

## 第五章 分子发光分析

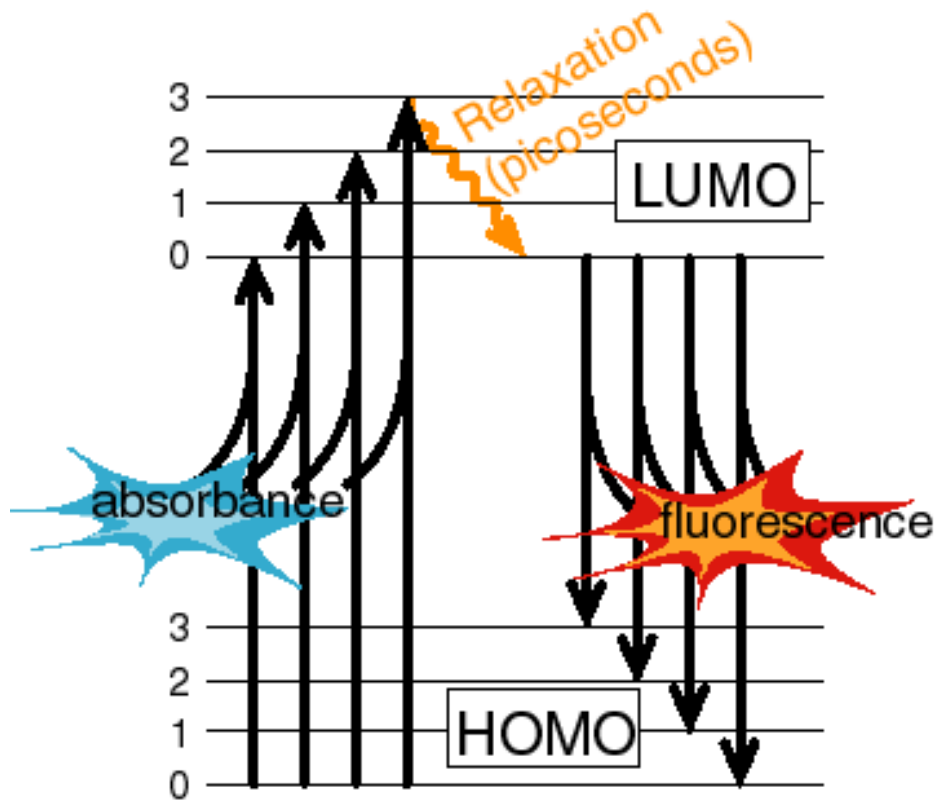
李哲 博士、副教授

药学院332

[lizhe5@mail.sysu.edu.cn](mailto:lizhe5@mail.sysu.edu.cn)

