

第五章 分子荧光分析法

荧光 自然界存在这样一类物质，当吸收了外界能量后，能发出不同波长和不同强度的光，一旦外界能源消失，则这种光也随之消失，这种光称为荧光。

外界提供能量的方式有多种，如光照、加热、化学反应及生物代谢等。通过光照激发产生的荧光称为光致荧光。

根据激发光的波长不同，荧光可分为X射线荧光、紫外可见荧光和红外荧光等。根据发射荧光的粒子不同，荧光又可分为分子荧光和原子荧光。

由于不同的物质其组成与结构不同，所吸收光的波长和发射光的波长也不同，利用这个特性可以进行物质的定性鉴别。如果该物质的浓度不同，它所发射的荧光强度就不同，测量物质的荧光强度可对其进行定量测定。

荧光分析法（fluorescence analysis）就是利用物质的荧光特征和强度，对物质进行定性和定量分析的方法。

荧光分析法的特点是灵敏度
高、选择性好、样品用量少和操作简
便。它的灵敏度通常比分光光度法高
2 ~ 3 个数量级。在卫生检验、环境
及食品分析、药物分析、生化和临床
检验等方面有着广泛的应用。

第一节 基本原理

一、荧光的产生

物质分子的能级包括一系列
电子能级、振动能级和转动能级。

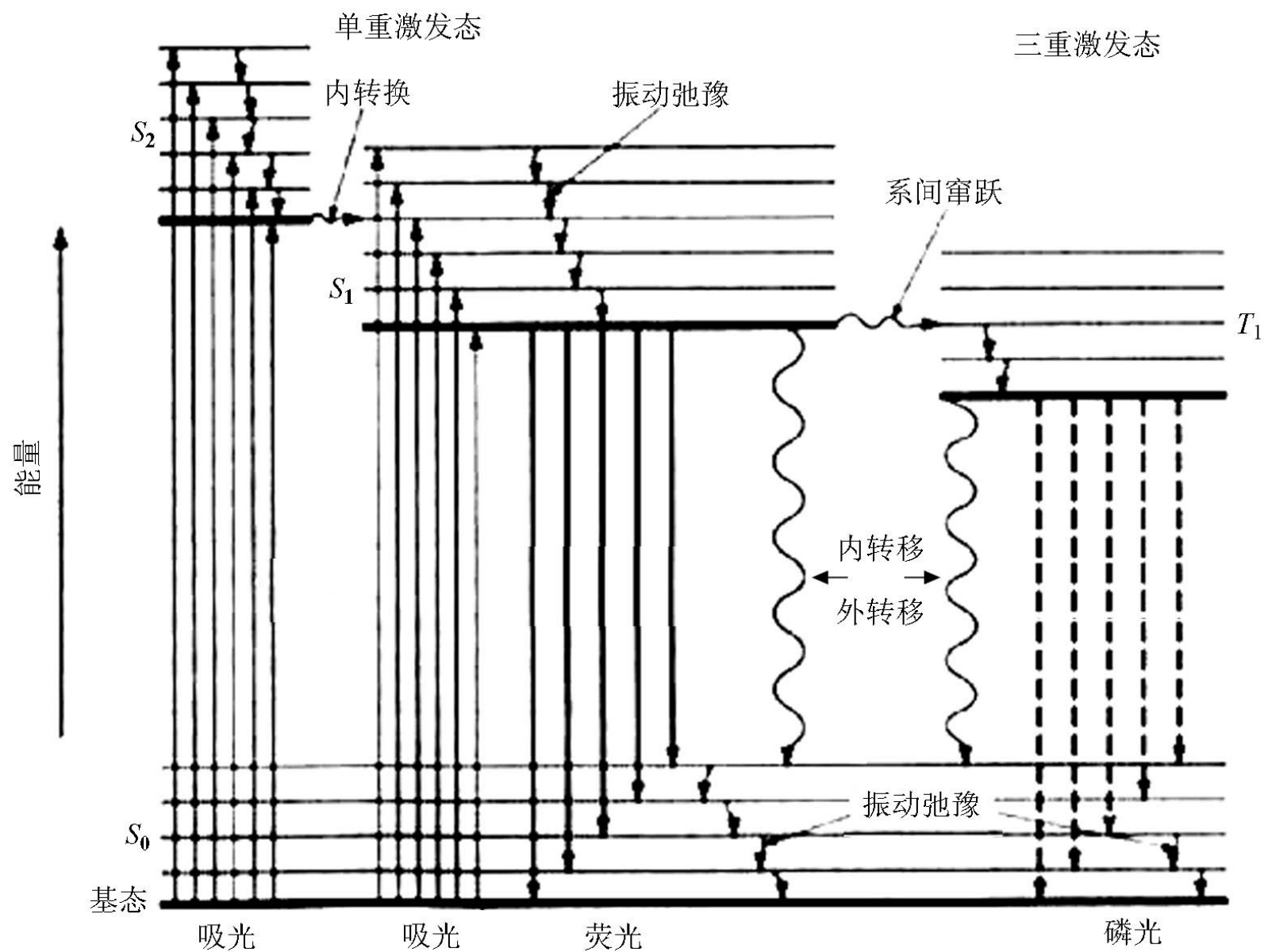


图6-1 荧光、磷光能级图

分子吸收能量后，从基态最低振动能级跃迁到第一电子激发态或更高电子激发态的不同振动能级（这一过程速度很快，大约 10^{-15} s），成为激发单重态分子。激发态分子不稳定，可以通过以下几种途径释放能量返回基态。

1. 振动弛豫

这一过程只能发生在同一电子能级内，即分子通过碰撞以热的形式损失部分能量，从较高振动能级下降到该电子能级的最低振动能级上。由于这一部分能量以热的形式释放，而不是以光辐射形式发出，故振动弛豫属于无辐射跃迁。

2. 内转换

即激发态分子将多余的能量转变为热能，从较高电子能级降至较低的电子能级。内转换也属于无辐射跃迁。

3. 荧光

较高激发态分子经无辐射跃迁降至第一电子激发单重态的最低振动能级后，仍不稳定，停留较短时间后（约 10^{-8} s，称作荧光寿命），以光辐射形式放出能量，回到基态各振动能级，这时所发射的光称为荧光。当然也可以无辐射跃迁形式返回基态。

4. 系间窜跃

有些物质的激发态分子通过振动弛豫和内转换下降到第一电子激发态的最低振动能级后，有可能经过另一个无辐射跃迁转移至激发三重态，这一过程伴随着自旋方向的改变，称为系间窜跃。对于大多数物质，系间窜跃是禁阻的。如果分子中有重原子（如 I、Br 等）存在，由于自旋-轨道的强偶合作用，电子自旋方向可以改变，系间窜跃就变得容易了。

5. 磷光

经系间窜跃的分子再通过振动弛豫降至激发三重态的最低振动能级，停留一段时间（ $10^{-4} \sim 10$ s，称作磷光寿命），然后以光辐射形式放出能量返回到基态各振动能级，这时发出的光称为磷光（phosphorescence）。由于激发三重态能量比激发单重态最低振动能级能量低，故磷光辐射的能量比荧光更小，即磷光的波长比荧光更长。

二、激发光谱和荧光光谱

(一) 荧光的检测

光源发出的紫外可见光通过激发单色器分出不同波长的激发光，照射到样品溶液上，激发样品产生荧光。样品发出的荧光为宽带光谱，需通过发射单色器分光后再进入检测器，检测不同发射波长下的荧光强度 F 。由于激发光不可能完全被吸收，可透过溶液，为了防止透射光对荧光测定的干扰，常在与激发光垂直的方向检测荧光（因荧光是向各个方向发射的）。

