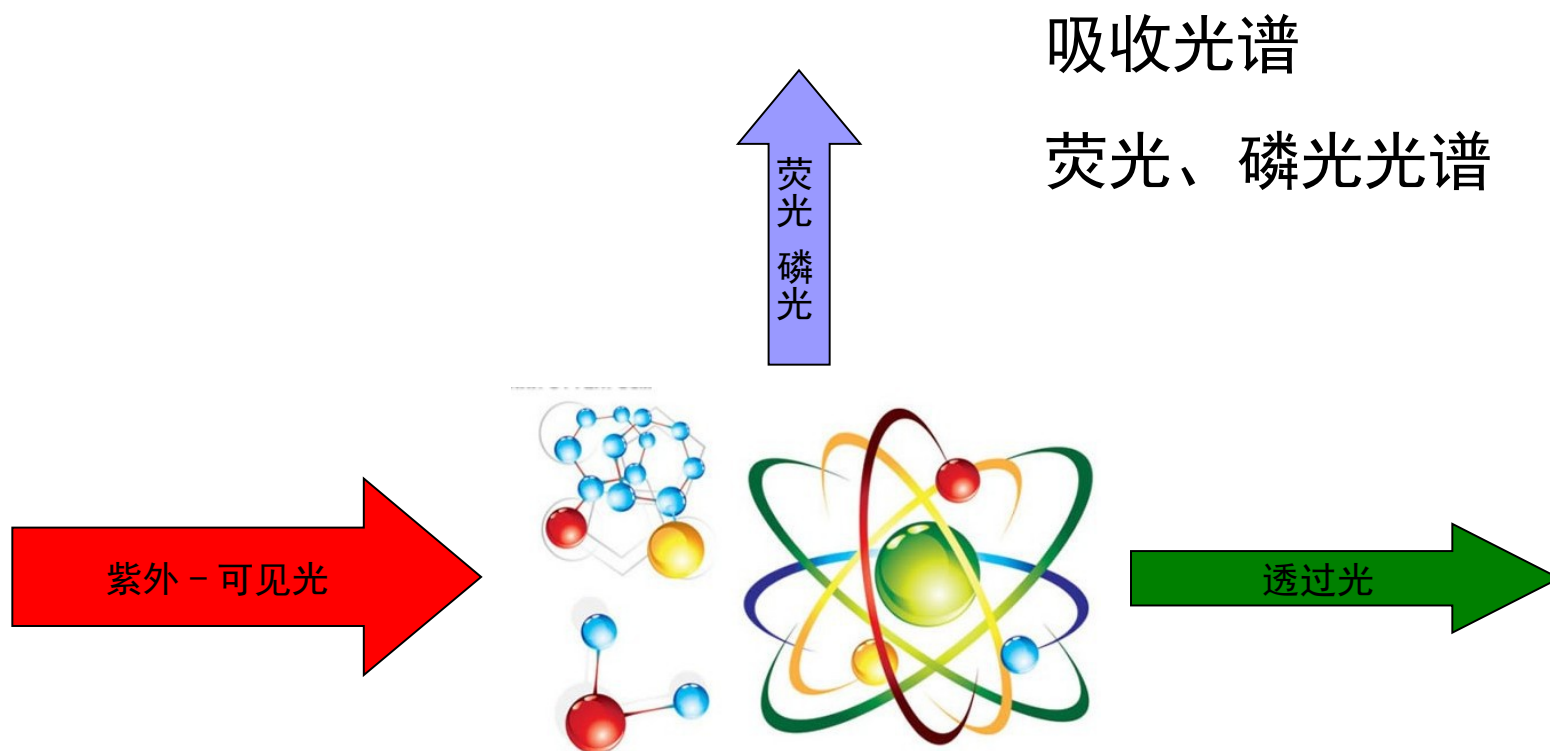
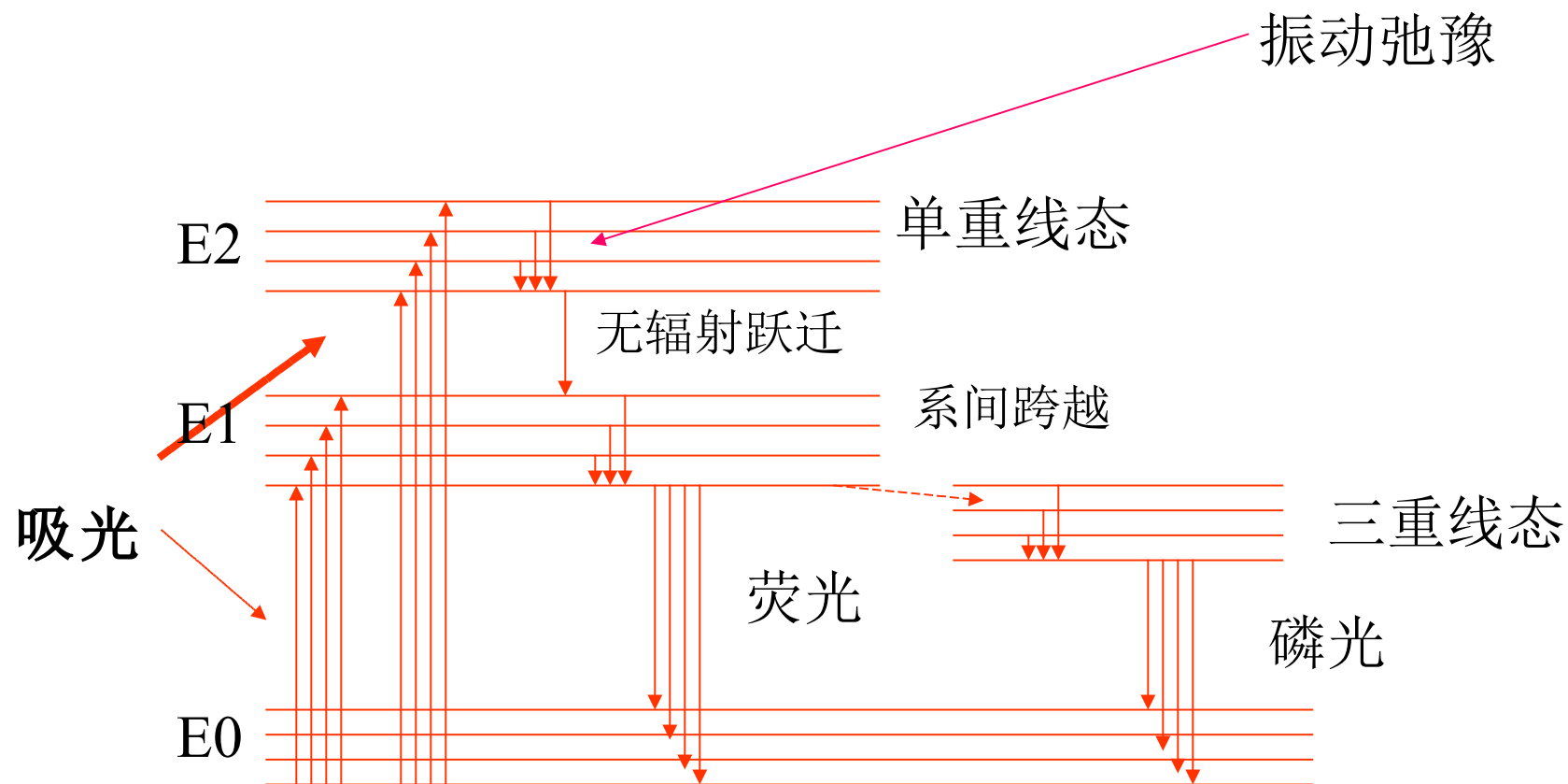


# 第四章 紫外 - 可见分子光谱法

(UV-VIS Molecular Spectrometry)



# 分子光谱的特点



# 第一节

# 分子吸收光谱概述

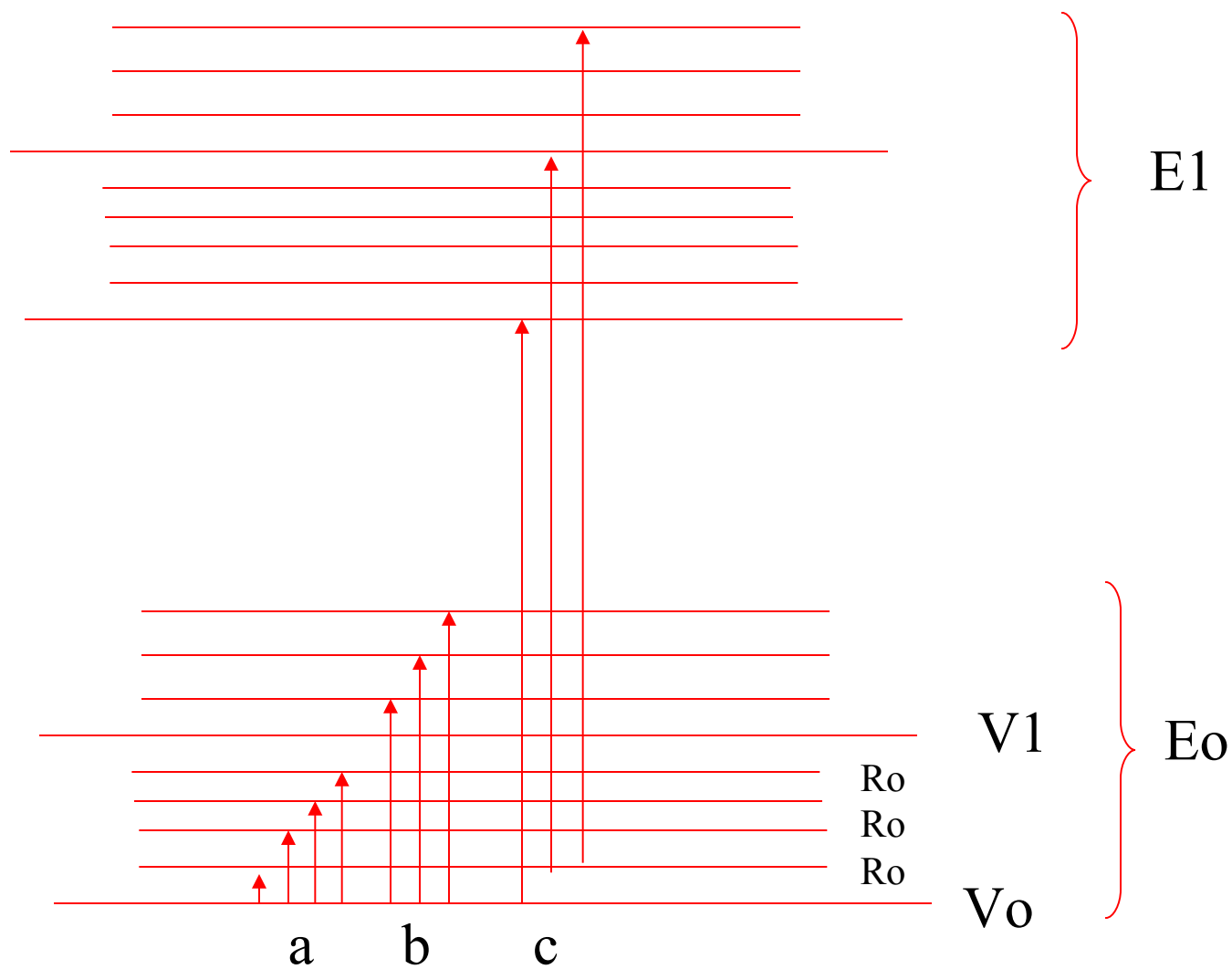
## 一、分子吸收光谱分析的发展概况

- 可见 - 紫外 - 红外

- 目视比色 - 光电比色 - 分光光度  
眼睛 滤光片 光栅

## 二、分子吸收光谱的分类和特征

- 紫外 - 可见 电子光谱  $\Delta E_e = 1 - 20 \text{ eV}$
- 红外                      振动光谱                      0.05-1
- 远红外                    转动光谱                      0.005-0.05



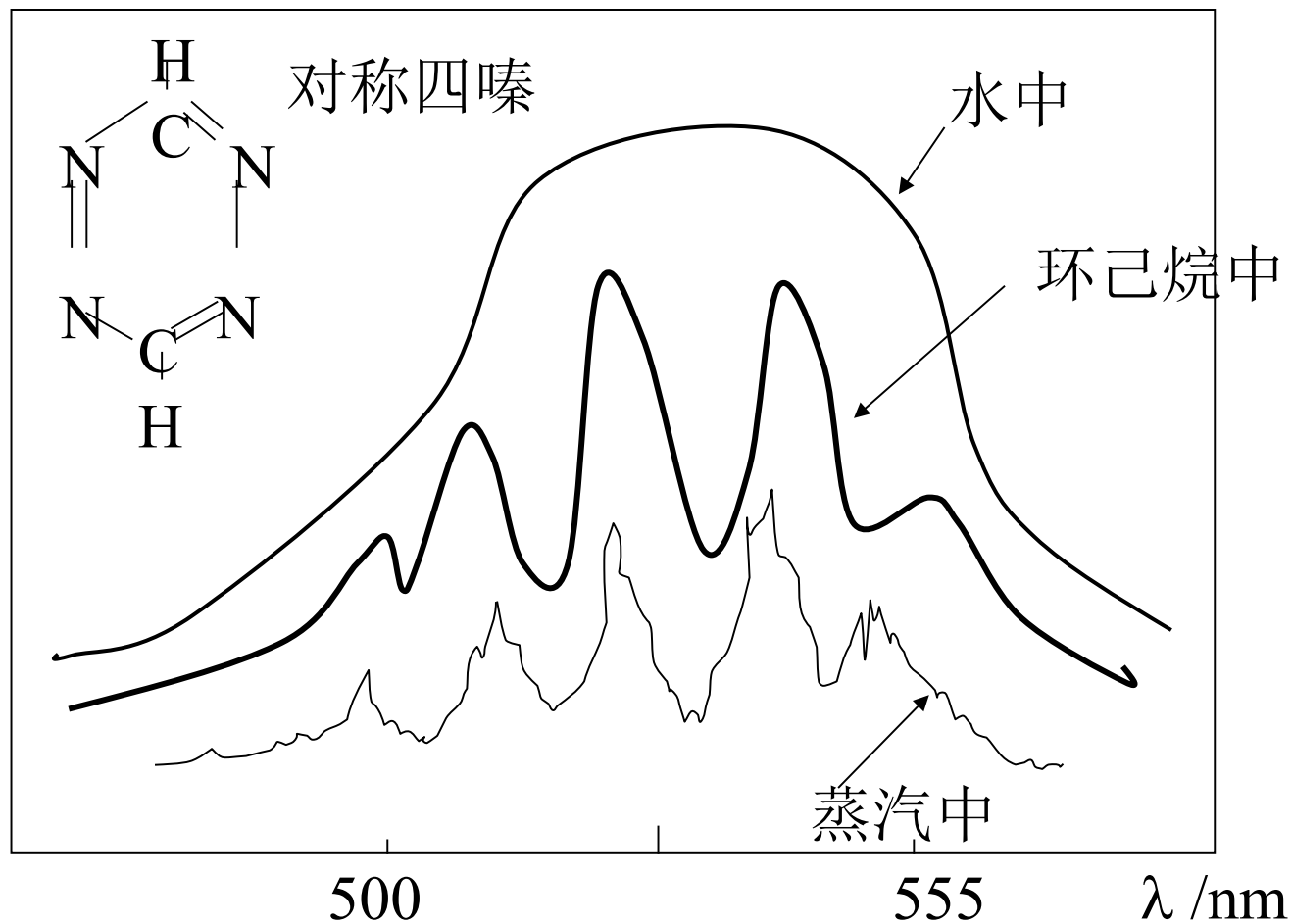
E 电子能级  
V 振动能级  
R 转动能级

# 分子的电子光谱的特点：

- 在波长范围内按一定强度分布的谱带——带光谱
- 波长位于紫外 - 可见区

# 分子在不同环境中的谱带形状

A



### 三、分子紫外 - 可见吸收光谱的特点

- 可进行分子的定性和定量分析
- 可用于一些物理化学常数的测定（如平衡常数等）
- 仪器结构简单、价格便宜
- 应用范围广泛（无机离子、有机化合物、生物大分子分析等）

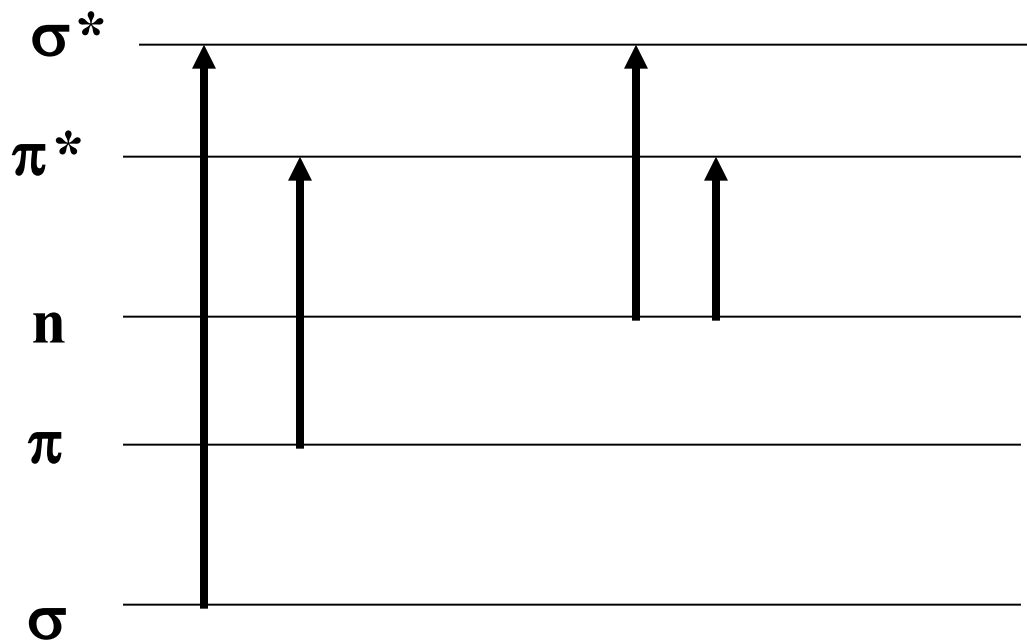


# 第二节 紫外 - 可见分子吸收光谱的理论基础

## 一、吸收光谱与分子结构 — 定性依据

### 1、有机化合物的吸收光谱

根据分子轨道理论，分子中的电子轨道有  $n$ 、 $\sigma$  和  $\pi$  三种



反键轨道

非键轨道

成键轨道

# $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁

---

- 能量很大
- 吸收光谱在真空紫外区
- 多为饱和烃

甲烷                      125 nm

乙烷                      135 nm

## $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁

---

- 所需能量小于  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  跃迁 ( 150-250 nm )
- 含有未共用电子对 ( n 电子 ) 原子的饱和化合物都可发生
- 跃迁的摩尔吸光系数比较小, 一般在 100-3000 L / mol cm

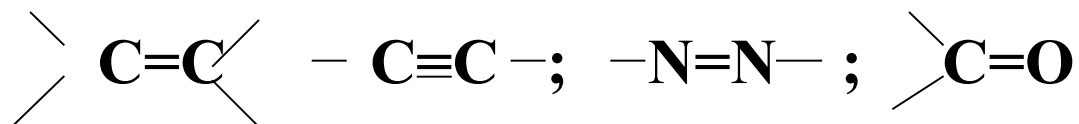
化合物	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$
H <sub>2</sub> O	167	1480
CH <sub>3</sub> OH	184	150
CH <sub>3</sub> Cl	173	200
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O	184	2520

# $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁

---

- $\pi \rightarrow \pi^*$  和  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁能量低 (  $>200 \text{ nm}$  )

- 含有不饱和键的有机分子易发生这类跃迁



- 有机化合物的紫外 - 可见吸收光谱分析多以这两类跃迁为基础

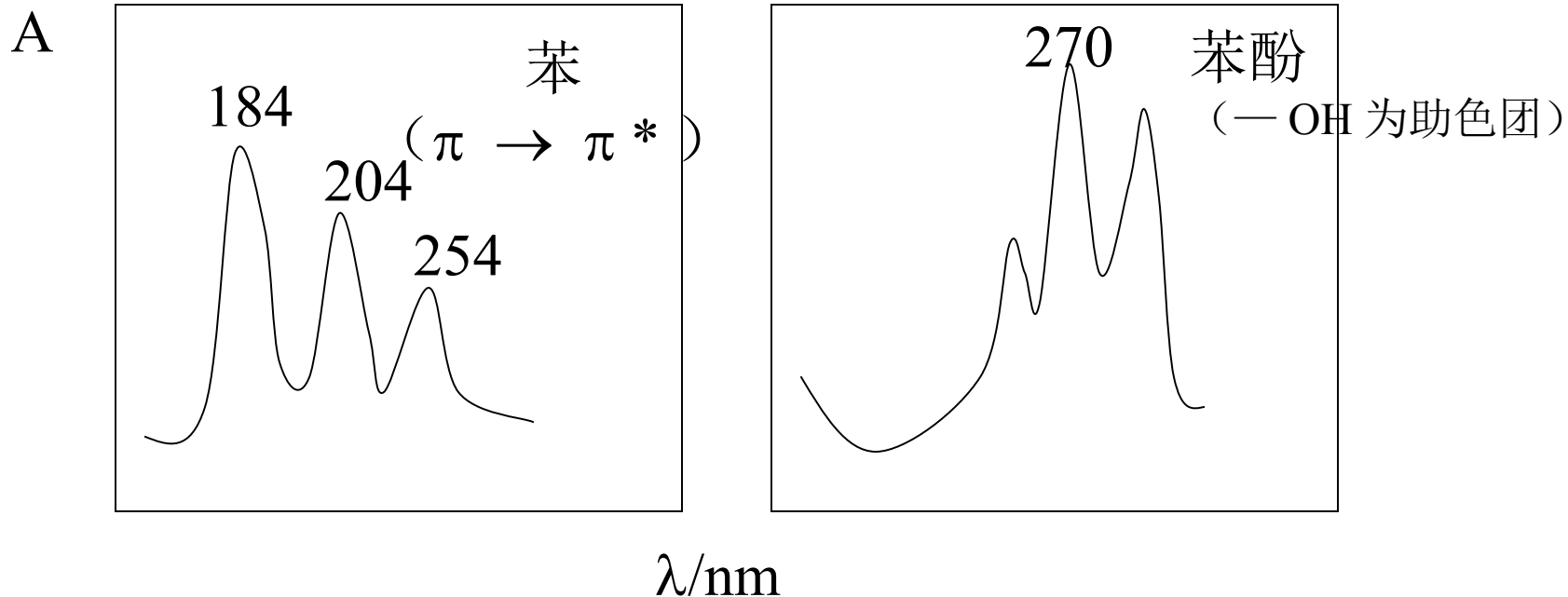
- $\pi \rightarrow \pi^*$  比  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁几率大 100-1000 倍

- $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁吸收强,  $\epsilon \sim 10^4$

- $n \rightarrow \pi^*$  跃迁吸收弱,  $\epsilon < 500$

生色团	——	含有 $\pi$ 键不饱和官能团
助色团	——	基团本身无色，但能增强生色团颜色

为含有 n 电子，且能与 $\pi$ 电子作用，  
产生  $n \rightarrow \pi$  共轭



$\epsilon_{\max}$

---

---

# 影响紫外 - 可见光谱的因素

- 共轭效应： $\pi$ 电子共轭体系增大，波长红移、吸收增强；
- 取代基影响：能够引起 $\pi$ 电子永久性转移的取代基使波长红移（助色团）；
- 溶剂影响：一般情况下分子的激发态极性大于基态，因此溶剂极性增大有利于激发态稳定，能量降低，波长红移。