---

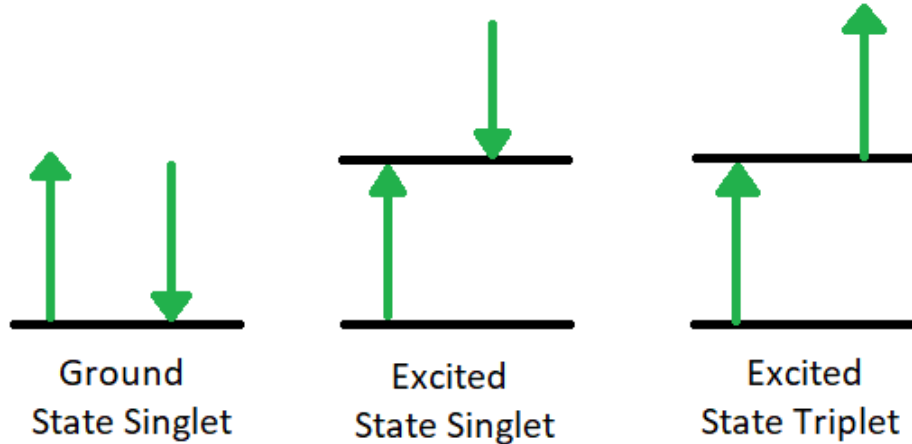
# 分子发光



- 灵敏度高
- 选择性好

分子从激发态释放能量回到基态，产生分子发光现象。

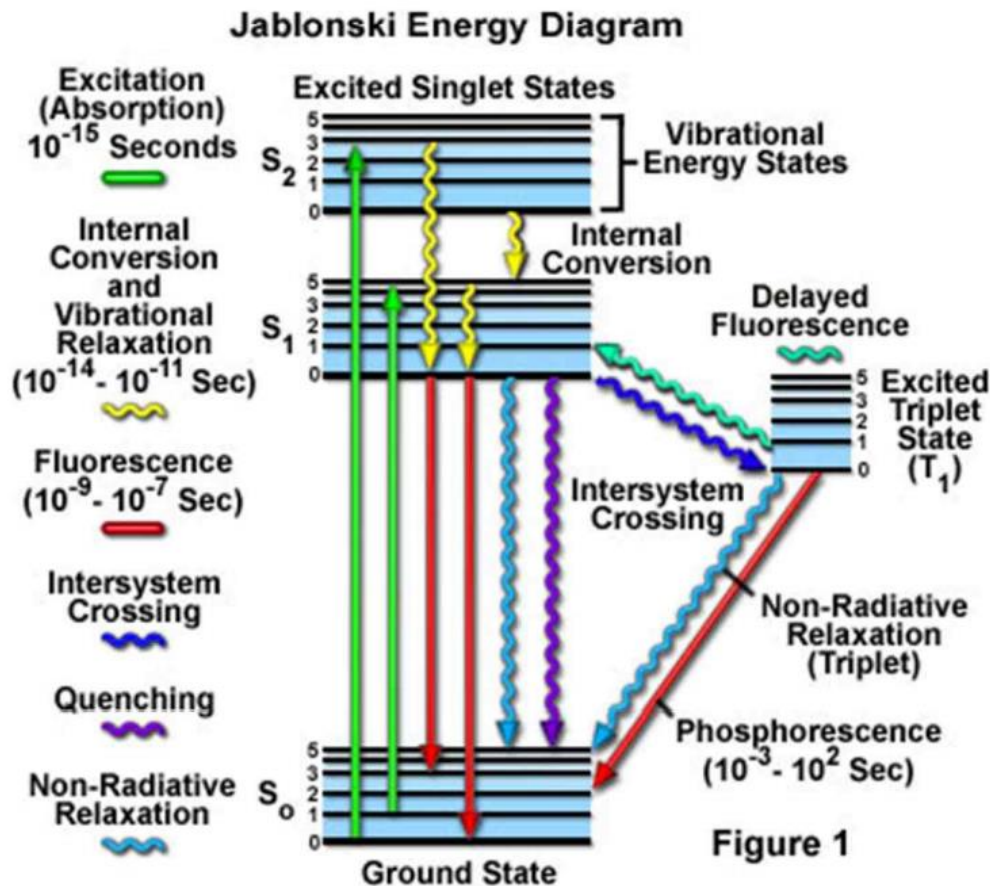
# 发光机制



**激发单重态** ( $S_1^*$ ) : 被激发跃迁到能量较高的轨道上, 电子自旋方向**不改变**。

**激发三重态** ( $T_1^*$ ) : 电子在跃迁过程中, 自旋方向**改变**。

# 发光机制



**振动弛豫:** 发生碰撞、回到同一电子激发态的最低振动能级的过程。

( $S_1^*$ 、 $T_1^*$  内部)。

**内转换:** 向能级相差小的其他激发态的无辐射跃迁。(  $S_2^* \rightarrow S_1^*$  )。

**外转换:** 发生碰撞,  $S_1^*$ 、 $T_1^*$ 最低振动能级  $\rightarrow$  基态

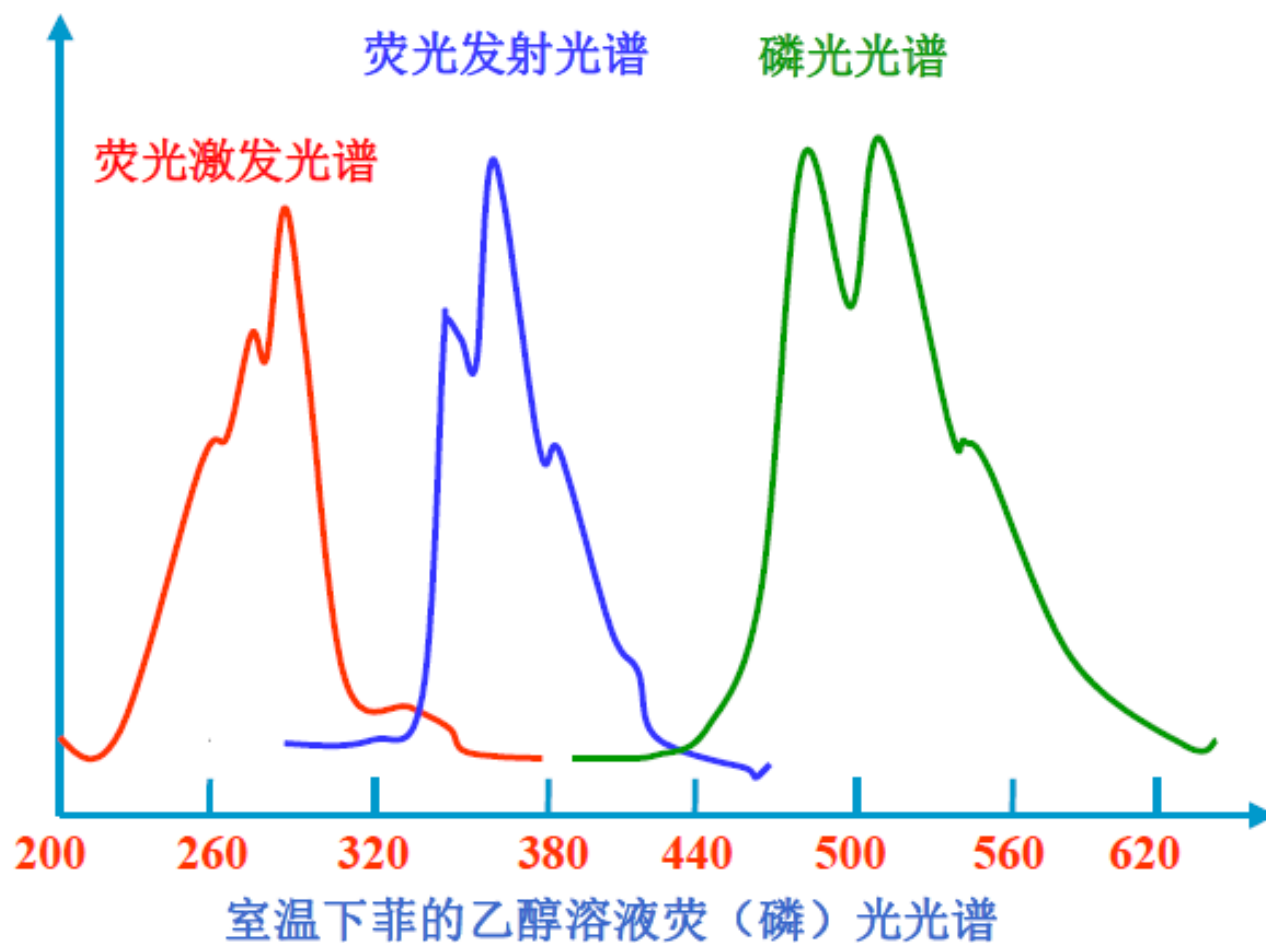
**荧光发射:** 从 $S_1^*$ 最低振动能级  $\rightarrow$  基态。

