲測量發射區域之同步掃描，此方法可以讓分析者計算相對校正因子。相對於方法一及方法二，此法具有較大之不確定性且較難以進行。

4.6. 參考訊號強度 (相對激發光)

當分析者欲比較不同激發波長之強度比率，或必須得知激發光譜之真實形狀或最大波峰位置時，必須用激發波長來校正激發強度，才能得到確實之定量結果。此校正之進行是相當重要的，因為樣品激發光束之相對光譜流量會在其波長範圍中有很大的改變(見圖4)，忽視激發光強度校正因子，會產生比忽略發射光校正因子還要大之錯誤，幸好許多螢光儀器有內建參考偵測系統以監控激發光束之強度。此監控一般使用光電二極體、光電倍增管、電

荷耦合器件或量子計數偵測器來測量激發光之一部分，收集到的參考訊號便可用於校正激發光強度所導致之螢光訊號波動。參考偵測器一般不會用來校正激發波長，因在較長之激發波長範圍（例如：大於50 nm）或在激發強度隨著激發波長改變而快速變化之波長範圍內（例如：紫外光區域），其誤差會變得過大而無法正確測量。當使用激發光極化器時，激發光譜之校正則會與極化器之設定具有相依性。

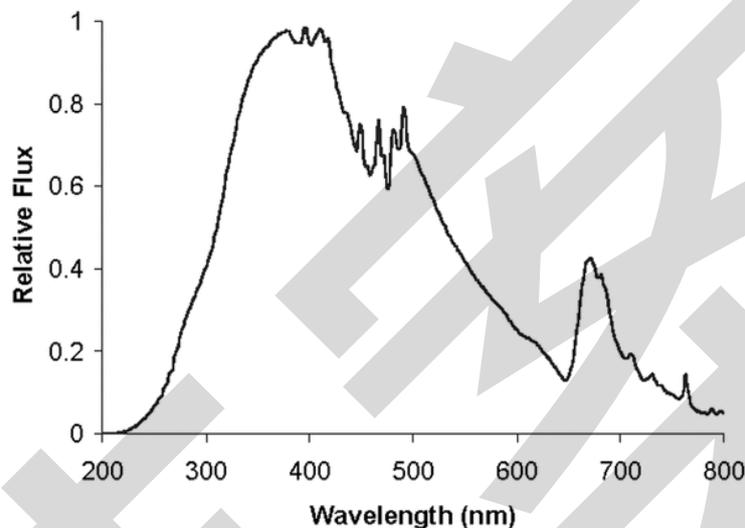


圖4、激發光束（氫燈光柵單色光器）產生之相對流量之例子，為了得到真實光譜形狀，在測量激發光譜前須先進行校正

當儀器沒有內建參考偵測器時，便需要對參考通道進行光譜校正或對激發光強度進行獨立光譜校正。共有三個方法可用來進行激發光強度之光譜校正：校準偵測器（方法一）；校準漫射光器（方法二）；量子計數器（方法三），後兩法使用儀器之螢光偵測系統作為偵測器。

在方法一及方法二中，偵測器及漫射光器要在以波長為函數之狀況下，對於反應率及反射率進行校正。在方法二中，激發光波長選擇器及發射光波長選擇器要同步進行掃描，發射光通道（參見4.5. 訊號強度（相對發射光））之光譜校正結果則應該使用於強度測量。方法三只能在量子計數器之有效波長範圍中，在此範圍其反應與波長無相依性。方法一使用之校準偵測器相對於另外兩個方法之告誡較少，其校準偵測器會放在樣品位置，接著使用與測量樣品相同之儀器設定，透過波長選擇器在欲測量之激發光區

域進行掃描，得到之數值，便可以與激發光波長形成函數關係。校準偵測器之反應率可用於計算激發光束之流量，若儀器之參考偵測器被用來跟校準偵測器同時測量激發光束之強度，則可以同時計算出參考偵測器反應率之校正因子。

4.7. 強度及靈敏度

偵測系統測量出來之螢光訊號絕對值，不只與樣品本身有關，也與給予樣品之激發光強度及儀器光學構型有關。因此任何樣品與儀器無關之螢光強度，或以樣品強度或偵測器測量方面來看的偵測系統絕對反應性相對於激發光強度來說，其測量是相當困難的。

校正儀器絕對強度最準確之方法是使用傳統的標準品法，例如將校準光源或校準偵測器結合校準反射器使用，這些方法需要使用者具備足夠知識及技術，且一般年度性驗證及重新驗證花費皆相當高，除此之外，這些標準品經常很大量且難與許多儀器相容，因此大部分研究者會使用較簡便之替代標準品及方法。