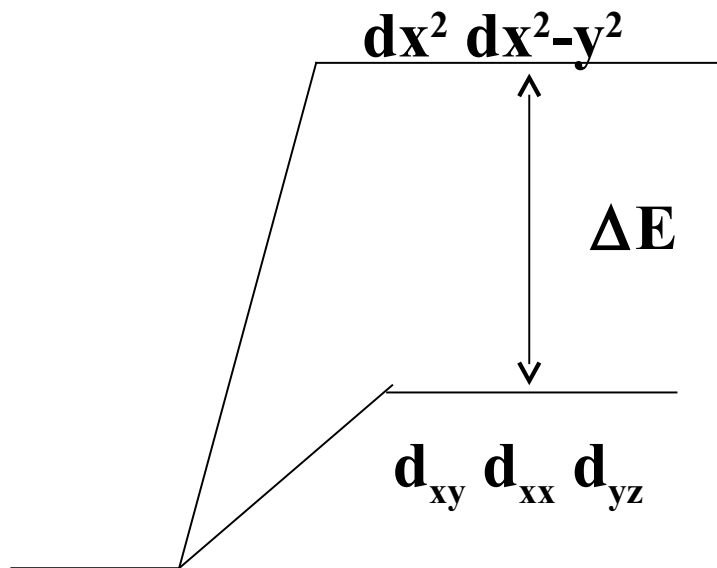
## 2、无机化合物的吸收光谱

### d-d 电子跃迁

绝大多数过渡金属离子都具有未充满的 d 轨道，按照晶体场理论，当它们在溶液中与 water 或其它配体生成配合物时，受配体配位场的影响，原来能量相同的 d 轨道发生能级分裂，产生 d-d 电子跃迁。

配体配位场越强，d 轨道分裂能越大，吸收波长越短。

(f-f 跃迁与此类似)



没有配位场    八面体配位场



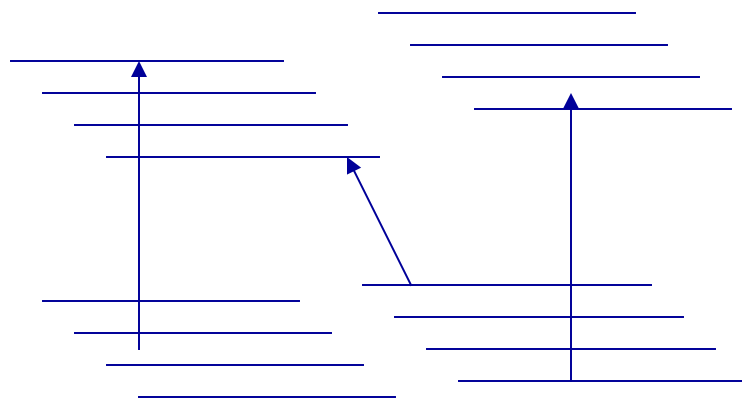
例如：  $\text{H}_2\text{O}$  配位场  $< \text{NH}_3$  配位场

$\text{Cu}^{2+}$  — 水合离子 794 nm 浅蓝色

$\text{Cu}^{2+}$  — 氨合离子 663 nm 深蓝色

# 电荷转移跃迁

配合物中一方电子向主要属于另一方的轨道跃迁



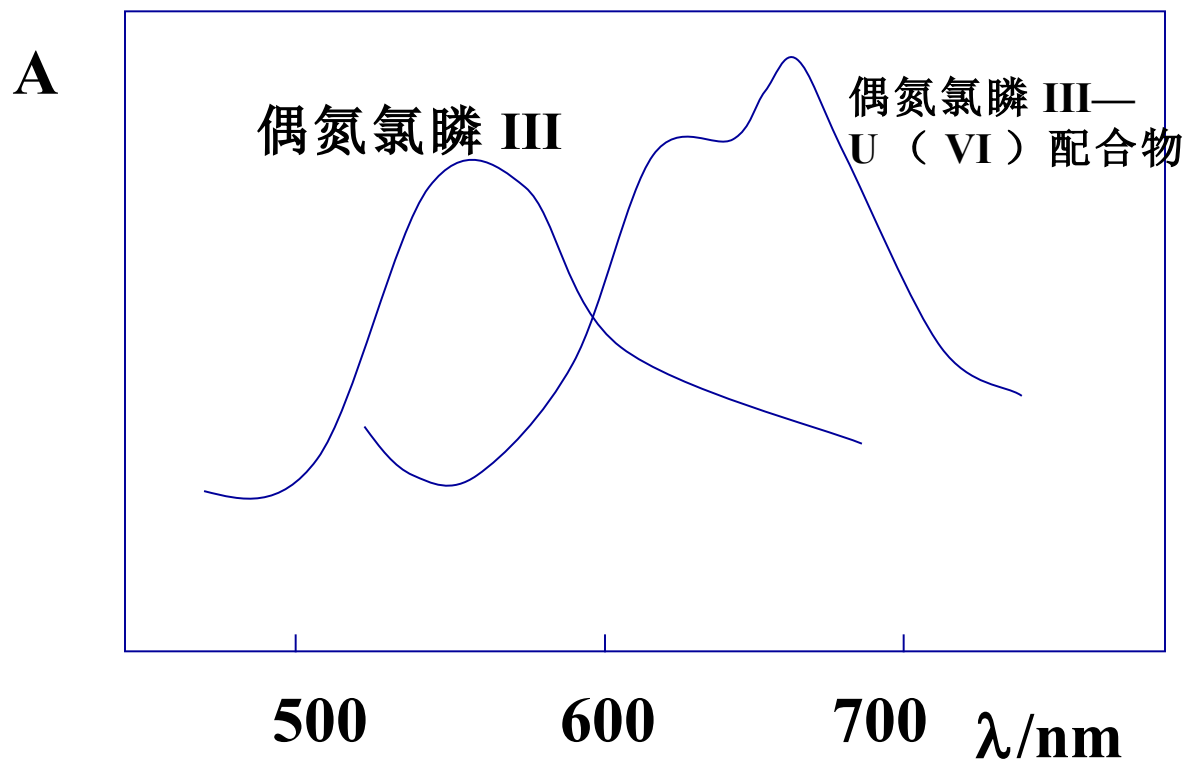
电子接受体 电子给予体

电荷转移跃迁的摩尔吸光系数都很大（10000以上），因此利用配合物可建立灵敏的分析方法。例如

**Fe（III）-SCN 配合物**

## 金属离子影响下的配体 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁

金属离子与有机物配合后使配体的共轭结构发生变化，导致吸收光谱蓝移或红移。



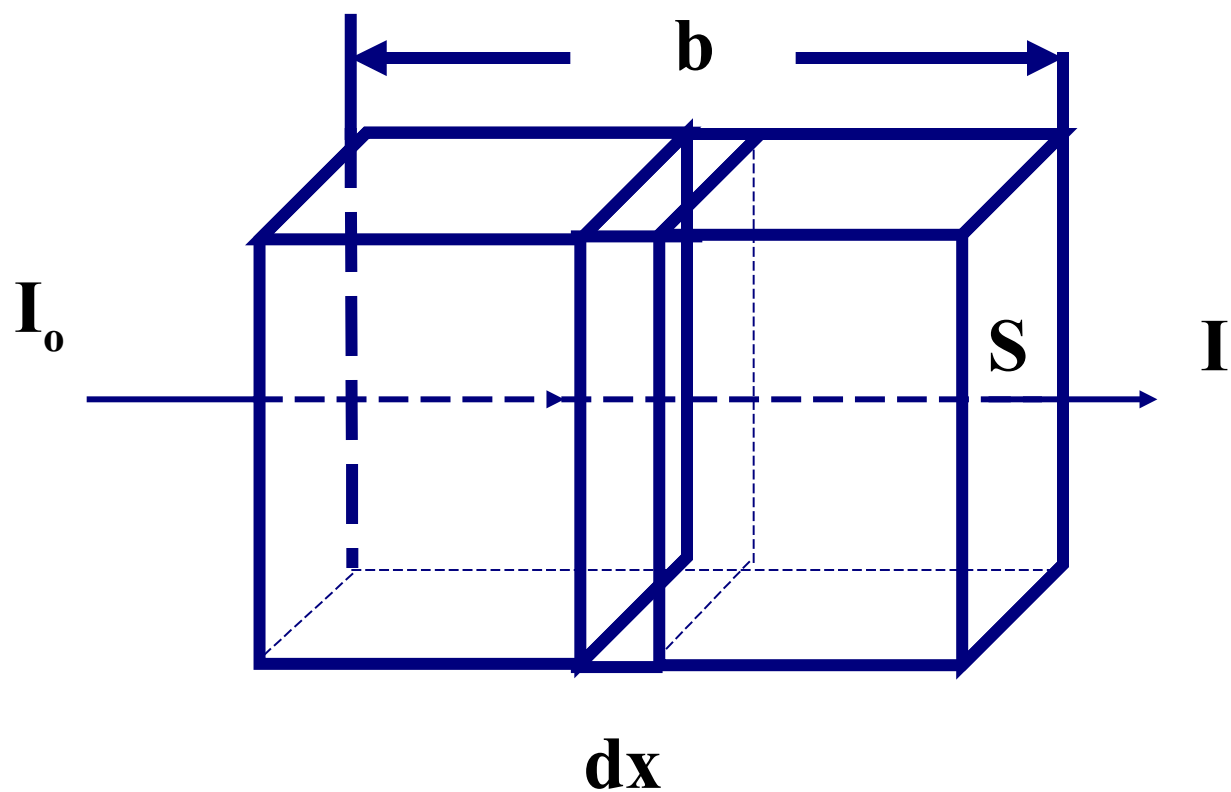


小结：

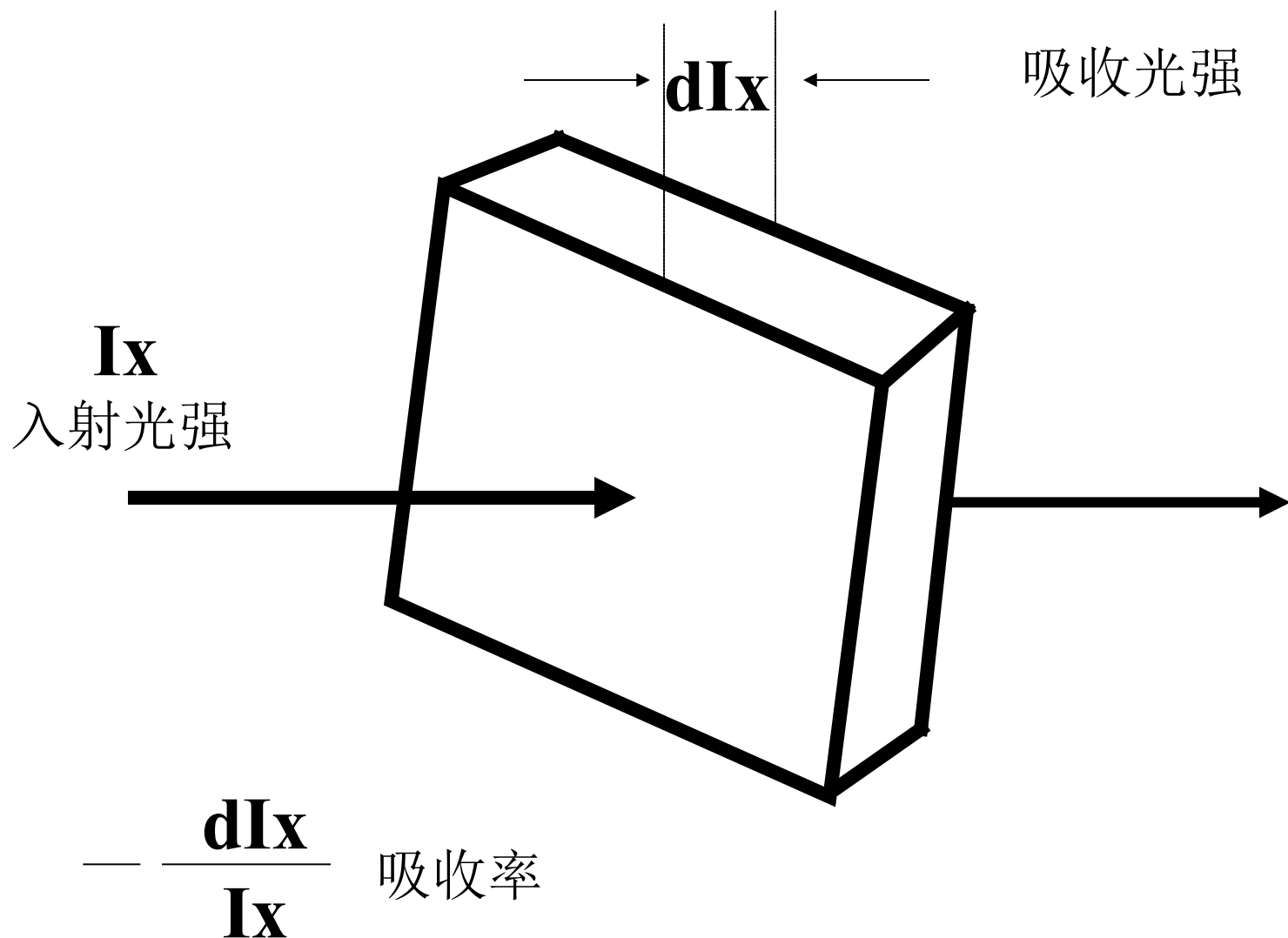
## 分子结构——光谱特征——定性分析

- 不同结构的分子由于共轭程度不同，分子吸收的特征不同；
- 相同共轭结构的分子骨架，因助色团的加入或改变，导致光谱位移和吸收系数变化；
- 相同配体，因过渡金属离子不同，导致配位场的变化或电荷转移跃迁，或配体共轭结构的变化，光谱发生变化