**系间跨越:** 发生电子自旋状态改变的 $S_1^* \rightarrow T_1^*$ 跃迁。

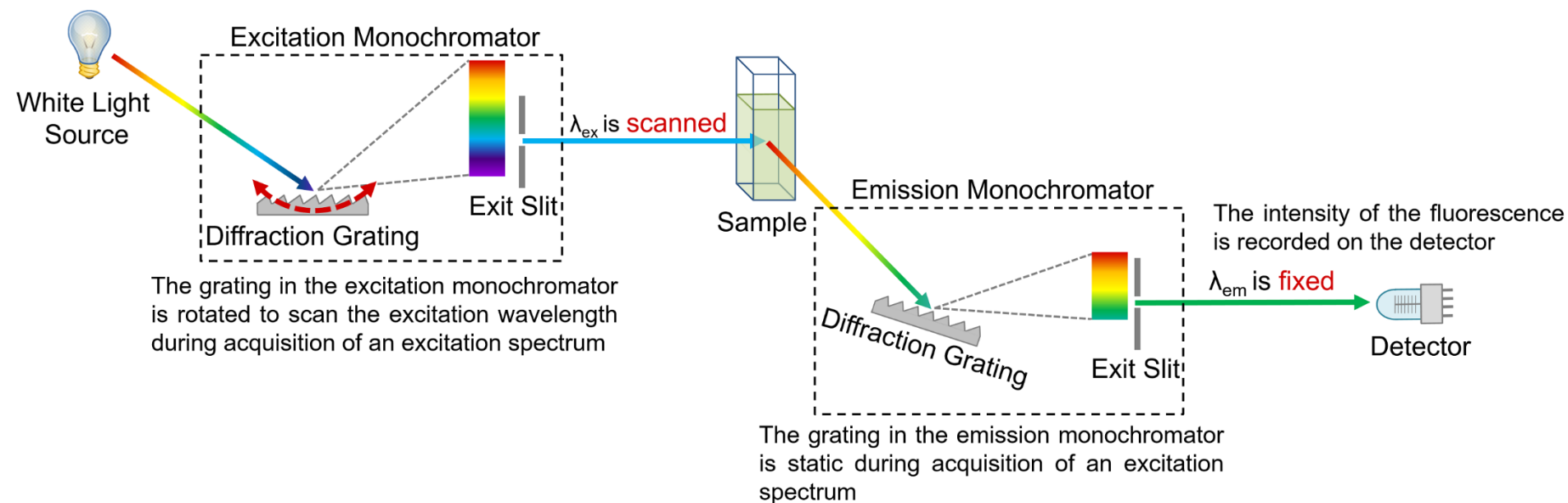
**磷光发射:**  $T_1^*$  最低振动能级  $\rightarrow$  基态。

