

第四章、发光光谱技术

发光光谱技术

- 一、荧光与磷光的产生过程
- 二、激发光谱与荧光(磷光)光谱
- 三、荧光的产生条件
- 四、影响荧光强度的因素
- 五、仪器结构流程
- 六、荧光分析法的应用
- 七、磷光分析法的应用

一、荧光与磷光的产生过程

一、荧光与磷光的产生过程

由分子结构理论，主要讨论荧光及磷光的产生机理。

1. 分子能级与跃迁

分子能级比原子能级复杂；在每个电子能级上，都存在振动、转动能级；

基态(S_0)→激发态(S_1 、 S_2 、激发态振动能级)：吸收特定频率的辐射；量子化；跃迁一次到位；

激发态→基态：多种途径和方式(见能级图)；速度最快、激发态寿命最短的途径占优势；

第一、第二、...电子激发单重态 S_1 、 S_2 ...；

第一、第二、...电子激发三重态 T_1 、 T_2 ...；

2. 电子激发态的多重度

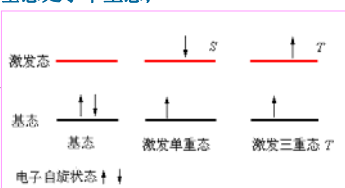
电子激发态的多重度： $M=2S+1$

S 为电子自旋量子数的代数和(0或1)；

平行自旋比成对自旋稳定(洪特规则)，三重态能级比相应单重态能级低；

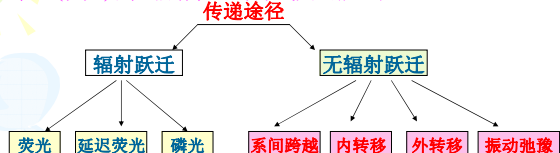
大多数有机分子的基态处于单重态；

$S_0 \rightarrow T_1$ 禁阻跃迁；
通过其他途径进入
(见能级图)；进入的
几率小；



3. 激发态→基态的能量传递途径

电子处于激发态是不稳定状态，返回基态时，通过辐射跃迁(发光)和无辐射跃迁等方式失去能量；



激发态停留时间短、返回速度快的途径，发生的几率大，
发光强度相对大。

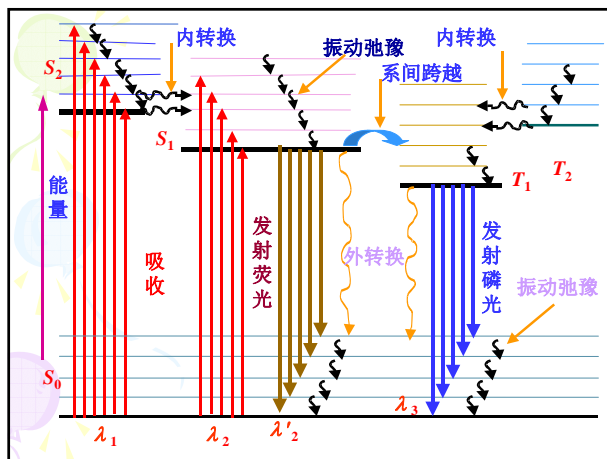
非辐射能量传递过程

振动弛豫：同一电子能级内以热能量交换形式由高振动能级至低相邻振动能级间的跃迁。发生振动弛豫的时间 10^{-12} s。

内转换：同多重度电子能级中,等能级间的无辐射能级交换。通过内转换和振动弛豫，高激发单重态的电子跃回第一激发单重态的最低振动能级。

外转换：激发分子与溶剂或其它分子之间产生相互作用而转移能量的非辐射跃迁；外转换使荧光或磷光减弱或“猝灭”。

系间跨越：不同多重态,有重叠的转动能级间的非辐射跃迁。改变电子自旋，禁阻跃迁，通过自旋—轨道耦合进行。



当处于基态的分子吸收紫外-可见光后，即分子获得了能量，其价电子就会发生能级跃迁，从基态跃迁到激发单重态的各个不同振动能级，并很快以振动弛豫的方式放出小部分能量达到同一电子激发态的最低振动能级，然后以辐射形式发射光子跃迁到基态的任一振动能级上，这时发射的光子称为荧光。