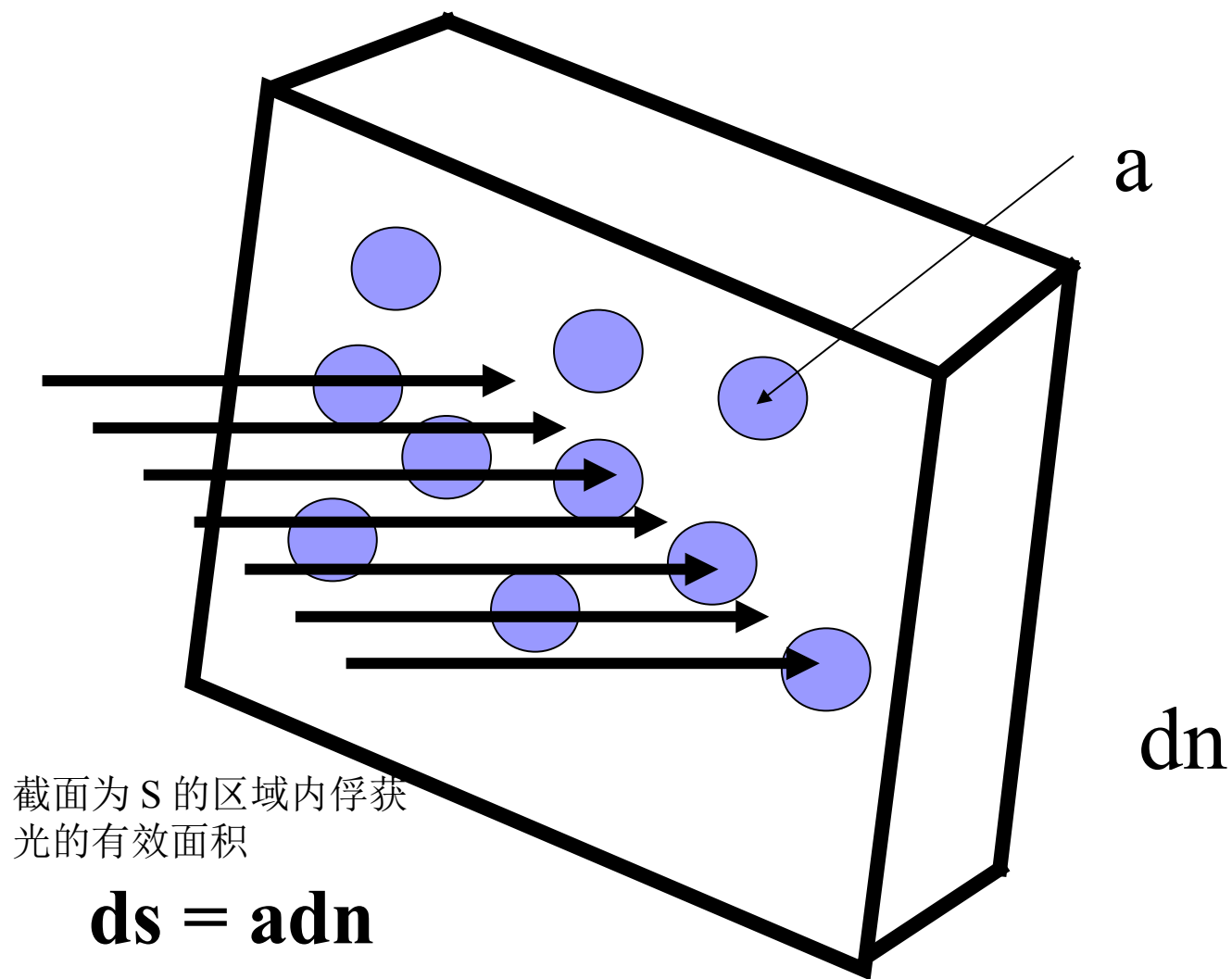
## 二、吸收定律（定量分析的基础）



## 任一截面的吸收率



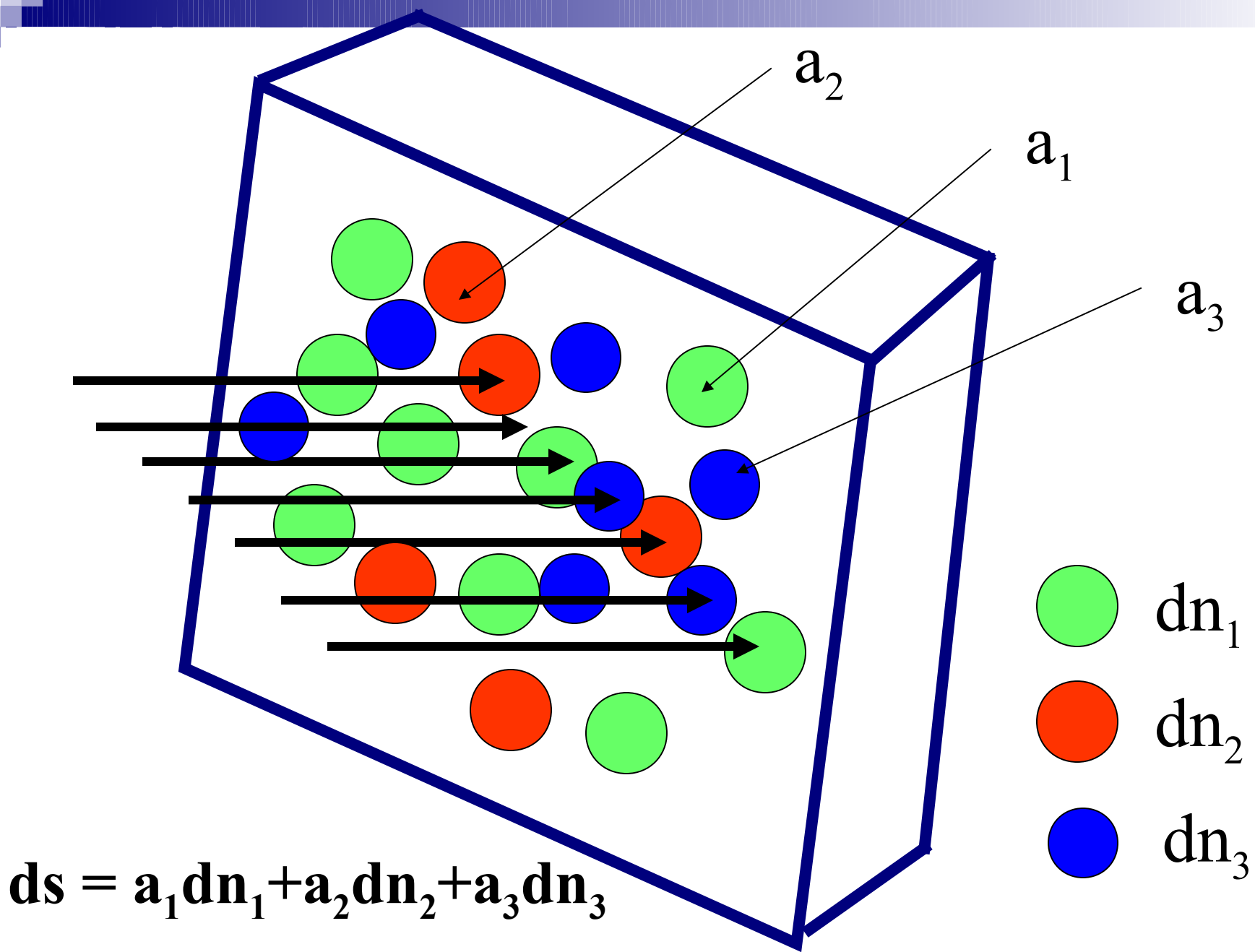
## 从分子吸收的角度考虑






因此俘获光的几率应为：










$$\text{令 } \varepsilon_i = 0.4343 N a_i$$

如果吸光介质内只有一种吸光分子

$$A_i = \varepsilon_i b c_i$$

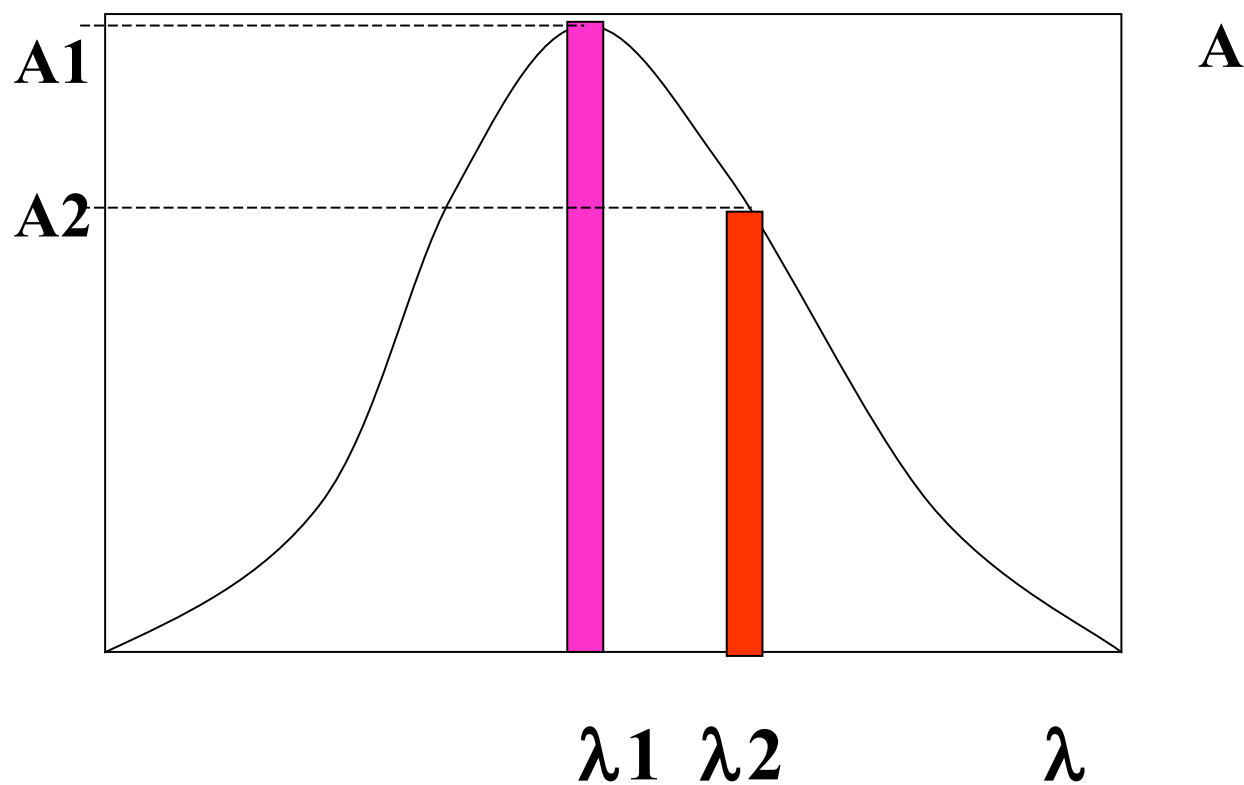

$$A = \varepsilon b c$$

定量分析的依据

## 二、吸收定律的适用性与限制


### 1、吸收定律具有加和性，即

## 2、吸收定律只适合单色光





设


$$I_1 = I_{o1} 10^{-\varepsilon_1 bc}$$

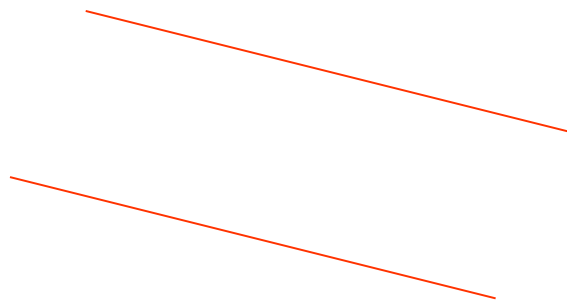
$$I_2 = I_{o2} 10^{-\varepsilon_2 bc}$$

$$A = \lg \frac{I_{o1} + I_{o2}}{I_1 + I_2}$$

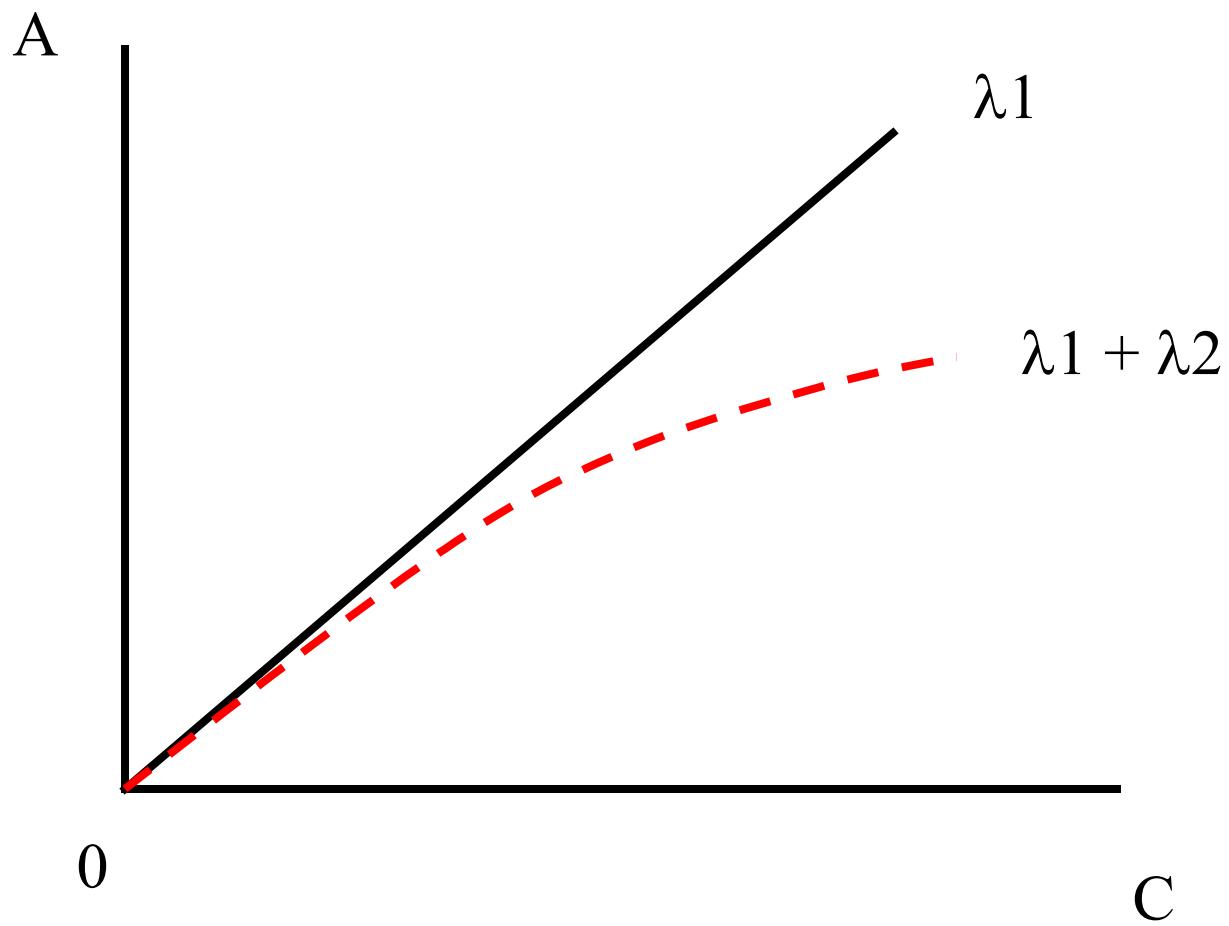
$$= \lg \frac{I_{o1} + I_{o2}}{I_{o1} 10^{-\varepsilon_1 bc} + I_{o2} 10^{-\varepsilon_2 bc}}$$



当  $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = \varepsilon$



当 时，出现偏离

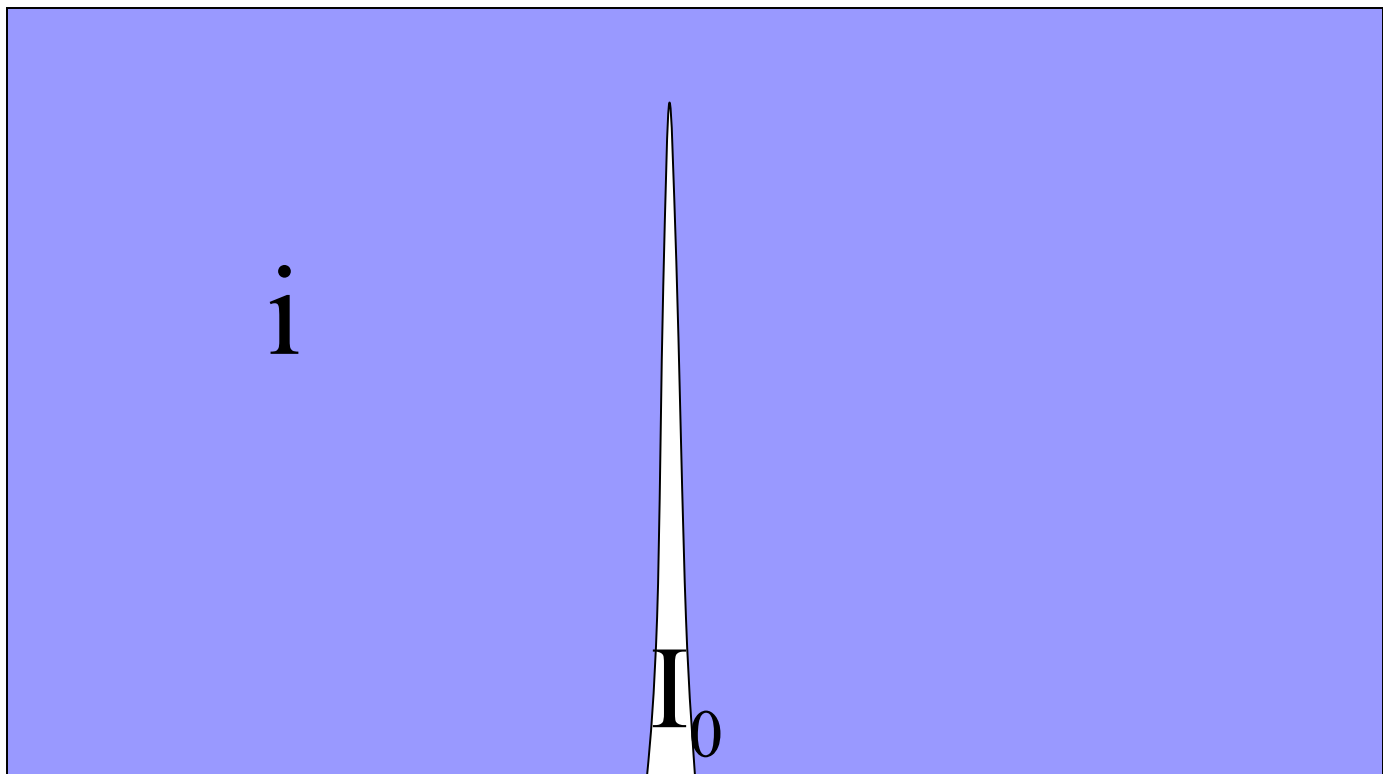


特别是存在非吸收线 ( 或吸收很小 , 杂散光 ) 和浓度较大时,  $I$  变的 很小,

$$I \ll i$$

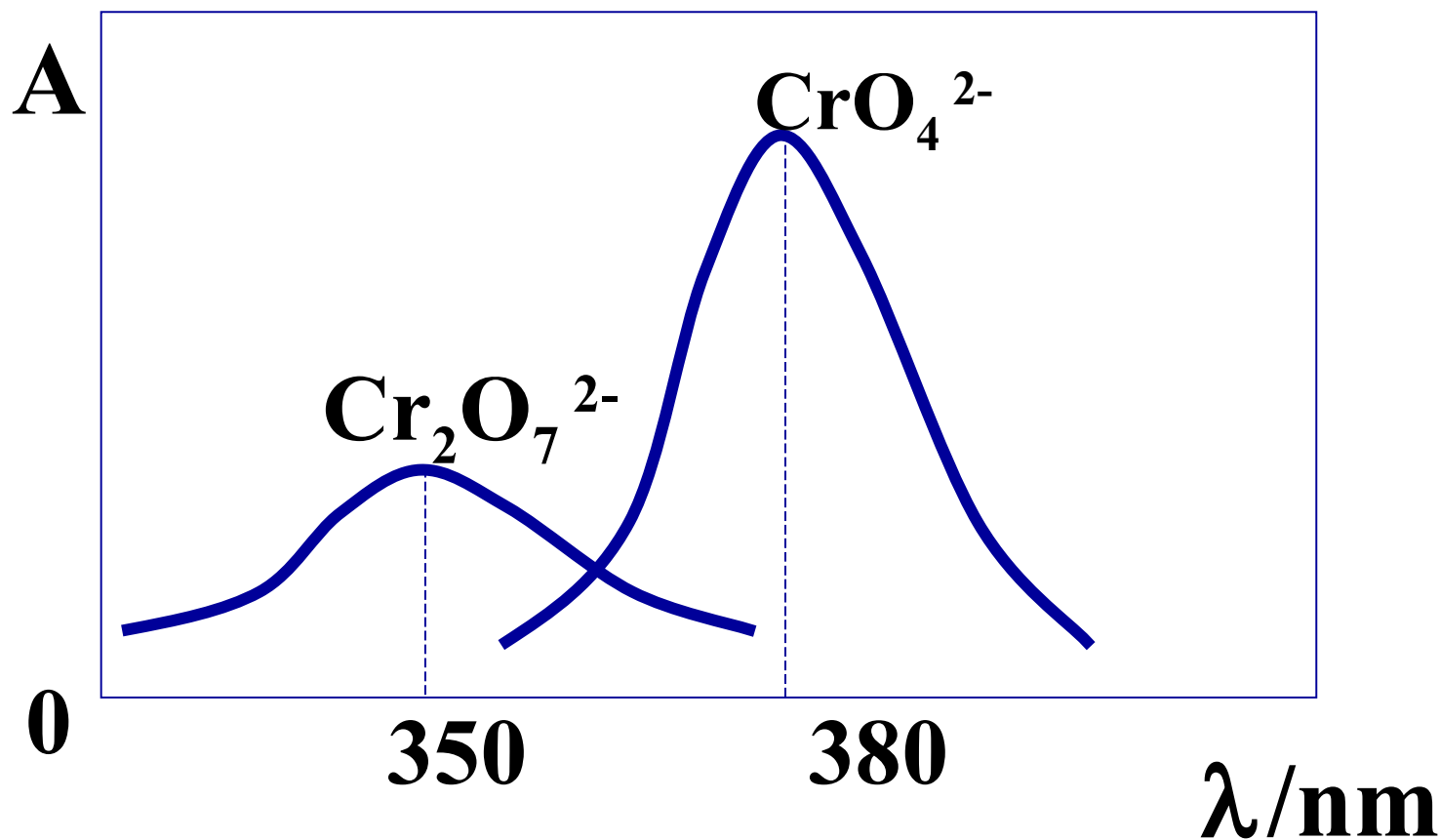
= 常数

**A**



### 3、吸收定律因化学反应而偏离

因解离等原因，被测物并不都以对特定频率辐射吸收有效的形态存在，导致吸收定律的偏离。



### 三、紫外 - 可见吸收光谱的灵敏度

$$\varepsilon = 0.4343 N a_i$$

$$a_i = 1 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$$

$$N = 6.02 \times 10^{23}$$

因为

$\varepsilon$  为摩尔吸光系数

$a_i$  的单位是  $\text{cm}^2$  (  $\text{cm}^3$  是 ml, 变成 L 除 1000 )

$$\begin{aligned} \text{所以 } \varepsilon &= 0.4343 N a_i \\ &= 0.4343 \times 6.02 \times 10^{23} \times 1 \times 10^{-15} / 1000 \\ &= 10^5 \end{aligned}$$

若 1% 吸收  $A=0.0044$

$$b = 1$$

$$C = \frac{A}{\epsilon b} = \frac{0.0044}{100000}$$

$$= 4.4 \times 10^{-8} \text{ (M)}$$

此即为方法的理论灵敏度

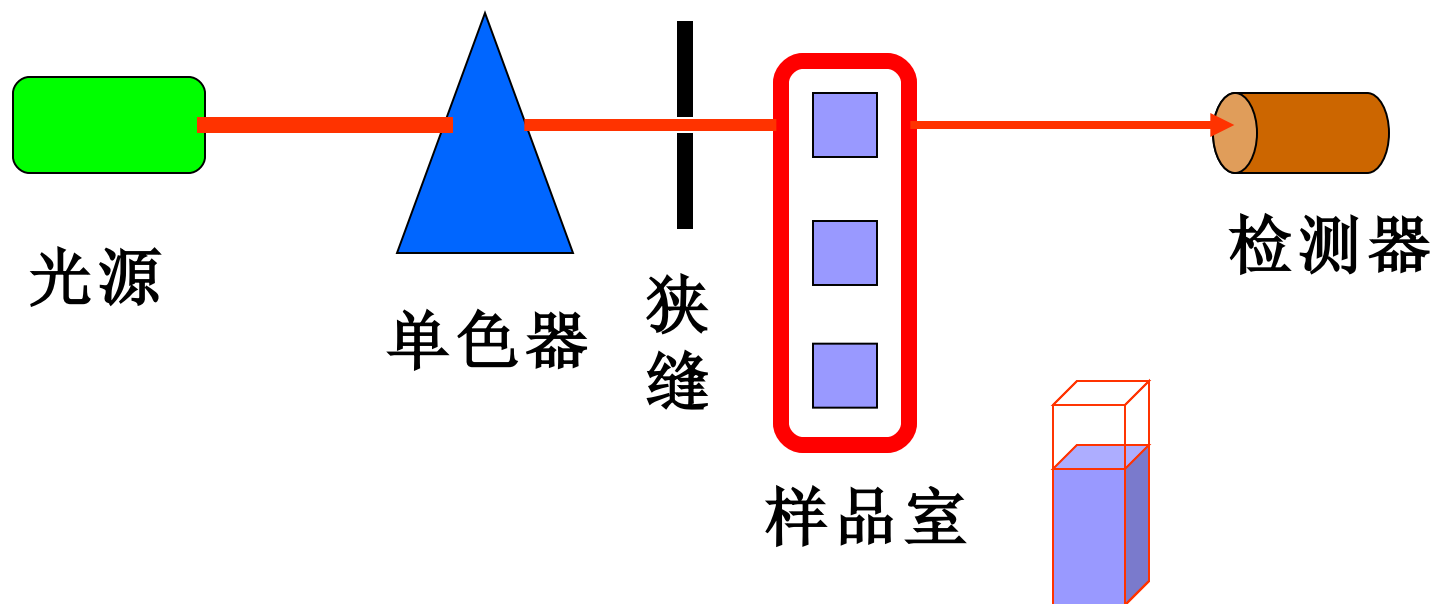
# 思考题

- UV-VIS 的理论灵敏度为  $4.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ ，这一极限值能够从哪几个方面突破？请你提出有效的方法。