$$\lambda_{\text{发射(磷光)}} > \lambda_{\text{发射(荧光)}} > \lambda_{\text{激发}}$$

# 光谱



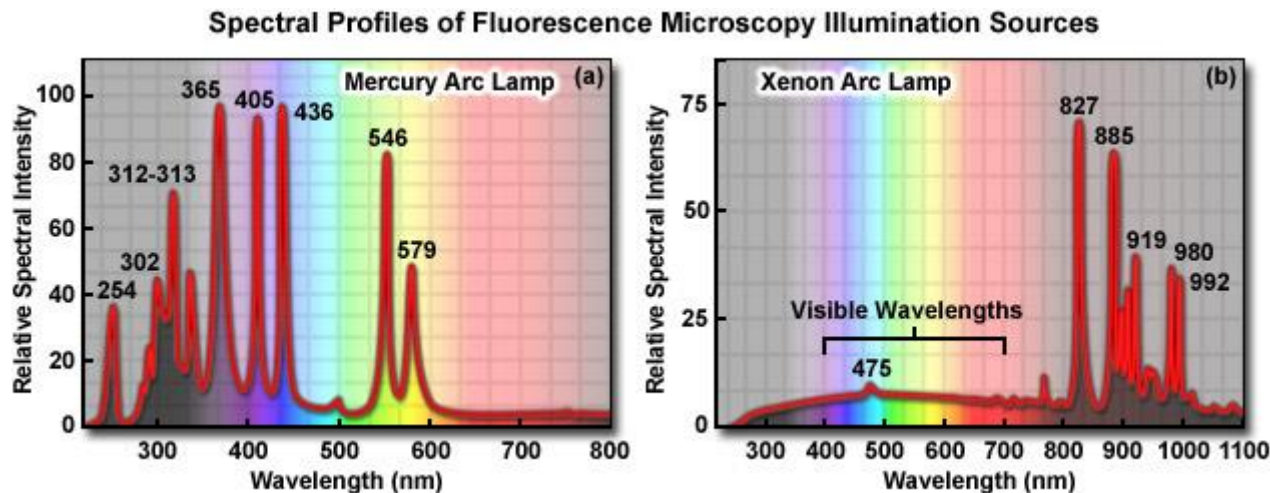
# 荧光分光光度计



特殊点：有**两个**单色器，光源与检测器通常成**直角**

# 荧光分光光度计

光源：氙灯、汞灯、激光器



氙灯是一种短弧气体放电灯，外套为石英，内充氙气，室温时其压力为**5atm**，工作时压力为**20atm**，具有光强度大，在**250 ~ 800nm** 范围内是连续光源的特点。氙灯的灯内气压高，启动时的电压高(**20 ~ 40KV**)，使用时注意安全。

