

本科生课程

仪器分析 --分子发光分析

Molecular Luminescence Analysis

主讲人:李大伟

13701632425

daweili@ecust.edu.cn





一、概述

方式?

1. 什么是分子发光分析?

光

是基于被测物质的基态分子吸收能量被激发到较高电子能态后，在返回基态过程中，以发射辐射的方式释放能量，通过测量辐射光的强度对被测物质进行定量测定的一类分析方法。



2. 分子发光分析的分类

❖ 根据提供能量的方式分类

■ 光致发光

- 分子荧光分析法(**molecular fluorescence analysis**)
- 分子磷光分析法(**phosphorescence analysis**)

■ 化学发光

- 化学发光分析法(**chemiluminescence analysis**)



二、荧光和磷光分析基本原理

1. 荧光和磷光的产生

(1) 分子的能级与跃迁

- 电子能级，振动能级，转动能级
- 基态 S_0 ，激发态 S_1

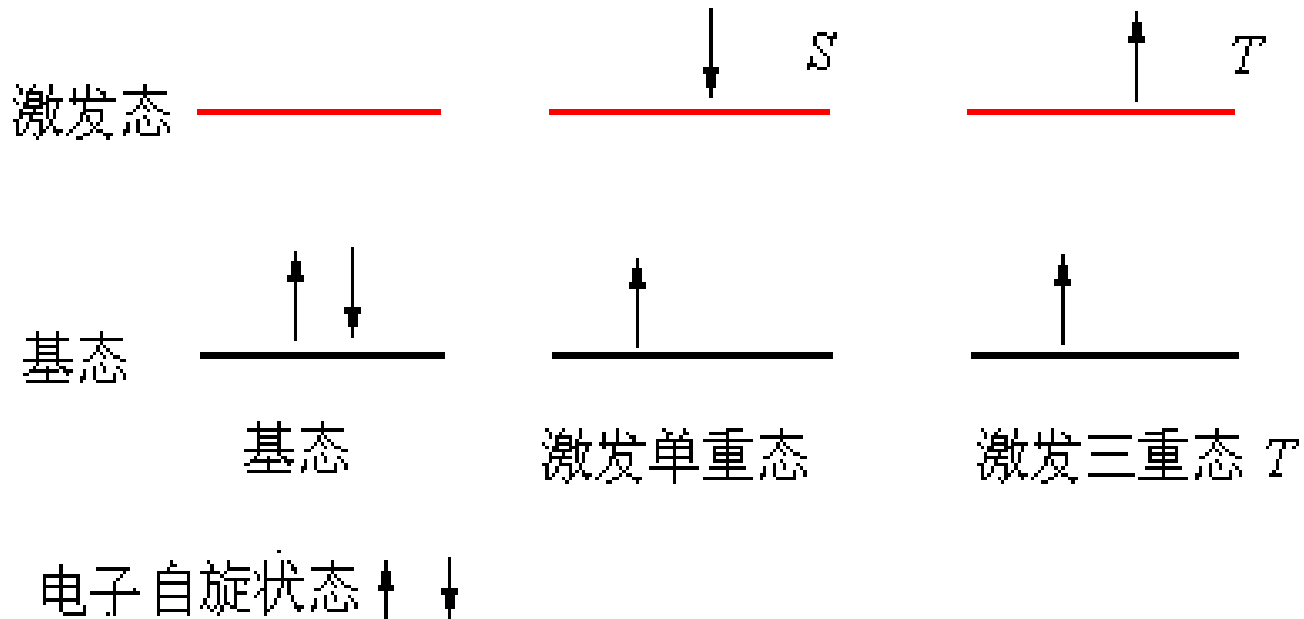
电子激发态的多重度

$$M=2S+1$$

S 为电子自旋角动量量子数的代数和

全部电子自旋配对, $S=0$

自旋不配对时, $S=1$





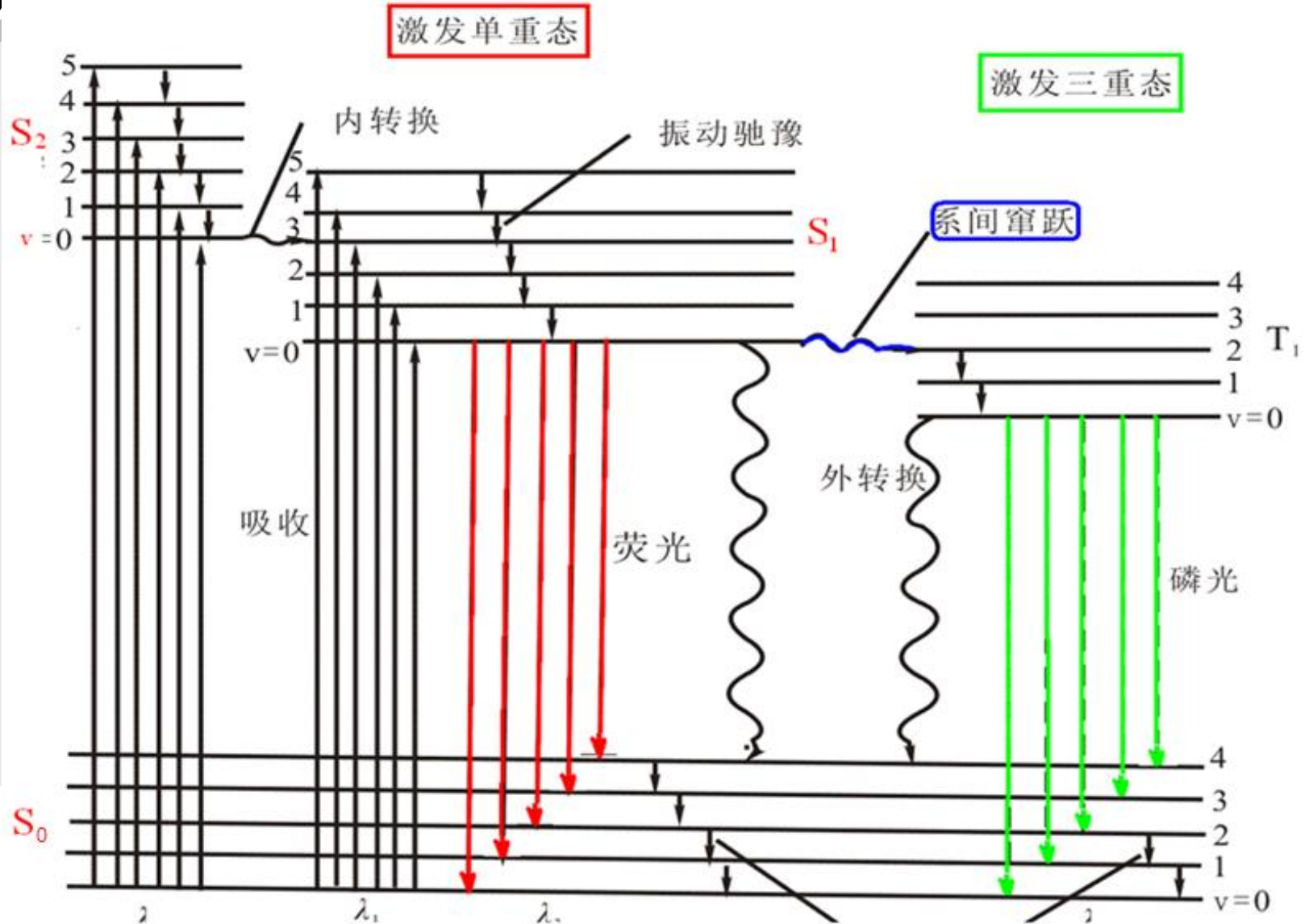
电子激发单重态 S_1 、 $S_2 \dots$

电子激发三重态 T_1 、 $T_2 \dots$

注意：

- 三重态能级比相应单重态能级低（洪特规则）；
- 大多数有机分子的基态处于单重态；
- $S_0 \rightarrow T_1$ 是禁阻跃迁的，只能通过其他途径进入 T_1