荧光： $10^{-7} \sim 10^{-9}$ s, 第一激发单重态的最低振动能级 → 基态；

如果受激发分子的电子在激发态发生自旋反转，当它所处单重态的较低振动能级与激发三重态的较高能级重叠时，就会发生系间窜跃，到达激发三重态，经过振动弛豫达到最低振动能级，然后以辐射形式发射光子跃迁到基态的任一振动能级上，这时发射的光子称为磷光。

磷光： $10^{-4} \sim 10$ s；第一激发三重态的最低振动能级 → 基态；

辐射能量传递过程

荧光发射： 电子由第一激发单重态的最低振动能级 → 基态（多为 $S_1 \rightarrow S_0$ 跃迁），发射波长为 λ_2 的荧光； $10^{-7} \sim 10^{-9}$ s。

由图可见，发射荧光的能量比分子吸收的能量小，波长长； $\lambda_2 > \lambda_1$ ；

磷光发射： 电子由第一激发三重态的最低振动能级 → 基态（ $T_1 \rightarrow S_0$ 跃迁）；

电子由 S_0 进入 T_1 的可能过程：（ $S_0 \rightarrow T_1$ 禁阻跃迁）

$S_0 \rightarrow$ 激发 \rightarrow 振动弛豫 \rightarrow 内转移 \rightarrow 系间跨越 \rightarrow 振动弛豫 $\rightarrow T_1$

发光速度很慢： $10^{-4} \sim 100$ s。

光照停止后，可持续一段时间。

二、激发光谱与荧光(磷光)光谱

激发光谱

• 当激光波长调谐到分子吸收跃迁 $E_i \rightarrow E_k$ 时，每秒在程长 Δx 吸收的光子数为

$$n_a = N_i \sigma_{ik} n_l \Delta x$$

n_l 入射激光光子数； σ_{ik} 每个分子的吸收截面；
 N_i 在吸收态 E_i 中的分子密度

每秒钟从受激发态 E_k 发射的荧光光子数：

$$n_f = N_k A_k = n_a \eta_k$$

$$A_k = \sum_m A_{km}, \eta_k = \frac{A_k}{A_k + R}$$

光电倍增管每秒钟探测到的光电子数为：

$$n_{pe} = n_a \eta_k \eta_{ph} \delta = N_i \sigma_{ik} n_L \Delta x \eta_k \eta_{ph} \delta$$

$$\eta_{ph} = \frac{n_{pe}}{n_{ph}} \quad \text{光阴极量子效率}$$

光电倍增管量子效率可达0.2，收集因子 δ 达0.1

当激光波长 λ_L 调谐通过吸收线的光谱范围时，作为激光波长 λ_L 的函数检测的总荧光强度

$$I_{fl}(\lambda) \propto n_L \sigma_{ik} N_i$$

总荧光强度 I_{fl} 相当于吸收光谱的像，称作激发光谱。

1、量子效率 η_k 必须对一切受激态 E_k 相同。

在无碰撞条件下，即在足够低的压强下，受激分子在它们可能碰撞前就已辐射， $\eta_k = 1$ 。

2、探测器的量子效率 η_{ph} 应在发射荧光的整个光谱范围内为常数。否则荧光光谱分布，可能对各个受激能级 E_k 不等，将会影响信号比值。

3、探测系统的几何收集效率 δ 应对来自不同受激能级的总荧光相同。这项要求把很长寿命的受激能级排除在外，在这些能级上的受激分子在发射荧光光子前就会扩散出观察区域。

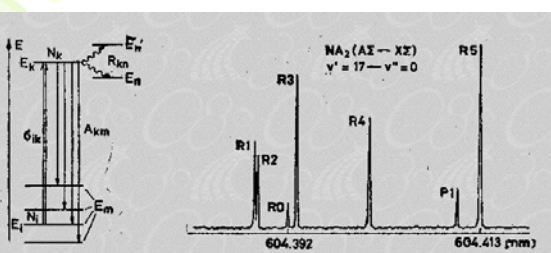


图 8.2 激发光谱学有关的能级图

图 8.3 在分子束中， $\lambda = 604\text{nm}$ 的可调谐染料激光器获得的 Na_2 分子激发光谱的一部分

$\Delta x = 0.1\text{cm}$, $N_i = 10^7 - 10^{10} / \text{cm}^3$
探测下限为 $10^2 / \text{cm}^3$