# 第三节 紫外 - 可见分光光度计

## 一、基本结构

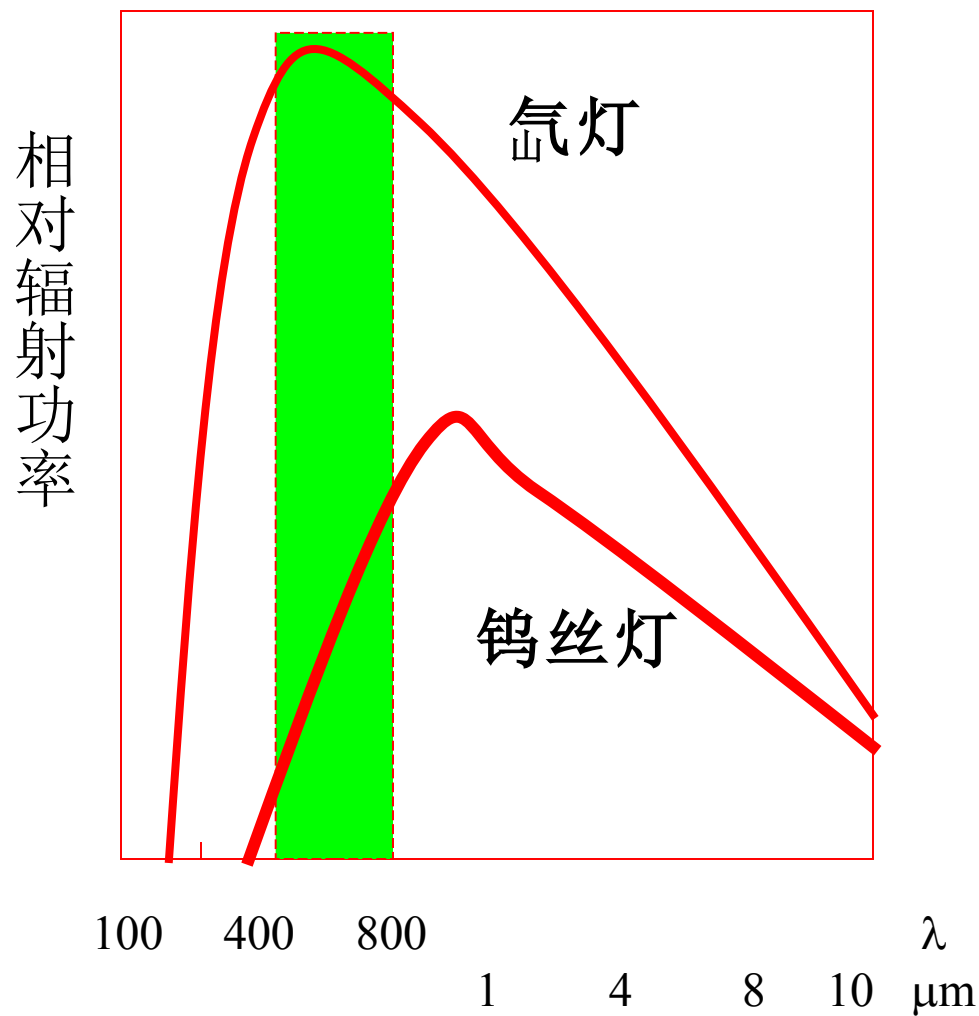


## 讨论：与原子吸收光谱仪比较：

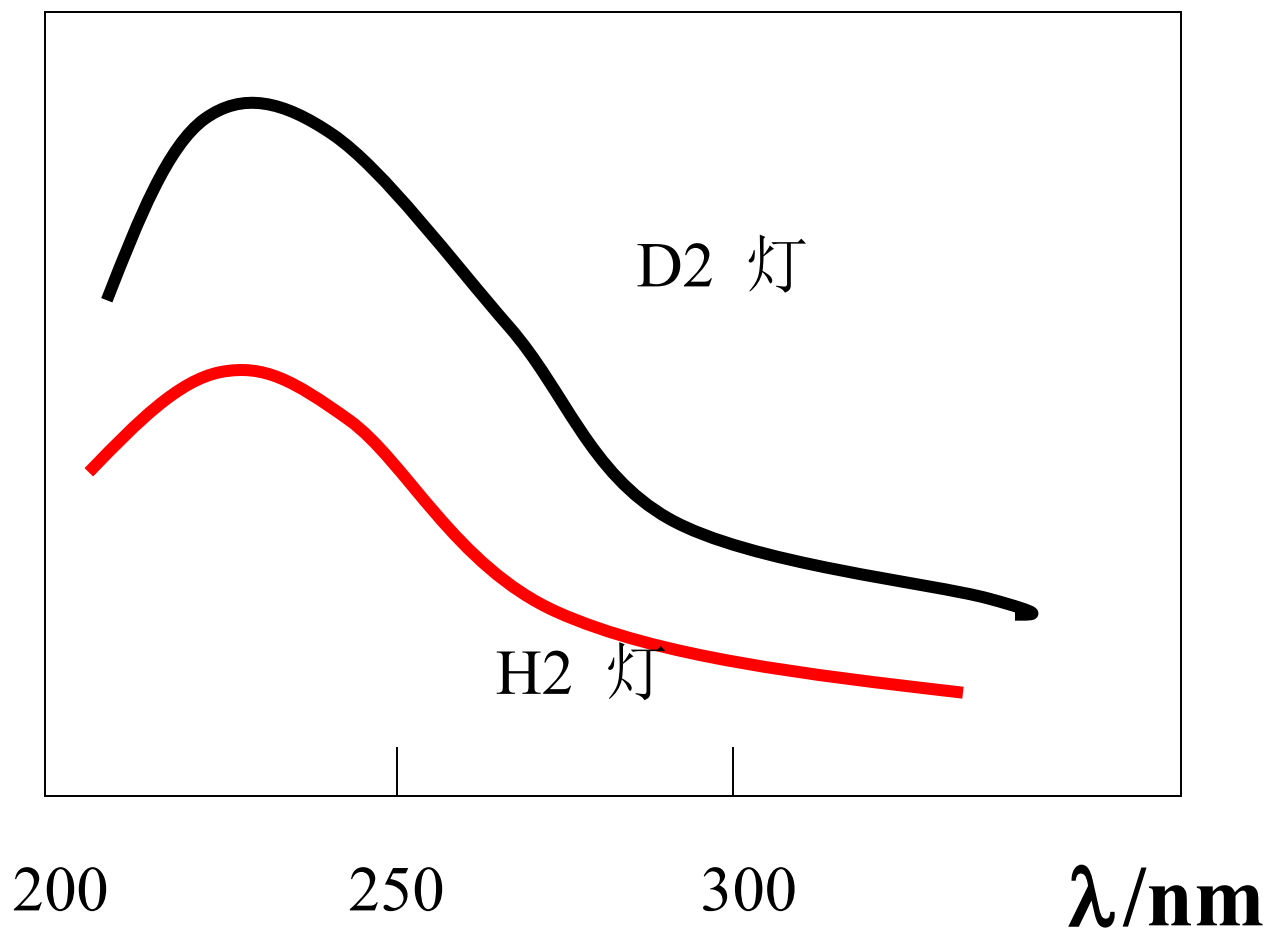
- 光源的单色性
- 单色器
- 样品室
- 检测器

# 1、光源

- 钨丝灯
- 卤钨灯
- 氢灯和氘灯



相对辐射功率





## 2、单色器

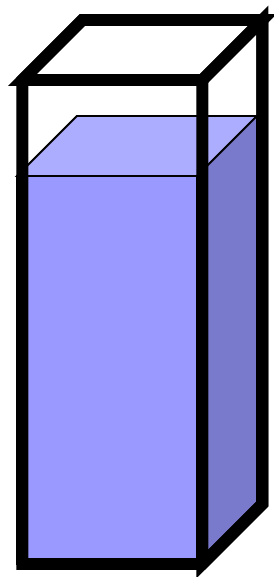
光栅——棱镜

## 3、检测器

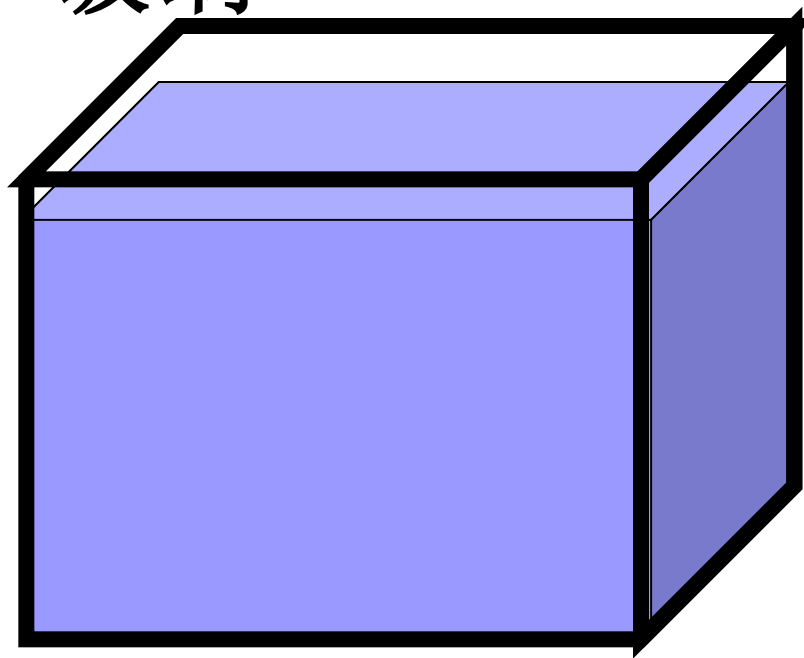
光电倍增管 — CCD

## 4、样品室

石英 —— 玻璃



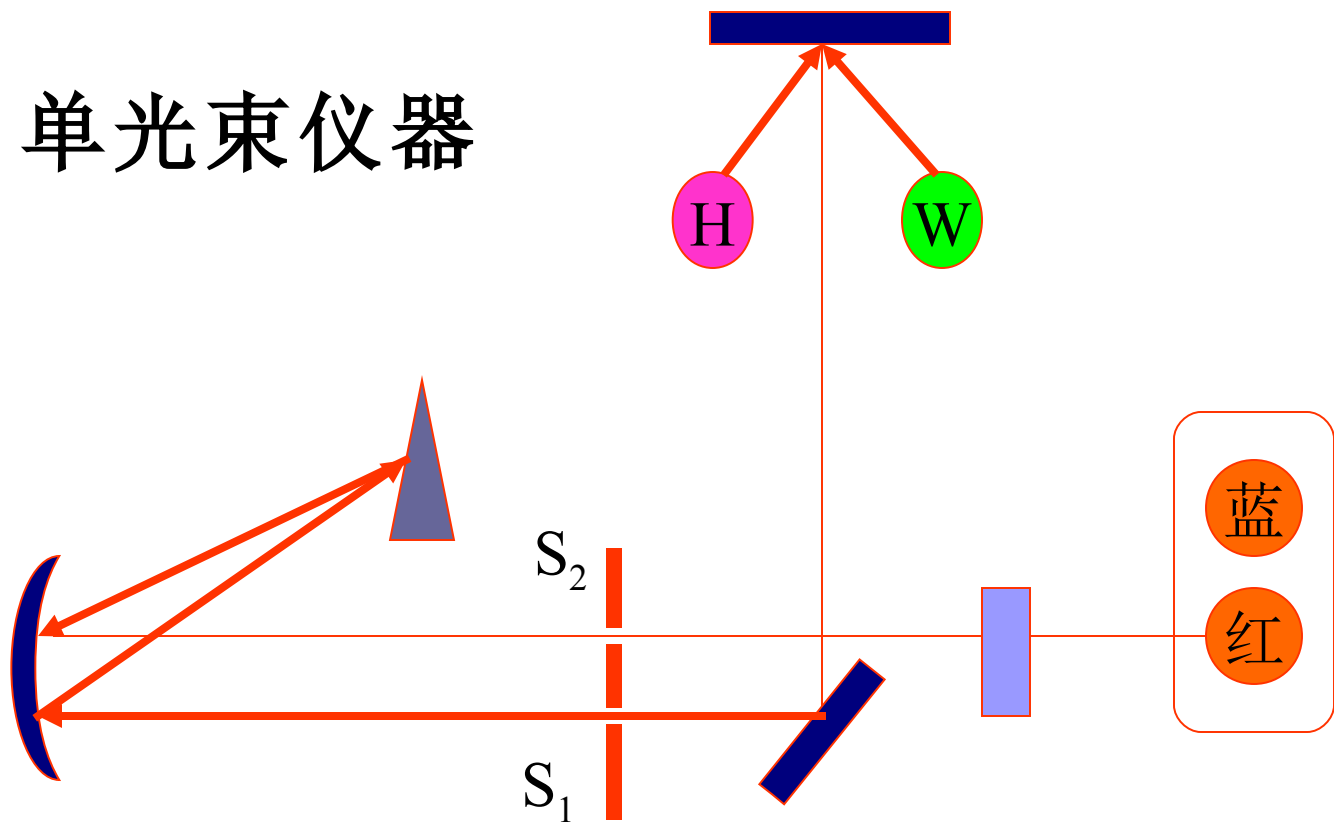
1 cm



5 cm

## 二、紫外 - 可见分光光度计

### 1、单光束仪器



# 单光束仪器的缺点：

---

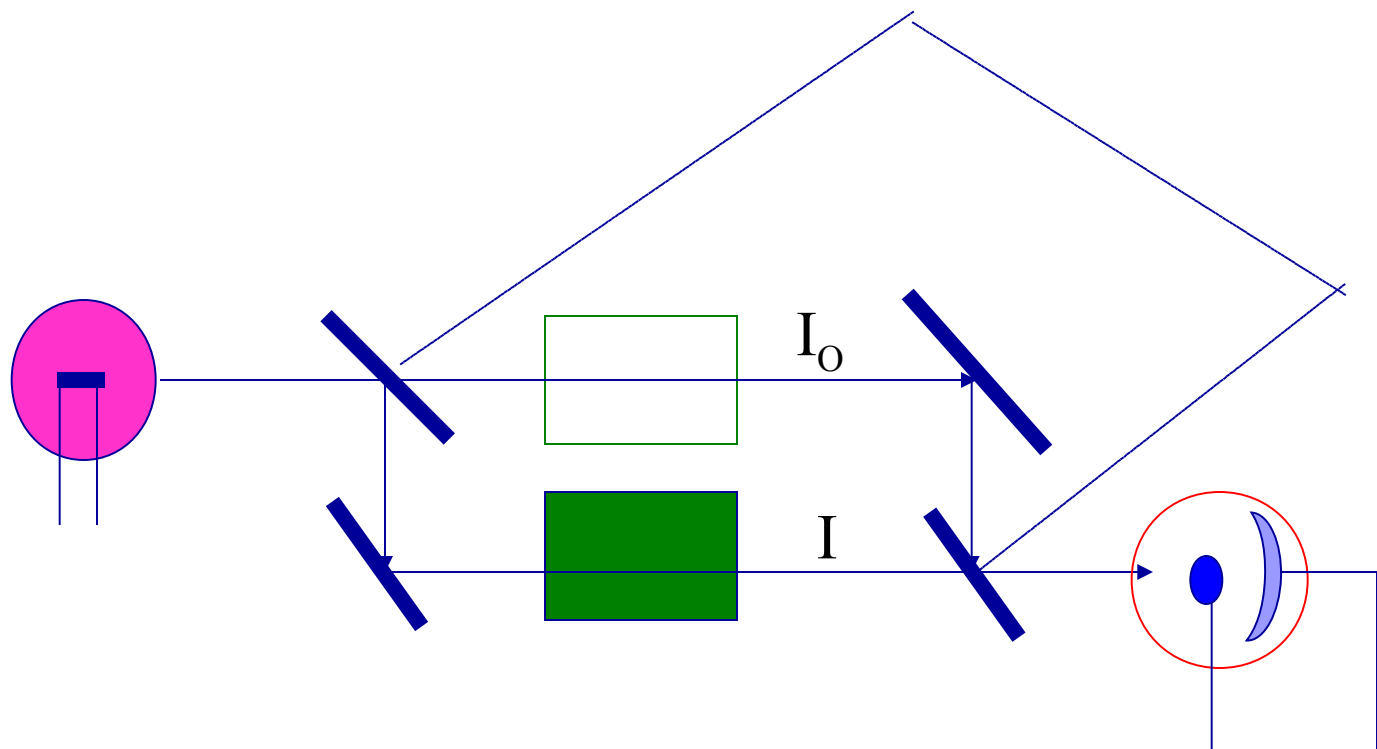
- 操作麻烦：

任一波长	空白—— $I_0$
	样品—— $I$

- 不能进行吸收光谱的自动扫描
- 光源不稳定性影响测量精密度



## 2、双光束仪器

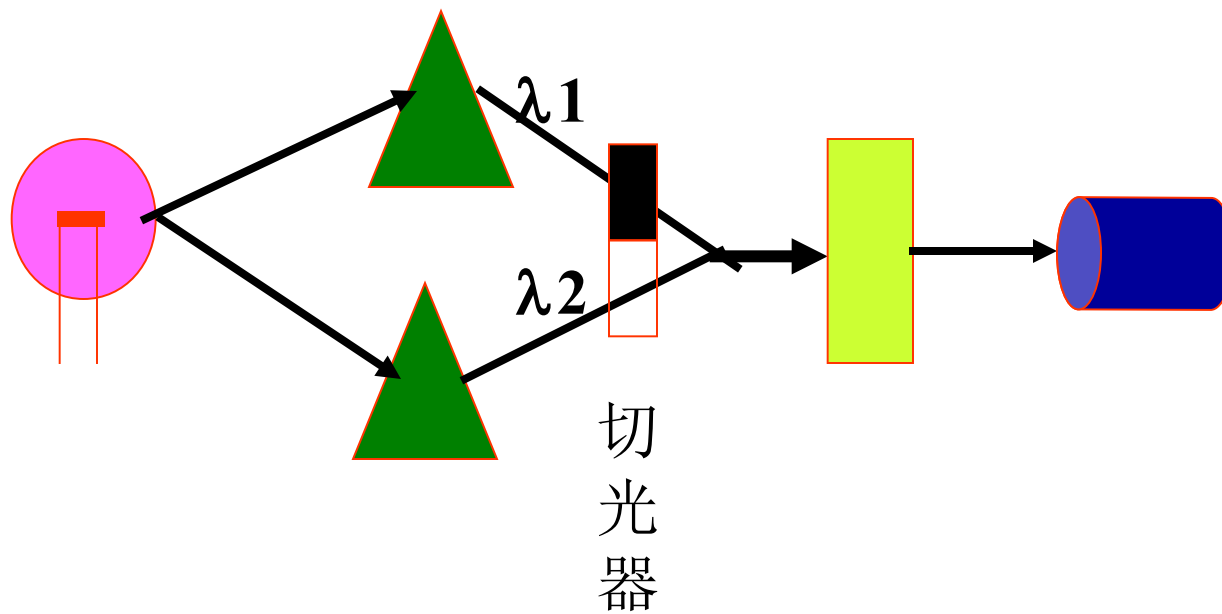


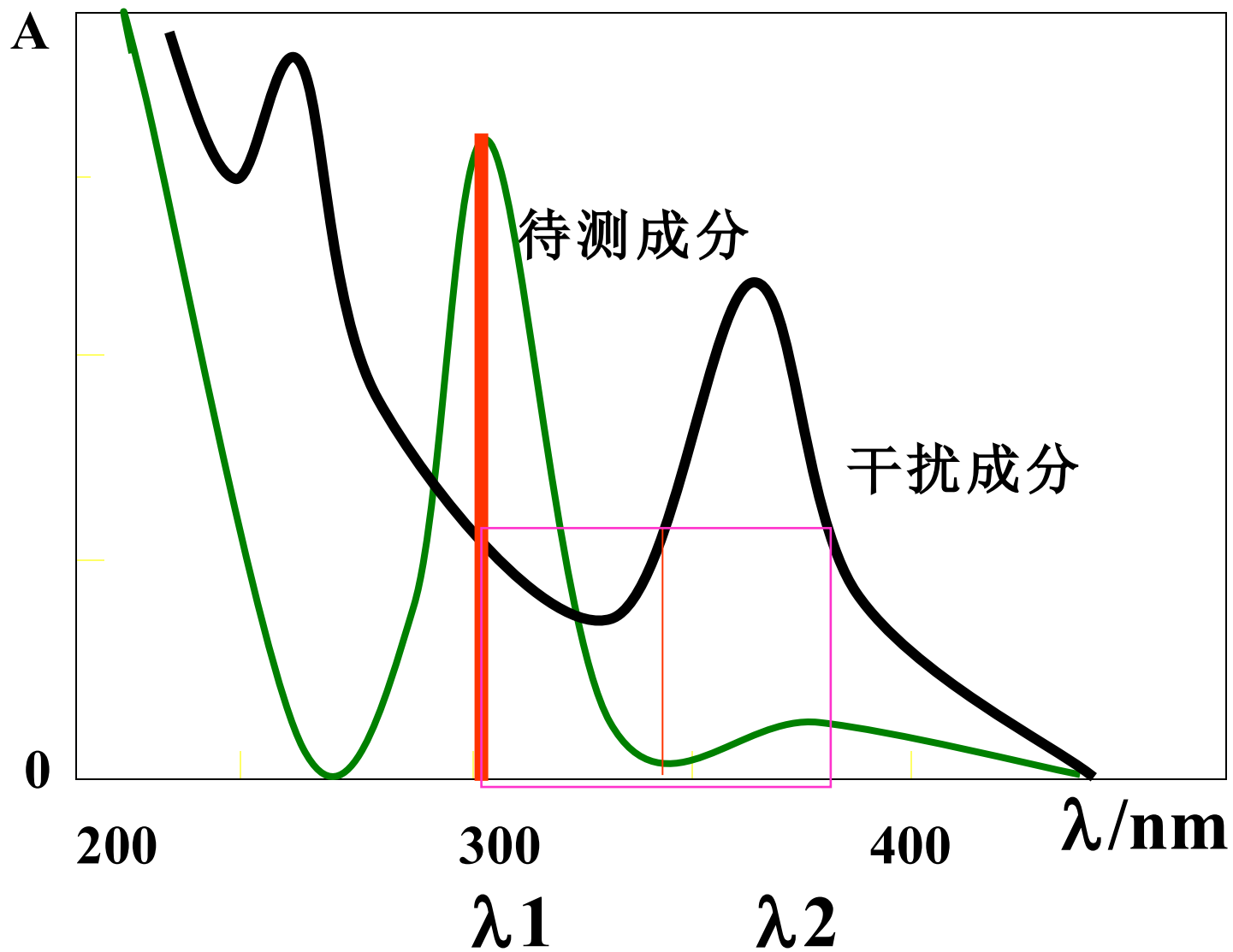
## 双光束仪器的特点和不足：

---

- 测量方便，不需要更换吸收池
- 补偿了仪器不稳定性的影响
- 实现了快速自动吸收光谱扫描
- 不能消除试液的背景成分吸收干扰

### 3、双波长仪器





## (1) 消除光谱重叠干扰

$$A_{\lambda_1} = A_{a_{\lambda_1}} + A_{i_{\lambda_1}}$$

$$A_{\lambda_2} = A_{a_{\lambda_2}} + A_{i_{\lambda_2}}$$

$$A_{i_{\lambda_1}} = A_{i_{\lambda_2}}$$

$$\Delta A = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = A_{a_{\lambda_2}} - A_{a_{\lambda_1}} = (\epsilon_{a_{\lambda_2}} - \epsilon_{a_{\lambda_1}}) b C_a$$

消除了共存组分的干扰

## 双波长仪器能否消除背景干扰？

$$A_{\lambda_1} = \lg I_0 / I_1 = \varepsilon_{\lambda_1} bC + A_b$$

$$A_{\lambda_2} = \lg I_0 / I_2 = \varepsilon_{\lambda_2} bC + A_b$$

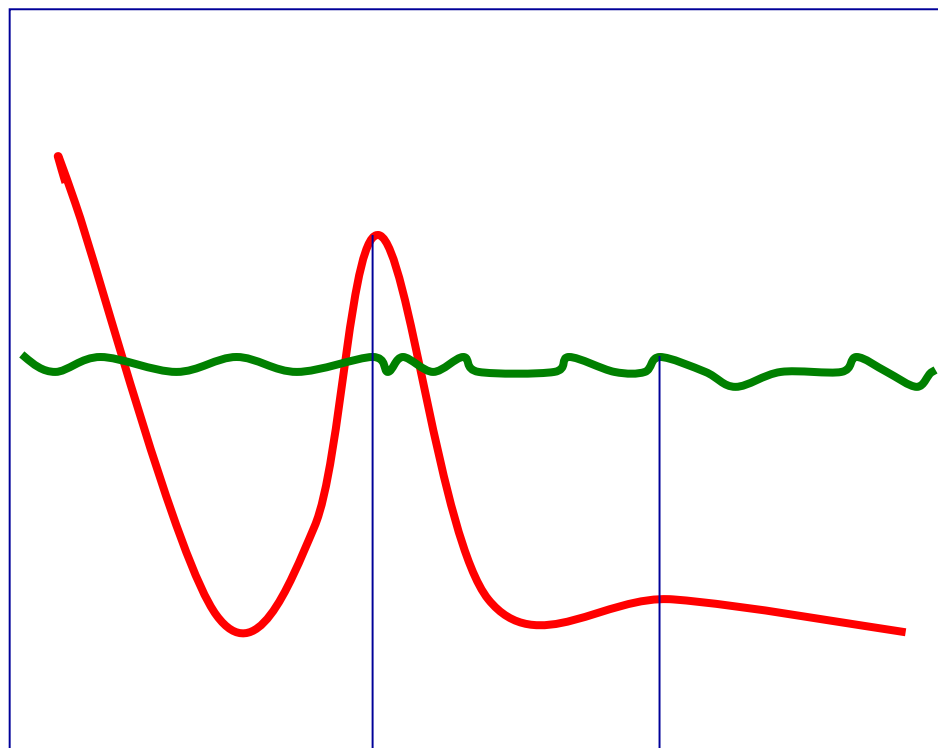
式中  $A_b$  为背景吸收或干扰物质的吸收

若波长选择合适， $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  处  $A_b$  相同

则

$$\Delta A = \lg I_1 / I_2 = (\epsilon_{\lambda_1} - \epsilon_{\lambda_2}) bC$$

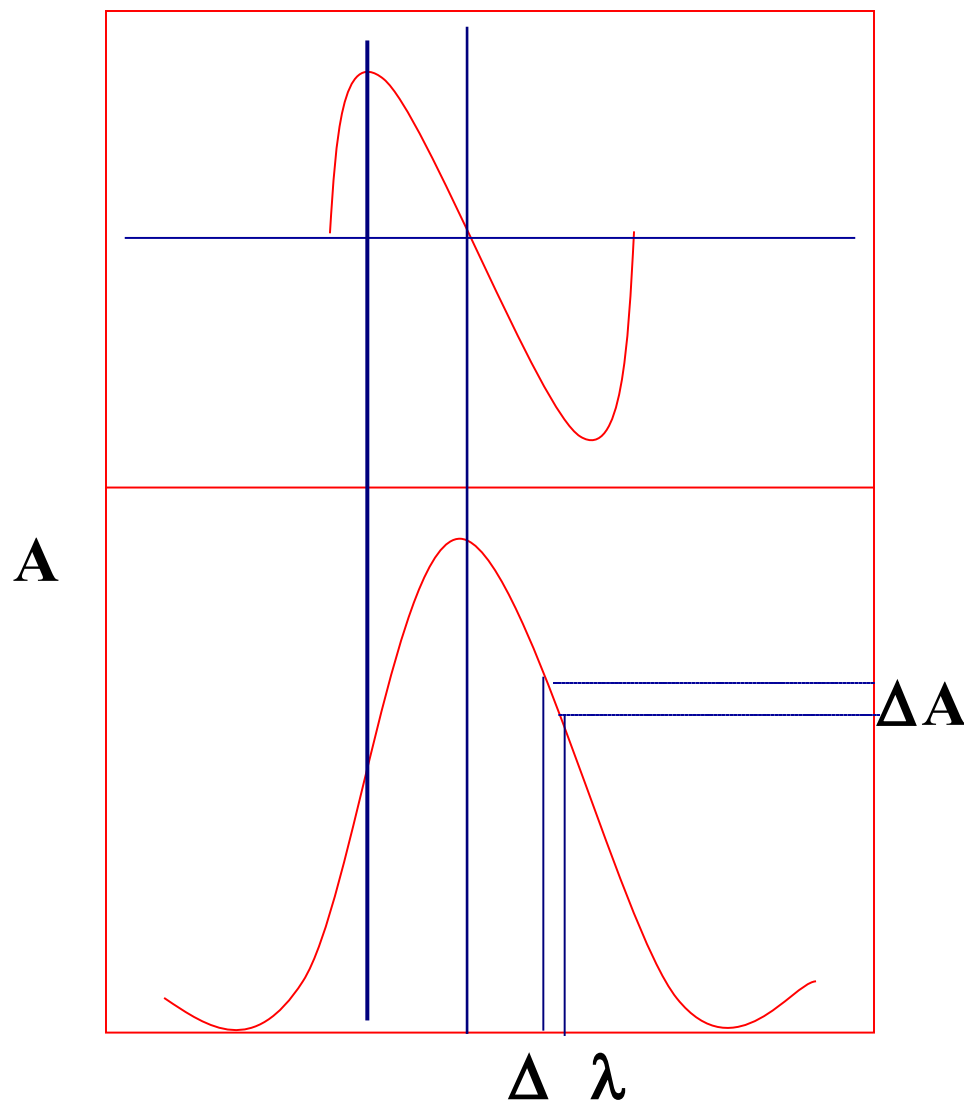
因此测量两波长吸光度之差，就消除了背景吸收的干扰。



### (3) 进行导数光谱测定

$$A = \varepsilon b C$$

$$\frac{dA}{d\lambda} = bC \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$



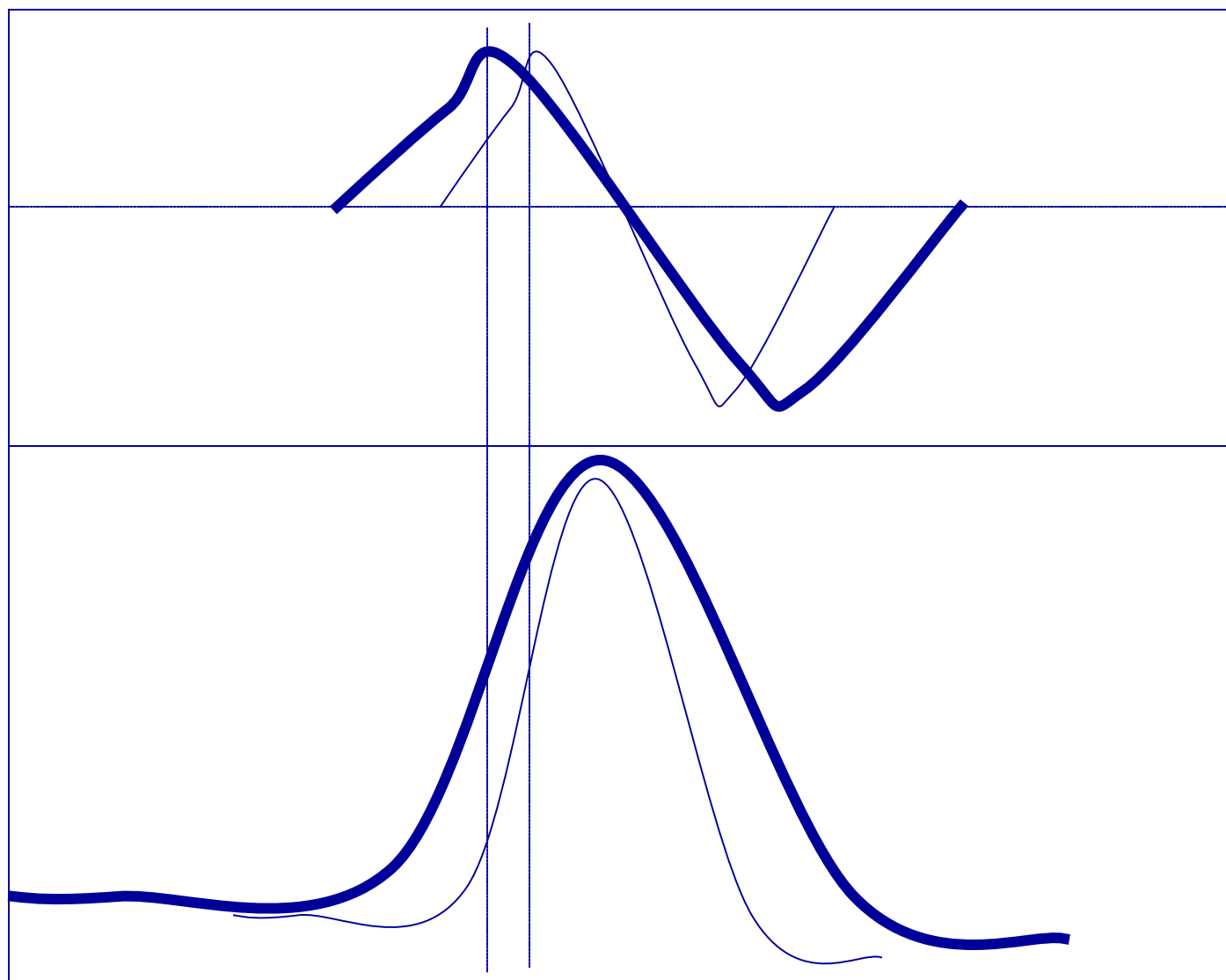
(1) 灵敏度取决于  $d\varepsilon/d\lambda$ ，拐点  $d\varepsilon/d\lambda$  最大，灵敏度最高；