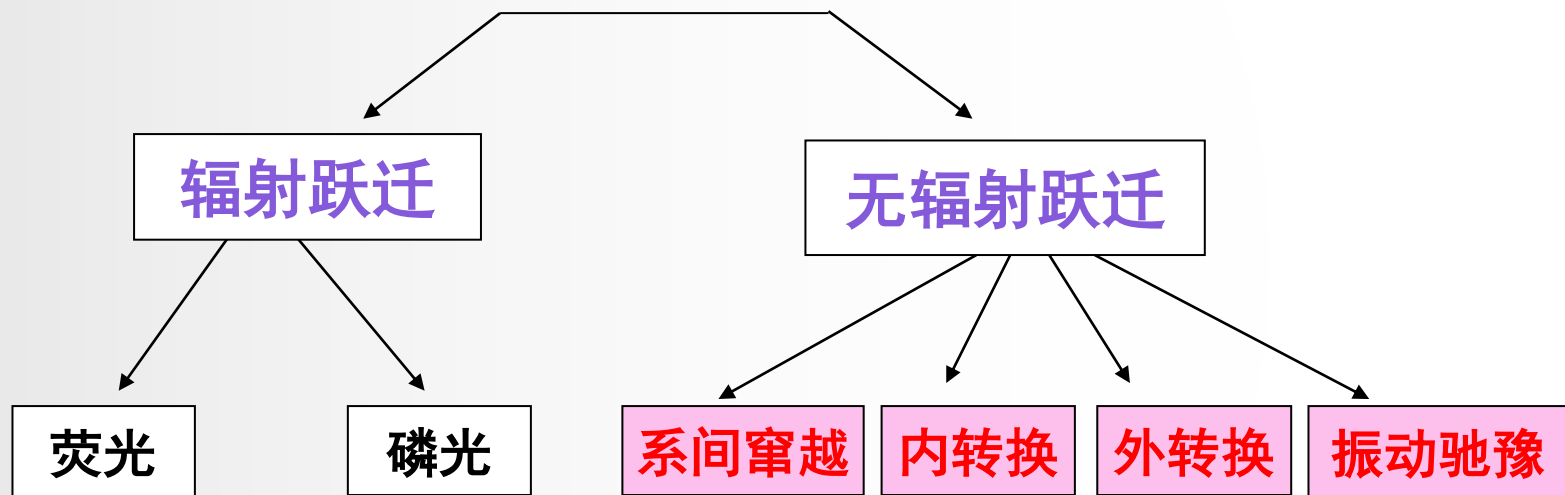
分子荧光对应的能级跃迁





(2) 激发态至基态的能量传递途径

能量传递途径



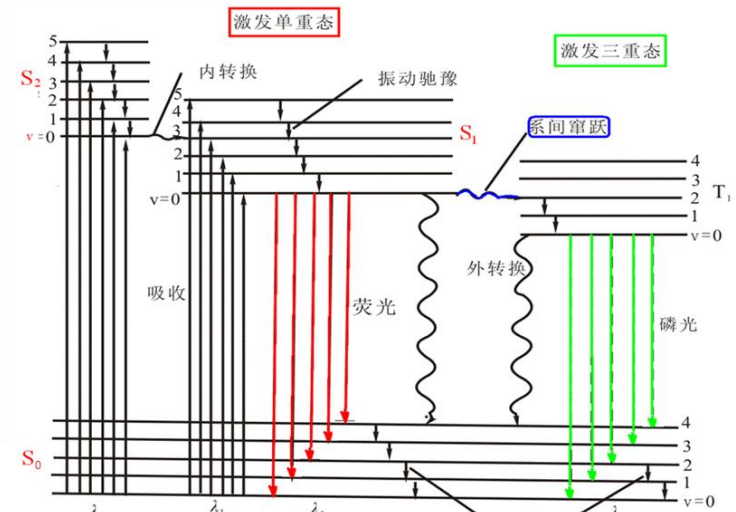
速率大的主导


无辐射跃迁

- 系间窜越, $S_1 \sim T_1 \dots 10^{-2} - 10^{-6} \text{s}$
- 内转换 (快), $S_1 \sim S_0, T_2 \sim T_1 \dots 10^{-11} - 10^{-13} \text{s}$
- 外转换, $T_1 \sim S_0 \dots 10^{-2} - 10^{-5} \text{s}$
- 振动弛豫 (快), $V_2 \sim V_1 \dots 10^{-12} - 10^{-14} \text{s}$

辐射跃迁

- 荧光发射
- 磷光发射





荧光的产生

分子由第一激发单重态的最低振动能级→基态 ($S_1 \rightarrow S_0$ 跃迁), 发射一定波长的荧光。寿命 $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ s}$ 。

跃迁至 S_0 的不同振转能级

$S_0 \rightarrow$ 激发 \rightarrow 振动弛豫 \rightarrow 内转换 \rightarrow 振动弛豫 $\rightarrow S_1 \rightarrow S_0$

• 磷光的产生

分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), 发射一定波长的磷光。寿命 $10^{-4} \sim 10 \text{ s}$ 。

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 内转换 \rightarrow 系间窜越 \rightarrow 振动弛豫 $\rightarrow T_1 \rightarrow S_0$