# 荧光分光光度计

**激光诱导荧光：**发光强度大，能极大地提高荧光分析的灵敏度

**单色系统：**两个

**样品池：**



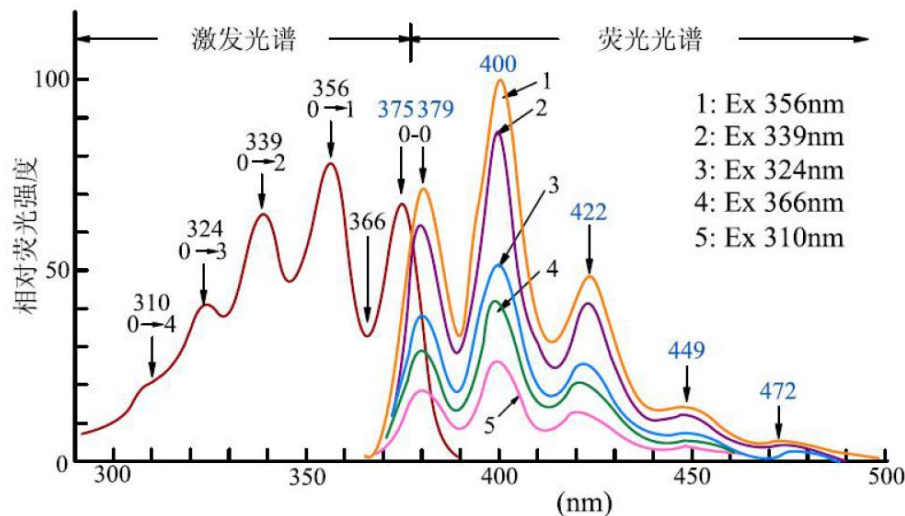


# 光谱

**激发光谱：**不同波长激发光照射下，荧光强度的变化所得到的曲线。（**改变激发波长**）

**发射光谱：**固定激发波长和强度，物质所发射的**荧光的波长**和强度所得到的曲线。（**改变测量波长**）

激发光谱和发射光谱是荧光物质定性的依据



蒽-乙醇溶液的激发光谱以及不同激发波长下的荧光发射光谱