(2)  $d\varepsilon/d\lambda = 0$  为吸收曲线极大值；

(3) 两个重叠度很大的曲线的导数曲线有可能区别开。

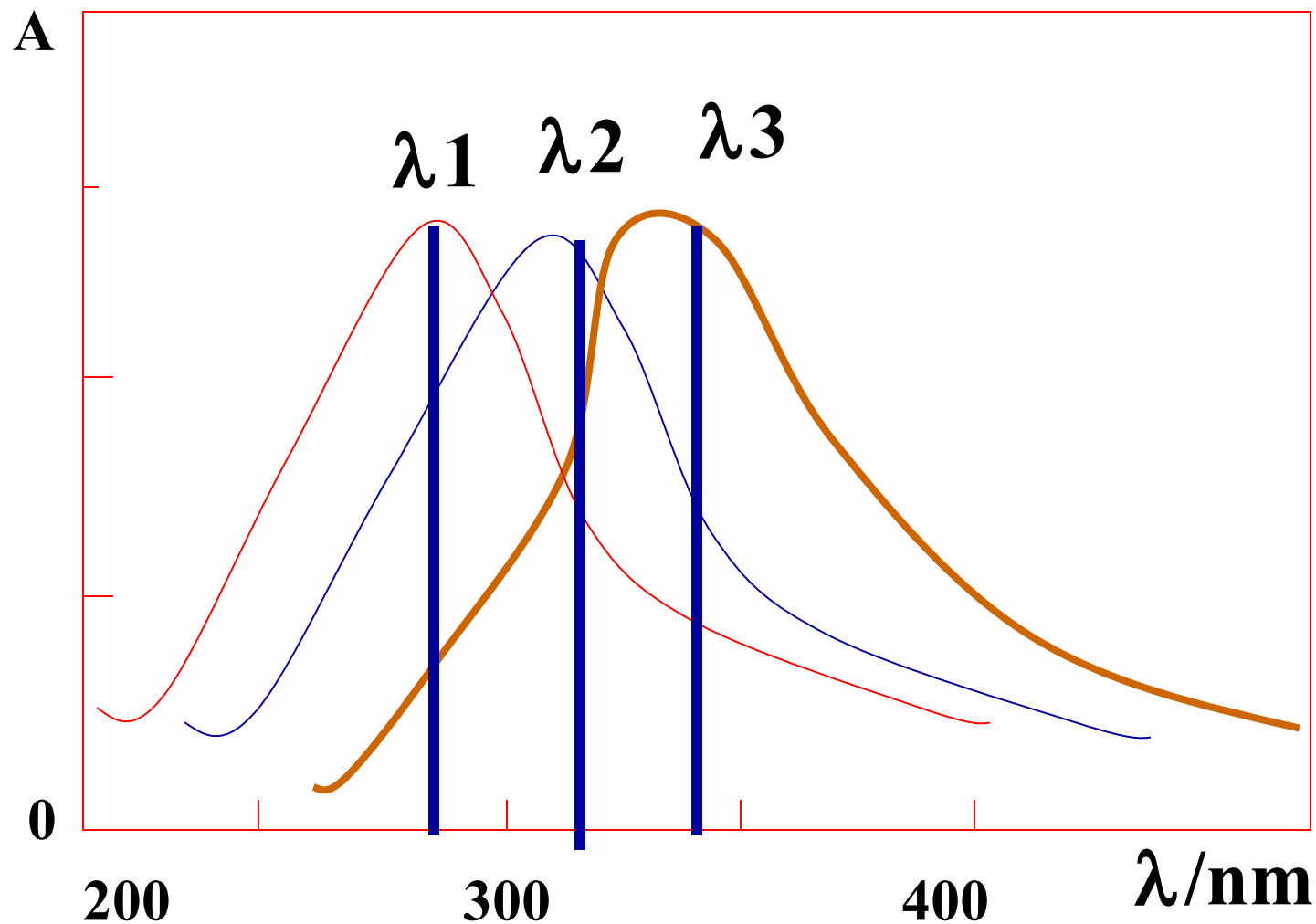



A



$\lambda/\text{nm}$

(4) 多组分混合物中各组分分别测定  
—— 多波长分光光度法




$$A_1 = \varepsilon_{11}C_1 + \varepsilon_{12}C_2 + \varepsilon_{13}C_3$$

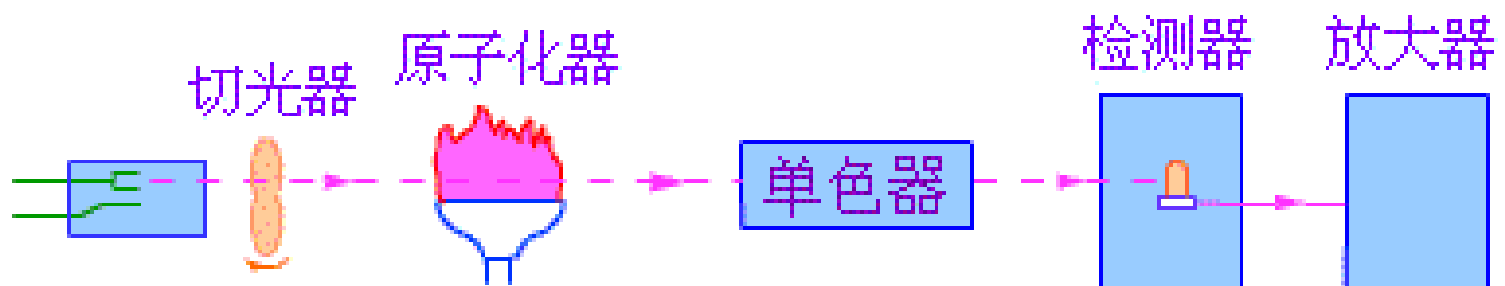
$$A_2 = \varepsilon_{21}C_1 + \varepsilon_{22}C_2 + \varepsilon_{23}C_3$$

$$A_3 = \varepsilon_{31}C_1 + \varepsilon_{32}C_2 + \varepsilon_{33}C_3$$

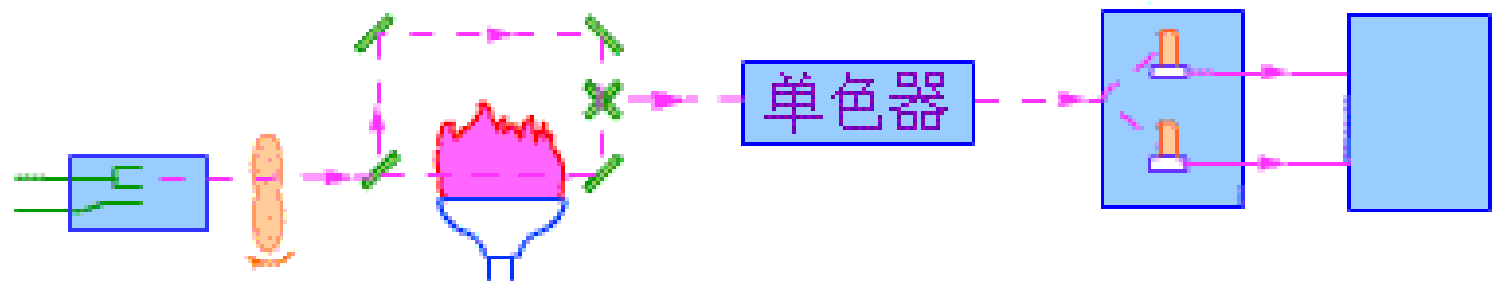
$\varepsilon_{ij}$  为在波长  $i$  测定组分  $j$  的摩尔吸光系数

$A_i$  为在波长  $i$  测得该体系的总吸光度  
解上联立方程可求出待测物浓度  
 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$

# 原子吸收能不能双光束？

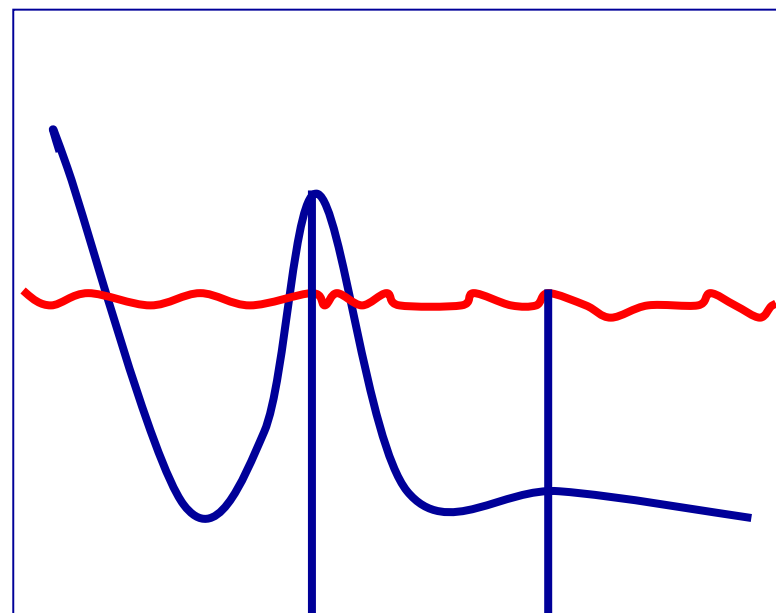
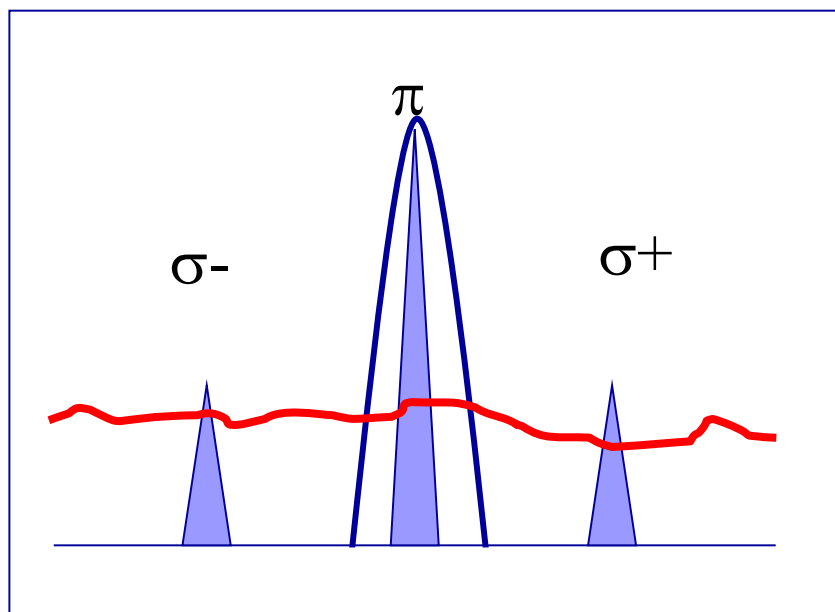


(a)



(b)

# 原子吸收能不能双波长？



## 第四节 紫外 - 可见分光光度法的应用

### 定性分析与定量分析（略）

#### 一、络合物组成的测定

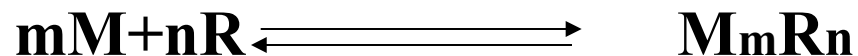
摩尔比率法

等摩尔系列法

斜率比法

平衡移动法

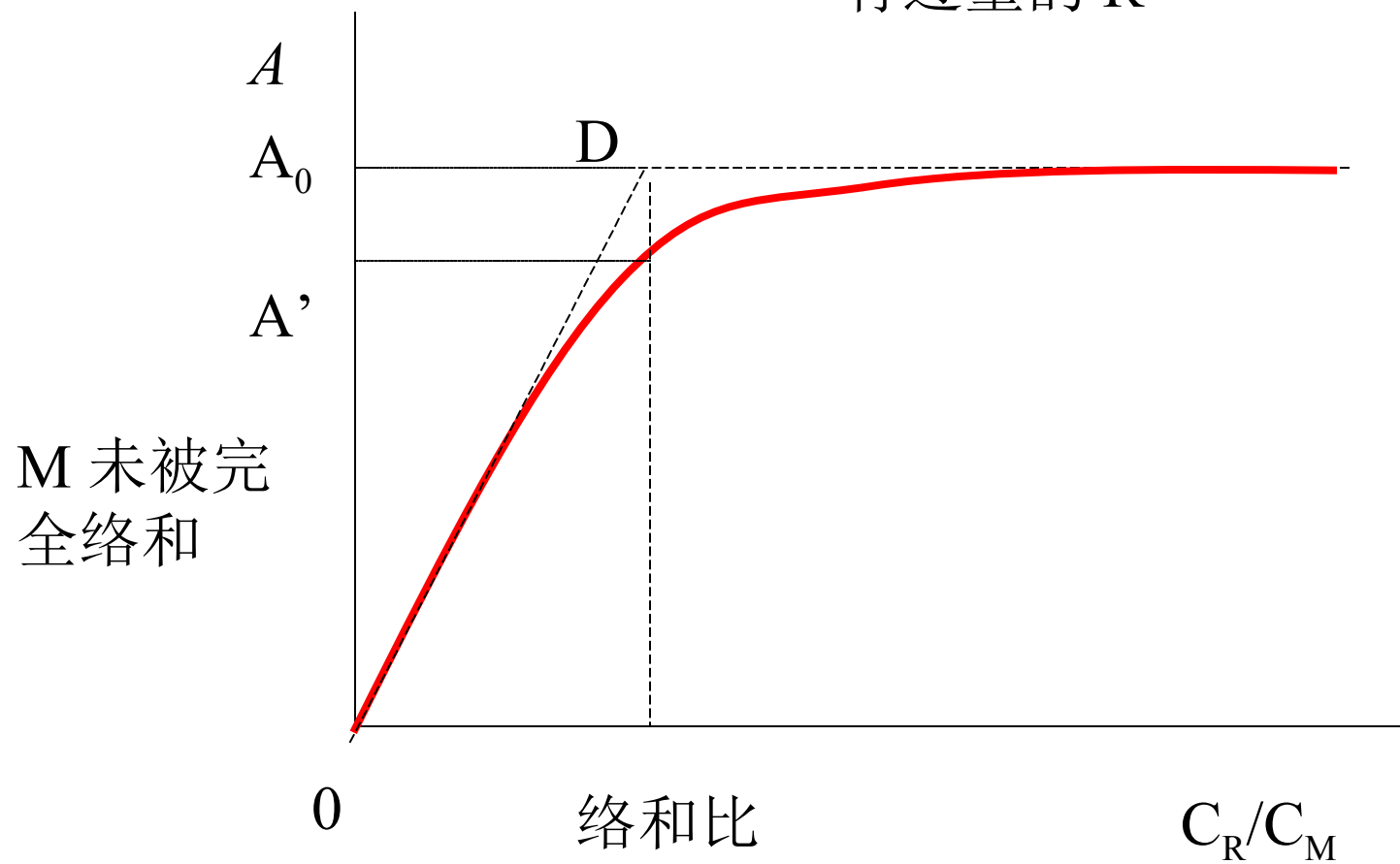
摩尔比率法测定络和比：



配制：不同  $C_R/C_M$  的系列溶液：如  $C_R/C_M=1, 2, 3, \dots n$

分别测吸光度：  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_n$ , 作  $A \sim C_R/C_M$  曲线

有过量的 R





若络合物稳定性差，络合物解离使吸光度下降，转折不明显，据此可以测定络合物不稳定常数。


设：络合物解离度为  $\alpha$ ，不解离时转折处浓度为  $C$

$$C_{M_m R_n} = (1 - \alpha)C$$

$$C_M = m \alpha C$$

$$C_R = n \alpha C$$

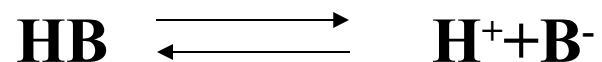
则络合物不稳定常数为



$$K = \frac{[C_M]^m [C_R]^n}{[C_{MmRn}]} = \frac{(m \alpha C)^m (n \alpha C)^n}{(1 - \alpha) C} = \frac{m^m n^n \alpha^{m+n} C^{m+n-1}}{1 - \alpha}$$

$$\alpha = \frac{A_0 - A'}{A_0}$$

## 二、酸碱离解常数的测定



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{B}^-]}{[\text{HB}]} \quad (1)$$

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \lg \frac{[\text{HB}]}{[\text{B}^-]}$$

设：  $b=1\text{cm}$

$$A = A_{\text{HB}} + A_{\text{B}^-}$$

则：  $A = A_{\text{HB}} + A_{\text{B}^-} = \epsilon_{\text{HB}}[\text{HB}] + \epsilon_{\text{B}^-}[\text{B}^-] \quad (2)$

$$C = [\text{HB}] + [\text{B}^-]$$

$$A = \epsilon_{\text{HB}}[\text{HB}] + \epsilon_{\text{B}^-}(C - [\text{HB}]) = \epsilon_{\text{B}^-}C + [\text{HB}] (\epsilon_{\text{HB}} - \epsilon_{\text{B}^-})$$

$$\therefore [\text{HB}] = \frac{\epsilon_{\text{B}^-}C - A}{\epsilon_{\text{B}^-} - \epsilon_{\text{HB}}} \quad (3)$$

同样由 (2) 得

$$A = \epsilon_{\text{HB}} (C - [\text{B}^-]) + \epsilon_{\text{B}^-}[\text{B}^-] = \epsilon_{\text{HB}}C + [\text{B}^-] (\epsilon_{\text{B}^-} - \epsilon_{\text{HB}})$$

$$[\text{B}^-] = \frac{A - \epsilon_{\text{HB}}C}{\epsilon_{\text{B}^-} - \epsilon_{\text{HB}}} \quad (4)$$

将 (3) (4) 代入 (1) 中：  $K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{B}^-]}{[\text{HB}]}$

$$K_a = \frac{[H^+](A - \epsilon_{HB} c)}{\epsilon_{B^-} c - A}$$

定义:  $A_{HB} = \epsilon_{HB} c$        $A_{B^-} = \epsilon_{B^-} c$

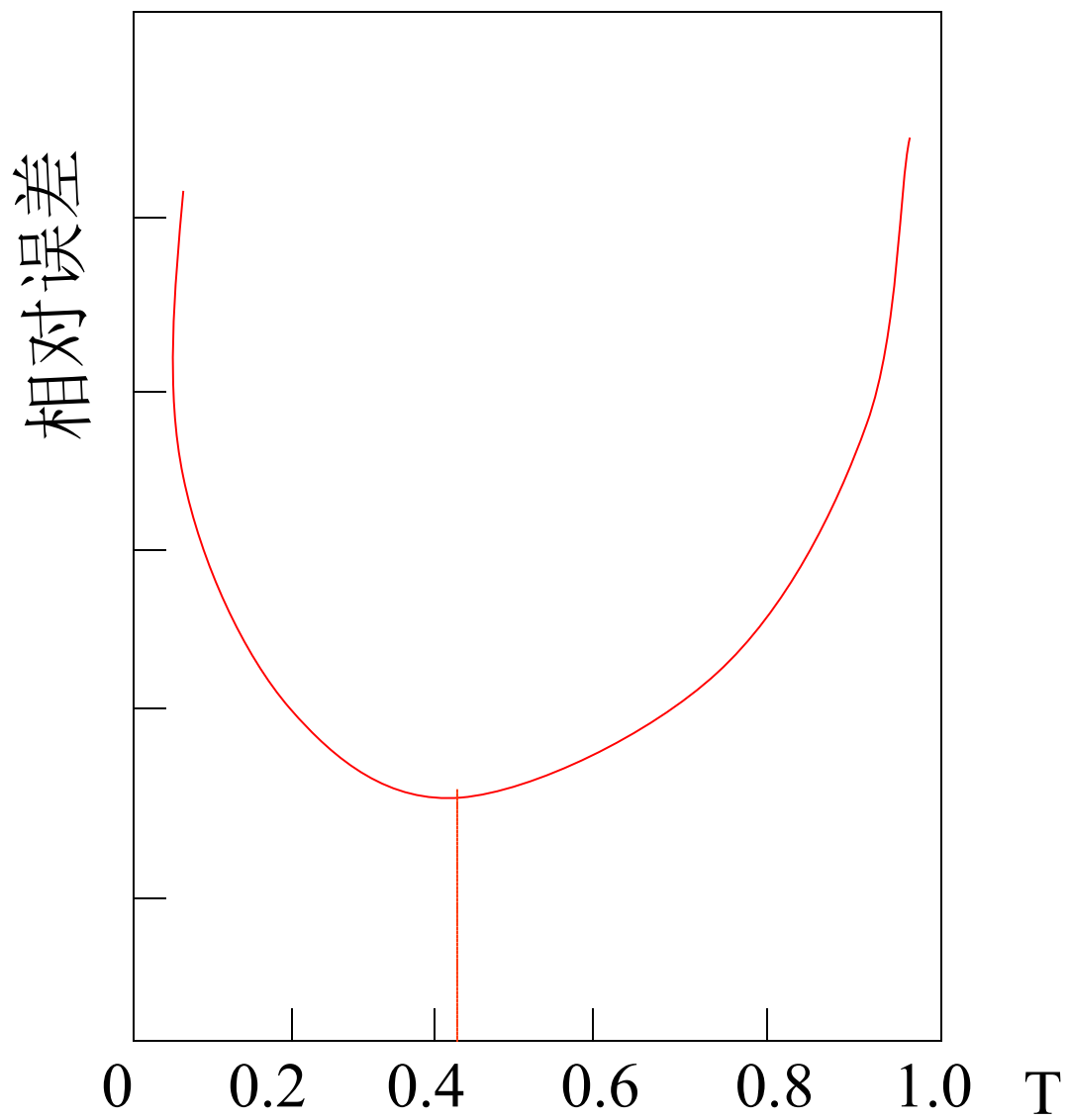
$$\therefore K_a = [H^+] \frac{A - A_{HB}}{A_{B^-} - A}$$