2. 激发光谱和发射光谱

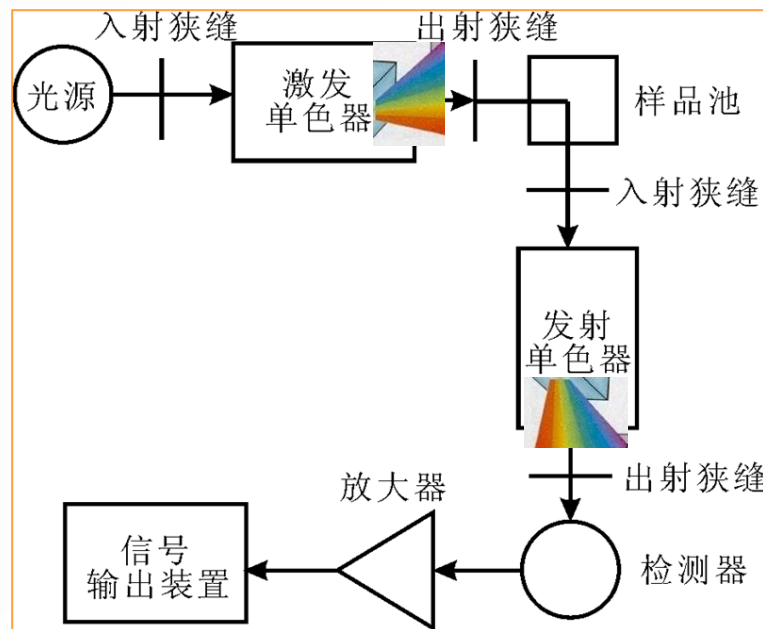
(1) 激发光谱

固定发射光波长，改变入射光（激发光）波长，以发射光强度对激发光波长作图所得到的光谱。

- ❖ 不同波长的入射光具有不同的激发效率，故入射光波长会影响激发光的光强
- ❖ 理论上与吸收光谱一样

(2) 发射光谱

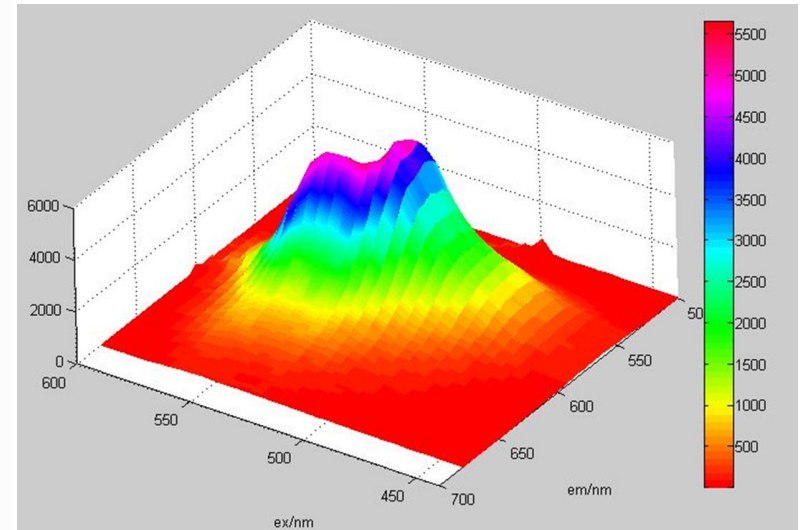
固定激发光波长与强度，以发射光强度对波长作图得到的光谱。



- 定性分析：激发和发射光谱的作用：
- 定量分析：选择某激发波长下的某发射波长

(3) 三维荧光光谱

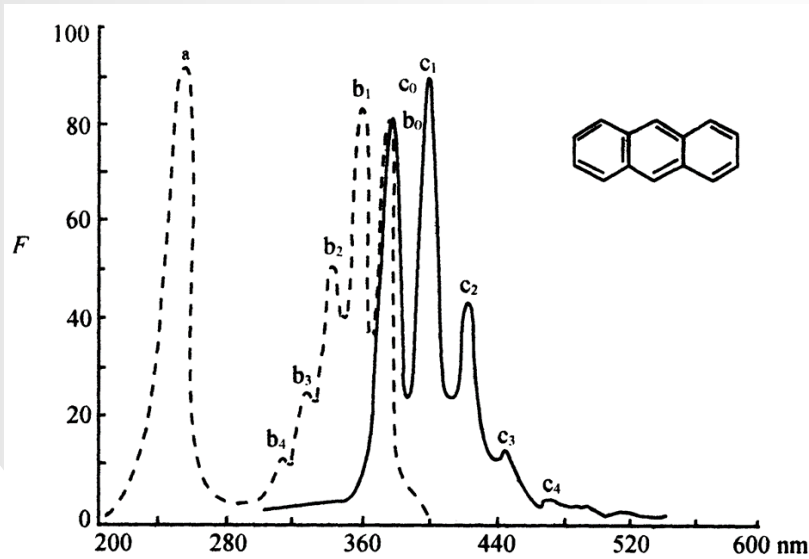
多激发波长和多发射波长的荧光光谱，信息更多



吸收光谱（虚线）和发射光谱（实线）

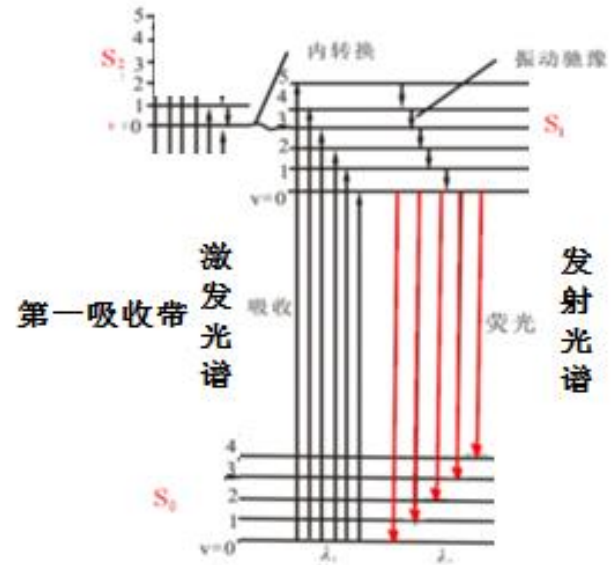
(4) 激发和发射光谱的关系

- **Stokes位移**：荧光发射波长大于激发波长
- 发射光谱的形状与激发波长无关
- **镜像规则**：发射光谱与**第一吸收带**之间呈镜像对称关系



蒽的荧光特征光谱

激发光谱（虚线）和发射光谱（实线）





3. 荧光的产生与分子结构的关系

(1) 分子产生荧光必须具备的条件

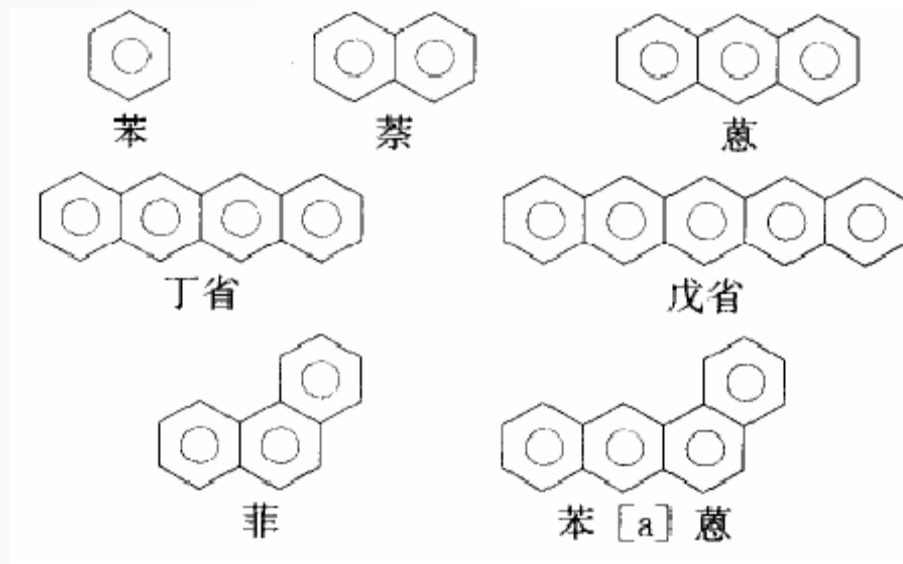
- 具有合适的结构，能吸收激发光
- 具有一定的荧光效率

荧光量子产率 (φ) : $\varphi = \frac{\text{发射荧光的光量子数}}{\text{吸收激发光的光量子数}}$

(2) 荧光与分子结构的关系

➤ 共轭效应

$\pi^* \rightarrow \pi$ 的荧光效率高，
 提高共轭度有利于增
 加荧光效率并产生红
 移。



化 合 物	ϕ_F	λ_{ex}/nm	λ_{em}/nm
苯	0.11	205	278
萘	0.29	286	321
蒽	0.46	365	400

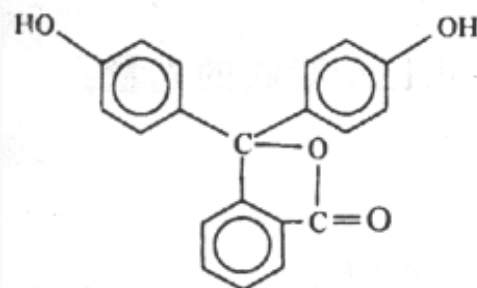


➤ 刚性平面结构

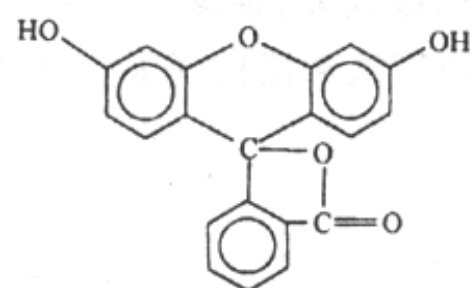
可降低分子振动，减少系间窜跃及碰撞去活的可能性。

❖ 取代基效应

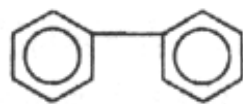
芳环上如有**供电基**， ρ - π 作用使共轭程度增大，荧光增强。



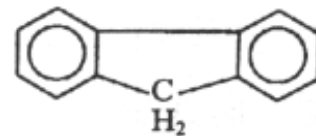
酚酞



荧光素



联苯 $\varphi = 0.18$



苊 $\varphi = 1$



取代基对苯分子荧光强度及波长的影响

吸电子基团荧光减弱：羧基、羰基或亚硝基