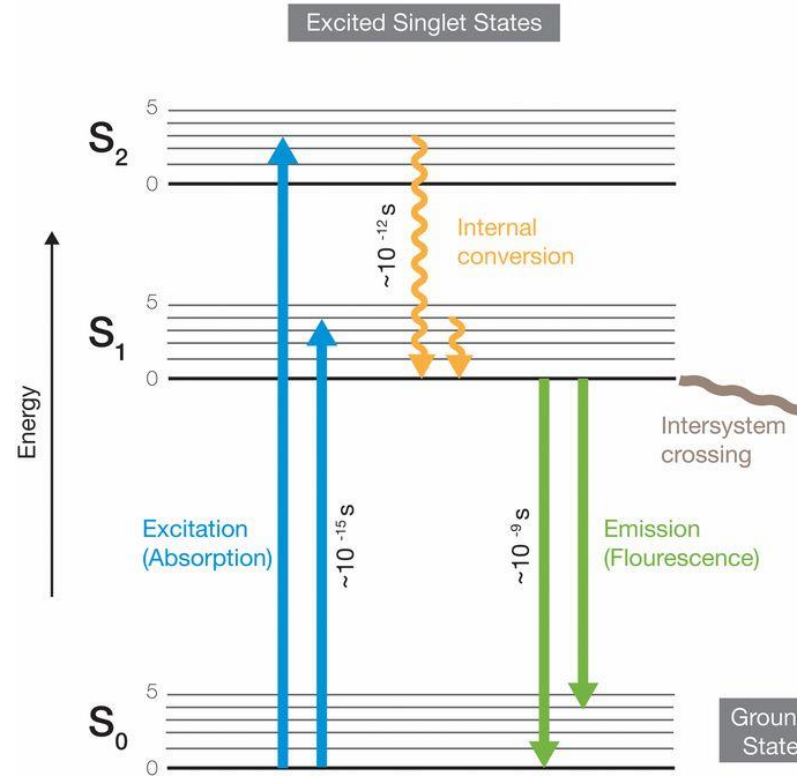
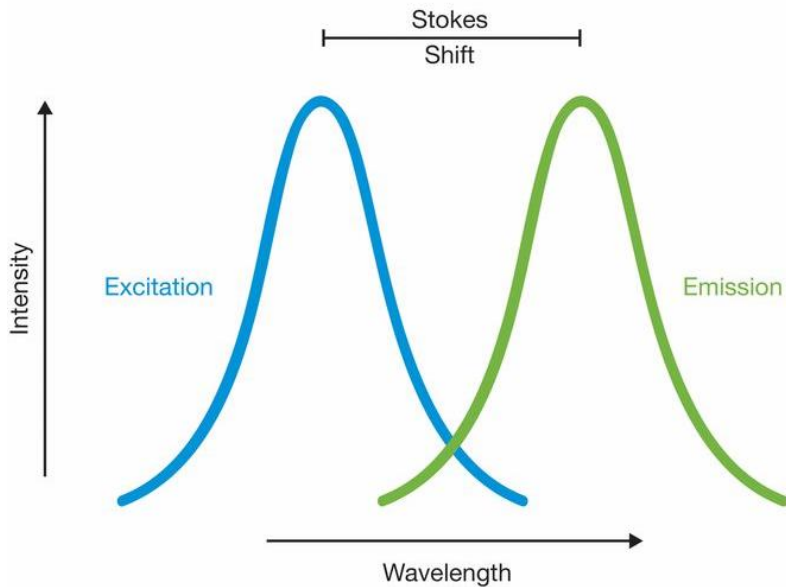
**测量波长确定：**先扫发射光谱再扫激发光谱

# 荧光光谱特征

## 1. 具有斯托克斯位移

荧光发射波长**大于**激发光波长

主要因为内转换和振动弛豫

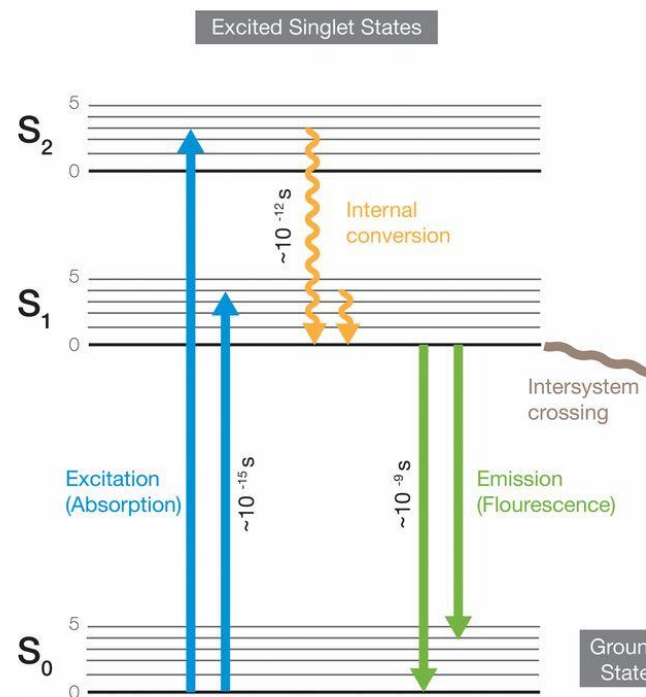
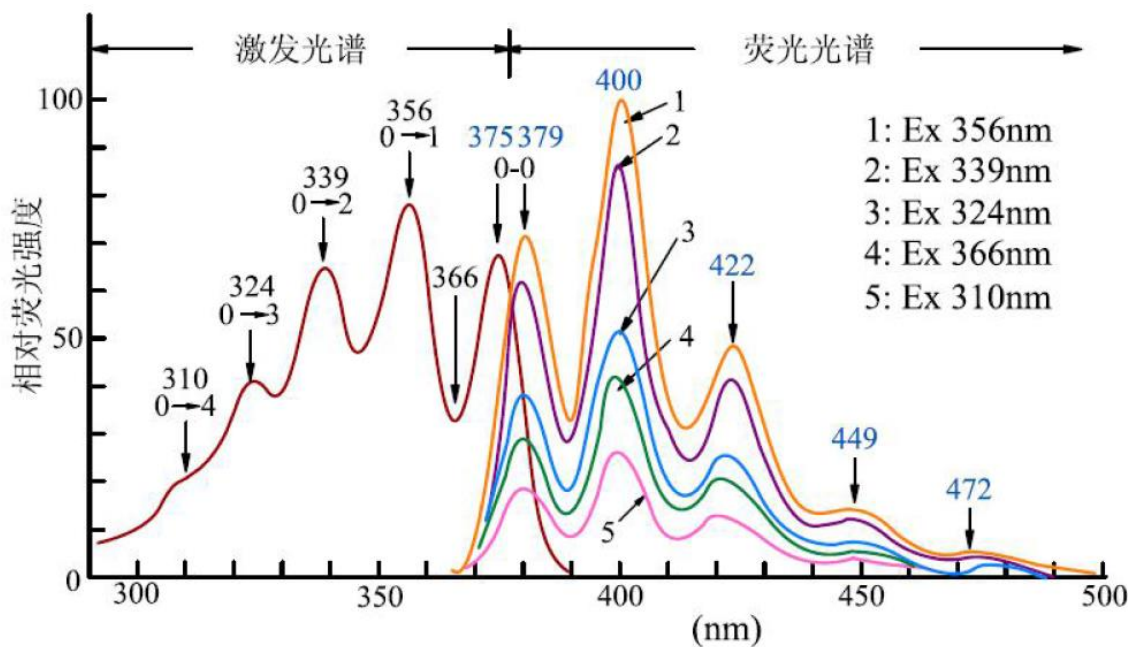