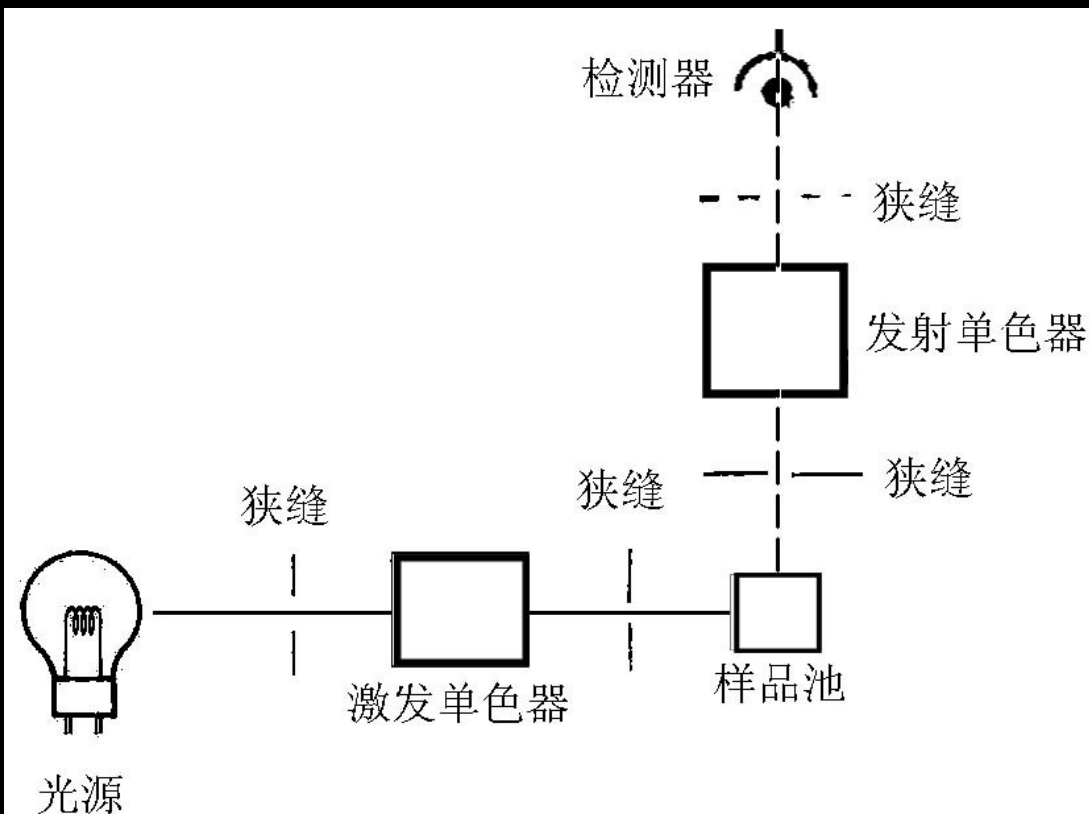


图6—3 荧光仪示意图

（二）激发光谱与荧光光谱的形成

任何荧光物质，都具有两种特征光谱，即激发光谱 (excitation spectrum) 和荧光发射光谱 (fluorescence emission spectrum) 。

1. 激发光谱

保持荧光发射波长不变（即固定发射单色器），依次改变激发光波长（即调节激发单色器），测定不同波长的激发光激发下得到的荧光强度 F （即激发光波长扫描）。然后以激发光波长为横坐标，以荧光强度 F 为纵坐标作图，就可得到该荧光物质的激发光谱。

激发光谱上荧光强度最大值所对应的波长就是最大激发波长，是激发荧光最灵敏的波长。物质的激发光谱与它的吸收光谱相似，所不同的是纵坐标。

2. 荧光光谱

荧光光谱，又称发射光谱。保持激发光波长不变（即固定激发单色器），依次改变荧光发射波长，测定样品在不同波长处发射的荧光强度 F 。以发射波长为横坐标，以荧光强度 F 为纵坐标作图，得到荧光发射光谱。荧光发射光谱上荧光强度最大值所对应的波长就是最大发射波