$$pK_a = pH + \lg \frac{A_{B^-} - A}{A - A_{HB}}$$



### 三、测量误差









只有当

则

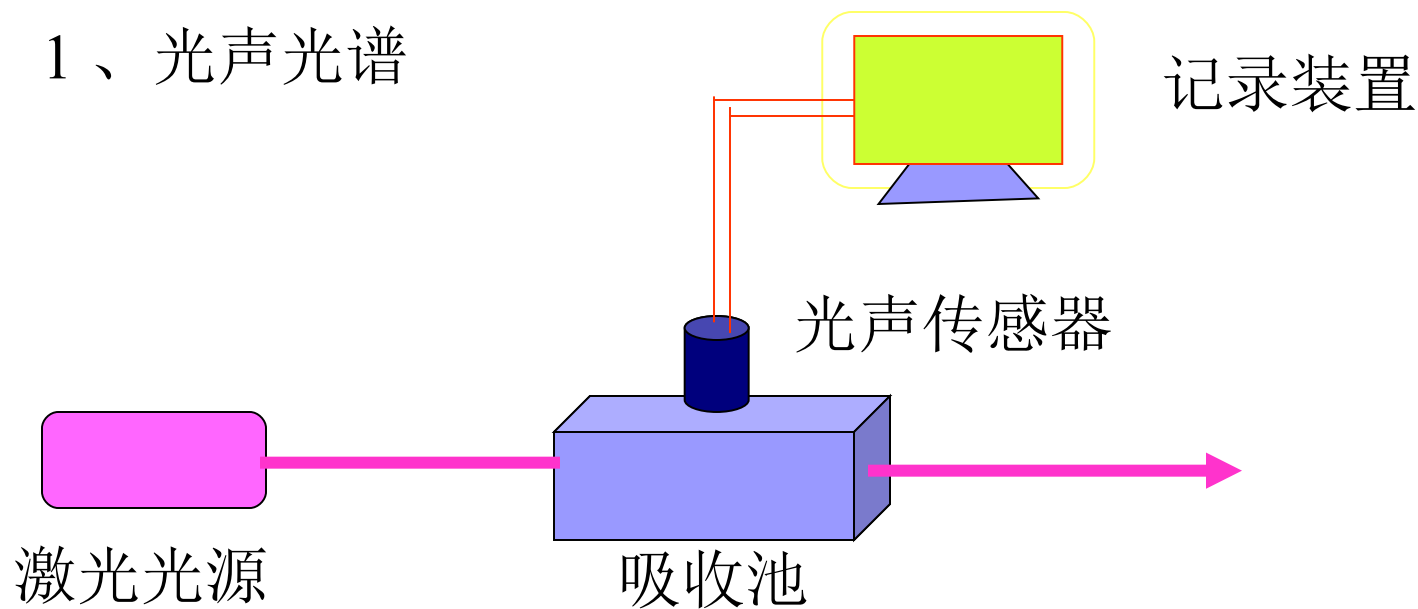
测量误差最小，此时

$$-\log T = \log e = 0.434 = A$$

即吸光度为 0.434 时，浓度测量才具有最小相对误差。

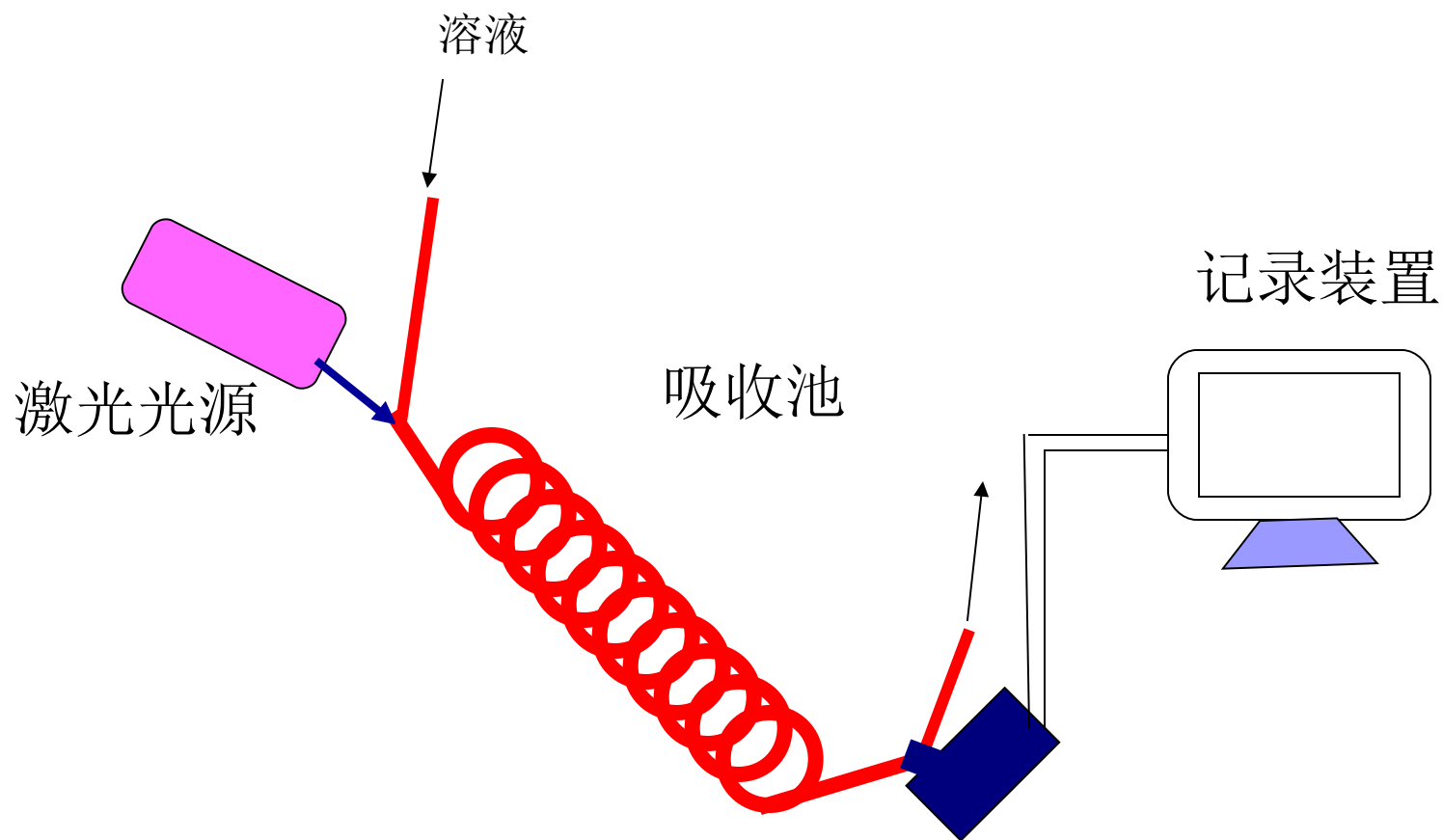
## 四、紫外 - 可见分子吸收光谱的发展

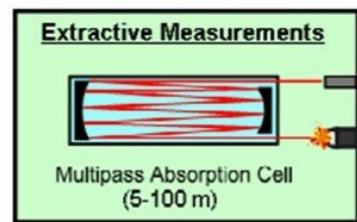
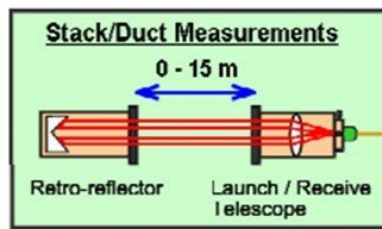
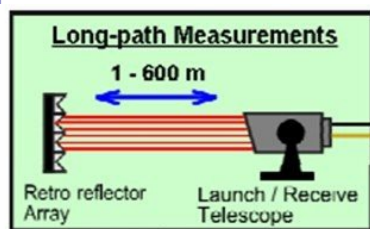
### 1、光声光谱



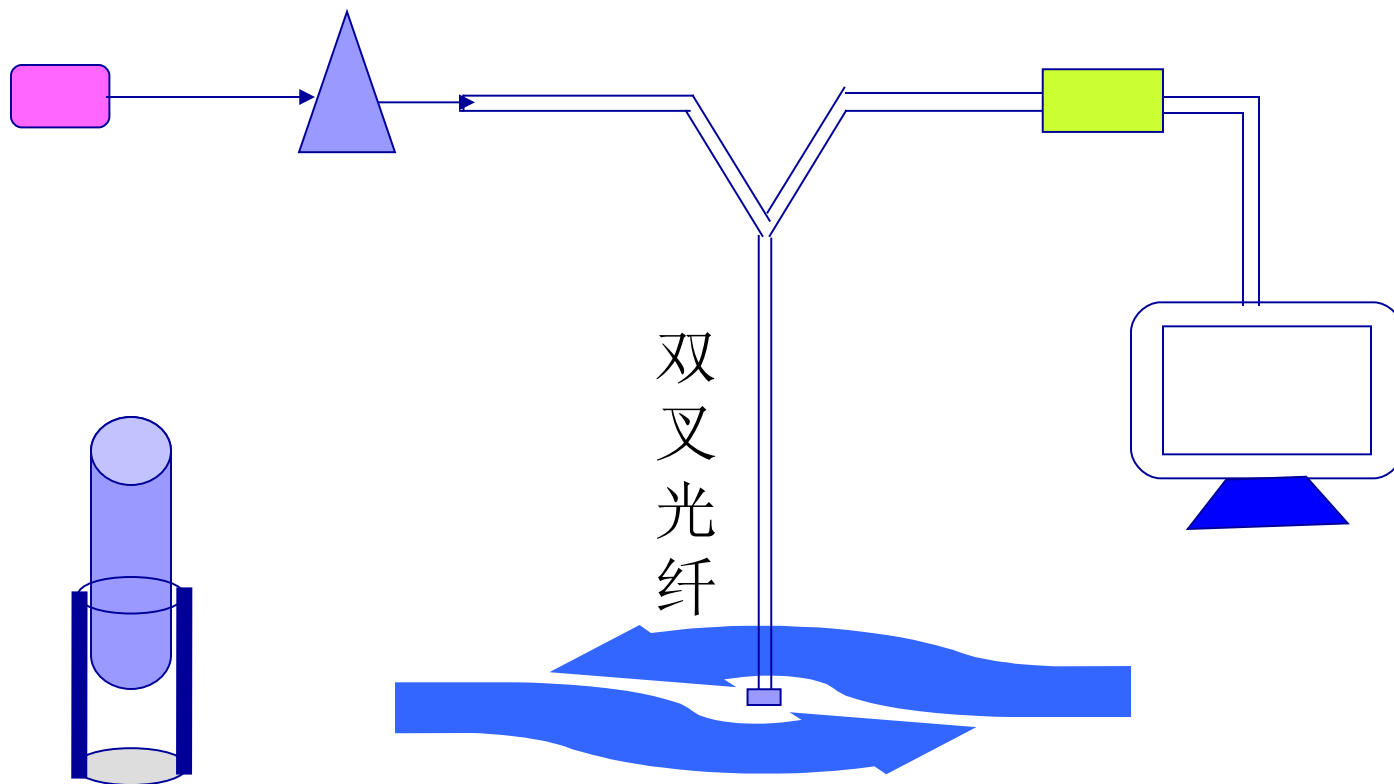
不仅可用于液体样品、也可用于固体样品

## 二、长光程紫外 - 可见分光光度计





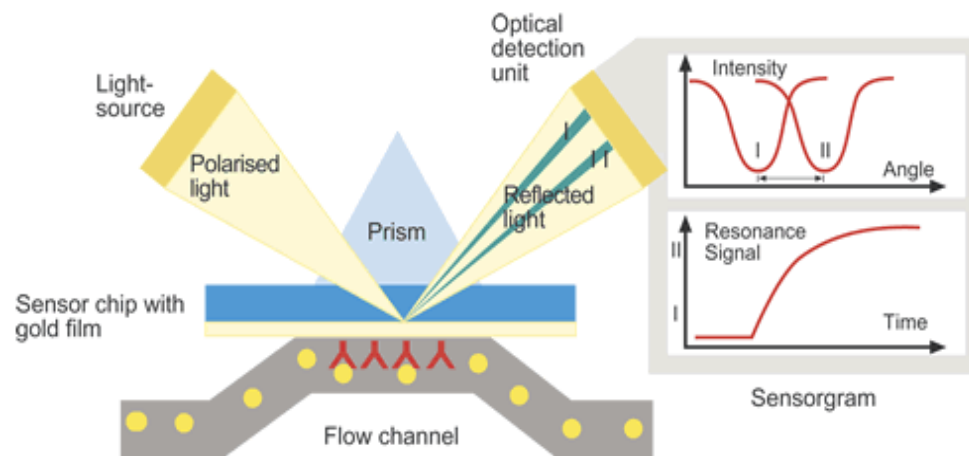
### 三、光导纤维光度计



## 四、表面等离子共振（SPR）

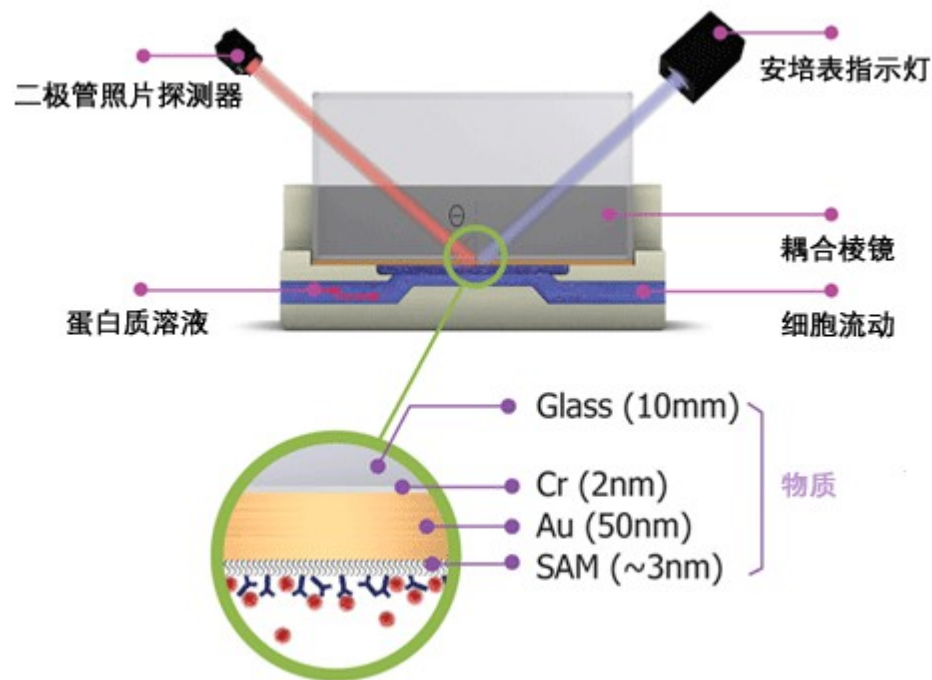
### 原理

表面等离子共振（SPR）是一种物理现象，当入射光以临界角入射到两种不同折射率的介质界面（比如玻璃表面的金或银镀层）时，可引起金属自由电子的共振，由于电子吸收了光能量，从而使反射光在一定角度内大大减弱。其中，使反射光在一定角度内完全消失的入射角称为SPR角。SPR随表面折射率的变化而变化，而折射率的变化又和结合在金属表面的生物分子质量成正比。因此可以通过获取生物反应过程中SPR角的动态变化，得到生物分子之间相互作用的特异性信号。



# 分析应用

- 基于 **SPR** 原理研究生物分子相互作用，无须进行标记，也可以无须纯化各种生物组分。在天然条件下通过传感器芯片实时、原位和动态测量各种生物分子如多肽、蛋白质、寡核苷酸、寡聚糖，以及病毒、细菌、细胞、小分子化合物之间的相互作用过程。

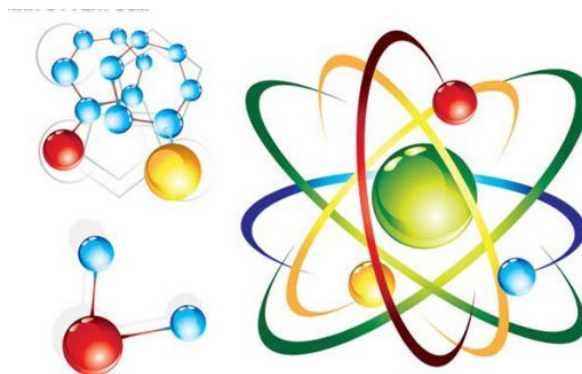




# 荧光、磷光光谱

↑  
荧光  
磷光

紫外 - 可见光



吸收光谱

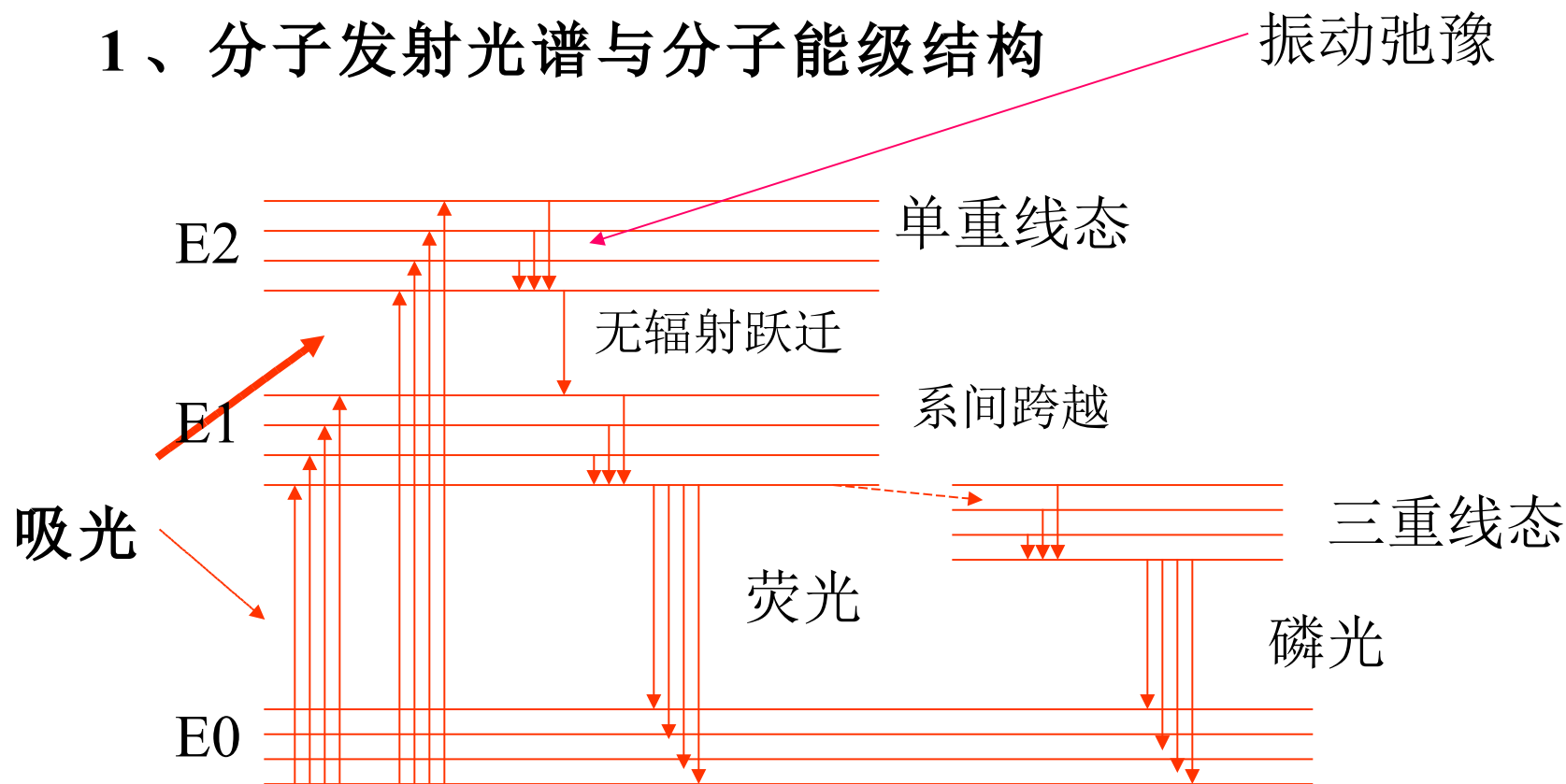
透过光

# 第五节 荧光、磷光和化学发光分析法

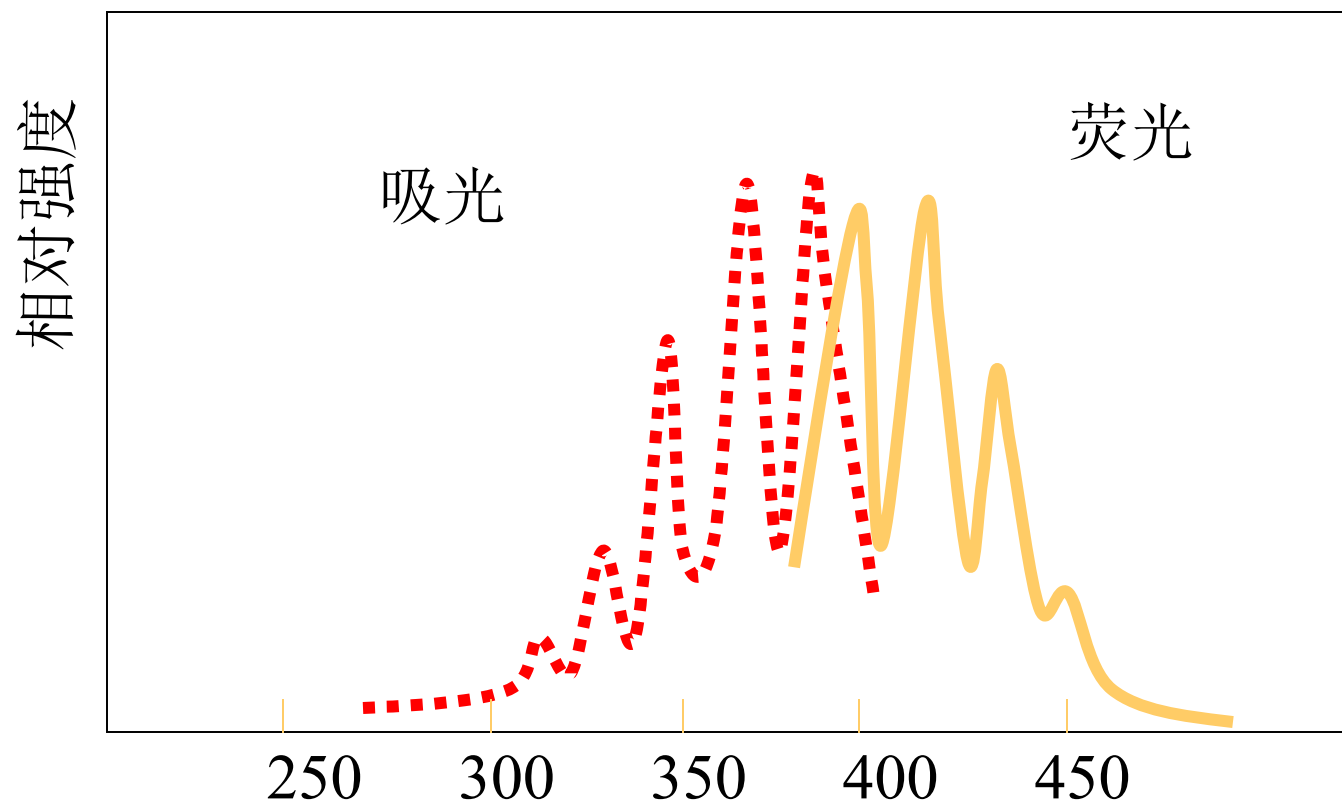
( Fluorescence , phosphorescence and chemiluminescence analysis )