其中一個方法是使用校正曲線或等溶性螢光基團單元，將螢光訊號及分析物濃度間之關係連結起來(參見4.1. 分析物濃度—校正曲線)；另一個方法是測量標準品之訊號強度，此測量值可預期在相同條件之下能得到相同的螢光強度。

有機染劑(例如做為螢光探針者)一般不適合當作強度標準品，因其光漂白性、穩定性及可再現濃度皆可能有問題，若要使用有機染劑則應該選擇國家度量衡機構製造之純度高及架儲期明確之產品，並且只能進行單次使用(分析者於每次測量時皆應使用新配製之溶液)。

較好之替代方案是使用即使暴露在光下也不會隨著時間而性質改變之螢光樣品，例如具有良好光穩定性、光譜性質及長架儲期之市售螢光無機玻璃。此物質可藉由使用特定之實驗參數(例如帶寬、激發光強度、溫度)測量於建議範圍內固定波長之螢光訊號，以得到準絕對強度比例尺(quasi-absolute intensity scale)。

螢光儀器之靈敏度可藉由測量強度標準品之螢光訊號訊噪比來決定，水的拉曼譜線常用於測量靈敏度，但拉曼訊號強度只有在紫外光範圍才足夠用於測量。分析者可使用有機染劑溶液來測量儀器靈敏度或偵測極限。

列舉於此之方法所得到之準絕對強度比例尺，在具有相同光學幾何構型、設計、設定之儀器中應該要與儀器不具有相依性。這些測量結果可用來比較不同螢光儀器之靈敏度，但比較過程應該要謹慎地進行，因為可能會包含相對大及難以定量之不確定性。

5. 程序確效

使用螢光來校正分析程序，必須在特定、可接受之不確定性下進行。儀器驗證一般是此程序之一部分，同時可能也包含儀器校正，分析者同時應該考慮樣品相關之誤差（參見3.2. 樣品因素），這些誤差可能導因於濃度、異向性、光穩定性及樣品形狀，這些因素與儀器光學構型之影響互相結合，所有可預期之誤差皆應被定量，並結合在一起以得到加總估計誤差，此值必須小於方法特定、可接受之極限值。

6. 附錄：定義

吸收率 (a) — 入射光穿透樣品時輻射吸收之測量值，可用以下分數來表示

$$A/bc$$

A ：吸收度。

b ：光徑 (cm)。

c ：濃度 (mg/mL)。

此值等同於由國際純化學和應用化學聯合會 (IUPAC) 所定之比吸收係數 (specific absorption coefficient)。

吸收係數 (α) — 根據布格定律計算入射光穿透樣品時之輻射吸收。

$$I/I_0 = e^{-ab}$$

I ：穿透強度。

I_0 ：入射強度。

e ：自然對數底數。

a ：吸收率。

b ：光束穿過樣品之光徑。

註：穿透度之公式為 $T = I/I_0$ ，而吸收度之公式為 $A = -\log T$ 。

比爾-蘭伯特定律 (又名比爾定律或比爾-蘭伯特-布格定律) — 在

沒有其他物理或化學因子存在時， A_λ 與輻射通過之光徑 b 及物質在溶液中之濃度 c 成正比。

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda cb$$

ϵ_λ ：莫耳吸收率。

c ：溶質濃度 (M/L)。

b ：光徑 (cm)。

校準偵測器 (CD) — 一個光偵測器，其對於某相關物質之波長與反應率之函數已經確定。

校準光源 (CS) — 一個光源，其對於某相關物質之波長與輻射值之函數已經確定。

校準漫反射體 (CR) — 一個蘭伯特反射器，其對於某相關物質之波長與反射值之函數已經確定。

檢定參考物質 (CRM) — 帶有欲得知特性之物質，其測量值及與其相關物質應經過標準化團體或組織驗證。其為「一個具有權威單位所核發文件之參考物質，並在相對應之不確定性或溯源性下使用有效程序所得到的一個或多個特定性質。」