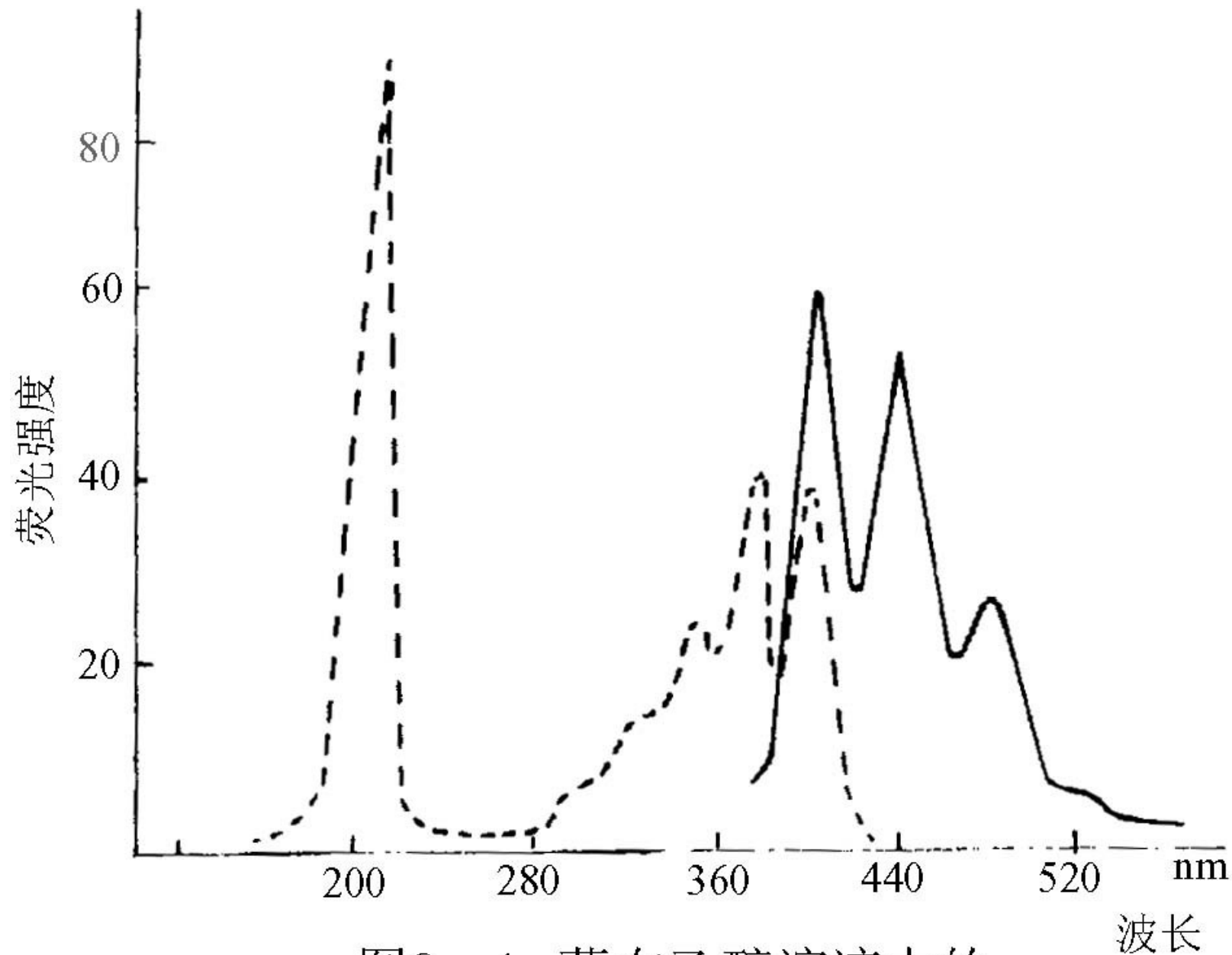


图6—4 茴在乙醇溶液中的
激发光谱 (----) 和荧光光谱

(三) 荧光光谱与激发光谱的关系

1. 荧光光谱形状与激发光波长无关

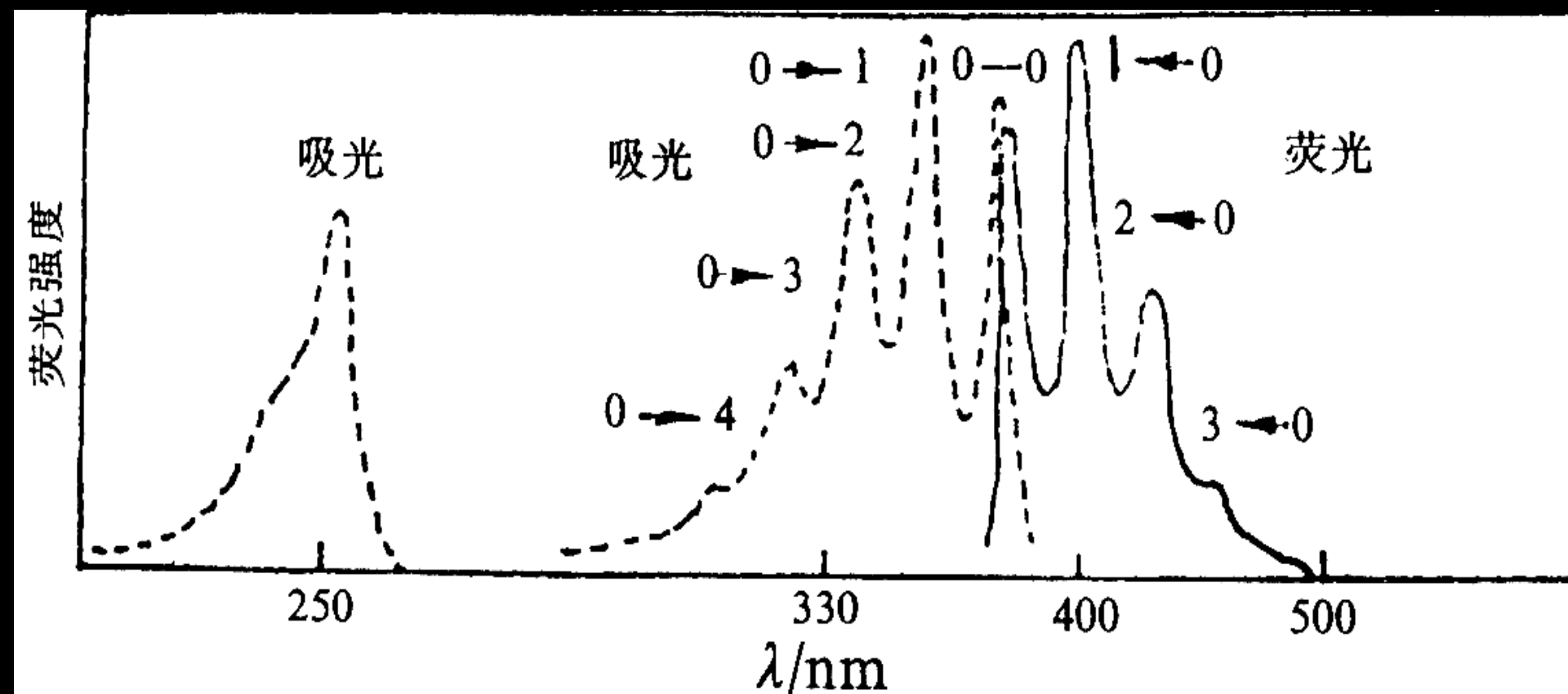
由于荧光是分子从第一电子激发态的最低振动能级返回到基态的各振动能级时释放的光辐射，与分子被激发至哪一个电子激发态无关。

2. 荧光光谱比激发光谱波长为长

由于分子吸收激发光被激发至较高激发态后，先经无辐射跃迁（振动弛豫、内转换）损失掉一部分能量，到达第一电子激发态的最低振动能级，再由此发出荧光。因此，荧光发射能量比激发光能量低，荧光光谱波长比激发光波长长。

3. 镜像对称

对于高度对称的有机分子，其荧光光谱与吸收光谱呈镜像对称关系。

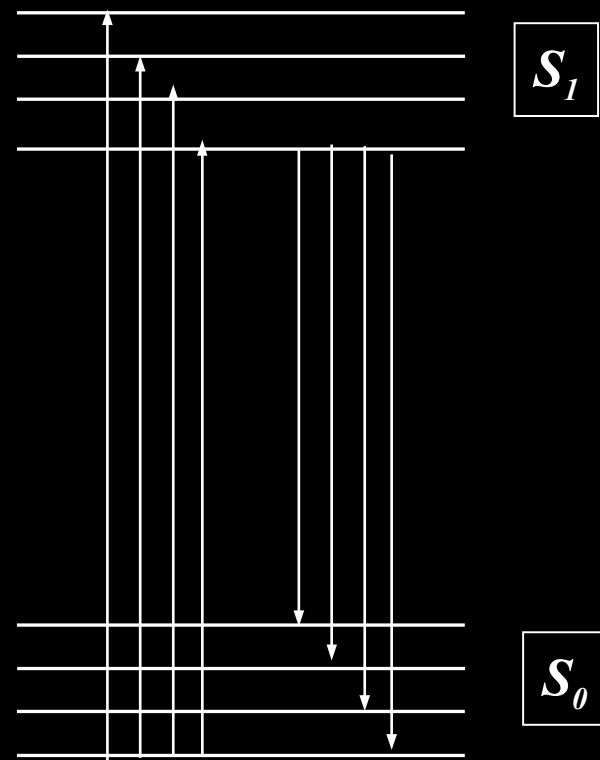


解释 1：能级结构相似性

荧光为第一电子激发单重态的最低振动能级跃迁到基态的各个振动能级而形成，即其形状与基态振动能级分布有关。

激发光谱是由基态最低振动能级跃迁到第一电子激发单重态的各个振动能级而形成，即其形状与第一电子激发单重态的振动能级分布有关。

由于激发态和基态的振动能级分布具有相似性，因而呈镜像对称。



三、影响荧光产生及荧光强度的因素

（一）物质产生荧光的必要条件

一种物质能否发荧光以及荧光强度的高低，与它的分子结构及所处的环境密切相关。能够发射荧光的物质都应同时具备两个条件：

1. 物质分子必须有强的紫外吸收（有 $\pi \sim \pi^*$ 跃迁）；

2. 物质具有较高的荧光效率（fluorescence efficiency）。荧光效率也称荧光量子产率，用 Φ_f 表示。

$$\Phi_f = \frac{\text{发射的荧光量子数}}{\text{吸收的光量子数}} = \frac{k_F}{k_F + k_{VR} + k_{IC} + k_{ISC} + k_{EC} + k_P}$$

可见，凡是使 k_F 增加，使其它去活化常数降低的因素均可增加荧光量子产率。通常， k_F 由分子结构决定（内因），而其它参数则由化学环境和结构共同决定。

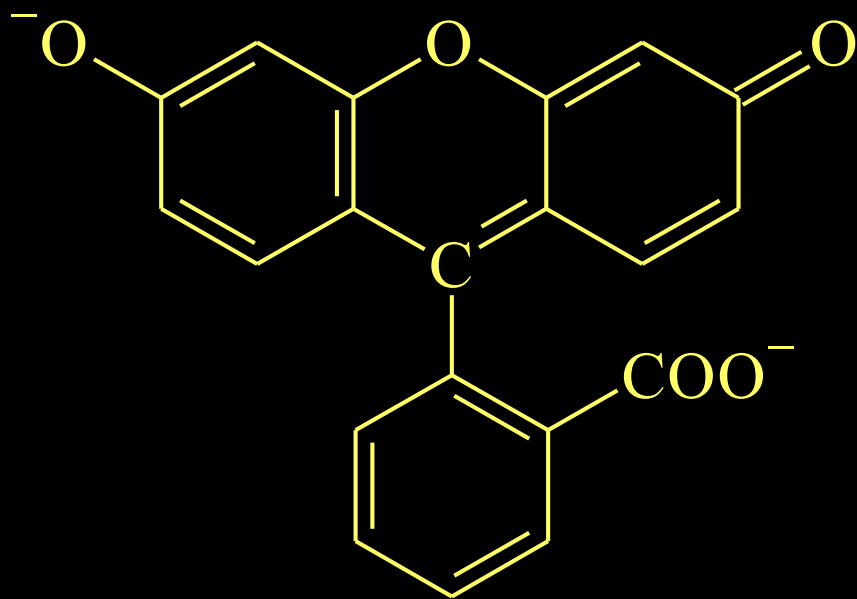
（二）影响荧光及其强度的因素。

跃迁类型：如上所述，物质必须在紫外可见区有强吸收和高荧光效率才能产生荧光。具有 $\pi-\pi^*$ 跃迁的分子才有强吸收。 $\pi-\pi^*$ 跃迁的 ϵ 大。