斯托克斯位移**越大越好**，降低激发光散射影响

# 光谱

## 2. 荧光光谱与激发波长无关

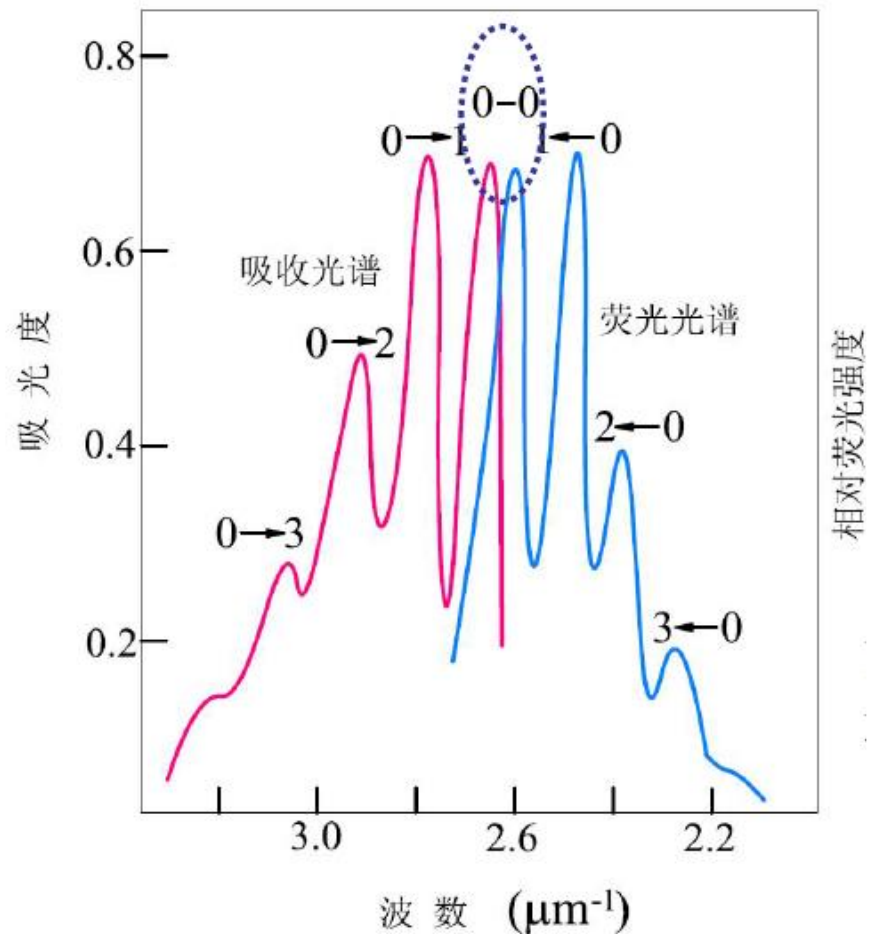
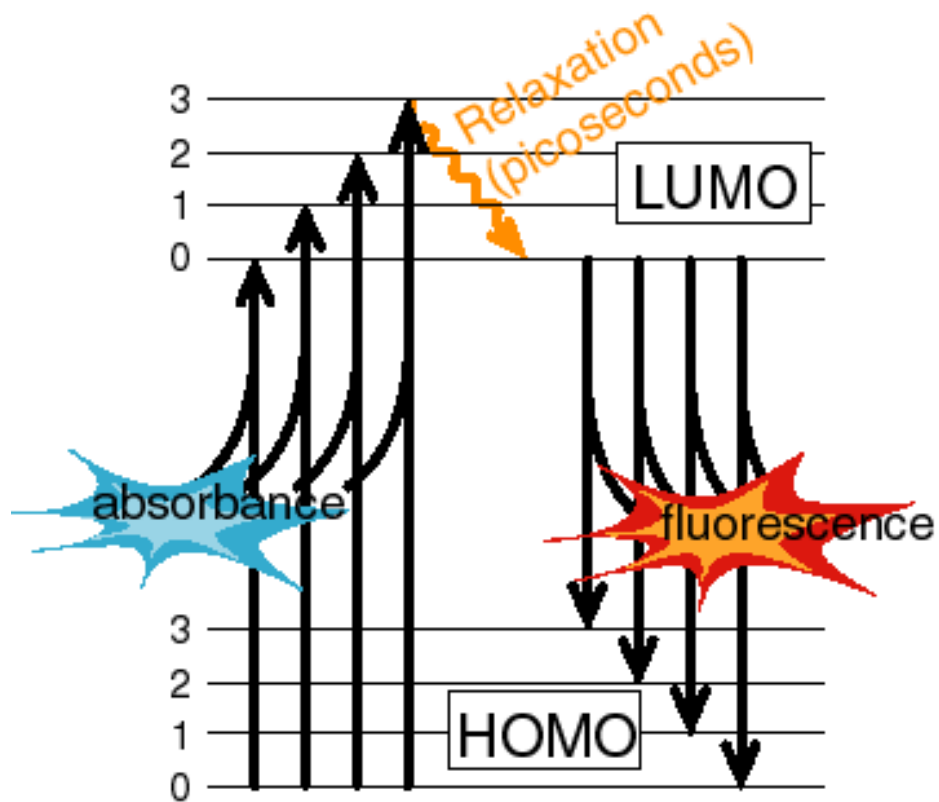
均为第一激发单重态的**最低**振动能级再跃迁回到基态，产生**波长一定**的荧光。