二、激发光谱与荧光(磷光)光谱

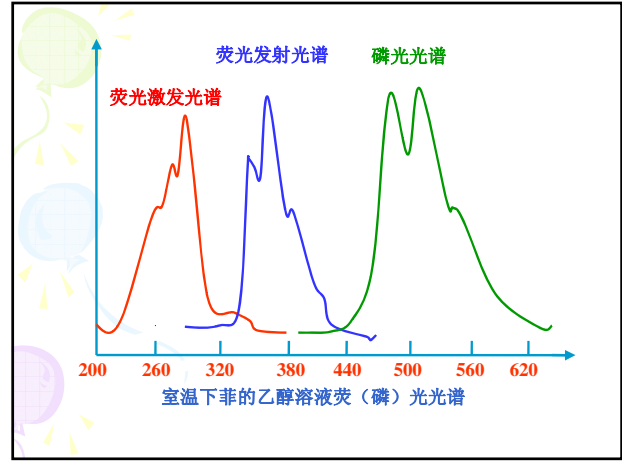
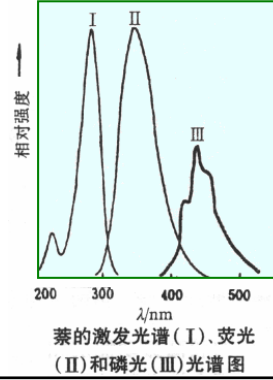
荧光(磷光)：光致发光，照射光波长如何选择？

1. 荧光(磷光)的激发光谱曲线

激发光谱：固定测量波长(选荧光、磷光最大发射波长)，扫描照射光波长，记录物质发射荧光的强度与照射光波长的关系曲线。激发光谱曲线的最高处，处于激发态的分子最多，荧光强度最大。

2. 荧光光谱(或磷光光谱)

固定激发光波长(选最大激发波长), 化合物发射的荧光(或磷光强度)与发射光波长关系曲线(图中曲线II或III)。



3. 激发光谱与发射光谱的关系

a. Stokes位移

激发光谱与发射光谱之间的波长差值。发射光谱的波长比激发光谱的长, 振动弛豫消耗了能量。

b. 发射光谱的形状与激发波长无关

电子跃迁到不同激发态能级, 吸收不同波长的能量(如能级图 λ_2, λ_1), 产生不同吸收带, 但均回到第一激发单重态的最低振动能级再跃迁回到基态, 产生波长一定的荧光(如 λ_2')。

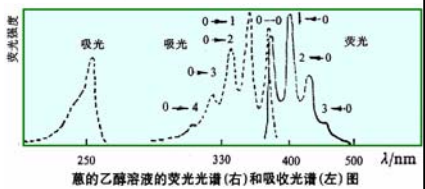
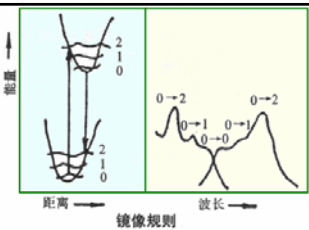
c. 镜像规则

通常荧光发射光谱与它的吸收光谱(与激发光谱形状一样)成镜像对称关系。

镜像规则的解释

基态上的各振动能级分布与第一激发态上的各振动能级分布类似;

基态上的零振动能级与第一激发态的二振动能级之间的跃迁几率最大, 相反跃迁也然。



三、荧光的产生的条件

1. 分子产生荧光必须具备的条件

- (1) 具有合适的结构;
- (2) 具有一定的荧光量子产率。

荧光量子产率 (φ):

$$\varphi = \frac{\text{发射的光量子数}}{\text{吸收的光量子数}}$$

荧光量子产率与激发态能量释放各过程的速率常数有关，如外转换过程速度快，不出现荧光发射；

四、影响荧光强度的因素

四、影响荧光强度的因素

1. 溶剂的影响

除一般溶剂效应外，溶剂的极性、氢键、配位键的形成都将使化合物的荧光发生变化；

2. 温度的影响

荧光强度对温度变化敏感，温度增加，外转换去活的几率增加。

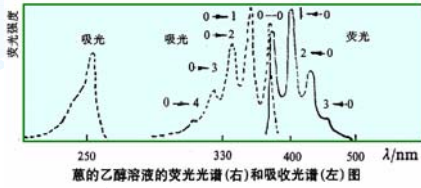
3. 溶液pH

对酸碱化合物，溶液pH的影响较大，需要严格控制；

4. 内滤光作用和自吸现象

内滤光作用: 溶液中含有能吸收激发光或荧光物质发射的荧光, 如色胺酸中的重铬酸钾;