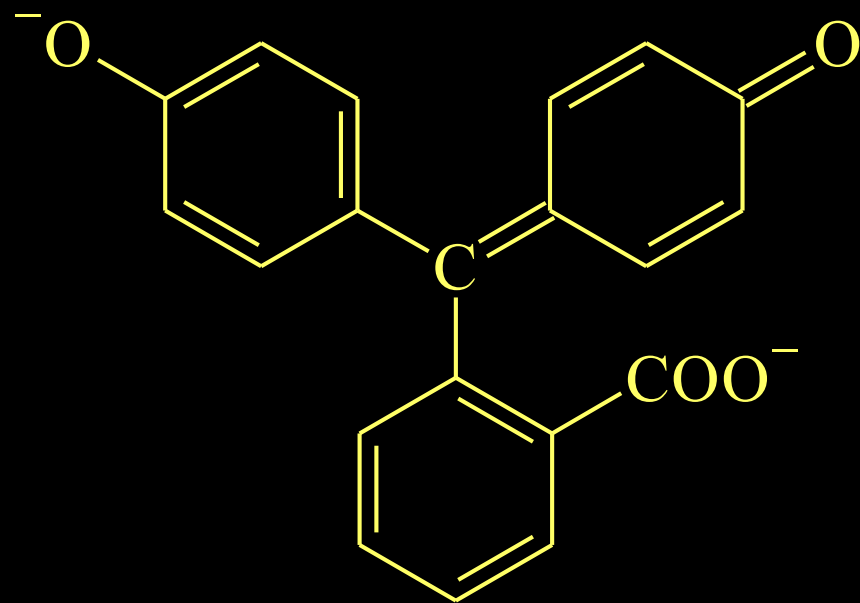
共轭效应：大多数能产生荧光的物质都含有芳香环或杂环，具有共轭的 $\pi \sim \pi^*$ 跃迁。其共轭程度愈大，荧光效率也愈大，且最大激发和发射波长都向长波长方向移动，如苯、萘、蒽三种物质。

	苯	萘	蒽	维生素 A
λ_{ex}	205nm	286nm	356nm	327nm
λ_{em}	278nm	321nm	404nm	510nm
Φ	0.11	0.29	0.36	

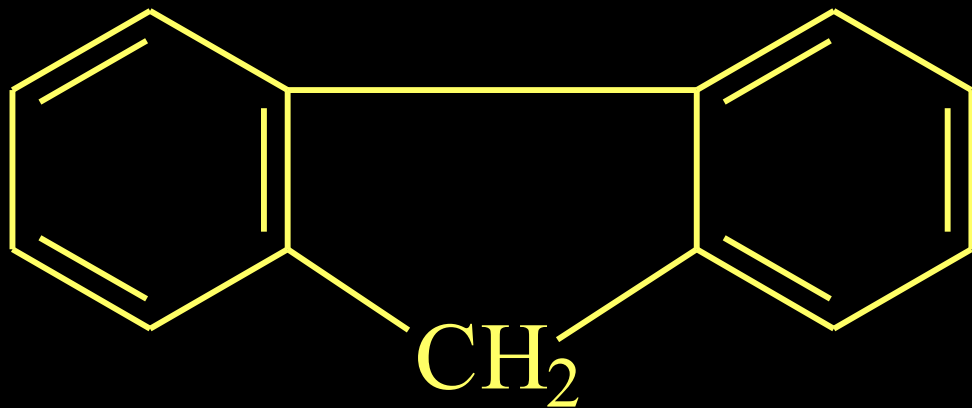
刚性平面结构：当荧光分子共轭程度相同时，分子的刚性和共平面性越大，荧光效率越大。



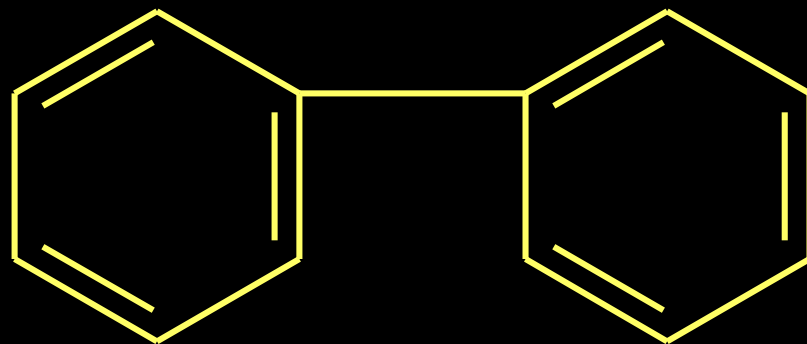
荧光物质（荧光素）



菲荧光物质（酚酞）

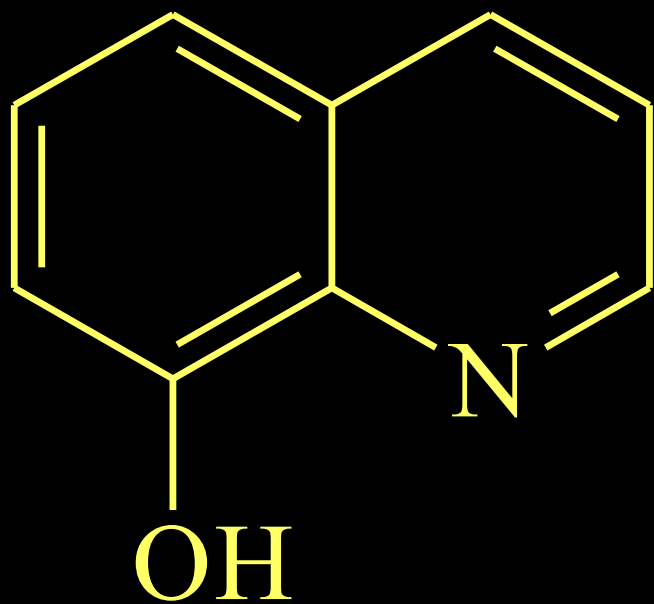


芴 ($\Phi=1.0$)

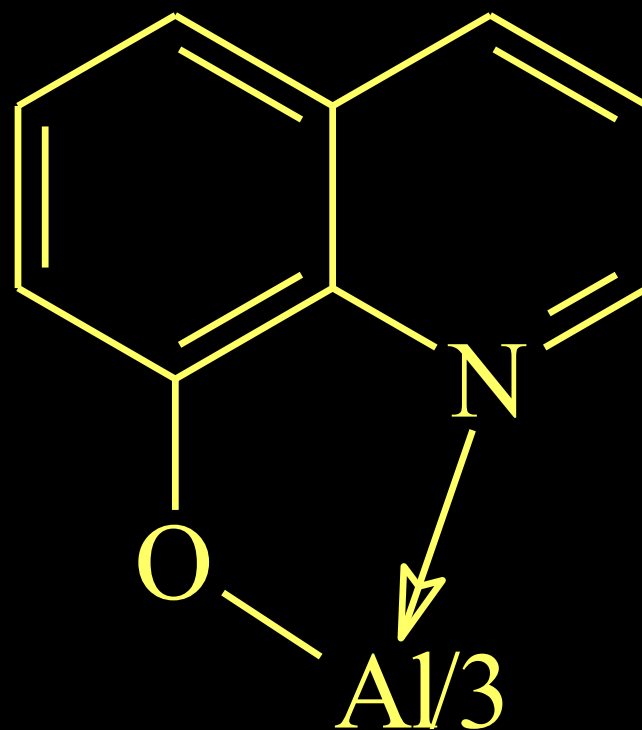


联苯 ($\Phi=0.2$)

有些物质本身不发荧光或荧光较弱，但和金属离子形成配合物后，如果刚性和共平面性增加，就可以发荧光或增强荧光。如 8- 羟基喹啉是弱荧光物质，与 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 等金属离子形成的配合物的荧光增强，利用这一特点可以间接测定金属离子。



8-羟基喹啉



8-羟基喹啉—铝

取代基团

荧光分子上的各种取代基对分子的荧光光谱和荧光强度都有很大影响。给电子取代基如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 等，能增加分子的 π 电子共轭程度，使荧光效率提高。而 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C=O}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 等吸电子取代基，可减弱分子 π 电子共轭性，使荧光减弱甚至熄灭。还有一类取代基则对荧光的影响不明显，如 $-\text{H}$

温度

温度对被测溶液的荧光强度有明显的影响。当温度升高时，介质粘度减小，分子运动加快，分子间碰撞几率增加，从而使分子无辐射跃迁增加，荧光效率降低。故降低温度有利于提高荧光效率及荧光强度。