给电子基荧光增强： $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCH}_3$

化 合 物	化 学 式	荧光波长 (nm)	荧光相对强度
苯	C_6H_6	270—312	10
甲 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	270—320	17
丙 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_3\text{H}_7$	270—320	17
氟 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{F}$	270—320	10
氯 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	275—345	7
溴 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$	290—380	5
碘 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{I}$	—	0
酚	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	285—365	18
苯 胺	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	310—405	20
苯胺离子	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+$	—	0
苄 腈	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}$	280—360	20
硝 基 苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	—	0



4. 影响荧光强度的外部因素

❖ 溶剂的影响


一般荧光波长随着溶剂极性的增大而向长波方向移动

❖ 温度的影响

大多数荧光物质随着温度的增高，其荧光效率和荧光强度降低

❖ 溶液pH值的影响

影响分子的电离状态，从而显著影响荧光光谱的形状和强度

Two circular inset images: the left one shows a dandelion seed head, and the right one shows a green water droplet on a leaf.

❖ 荧光猝灭

- 荧光物质与溶剂分子或其他溶剂分子相互作用，引起荧光强度下降或消失的现象。
- 猝灭剂：能引起荧光猝灭的物质
- 动态猝灭：激发态荧光分子与猝灭剂碰撞后，发生能量转移引起猝灭
- 静态猝灭：猝灭剂与基态荧光分子形成配合物（相互作用）等引起的荧光猝灭