自吸现象: 化合物的荧光发射光谱的短波长端与其吸收光谱的长波长端重叠, 产生自吸收; 如蒽化合物。



5. 溶液荧光的猝灭 碰撞猝灭

五、仪器结构流程

五、仪器结构流程

测量荧光的仪器主要由四个部分组成: 激发光源、样品池、双单色器系统、检测器。

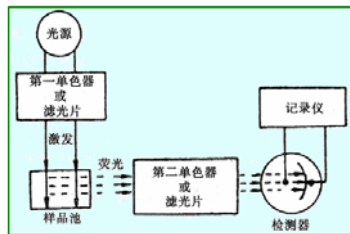
特殊点: 有两个单色器, 光源与检测器通常成直角。

基本流程如图:

单色器: 选择激发光波长的第一单色器和选择发射光(测量)波长的第二单色器;

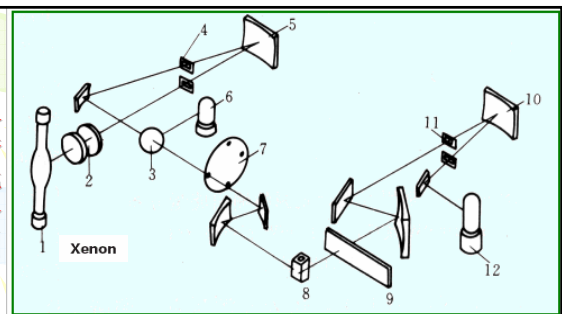
光源: 氙灯或高压汞灯, 染料激光器(可见与紫外区)

检测器: 光电倍增管。



荧光分析仪基本部件示意图

仪器光路图



180-2400

Continuous & lines
> 600 nm

日立 F-4500 荧光分光光度计的光学系统图

- 1—氙灯 (150W); 2—透镜; 3—光束分裂器; 4, 11—水平夹缝;
- 5—激发单色器光栅; 6—参考光电管; 7—光闸; 8—样品池;
- 9—样品室光闸; 10—发射单色器光栅; 12—光电倍增管 (R-3788)

同步扫描技术

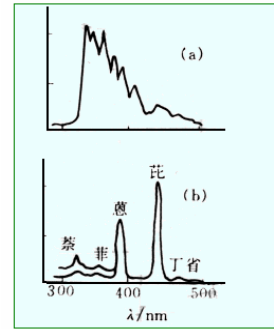
同步扫描技术是由Lloyd首先提出的,它与常用的荧光测定方法最大的区别是同时扫描激发和发射两个单色器波长。由测得的荧光强度信号与对应的激发波长(或发射波长) 构成光谱图,称为同步荧光光谱。

1. 恒波长同步荧光分析法

恒波长同步荧光法系在扫描过程中使激发波长和发射波长彼此间保持固定的波长间隔($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = \text{常数}$)。在恒波长同步荧光法中, $\Delta\lambda$ 的选择十分重要,这将直接影响到同步荧光光谱的形状、带宽和信号强度。在可能条件下,选择等于斯托克斯位移的 $\Delta\lambda$ 。同步荧光法具有选择性好、灵敏度高、干扰少等特点,可用于多组分多环芳烃混合物的同时测定。

合适的 $\Delta\lambda$ 可减少光谱重叠;

酪氨酸和色氨酸的荧光激发光谱相似,发射光谱严重重叠,但 $\Delta\lambda < 15\text{nm}$ 的同步光谱只显示酪氨酸特征光谱; $\Delta\lambda > 60\text{nm}$ 时,只显示色氨酸的特征光谱,实现分别测定。