由于荧光仪器光源的光强度大、温度较高，容易引起溶液温度升高，加之分析过程中室温可能发生变化，从而导致荧光强度改变。另外，有些荧光物质的溶液在激发光较长时间的照射下，还会发生光分解，使荧光强度下降。因此，试样不应长时间受光照射，只在测定荧光强度时才打开光闸，其余时间应关闭。在较高档的荧光分光光度计中，样品室四周设有冷却水套或配有恒温装置，以使溶液的温度在测定过程中保持恒定。

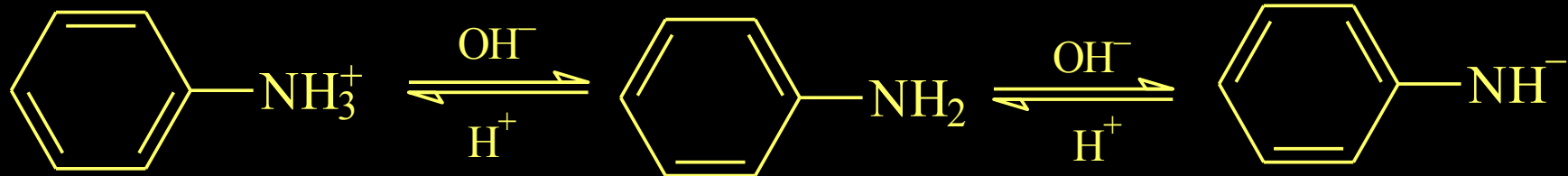
溶剂：同一种荧光物质在不同的溶剂中，其荧光光谱的位置和荧光强度可能会有一定的差别，尤其是那些分子中含有极性取代基的荧光物质，它们的荧光光谱易受溶剂的影响。

溶剂的影响可以分为一般溶剂效应和特殊溶剂效应。一般溶剂效应是指溶剂极性的影响。通常情况下，随着溶剂极性增大， $\pi \sim \pi^*$ 跃迁所需的能量差 ΔE 减小，跃迁几率增加，从而使荧光波长长移，荧光强度增大。

特殊溶剂效应是指溶剂与荧光物质形成化合物，或溶剂使荧光物质的电离状态改变，使荧光峰的波长和荧光强度都发生较大变化。如在萘胺的乙醇溶液中加入盐酸，随着溶液中盐酸浓度的增加，萘胺的 —NH_2 基逐渐被 $\text{—NH}_3\text{Cl}$ 基所代替，而 $\text{—NH}_3\text{Cl}$ 基对萘环特征频率的影响小于 —NH_2 ，因此溶液的荧光光谱趋近于萘的荧光光谱。

pH 值：溶液的酸度（pH 值）对荧光物质的影响可以分两个方面：

1. 若荧光物质本身是弱酸或弱碱时，溶液 pH 值改变，物质分子和其离子间的平衡也随之发生变化，而不同形体具有其各自特定的荧光光谱和荧光效率。例如苯胺



pH < 2

pH 7 ~ 12

pH > 13

无荧光（离子形式）

蓝色荧光（分子形式）

无荧光（离子形式）

2. 对于金属离子与有机试剂生成的荧光配合物，溶液 pH 值的改变会影响配合物的组成，从而影响它们的荧光性质。例如 Ga^{3+} 离子与邻 - 二羟基偶氮苯，在 pH3 ~ 4 的溶液中形成 1:1 配合物，能产生荧光。而在 pH6 ~ 7 的溶液中，则形成 1:2 的配合物，不产生荧光。

总之，溶液 pH 值对荧光物质的荧光光谱、荧光效率及荧光强度均有影响。需通过条件实验找出 pH 与荧光强度的关系，确定最适宜的 pH 范围，以提高分析的灵敏度和准确度。

荧光熄灭

由于荧光物质分子间或与其它物质相互作用，引起荧光强度显著下降的现象叫做荧光熄灭（quenching）或猝灭。引起荧光熄灭的物质称为荧光熄灭剂，如卤素离子、重金属离子、氧分子、硝基化合物、重氮化合物和羧基化合物等。

造成荧光熄灭的原因有多种：

（1）激发态荧光分子和熄灭剂分子碰撞，将能量转移到熄灭剂而使荧光熄灭；（2）荧光分子与熄灭剂分子作用生成了本身不发光的配合物；（3）荧光物质分子中引入重原子后，易发生系间窜越而转变为三重态；

(4) 当荧光物质浓度较大时，激发态分子和基态分子发生碰撞，产生**荧光自熄灭现象**。溶液浓度越高，自熄灭现象越严重；(5) 溶液中溶解的氧分子能引起几乎所有的荧光物质产生不同程度的**荧光熄灭**。

荧光熄灭是荧光分析的不利因素。但是如果一个荧光物质在加入某种熄灭剂后，荧光强度的减小和熄灭剂的浓度呈线性关系，则可以利用这一性质建立熄灭剂的荧光分析法，称为荧光熄灭法。荧光熄灭法比直接荧光法更灵敏、更有选择性。例如铝 - 桑色素配合物的荧光强度因微量氟离子的存在而引起荧光熄灭，利用这种性质可测定样品中微量氟离子的含量，这时溶液的荧光强度和氟离子浓度成反比。

散射光 (scattering light)

当一束光照射在被测溶液上，其中一部分光被吸收后发出荧光，一部分光透过溶液，还有一小部分光则由于光子与溶剂分子的相互碰撞，使光子的运动方向发生改变而向不同方向散射，称为散射光。