采用荧光进行痕量测定时要除氧



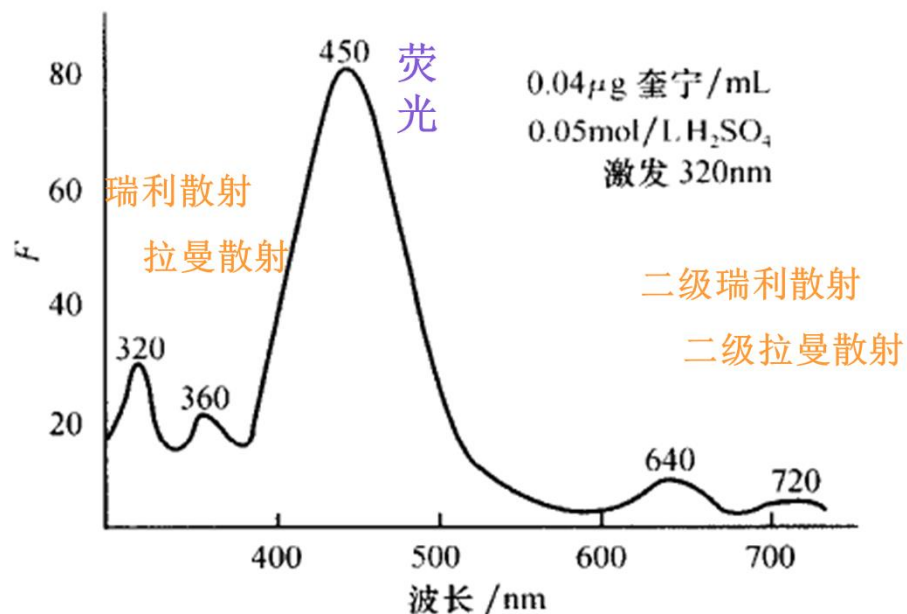
与光谱有关的干扰

➤ 散射光的影响：瑞利散射、拉曼散射

什么是瑞利散射和拉曼散射？改变激发光的波长能避免其干扰，

➤ 激发光照的影响：光分解

➤ 内滤光作用：溶液中存在组分吸收激发或发射光



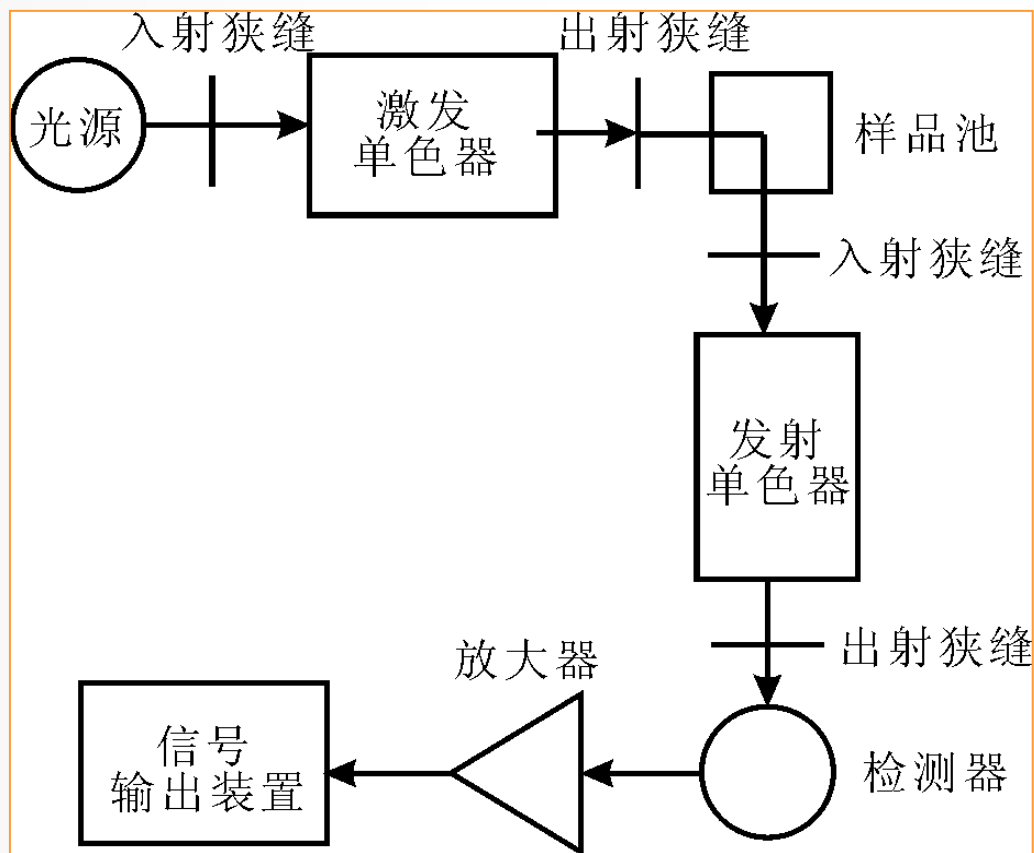
四、荧光（磷光）分析仪

四个部分：

- 激发光源
- 样品池
- 单色器系统
- 检测器

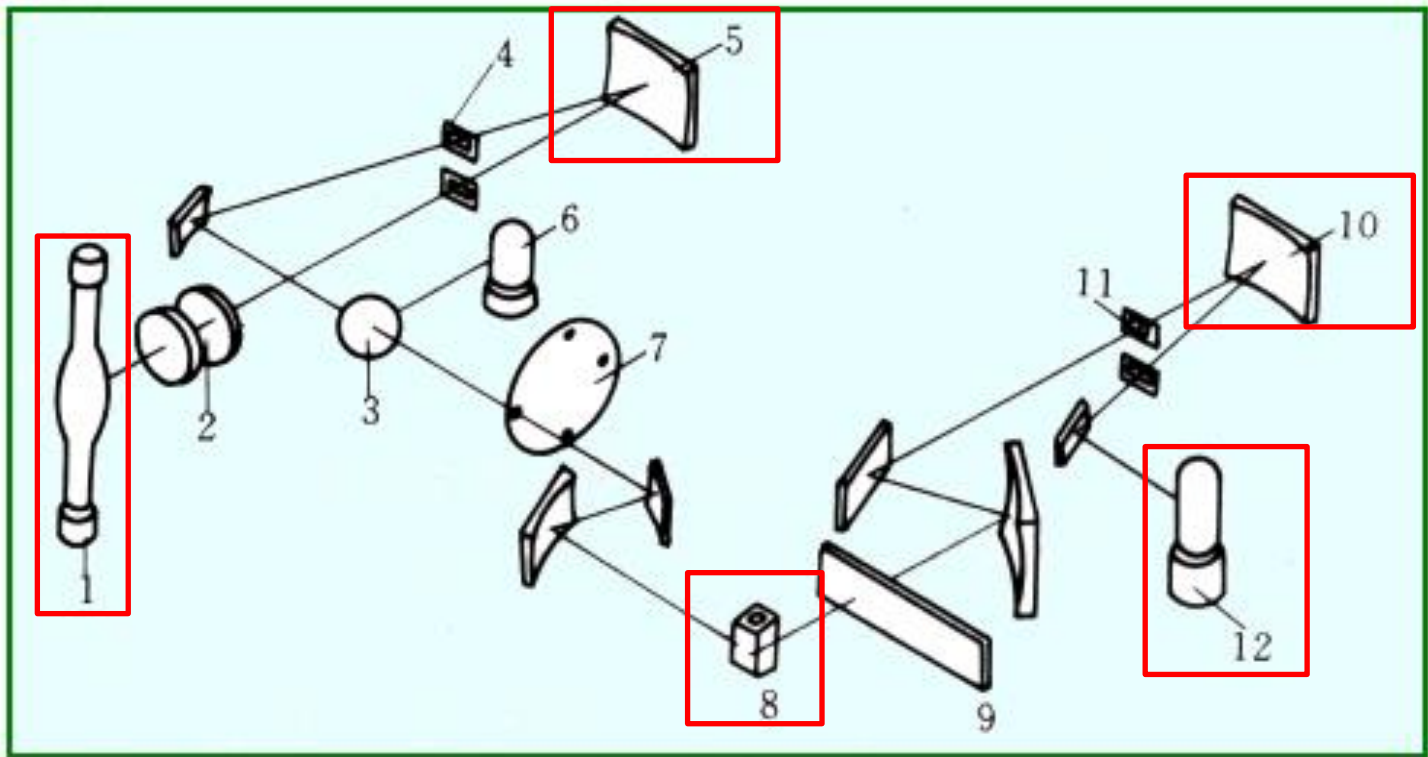
特点

- 双单色器系统
- 直角位置检测



荧光分光光度计的结构示意图

荧光光谱仪光路图



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)