## 一、理论基础

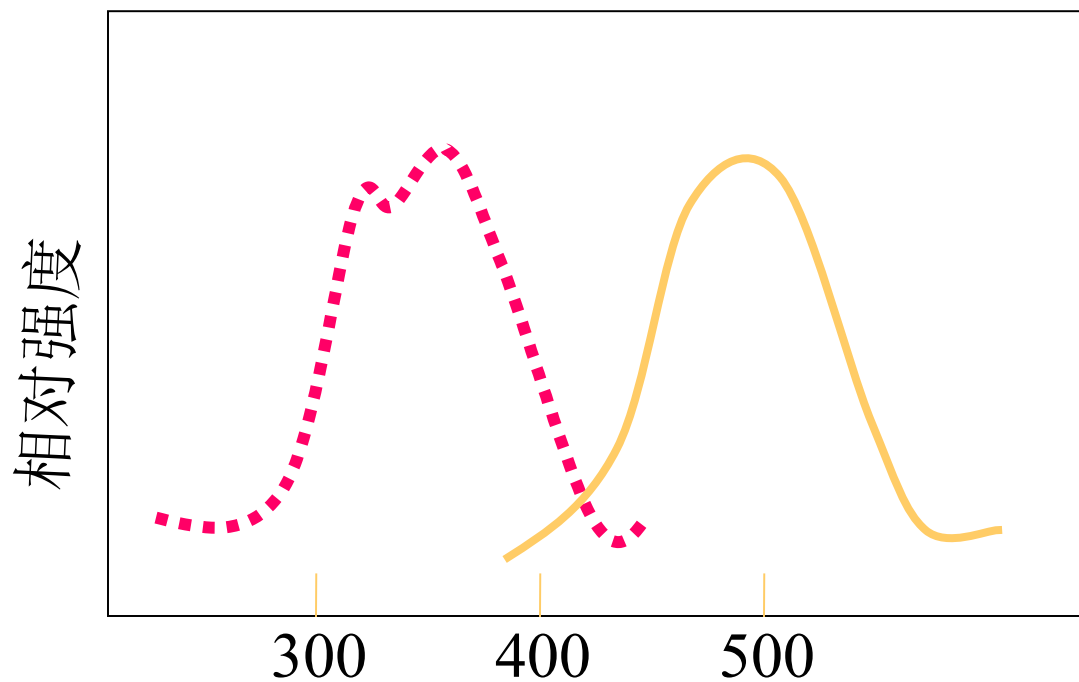
### 1、分子发射光谱与分子能级结构



# (1) 分子吸收光谱与分子荧光光谱



蒽乙醇溶液吸收和荧光光谱



### 硫酸奎宁在稀硫酸中的荧光光谱与吸收光谱

- 荧光光谱与吸收光谱镜像对称
- 荧光光谱较吸收光谱简单

## ( 2 ) 荧光量子产率 ( 荧光效率 )

发荧光的两个必要条件

- 分子能吸收光子而跃迁至激发态
- 激发态分子能以光的形式释放能量

$$\text{荧光效率 } (\phi_f) = \frac{\text{发出光子数}}{\text{吸收光子数}}$$

如果一个分子将吸收的光子全部释放，则其量子产率为 100% 。


## 某些化合物的荧光效率

化合物	荧光效率	溶剂
荧光素	0.92	( 0.1MNaOH )
曙红	0.19	( 0.1MNaOH )
罗丹明 B	0.97	( 乙醇 )
蒽	0.31	( 己烷 )
核黄素	0.26	( 水, pH7 )
菲	0.10	( 乙醇 )
萘	0.12	( 乙醇 )
酚	0.22	( 水 )
叶绿素	0.32	( 苯 )

### ( 3 ) 量子产率与分子结构

荧光通常发生在具有刚性结构和平面结构的 $\pi$  - 电子共轭体系分子中，任何有利于提高 $\pi$  - 电子共轭度的结构改变，都将提高荧光量子产率，或使荧光波长向长波长方向移动。

化合物	荧光效率	平均波长
苯	0.07	283
联苯	0.18	316
对联三苯	0.93	342



化合物	荧光效率	平均波长
苯	0.07	283
萘	0.23	334
蒽	0.36	402
苯	0.07	283
甲苯	0.17	285
乙苯	0.18	286



## 2、 荧光定量分析基础

### ( 1 ) 荧光强度与浓度

$$I_f = \Phi_f I_a = \Phi_f ( I_o - I )$$

$I_f$  : 荧光强度  
率  
 $I_o$  : 所吸收的辐射强度;  
 $\phi_f$  : 荧光效率

将指数展开：

如果吸光度  $A < 0.05$ ，方括号中其他各项与第一项相比均可忽略：

由于  $A = \epsilon bc$  : 故在实验条件固定时  
,  
荧光强度与浓度成正比, 即:

$$K =$$

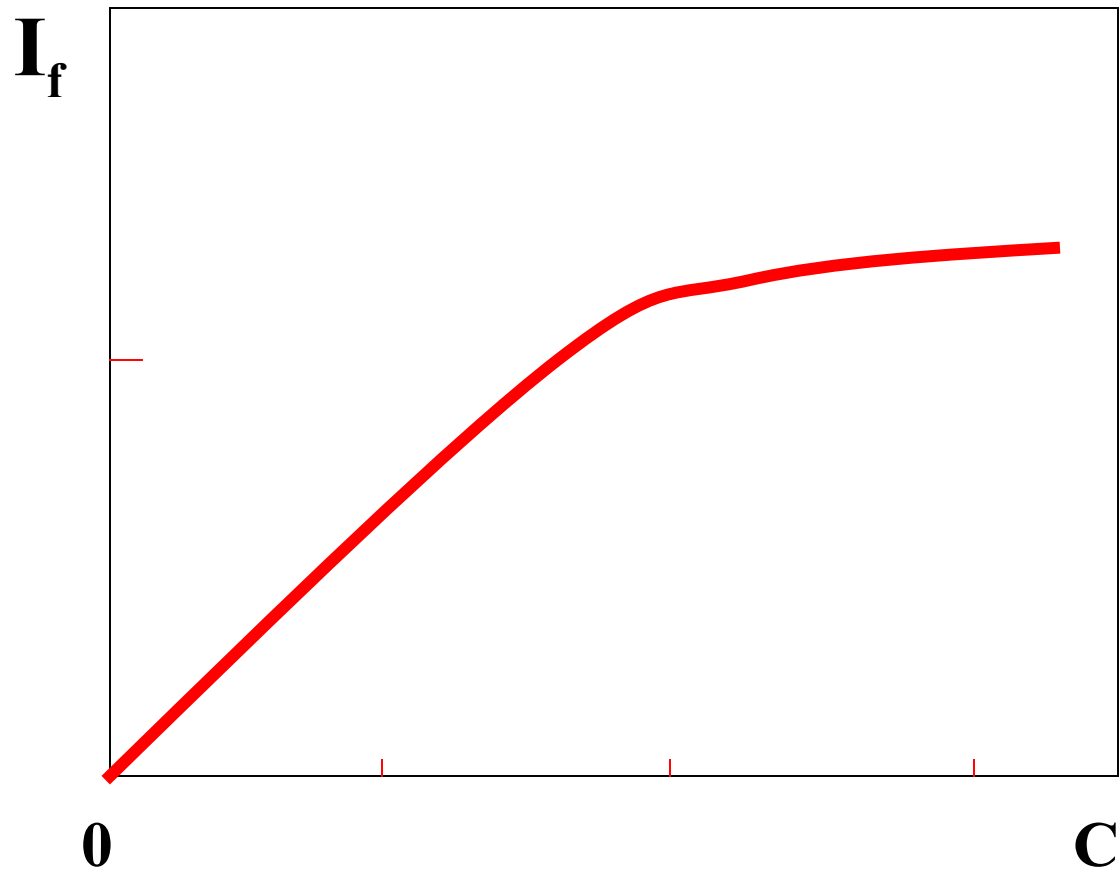
$$\Phi_f$$

$$\epsilon$$

$$I_0$$

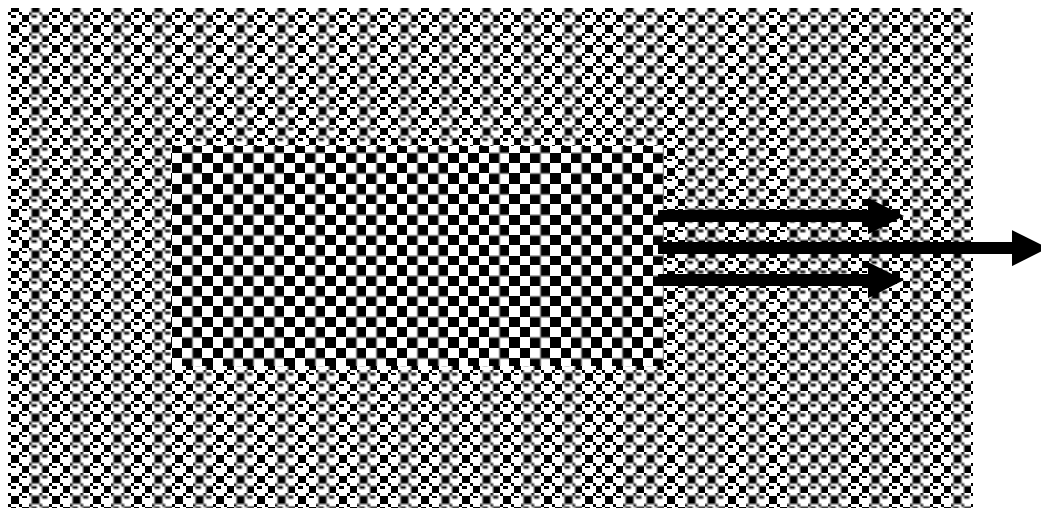
$$b$$

## ( 2 ) 荧光熄灭



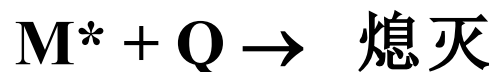
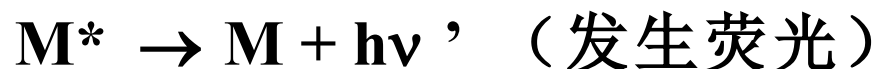
## □内滤效应（自吸收）

发射的荧光在溶液中通过时被基态分子所吸收而使荧光强度下降的现象。



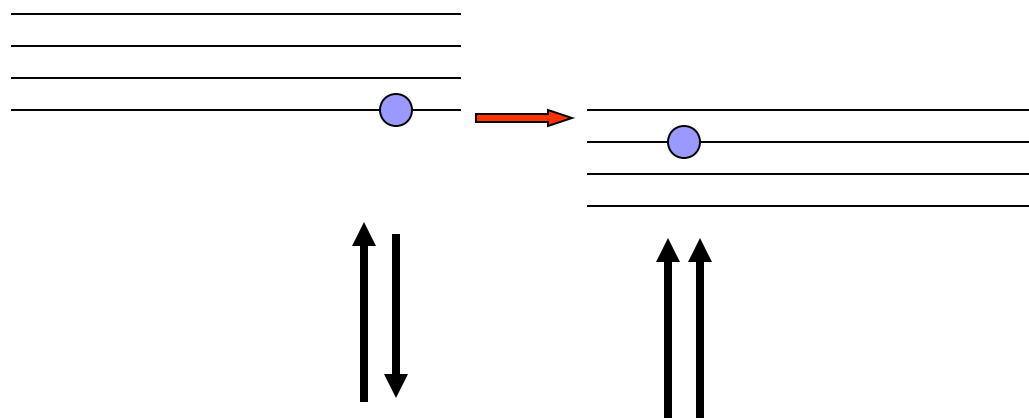
## □ 淬灭效应

碰撞淬灭：                荧光分子之间或荧光分子与熄灭剂分子之间碰撞引起的荧光熄灭效应



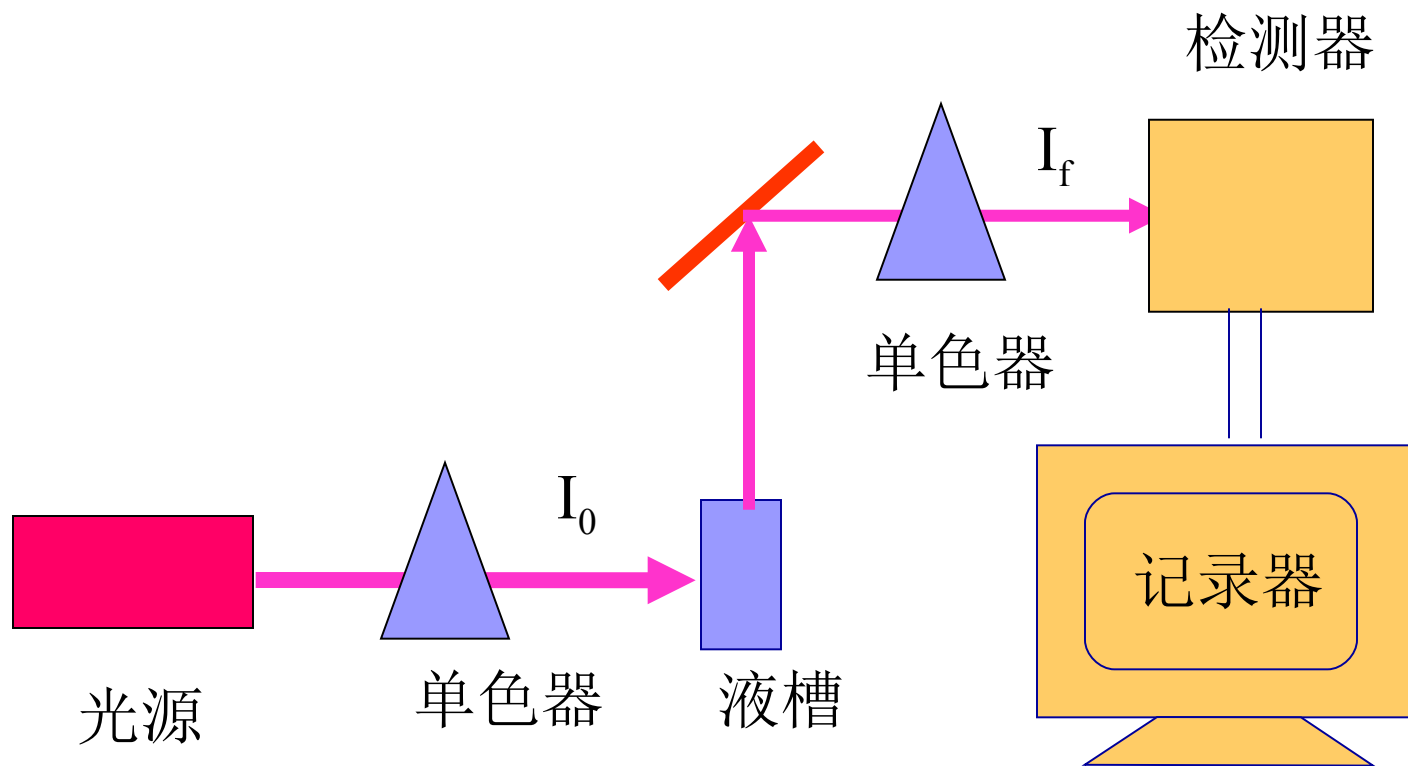
例如：芳香烃的荧光可以被溶解  $O_2$  所淬灭

## 转入三线态的淬灭



含溴化物、碘化物、硝基化合物、重氮化合物、羰基化合物及某些杂环化合物容易转变为三重态，因而易使荧光淬灭

## 二、荧光分析的仪器





## 1、光源

汞 弧灯

低压汞灯： 254 nm

氙 弧灯

荧光光源强度 > 紫外 - 可见吸收光谱光源

激光光源

激光诱导荧光

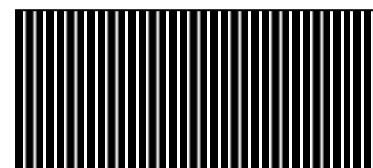
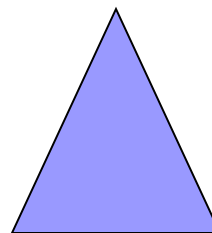
Laser Induced fluorescence

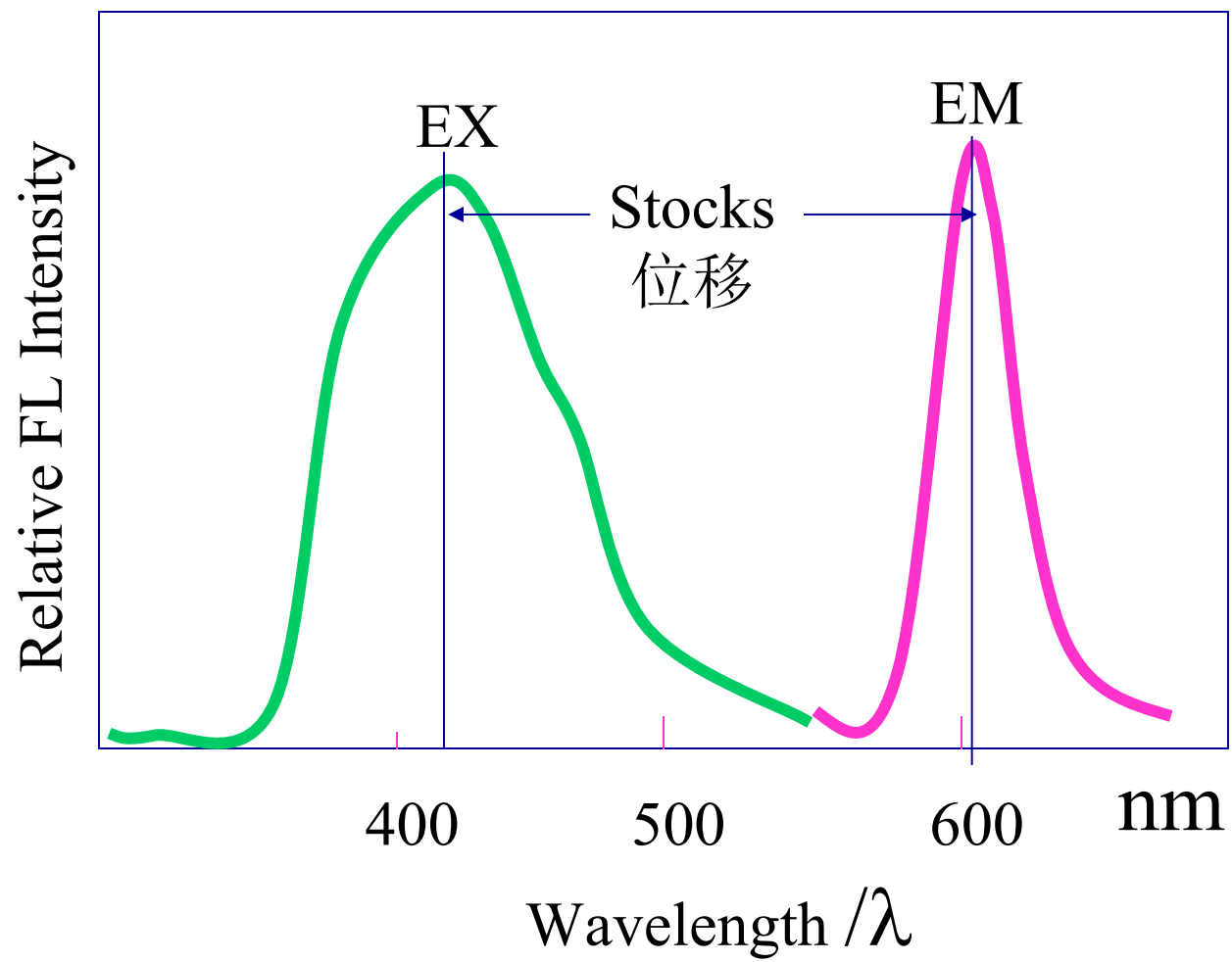
## 2、单色器

滤光片

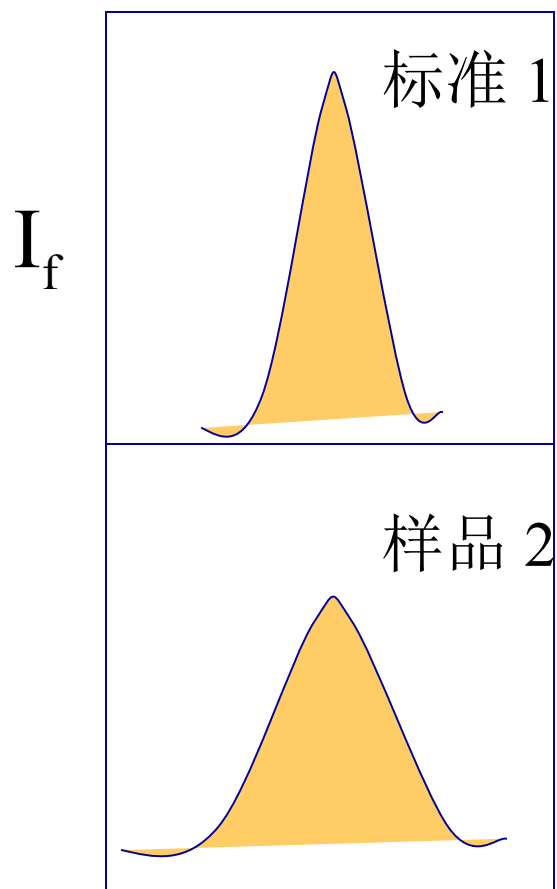
棱镜

光栅






## 荧光光谱



Wavelength  $/\lambda$

## 量子产率的测定

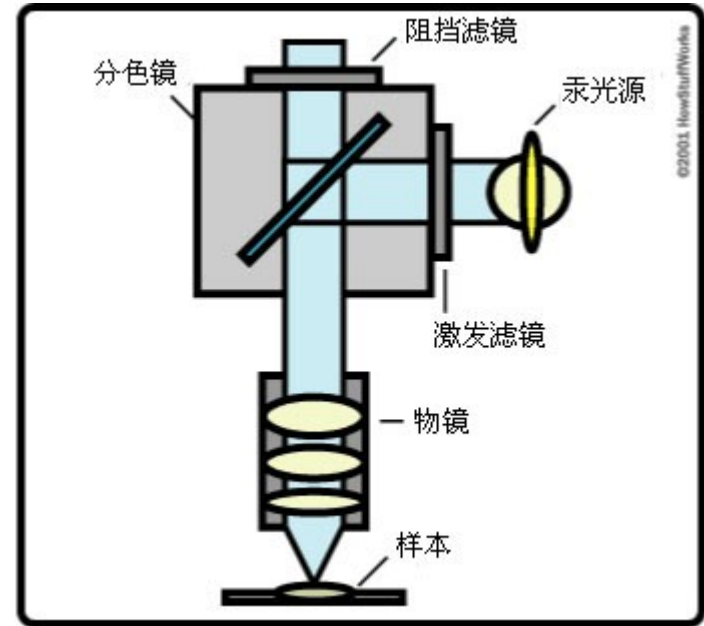
$$\frac{I_{f1}}{I_{f2}} = \frac{\phi_1 A_1}{\phi_2 A_2}$$


$$\frac{\phi_1}{\phi_2} = \frac{A_1 I_{f1}}{A_2 I_{f2}}$$

奎宁在 0.1M 的硫酸中荧光量子产率的绝对值为 0.55 。

荧光分析的缺点——散射光影响

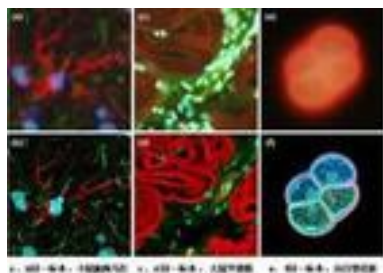
# 荧光显微镜



荧光显微镜 (Fluorescence microscope)

是以紫外线为光源，用以照射被检物体，使之发出荧光，然后在显微镜下观察物体的形状及其所在位置。荧光显微镜用于研究细胞内物质的吸收、运输、化学物质的分布及定位等。细胞中有些物质受紫外线照射后可发荧光；另有一些物质本身虽不能发荧光，但如果用荧光染料或荧光抗体染色后，经紫外线照射亦可发荧光，荧光显微镜就是对这类物质进行定性和定量研究的工具之一。