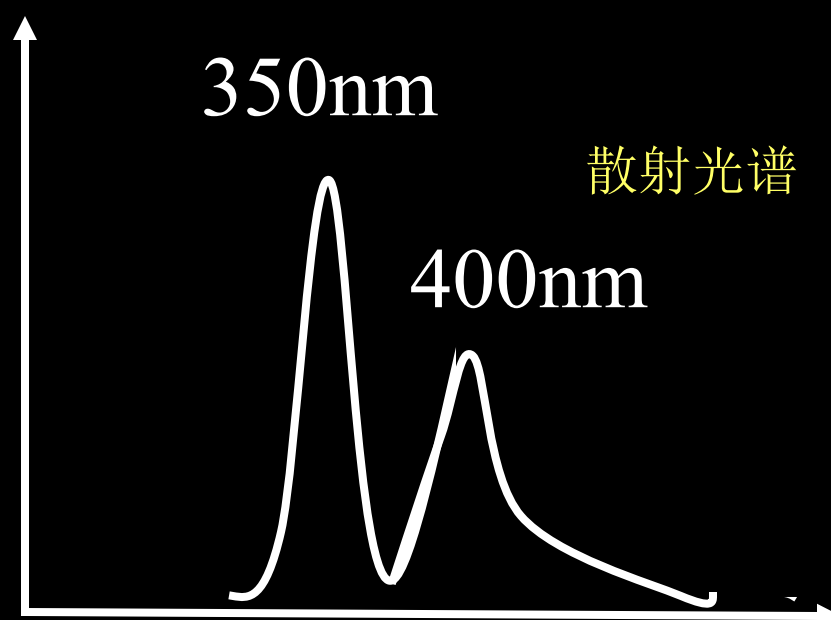
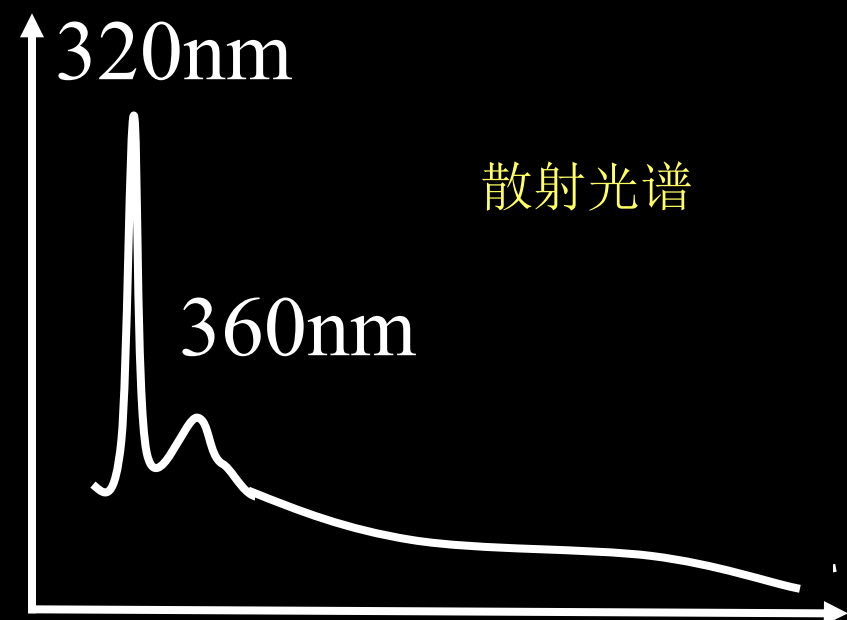
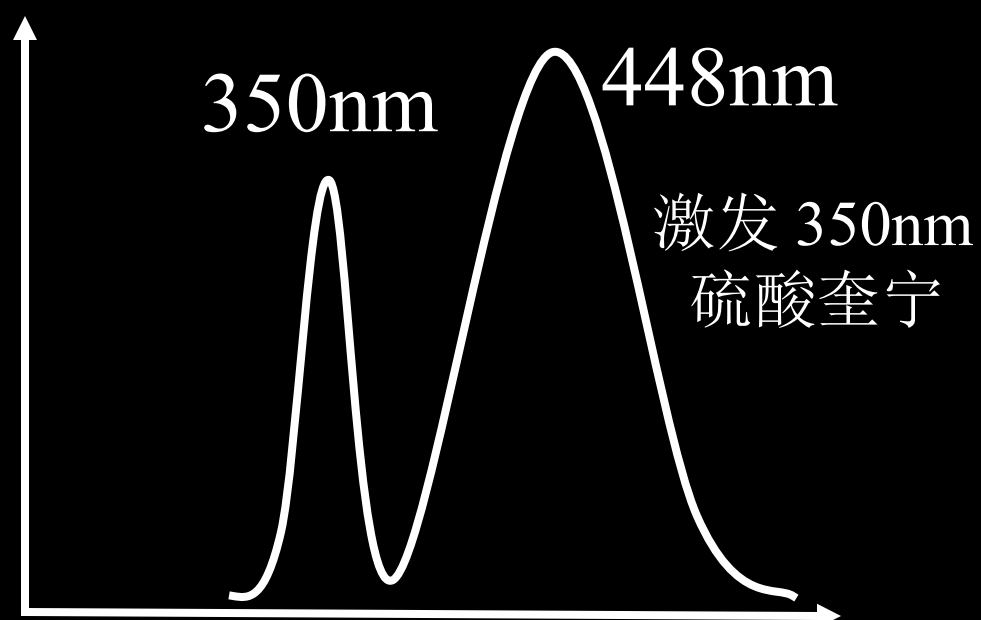
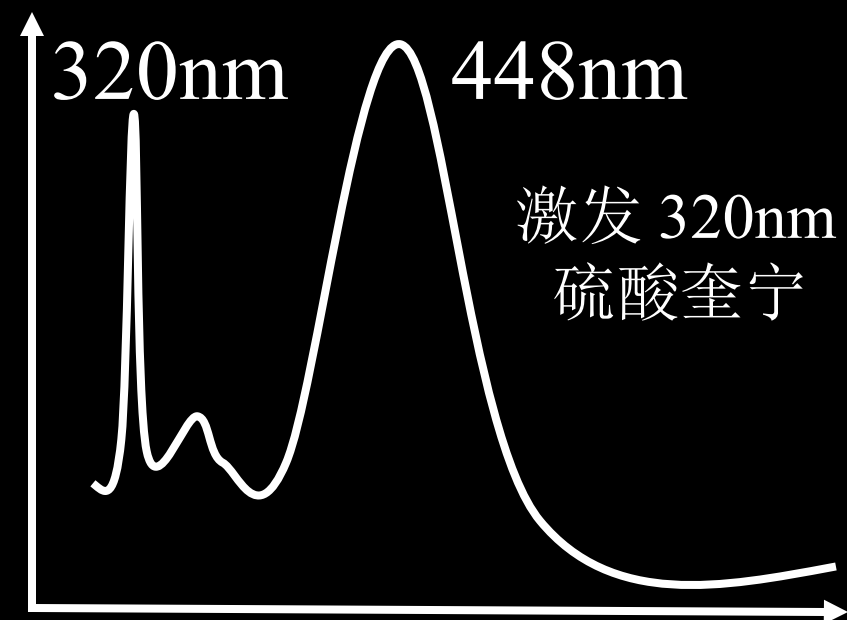
1. 瑞利 (Reyleigh) 散射光

光子和物质分子发生弹性碰撞，不发生能量的交换，只是光子运动方向发生改变，其波长和激发光相同，这种散射光称为瑞利散射光。它的强度与波长的四次方成反比，即波长越短，瑞利散射光越强。但因瑞利散射光波长与激发光波长相同，只要选择适当的荧光测定波长或选用滤光片即可消除其影响。

2. 拉曼（Raman）散射光

光子和溶剂分子发生非弹性碰撞，在运动方向发生改变的同时，光子与溶剂分子还发生能量的交换，使光子能量减小或者增加，光的波长增长或变短，这两种散射光均称为拉曼（散射）光。其中波长较长的拉曼光因其波长与物质的荧光波长相接近，故对测定的干扰较大。

由于拉曼光波长随激发光波长的改变而改变，而荧光物质的荧光波长与激发光波长无关，故通过选择适当的激发光波长，就可以将二者区分开。



第二节 定性定量分析

一、荧光强度与溶液浓度的关系

分光光度法是测定物质对光的吸收程度；荧光分析法是测定物质吸收了一定频率的光之后，物质本身所发射的荧光强度。当溶液中的荧光物质被入射光激发后，可以在各个方向观察到荧光，由于激发光一部分可透过溶液，所以在透射光方向观察荧光是不适宜的，一般是在与透射光垂直的方向观察荧光

测定荧光强度时，要选择两个不同的波长：一个是物质吸收的光，即激发光的波长；另一个是被激发物质发射的光，即荧光的波长。

溶液的荧光强度与该溶液对光的吸收程度以及溶液中荧光物质的荧光效率有关。

根据 Beer 定律

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-abc} \quad I = I_0 10^{-abc}$$

所以

$$I_a = I_0 - I = I_0 (1 - 10^{-abc})$$

由于溶液的荧光强度与溶液对光的吸收程度及荧光效率成正比，即

$$F \propto \Phi I_a$$

$$F = K \Phi I_0 (1 - 10^{-abc})$$

$$= K \Phi I_0 (1 - e^{-2.3abc})$$

$$I_a = I_0 - I = I_0 (1 - 10^{-abc})$$

$$e^{-2.3abc} = 1 + (-2.3abc) + \frac{(-2.3abc)^2}{2!} + \dots$$

$$F = K\Phi I_0(1 - e^{-2.3abc})$$

$$F = K\Phi I_0 \left\{ 1 - \left[1 + (-2.3abc) + \frac{(-2.3abc)^2}{2!} + \dots \right] \right\}$$

$$F = K\Phi I_0 \left[-2.3abc + \frac{(-2.3abc)^2}{2!} + \dots \right]$$

当 $abc \leq 0.05$ （即溶液很稀） 时

$$, \quad F = K\Phi I_0 \left[-2.3abc + \frac{(-2.3abc)^2}{2!} + \cdots \right]$$