磷光检测附件

➤ 磷光的产生：效率低，通常低温检测；固定磷光体（增加刚性）

➤ 磷光镜

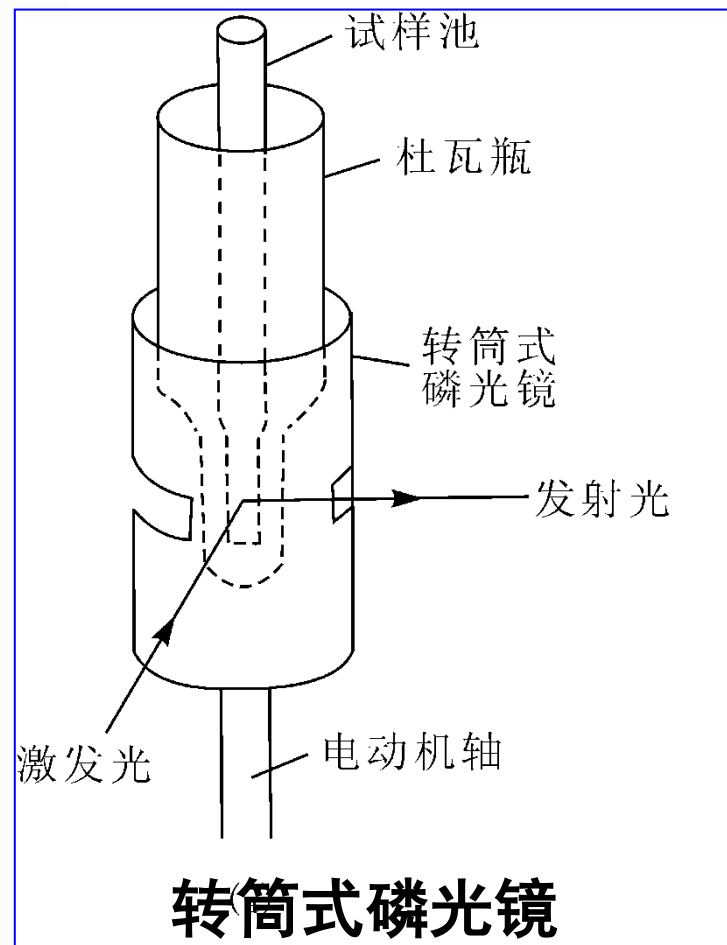
- 杜瓦瓶：盛液氮，实现磷光的低温测定

- 室温磷光技术：固体基质、表面活性剂（胶束固定）

➤ 荧光和磷光同时测定：寿命差别，开有孔洞的转筒来实现

- 遮挡激发光：测磷光

- 开启激发光：测荧光+磷光





四、荧光（磷光）定量分析

1. 定量依据——荧光强度

吸收的光强度

根据荧光效率的定义： $F = \varphi \cdot I_a$

根据比尔定律： $I_a = I_0 - I_t = I_0(1 - 10^{-\varepsilon bc})$

$$F = \varphi \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-2.3\varepsilon bc})$$

$$e^{-2.3\varepsilon bc} = 1 - 2.3\varepsilon bc - \frac{(2.3\varepsilon bc)^2}{2!} - \frac{(2.3\varepsilon bc)^3}{3!} - \dots$$

对于稀溶液： $F = 2.3\varphi I_0 \varepsilon bc$
 $\varepsilon bc < 0.05$

荧光定量关系式！

Two circular inset images: the left one shows a dandelion seed head, and the right one shows a green leaf with water droplets.

2. 线性关系偏离的原因

- 内滤效应：溶液中杂质（增多）及前部溶液对入射光吸收，使激发光（溶液中后部）强度降低
- 浓溶液：发生溶质间相互作用，碰撞去活概率增大
- 自吸收：荧光发射波长与化合物的吸收波长有重叠

3. 定量方法

- 标准曲线法
- 单点校正



五、荧光分析的特点与应用

1. 荧光分析法的特点

- **灵敏度高**：可提高 I_0 ，单分子检测
- 试样用量少
- **选择性高**
- 信息量丰富
- **可直接检测的分子较少**

Two circular inset images: the left one shows a dandelion seed head, and the right one shows a green leaf with water droplets.

2. 荧光分析法的应用

(1) 定量分析

- 适用于微量及痕量无机离子、有机化合物及生物分子的定量分析
- 多通过间接方法实现，如荧光猝灭法、荧光探针
- 相对于UV-Vis，定量测定的应用范围小
- 磷光分析法适合于微量及痕量的稠环芳烃、农药、生物碱、激素的分析、药物分析和临床分析。



表 某些有机化合物的荧光测定法

待 测 物	试 剂	激发光波长 nm	荧光波长 nm	测定范围 $c/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-1})$
丙三醇	苯胺	紫外	蓝色	0.1 ~ 2
糠 醛	萘酮	465	505	1.5 ~ 15
葱		365	400	0 ~ 5
苯基水杨酸酯	N, N'-二甲基甲酰胺 (KOH)	366	410	$3 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
1-萘酚	$0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$	紫外	500	
四氧嘧啶(阿脉)	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
胍基丁胺	邻苯二醛	365	470	0.05 ~ 5
玻璃酸酶	3-乙酰氧基吡啶	395	470	0.001 ~ 0.033
青霉素	α -甲氧基-6-氯-9-(β -氨基乙基)-氨基氮杂蒽	420	500	0.0625 ~ 0.625



表 某些无机物的荧光测定法

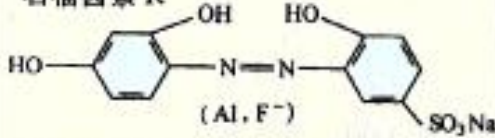
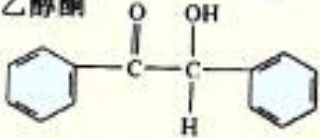
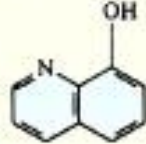
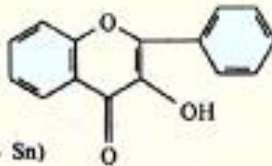
离子	试 剂	λ/nm		检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	干 扰
		吸 收	荧 光		
Al^{3+}	石榴茜素 R  (Al, F^-)	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F^- , NO_3^- , Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
F^-	石榴茜素 R-Al 配合物 (熄灭)	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	二苯乙醇酮  (B, Zn, Ge, Si)	370	450	0.04	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  (Al, Be 等)	370	580	0.2	Mg
Sn^{4+}	黄酮醇  (Zr, Sn)	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	檢出限/ng
吖啶	360	640	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.4
苯并(a)蒽	395	698	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.5
苯并(e)蒽	335	545	CsI	0.01
2,3- 苯并芴	343	505	NaI	0.028
呔唑	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)呔唑	295	475	NaI	0.002
螢蒽	365	545	$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	0.05
芴	270	428	CsI	0.2
1- 萘酚	310	530	NaI	0.03
蒽	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 (阿司匹灵)	血清或血浆	10 — 1000
普鲁卡因	血液	0.030 — 30
柯卡因	血或尿	0.030 — 3.0
苯巴比妥	血	10 — 1000
阿托品	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