擴散式散射物質 — 一個會將光線散射往多個方向之物質，其中包含了具有蘭伯特性質之漫射光器及不具有蘭伯特性質之散射溶液。

螢光異向性 (r) — 一個螢光極化程度之測量值。

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

I_{\parallel} ：當螢光計之發射光極化器其方向與被極化之激發光方向互相平行時觀察到之螢光強度。

I_{\perp} ：當螢光計之發射光極化器其方向與被極化之激發光方向互相垂直時觀察到之螢光強度。

螢光譜帶 — 在螢光光譜上之一個區域，在此區域中螢光強度會達到最大值，且一般會符合不連續之電子躍遷狀態。

螢光生命期 — 一個用來描述樣品組成之螢光強度隨著時間衰減之參數。若一個樣品之螢光衰減符合一級動力學，則此值即為其螢光強度及相應之激發態分子數減少至初始值 $1/e$ 所需要之時間。

螢光量子效率 — 離開發射器之螢光光子數量與被吸收光子數量之

比值。

螢光量子產率 (ϕ) — 當一個分子或物質在吸收一個光子之後會放出螢光之可能性。此為物質內生性之性質，一般使用樣品放出螢光之分子數量與於吸收分子數量之比值表示。螢光量子產率之數值範圍從0（沒有分子放出螢光）至1（理論上所有吸收輻射之分子皆放出螢光之最大值）。

流量（或稱輻射流量）— 輻射能量之傳播速率，一般以瓦特（watts）為單位。光譜流量為每個單位光譜頻帶寬度之流量，一般以（watts/nm）表示。

光柵方程式— 此方程式描述繞射光角度與入射光柵上波長間之關係。

$$m\lambda = d(\sin \alpha + \sin \beta)$$

m ：繞射級。

d ：光柵上的溝槽空間。

α ：入射光波前相對於光柵垂直線之角度。

β ：繞射光波前相對於光柵垂直線之角度。

內濾效應— 過度吸收激發光束或樣品本身對發射光之再吸收，導致所測量到量子效率下降之現象。此效應會導致測量到之量子效率會與樣品吸收度、濃度、激發光徑長度及發射光徑長度具有相依性。

強度— 電磁能量之測量值，此定義值可視為與光偵測器之訊號輸出或樣品流量或光源流量相同或直接成比例。在輻射計量學中更常使用之精確定義為：從點源產生之每單位立體角輻射流量，單位一般用瓦/立體弧度（W/sr）表示。（註：立體弧度與國際標準單位中定義之立體角單位相同。）

蘭伯特反射器— 一個依據蘭伯特率反射光線之表面，此光線為非極化光，且其輻射率具有等向性或跟觀察角度無關。

偵測極限— 一個在程序中分析物可以被測量到之最低濃度估計值，常用分析物濃度之訊噪比為3。

雜訊級— 空白樣品波峰至波峰之雜訊量。

光漂白— 一個樣品因暴露於光而造成發射光強度或激發光強度下

降之現象。此下降可能為可逆或不可逆，若為不可逆則稱為光降解或光分解。

量子計數器—一個於定義光譜範圍中其量子效率與激發光波長無關之光致發光發射器。當量子計數器與偵測器連結，提供與入射光子數量成比例之反應結果時，此種儀器組合稱為量子計數偵測器。

準絕對強度比例尺—使用在固定設定之儀器或實驗條件下的螢光參考樣品，或人造物質的強度，進行標準化的螢光強度比例尺。此人造物質在固定設定的條件下應該要能產生在不同時間或儀器下皆具有再現性的螢光強度值。

拉曼散射—樣品在進行分子振動時發生鍵結極化狀態改變，產生之非彈性散射（散射波長與入射輻射波長不一致）。與螢光不同的是，在樣品中被散射之輻射不需要處於與電子躍遷共振之狀態。

雷利散射光—樣品輻射之彈性散射，入射輻射具有與散射輻射相同之能量（相同波長）。

反應率（光譜）—光電流輸出與光偵測系統收集到輻射能量之比值。光譜反應率為每單位光譜頻帶寬度之反應率。

靈敏度—在特定設定條件下儀器偵測分析物之能力。

光譜頻帶寬度（或光譜帶通、解析度）—光譜能夠區辨輻射或解析相近波長光譜波峰之能力。一般會看到發射線譜呈現三角散射（triangular dispersion）狀態，此參數使用波峰半高寬來評估。

光譜狹縫寬度—光譜儀出射縫之寬度除以出射縫平面之線性色散。實際上會觀察到發射譜線之三角散射狀態，這個寬度會包含此狹縫之所有穿透光波長。

躍遷偶極矩—一個在分子物種中被與其物種能量躍遷共振之電磁波所激發之震盪式偶極矩，例如電子躍遷。其方向定義了躍遷極化，且其值平方決定了躍遷之強度。