$$F = -2.3K\Phi I_0 abc$$

对于一定的荧光物质， 当测定条件
固定时，

$$F = K'c$$

即对一定的荧光物质的稀溶液

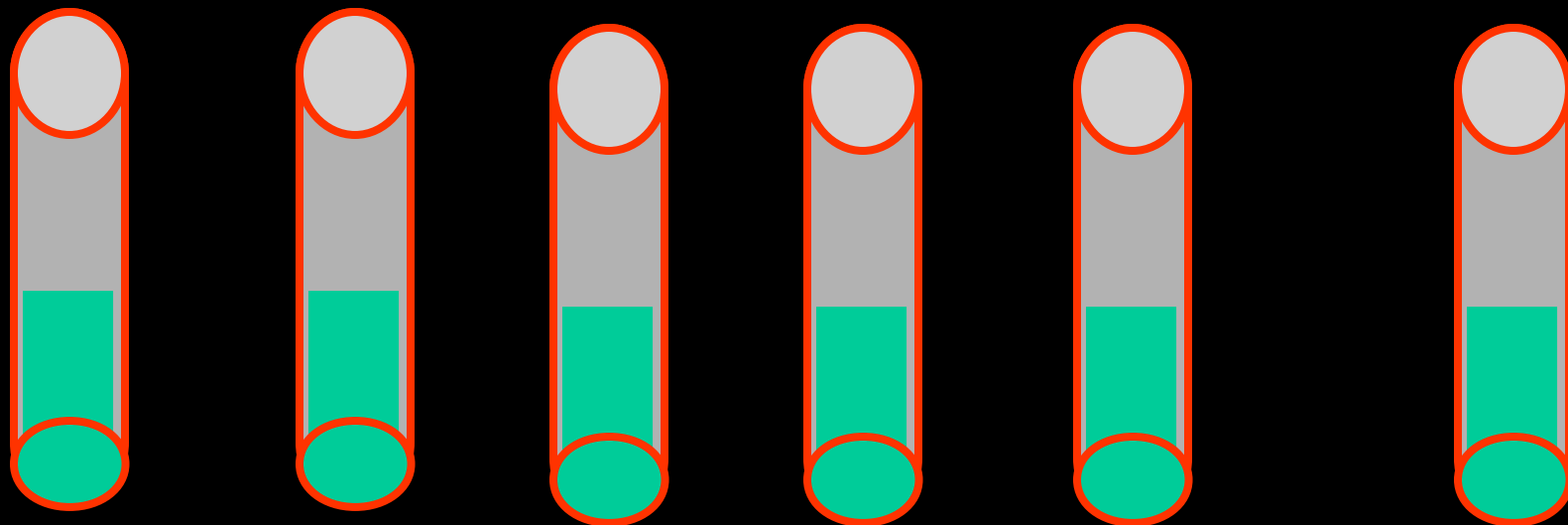
($abc \leq 0.05$) , 在一定的温度下, 当激发光的波长、强度和液层厚度都固定后, 其荧光强度与该溶液的浓度成正比。这是荧光分析定量的基础。

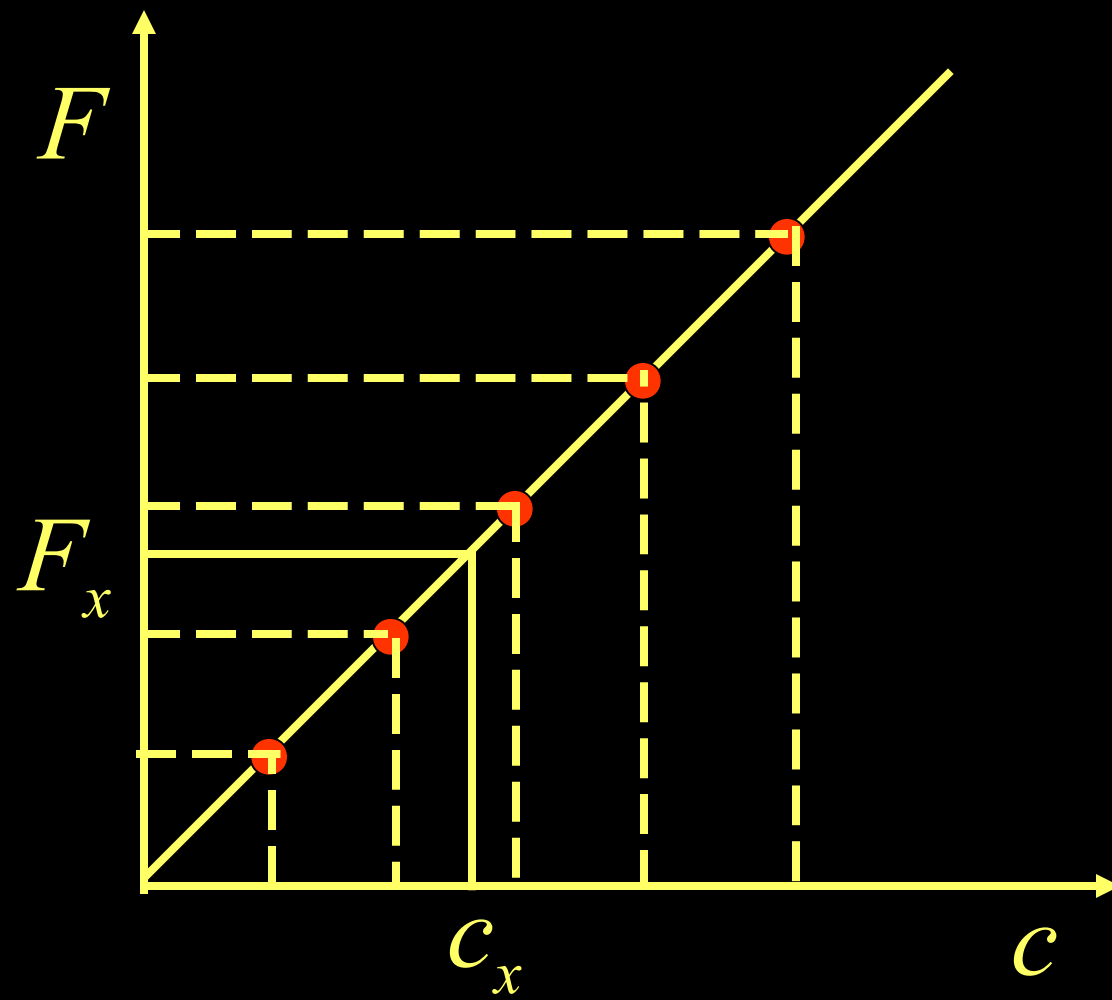
二、定性分析

荧光物质的特征光谱包括激发光谱和荧光光谱，因此用它鉴定物质比吸收光谱可靠。

三、定量分析

1. 标准曲线法





2. 直接比较法

如果荧光物质的标准曲线过零点，且线性良好，可用直接比较法测定。

$$F_s - F_0 = Kc_s$$

$$F_x - F_0 = Kc_x$$

$$\frac{F_s - F_0}{F_x - F_0} = \frac{c_s}{c_x}$$

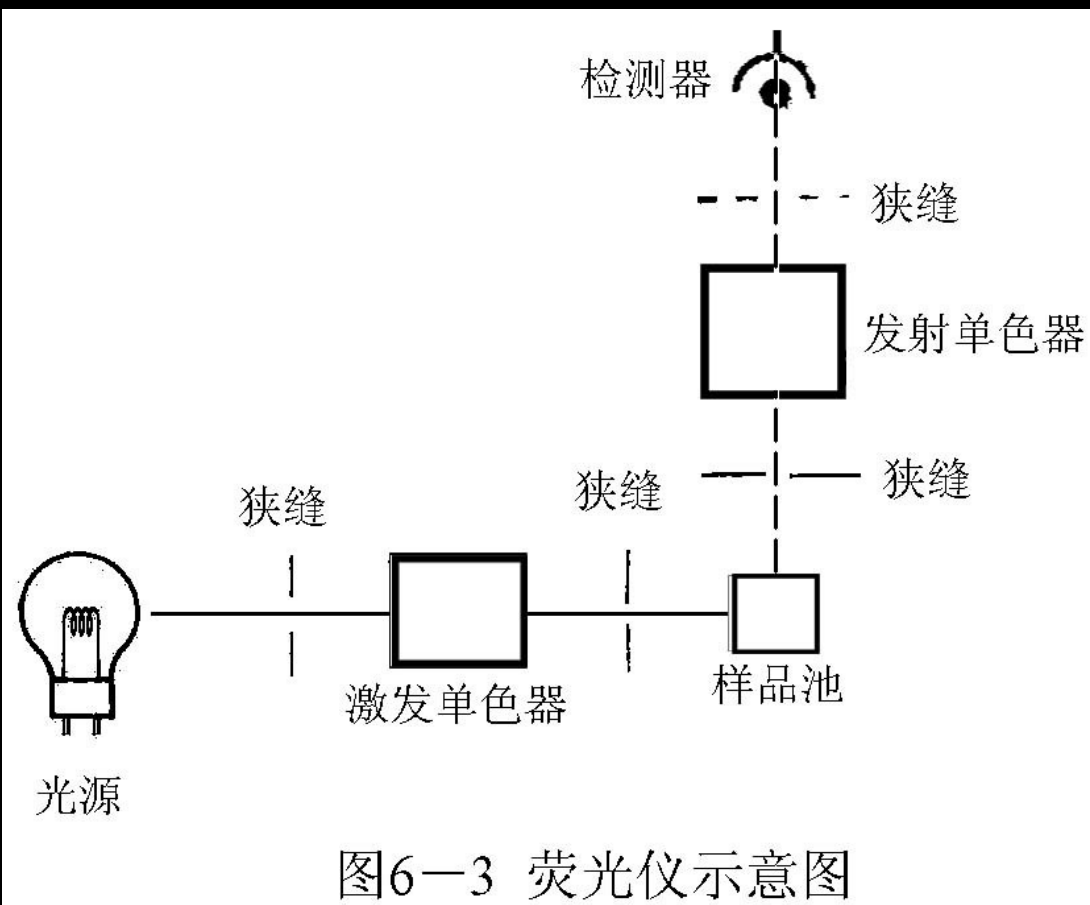
$$c_x = \frac{F_s - F_0}{F_x - F_0} \cdot c_s$$