(2) 联用技术的检测器

高效液相色谱、毛细管电泳的检测器。微型化分析方法如基因芯片、微流控芯片的检测手段。

(3) 分子结构性能测定

为分子结构及分子间相互作用的研究提供有用的信息。



3. 荧光分析技术进展

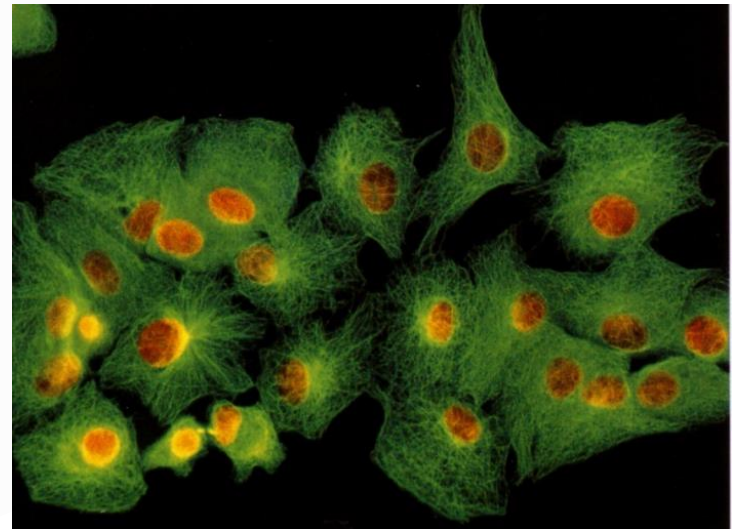
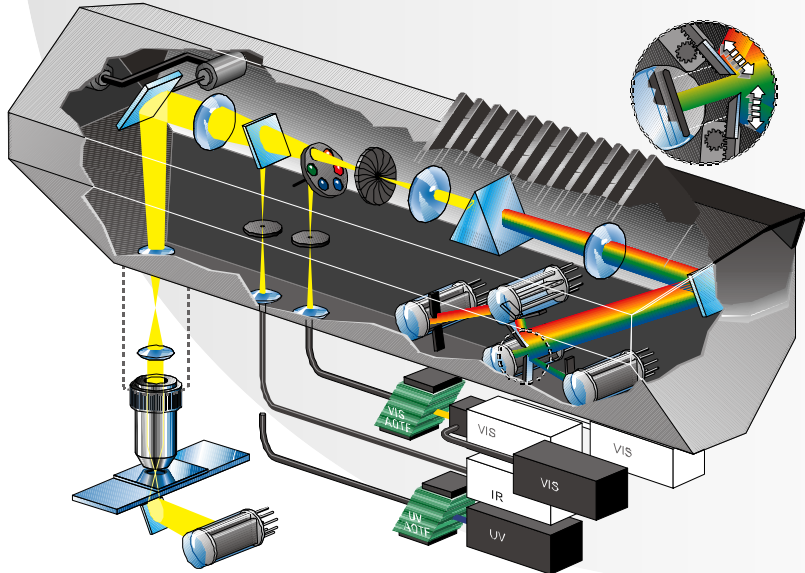
- ❖ 同步荧光光谱
- ❖ 三维荧光光谱
- ❖ 激光诱导荧光光谱分析法
- ❖ **共聚焦荧光显微镜**
- ❖ 时间分辨荧光分析法

激光扫描共聚焦荧光显微镜



细胞成像

- 荧光标记物
- 3D成像
- 可视化
- 应用：肿瘤边界、药物作用位点等





六、化学发光分析简介

1. 化学发光分析的原理

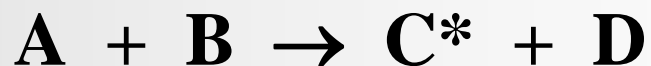
在化学反应过程中，某些化合物接受能量而被激发，从激发态返回基态时，发射出一定波长的光。与对应分子的荧光光谱，或磷光光谱很相似。



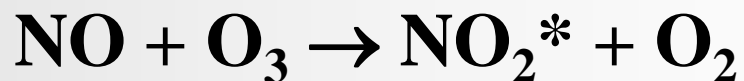


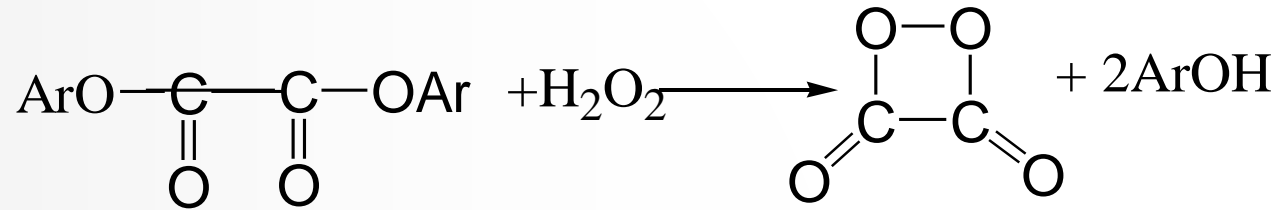
2. 化学发光的分类

❖ 直接化学反应发光

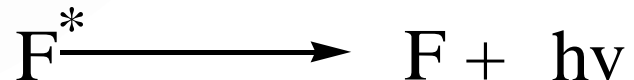
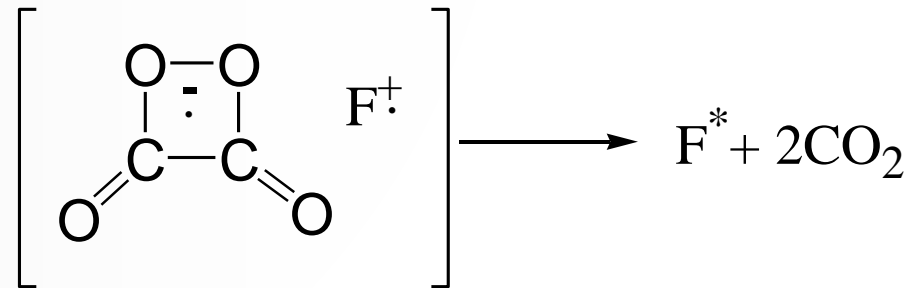
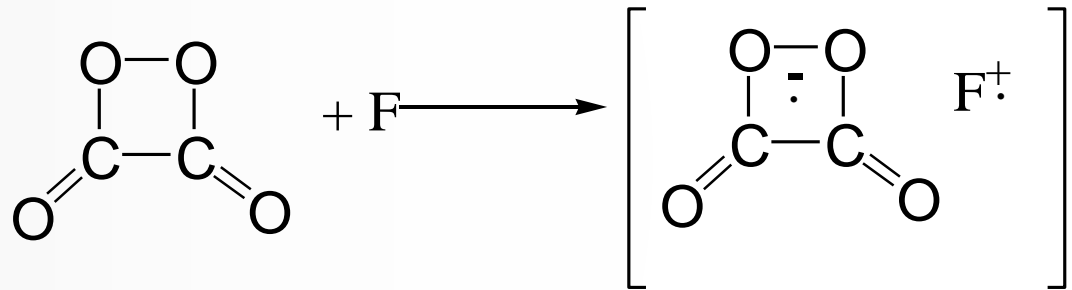
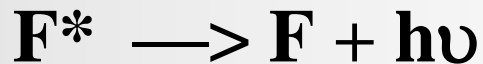
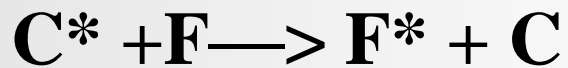
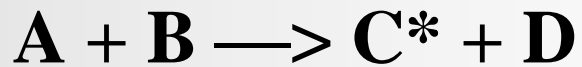


❖ 例:





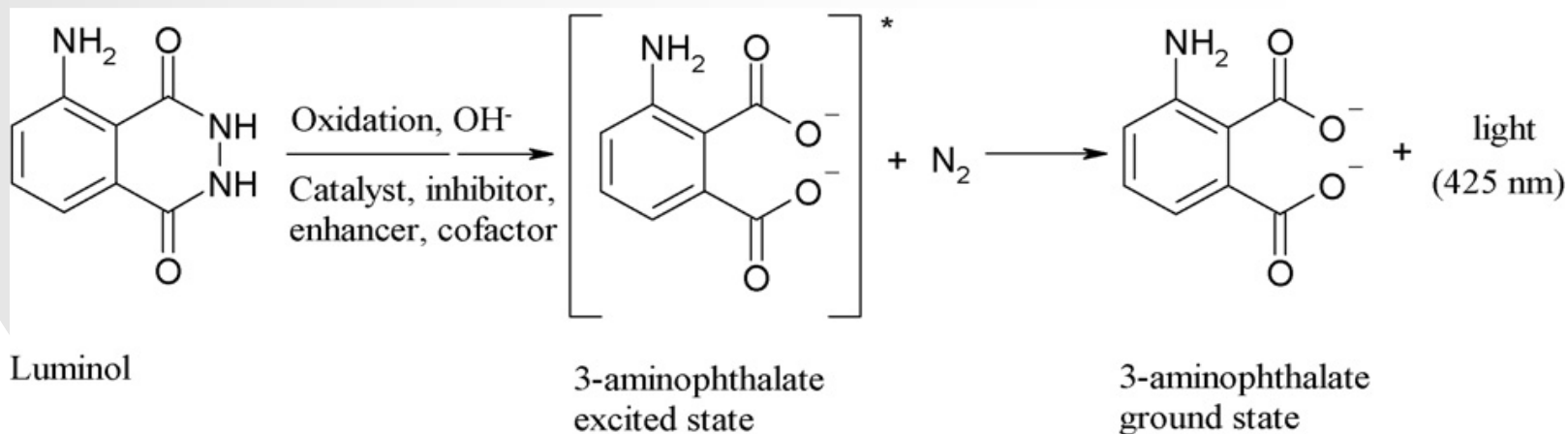
❖ 间接化学反应发光



3. 对化学发光反应的要求

- ❖ 反应必须提供足够的能量；多为氧化还原反应
- ❖ 吸收了化学能的分子，必须能释放出光子转移能量

常用的发光体系：鲁米诺及其衍生物、光泽精、洛粉碱等



3. 化学发光分析的仪器流程

发光反应室

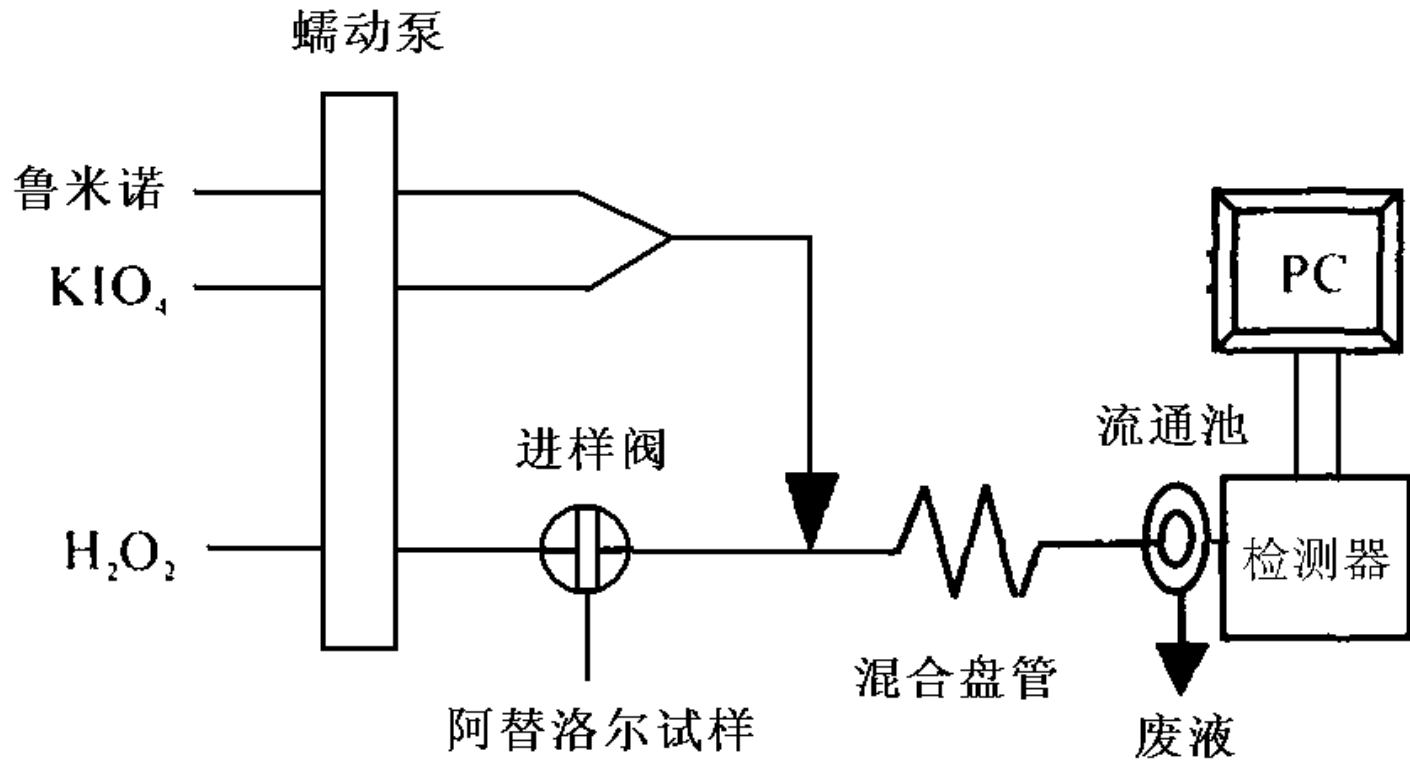
光检测器

信号放大器

显示与记录

仪器结构简单，
无需光源！





化学发光法测定阿替洛尔的流动注射装置流程图



4. 化学发光分析的特点与应用

(1) 特点

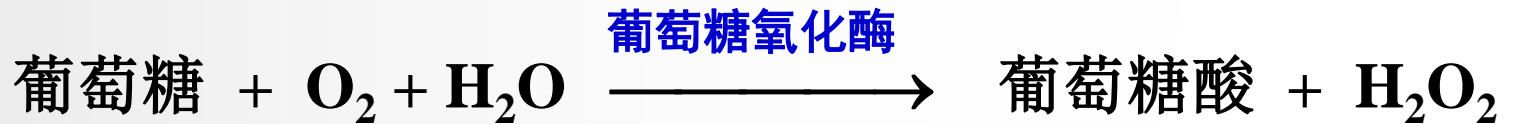
- 灵敏度高
- 选择性好
- 仪器设备简单
- 应用还不够广泛
- 发光反应效率低（大大低于生物发光）



(2) 应用

痕量无机离子、生物分子的测定（法医血迹测定）

例1:



通过测定生成的 H_2O_2 ，确定氨基酸、葡萄糖含量。



课程讲授 结束

课堂测验