# 激光共聚焦扫描显微镜 ( Confocal laser scanning microscope )



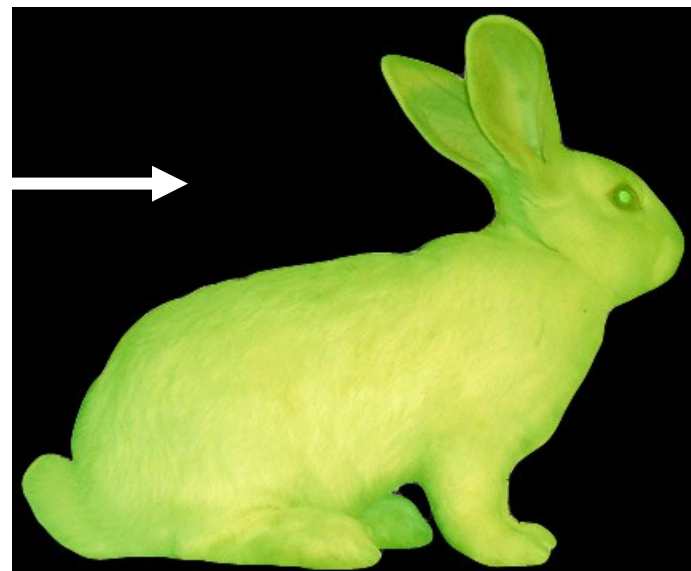
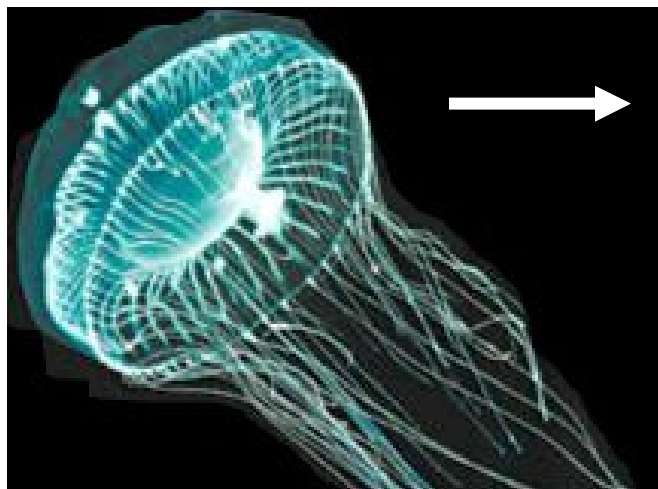
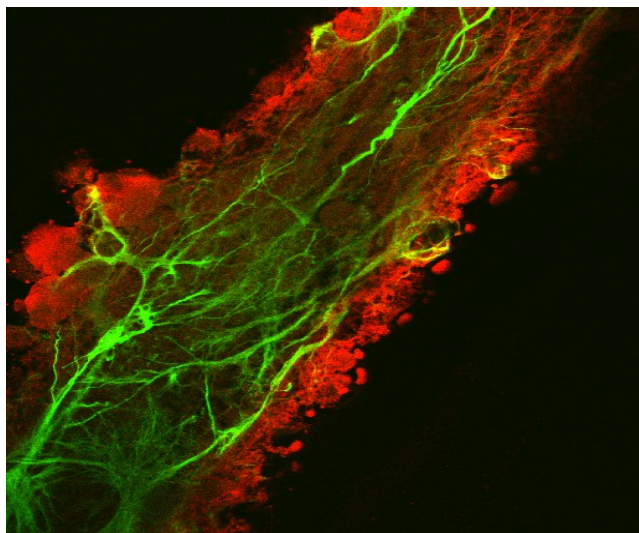
用激光作扫描光源，逐点、逐行、逐面快速扫描成像。由于激光束的波长较短，光束很细，所以共焦激光扫描显微镜有较高的分辨力。系统经一次调焦，扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不一样时，就可以获得样品不同深度层次的图像，这些图像信息都储于计算机内，通过计算机分析和模拟，就能显示细胞样品的立体结构。

激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态，也可以用于细胞内生化成分的定量分析及细胞形态的测量，配合焦点稳定系统可以实现长时间活细胞动态观察。



# 光学探针特别是荧光探针的发展大大推进了分子水平上细胞研究的进步

## 荧光蛋白

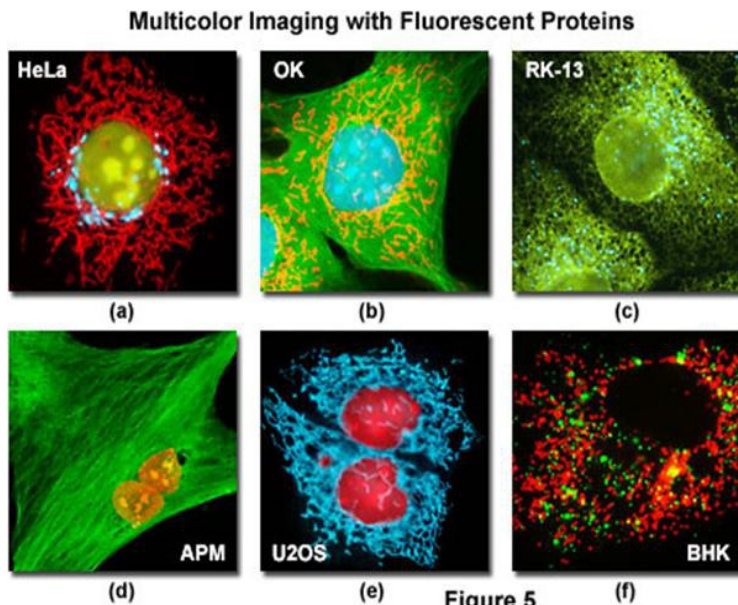
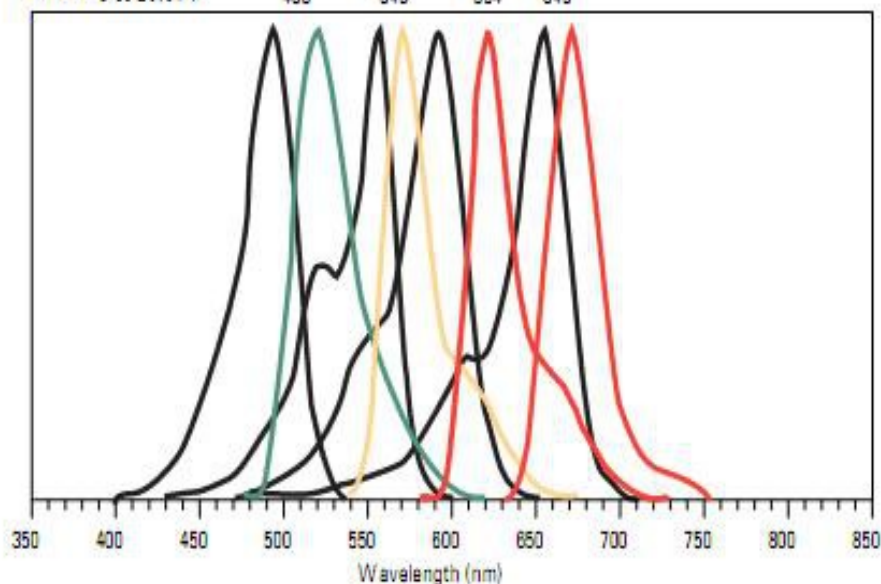




# 荧光量子点是荧光探针的重要研究方向

A.

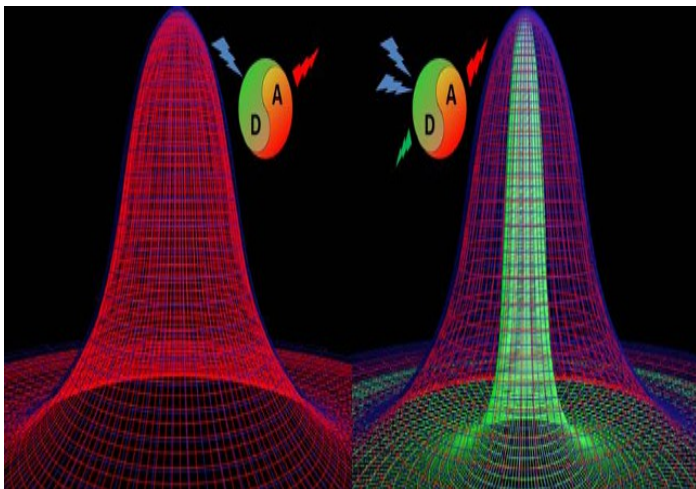
Thermo Scientific DyLight  
Fluor 荧光染料



- 分子荧光呈现出比较宽的带状光谱，而可进行荧光测量的波长窗口宽度有限，对可见荧光而言只有 400–800nm 左右范围，因此，能够容纳的探针数量受到限制（如上图仅 8 个探针即相互干扰）；
- 由于荧光染料分子的发射光谱常常互相重叠，相互干扰，决定了常规荧光检测器最多只能检测四色标记的荧光探针，难以进行多色检测。
- 发展对多种复杂靶分子成分的同时分析是细胞传感技术的挑战之一。

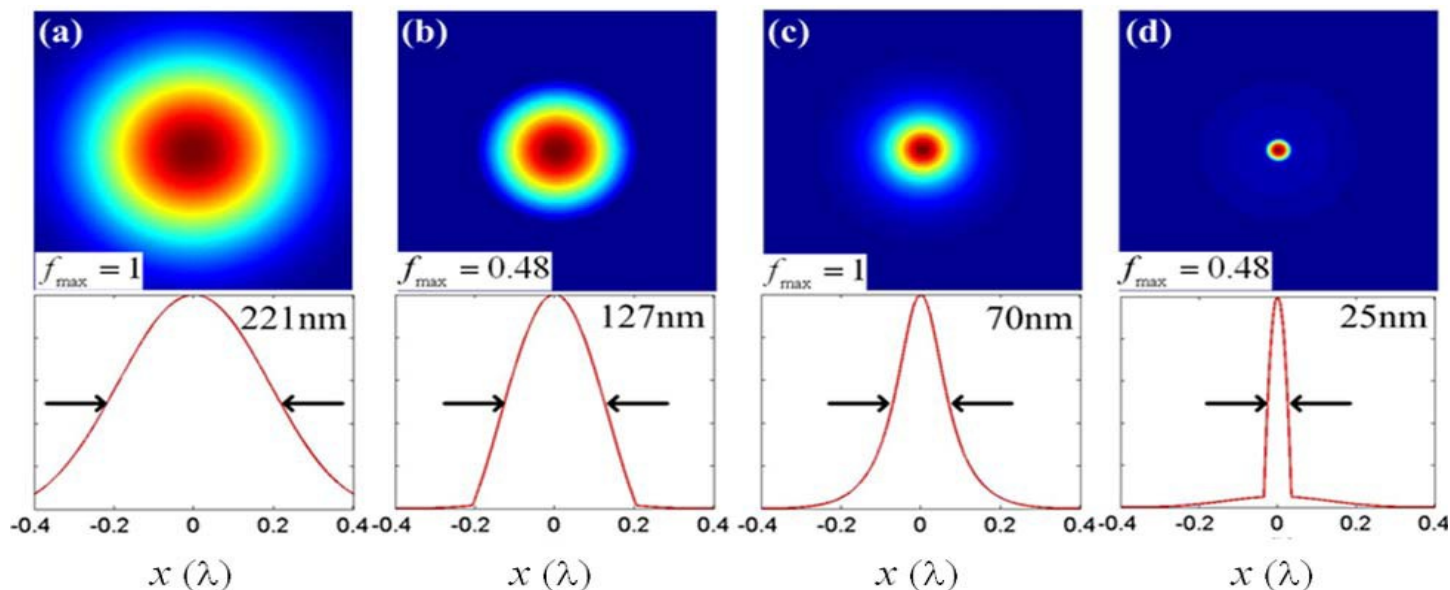


# 发展超分辨荧光显微探测方法是荧光分析的重要研究方向



激发光呈现出高斯分布的轮廓，中心位置光子的强度较锋翼部分强得多。当激光照射到细胞某一个点时，就会出现斑点中心光强远远强于外沿的现象。

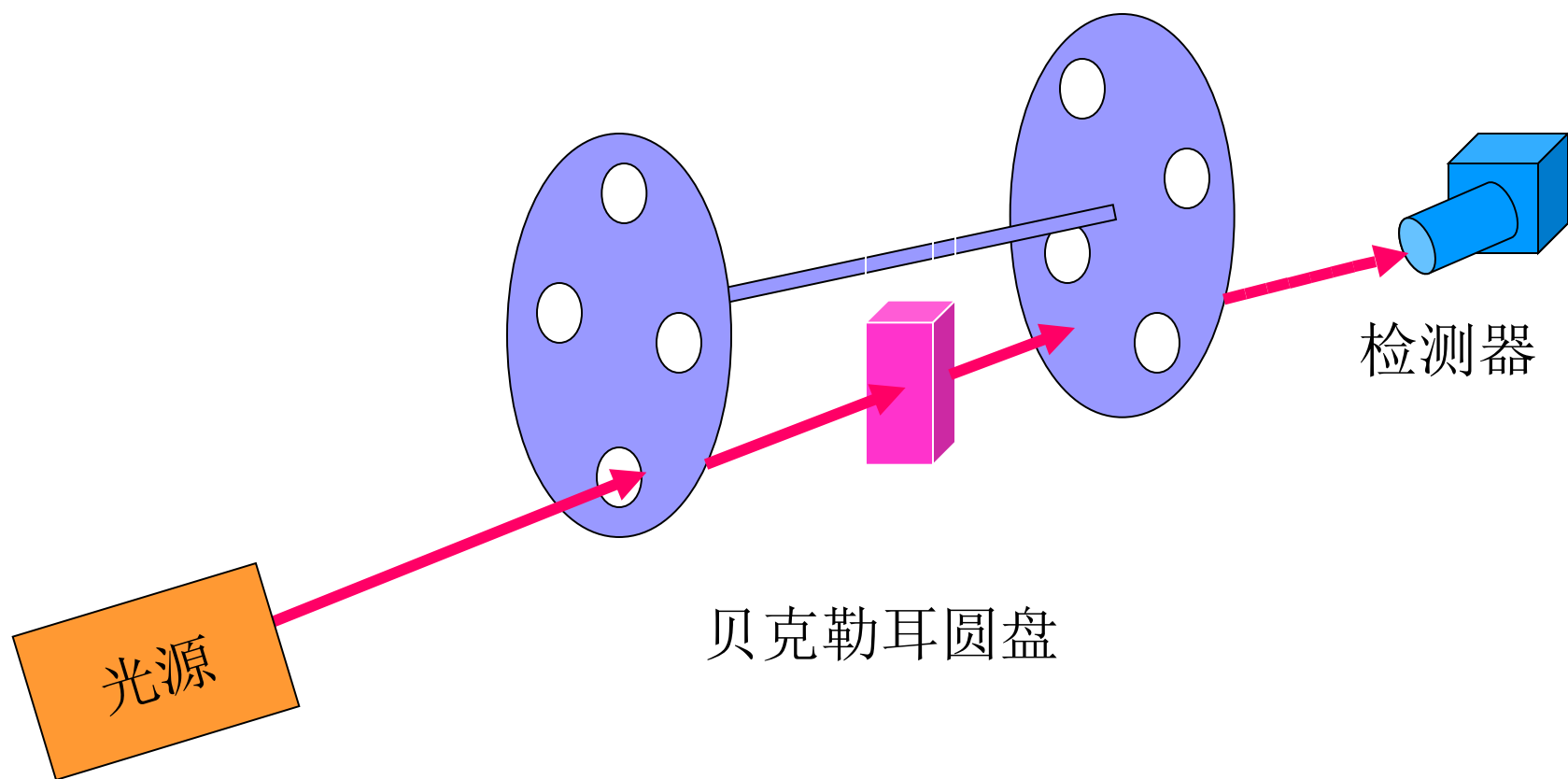
由于受体分子的存在，外沿供体分子的荧光被淬灭，而光斑中心由于有更多供体荧光分子被激发，因此不能被受体分子有效淬灭，我们探测到的荧光光斑的直径显然就会小于入射光斑的直径，从而克服了光源的衍射极限，实现了高分辨探测。



### ( 3 ) 荧光分析的特点

- 灵敏度高
- 选择性好
- 仪器简单
- 应用范围广

# 磷光分析的仪器





低温磷光分析

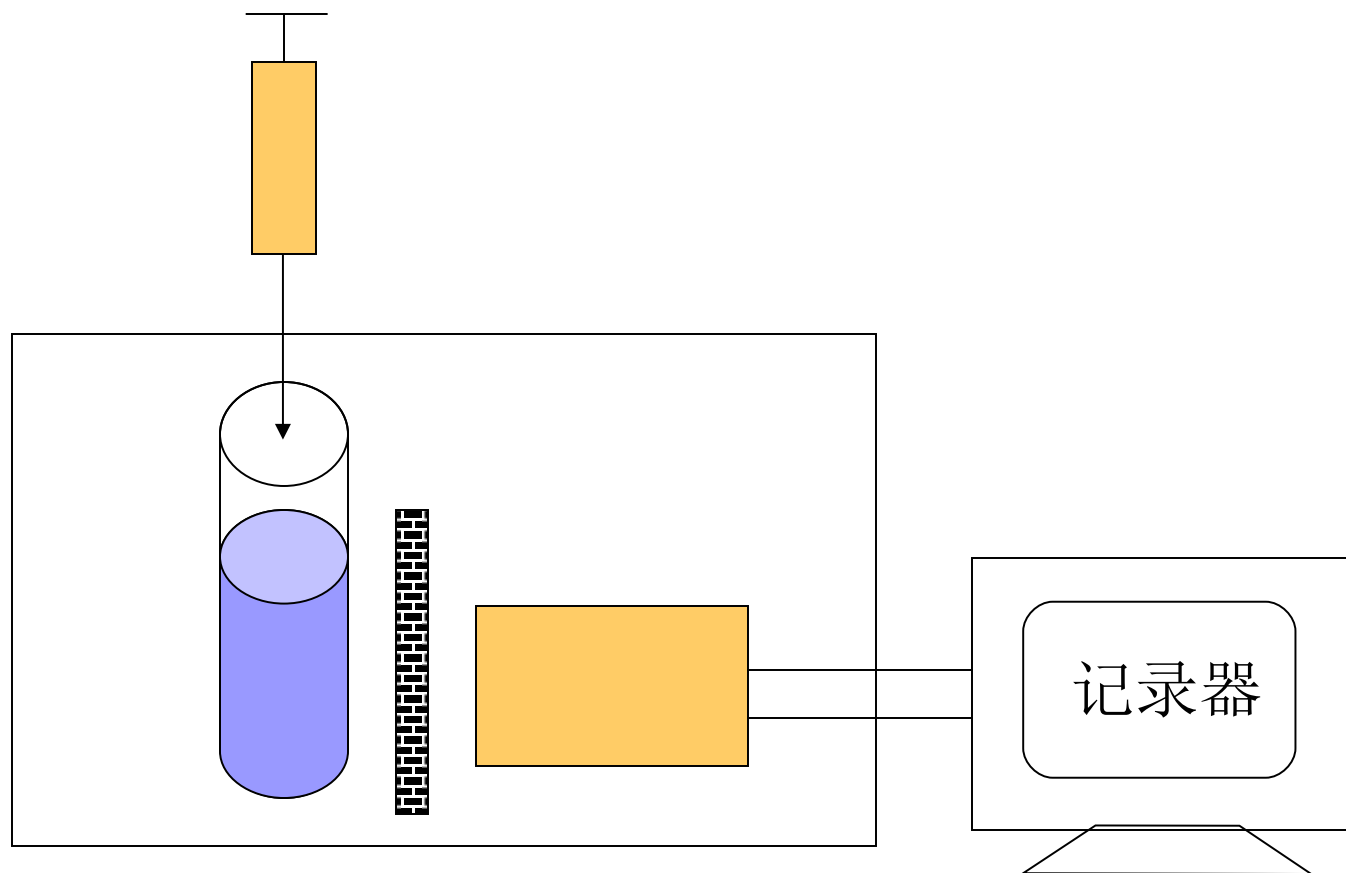
固体基质室温磷光分析

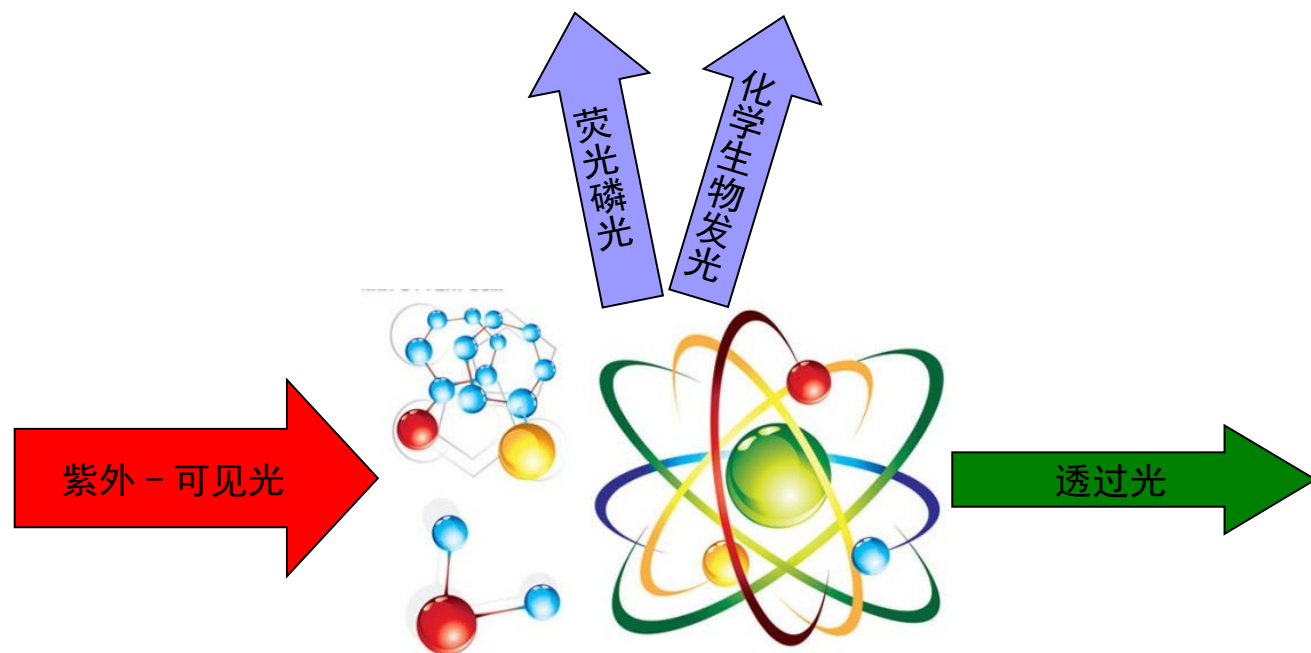
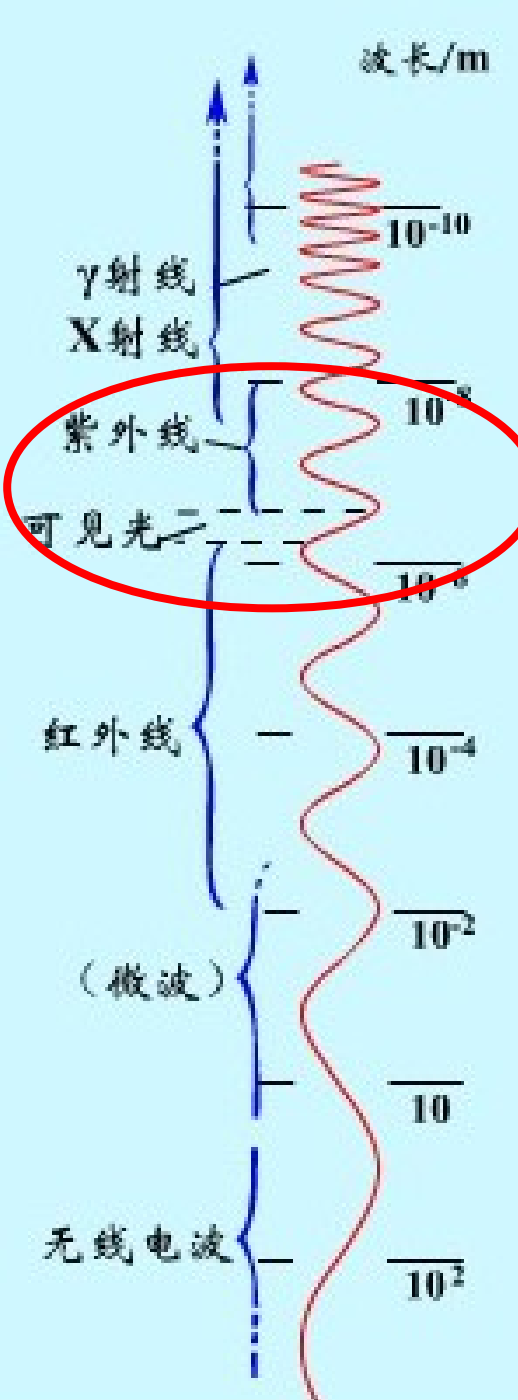
保护流体室温磷光分析

无保护流体室温磷光分析

磷光分析的缺点——仪器复杂，需要固体基质或保护

# 化学发光分析的仪器





# 作业题

- 1、3、4、5、8、9 题