第三节 仪器

一、仪器的构造及原理

仪器类型很多，基本结构相似，一般包括五部分：激发光源、单色器、样品池、检测器和记录显示部分。

1. 光源 能发射紫外到可见区波长的光、强度大、稳定。常用的有溴钨灯、高压汞灯、氙灯。



2. 单色器

两个单色器

3. 样品池
成

通常用石英制

4. 检测器

光

电倍增管

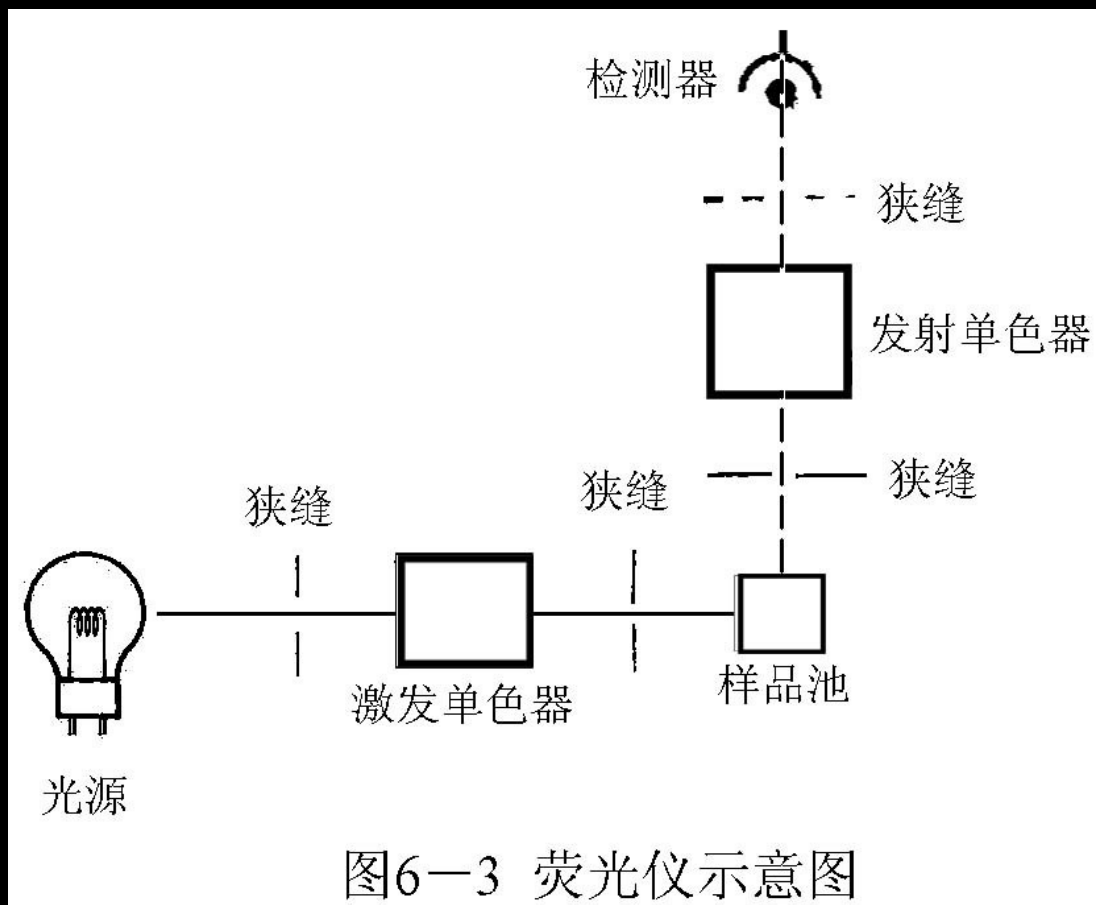


图6—3 荧光仪示意图

二、仪器类型

1. 光电荧光计 用滤光片作单色器（激发滤光片和荧光滤光片），溴钨灯或高压汞灯作光源，光电管为检测器。

2. 荧光分光光度计 用氘灯作光源、光栅作单色器，光电倍增管为检测器。可连续扫描激发光谱和荧光光谱

第五节 荧光分析法的应用

（一） 有机物的荧光分析

由于荧光分析的高灵敏度、高选择性，使它在医学检验、卫生检验、药物分析、环境检测及食品分析等方面有广泛的应用。

芳香族及具有芳香结构的物质，在紫外光照射下能产生荧光。因此，荧光分析法可直接用于这类有机物的测定，如：多环胺类、萘酚类、嘌呤类、吡啶类、多环芳烃类、具有芳环或芳杂环结构的氨基酸及蛋白质等，约有 200 多种。

食品中维生素含量的测定是食品分析的常规项目，几乎所有种类的维生素都可以用荧光法进行分析。多环芳烃普遍存在于大气、水、土壤、动植物及加工食品中，大家所熟知的苯并[a]芘是致癌活性最强的一种，通过萃取或色谱分离后，可采用荧光法进行测定。该方法准确可靠，测定最低浓度可达 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。

应用实例：食品中 VB_2 （核黄素）的测定 其测定原理是 VB_2 在 $440 \sim 500 \text{ nm}$ 波长的光照射下，发出黄绿色荧光，在波长 525 nm 下测定其荧光强度，在稀溶液中其荧光强度与 VB_2 的浓度成正比。为消除试液中共存荧光杂质的干扰，可在测定过荧光强度的溶液中加入连二亚硫酸钠（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ），将 VB_2 还原为无荧光的物质，然后再测定试液中残余的荧光杂质的荧光强度，两者之差即为食品中 VB_2 的荧光强度。该方法被作为食品分析的国家标准方法。

（二） 无机元素的荧光分析

能产生荧光的无机物较少，对其进行分析通常是将待测元素与荧光试剂反应，生成具有荧光特性的配合物，进行间接测定。目前利用该法可进行荧光分析的无机元素已近 70 种。常见的有铬、铝、铍、硒、锗、镉等及部分稀土元素。

例如 Al^{3+} 与桑色素或 8- 羟基喹啉的配合物就可产生荧光，从而用于铝的测定。有些元素虽不能与有机试剂形成能产生荧光的配合物，但它可使荧光物质的荧光熄灭。例如 F^- 离子在一定 pH 的溶液中，能从 Al^{3+} 与桑色素的荧光配合物中夺取 Al^{3+} ，从而导致荧光配合物的荧光强度降低，其荧光强度与 F^- 离子的浓度成反比，利用这一性质可间接测定样品中的氟离子含量。

应用实例：硒的测定 其测定原理是将样品用 HNO_3 和 HClO_4 湿式分解，硒被氧化成 H_2SeO_4 ，再加 HCl 加热，还原为 H_2SeO_3 。在酸性溶液中 Se(IV) 与 2,3-二氨基萘发生特异反应，生成能发荧光的 4,5-苯并苯硒脑，用环己烷萃取后进行荧光测定。此方法灵敏度高，选择性好，是测定硒的国家标准分析方法。

（三）在生命科学中的应用

荧光分析法常用于临床测定生物样品中某些成分的含量，由于这些物质荧光量子产率较低，所以常用各种荧光探针来间接测定。荧光探针还被广泛应用于研究蛋白质大分子构象及构象动力学信息。此外，荧光光谱可用以研究DNA的烷基化损伤与修复；荧光偏振、荧光猝灭及多维荧光检测技术可用于研究蛋白质与配体之间的相互作用及动力学；时间分辨荧光免疫技术越来越多地用于许多蛋白质、激素、病毒抗原乃至DNA杂交体等的分析。总之，荧光分析法在生命科学领域中的应用前景十分广