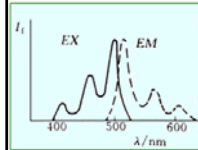
酪、葱、菲、芪及丁省混合物在乙醇溶液中的荧光发射谱 (a) 和混合物的同步荧光光谱 (b)

2. 恒能量同步荧光分析法

恒能量同步荧光光谱法(CESLS) 由Inman和Winefordner于1982年提出。恒能量同步荧光法系在激发波长 λ_{ex} 和发射波长 λ_{em} 的同时扫描过程中保持两者一恒定的能量差 ΔE_v 关系。该法以荧光体的量子振动跃迁的特征能量为依据来进行同步扫描,若选择一固定能量差 ΔE_v 等于某一振动能量差,则在同步扫描中,当激发能量和发射能量刚好匹配一特定吸收、发射跃迁条件时,该跃迁处于最佳条件,由此产生的同步光谱可达最大强度。恒能量同步荧光法对于多环芳烃的鉴别和测定特别有利。恒能量同步荧光法的光谱优点可以定量形式来表达并用来选择扫描参数,从而为体系的参数优化提供了便利

可获得三维光谱图的仪器

可获得激发光谱与发射光谱同时变化时的荧(磷)光光谱图



常规激发光谱和发射光谱

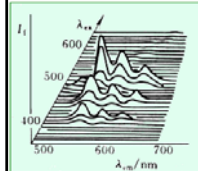
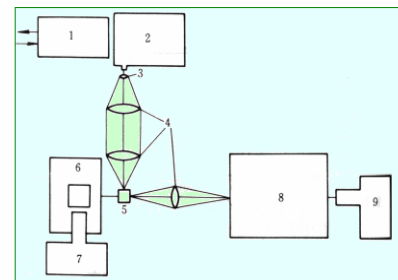


图 三维光谱



带正交多色器光学系统和硅强化肥多通道检测器的快速扫描荧光分光光度计组成示意图

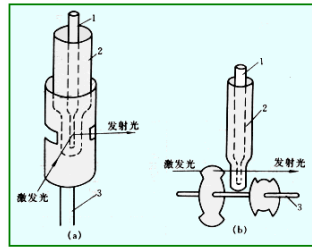
1—硅强化肥多通道检测器; 2—分析多色器; 3—场透镜; 4—透镜系统; 5—样品池; 6—激发多色器; 7. 9—150W 氙灯; 8—激发单色器

磷光检测

荧光计上配上磷光测量附件即可对磷光进行测量。在有荧光发射的同时测量磷光。

测量方法:

- (1) 通常借助于荧光和磷光寿命的差别, 采用磷光镜的装置将荧光隔开。
- (2) 采用脉冲光源和可控检测及时间分辨技术。



转筒式磷光镜 (a) 和转盘式磷光镜 (b)
1—试样池; 2—杜瓦瓶; 3—电机轴

室温测量时, 不需要杜瓦瓶。

六、荧光分析方法与应用

六、荧光分析方法与应用

1. 特点

- (1) 灵敏度高
比紫外-可见分光光度法高2~4个数量级;
检测下限: $0.1 \sim 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
- (2) 选择性强
既可依据特征发射光谱, 又可根据特征吸收光谱;
- (3) 试样量少
缺点: 应用范围小。

2. 定量依据与方法

(1) 定量依据

荧光强度 I_f 正比于吸收的光量 I_a 和荧光量子效率 ϕ :

$$I_f = \phi I_a$$

由朗-比耳定律: $I_a = I_0(1 - 10^{-\epsilon l c})$

$$I_f = \phi I_0(1 - 10^{-\epsilon l c}) = \phi I_0(1 - e^{-2.3 \epsilon l c})$$

浓度很低时, 将括号项近似处理后:

$$I_f = 2.3 \phi I_0 \epsilon l c = Kc$$

(2) 定量方法

标准曲线法:

配制一系列标准浓度试样测定荧光强度，绘制标准曲线，再在相同条件下测量未知试样的荧光强度，在标准曲线上求出浓度；

比较法:

在线性范围内，测定标样和试样的荧光强度，比较；

3. 荧光分析法的应用

(1) 无机化合物的分析

与有机试剂配合物后测量；可测量约60多种元素。

铍、铝、硼、镓、硒、镁、稀土常采用荧光分析法；

氟、硫、铁、银、钴、镍采用荧光熄灭法(利用荧光强度的减小与荧光熄灭剂的浓度呈线性关系来进行测定含量的方法)测定；

铜、铍、铁、钴、钨及过氧化氢采用催化荧光法测定；

铬、铈、铀、碲采用低温荧光法测定；

铈、镨、铈、钒、铀采用固体荧光法测定

(2) 生物与有机化合物的分析见表

表 某些无机物的荧光测定法

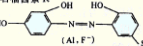
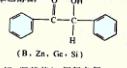




离子	试剂	λ/nm		检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	干扰
		吸收	荧光		
Al^{3+}	石榴茜素 R  (Al, F ⁻)	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ni, PO ₄ ³⁻ , Th, Zr
F^{-}	石榴茜素 R-Al 配合物 (熄灭)	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO ₄ ³⁻ , Th, Zr
B_2O_3	二苯乙醇酮  (B, Zn, Ge, Si)	370	450	0.04	Be, Sb
Cd^{2+}	2-(邻-羟基苯)-间氮杂氧 	365	蓝色	2	NH ₃
Li^{+}	8-羟基喹啉 	370	580	0.2	Mg
Sn^{4+}	荧酮醇 (Al, Be 等) 	400	470	0.008	F ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Zr
Zn^{2+}	二苯乙醇酮 	—	绿色	10	Be, B, Sb, 显色离子

表 某些有机化合物的荧光测定法

待测物	试剂	激发光波长	荧光波长	测定范围 c/($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
		nm	nm	
丙三醇	苯胺	紫外	蓝色	0.1~2
糠醛	萘酚	465	505	1.5~15
萘		365	400	0~5
苯基水杨酸酯	N,N'-二甲基甲酰胺 (KOH)	366	410	$3\times 10^{-4}\sim 5\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
1-萘酚	$0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ NaOH}$	紫外	500	
四氢嘧啶 (阿尿)	苯二胺	紫外 (365)	485	10^{-10}
维生素 A	无水乙醇	345	490	0~20
氨基酸	氧化酶等	315	425	0.01~50
蛋白质	曙红 Y	紫外	540	0.06~6
肾上腺素	乙二胺	420	525	0.001~0.02
氨基丁酸	邻苯二胺	365	470	0.05~5
玻璃酸酶	3-乙酰氧基吲哚	395	470	0.001~0.033
青霉素	α -氨基-6-氨基-9-(β -氨基乙基)-氨基杂蒽	420	500	0.0625~0.625

七、磷光分析法的应用

- ### 七、磷光分析法的应用
- 1. 稠环芳烃分析**
采取固体表面室温磷光分析法快速灵敏测定稠环芳烃和杂环化合物（致癌物质）；见表
 - 2. 农药、生物碱、植物生长激素的分析**
烟碱、降烟碱、新烟碱，2，4-D等分析
检测限 $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
 - 3. 药物分析和临床分析**
见表

表 某些稠环芳烃室温磷光分析

化 合 物	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	重原子	检出限/ng
吖啶	360	640	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.4
苯并(a)芘	395	698	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.5
苯并(e)芘	335	545	CsI	0.01
2,3- 苯并芘	343	505	NaI	0.028
喹啉	296	415	CsI	0.005
蒽	330	518	NaI	0.03
1, 2, 3, 4- 二苯并蒽	295	567	CsI	0.08
1, 2, 5, 6- 二苯并蒽	305	555	NaI	0.005
13H- 二苯并(a, i)喹啉	295	475	NaI	0.002
蒽蒽	365	545	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.05
芘	270	428	CsI	0.2
1- 萘酚	310	530	NaI	0.03
芘	343	595	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.1

表 磷光分析实例

测 定 物 质	试 样	测定范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
乙酰水杨酸(阿司匹林)	血清或血浆	10 — 1000
普鲁卡因 (局部麻醉)	血液	0.030 — 30
柯卡因	血或尿	0.030 — 3.0
苯巴比妥 (镇静、催眠)	血	10 — 1000
阿托品 (抗心律失常药)	尿	8 — 80
氯普鲁麻金盐酸盐	血	0.10 — 10.0
对硝基苯酚	尿	0.0028 — 1.40
犬尿烯酸	尿	10 — 200