葱-乙醇溶液的激发光谱以及不同激发波长下的荧光发射光谱

# 光谱

## 3. 激发光谱与发射光谱大致成镜像对称。



# 荧光特征参数

**荧光寿命**：除去激发光源后，荧光强度降低到最大荧光强度的  $1/e$  ( $\sim 37\%$ ) 所需的时间。

利用分子荧光寿命的差别，可以进行荧光物质混合物的分析。

**荧光量子产率**：发荧光的分子数目与基态分子吸收激发光的光子数的比值即

$$\text{荧光效率 } \varphi_f = \frac{\text{发射荧光的光子数}}{\text{吸收激发光的光子数}}$$

测量：利用已知量子产率物质对比计算

奎宁：0.1M硫酸中量子产率：0.55

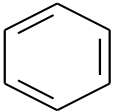
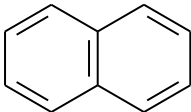
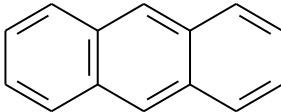
## 荧光特征参数

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)

# 荧光与分子结构的关系

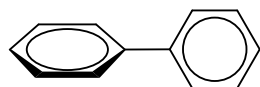
## 1. 大共轭结构

$\pi^* \rightarrow \pi$  摩尔吸收系数大、量子产率高

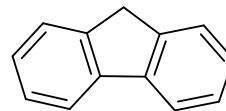
			
激发光	205nm	286nm	356nm
荧光	278nm	321nm	404nm
荧光效率	0.11	0.29	0.36

# 荧光与分子结构的关系

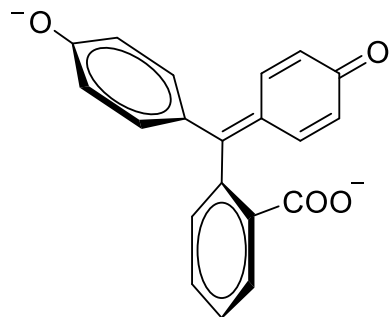
## 2. 刚性共平面结构



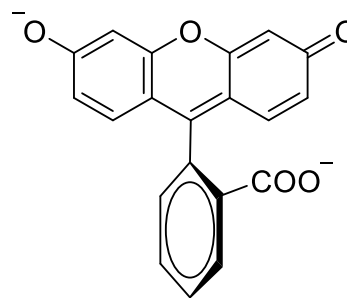
联苯  $\phi = 0.2$



芴  $\phi = 1$



酚酞  
不产生荧光



荧光黄  
 $\phi = 0.92$



# 荧光与分子结构的关系

## 3. 取代基

**给电子**：增加共轭程度 -  $\text{NH}_2$ 、-  $\text{OH}$ 、-  $\text{OCH}_3$

荧光效率**提高**，**红移**

**吸电子**：减弱共轭程度 -  $\text{COOH}$ 、-  $\text{Cl}$  荧光效率**减弱**

对共轭作用小，-  $\text{R}$ ，对荧光影响不明显

**重原子效应**：卤素等重原子增强系间跨越，降低荧光效率，增强磷光。

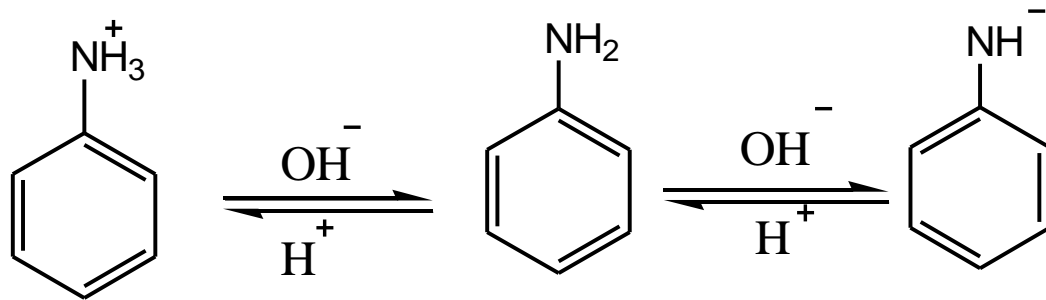
化合物	苯	苯酚	苯胺	苯甲腈	苯甲醚
$\lambda$ (nm)	278-310	285-365	310-405	280-390	285-345
相对荧光强度	10	18	20	20	20

# 影响荧光发射的环境因素

---

- 1. 溶剂：**溶剂极性增强，稳定激发态，荧光**红移**；  
溶剂粘度降低，增加分子碰撞，荧光强度**减弱**；

- 2. 酸度：**不同pH下，分子或离子电子构型不同



pH < 2 无荧光      7-12 蓝色荧光      > 13 无荧光

表明产生荧光的是苯胺分子

---

# 影响荧光发射的环境因素

## 3. 温度：荧光强度一般随温度降低而提高

温度升高，介质流动性增大，黏度降低

温度升高，内能量转化增加

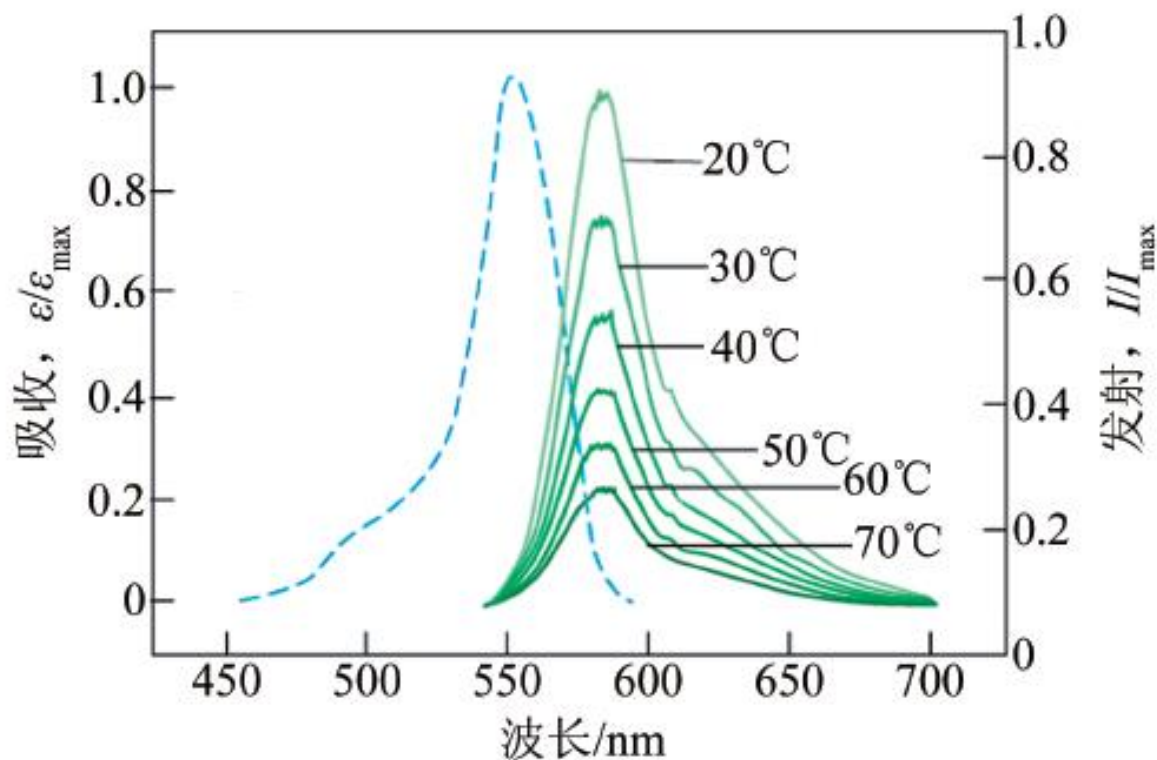


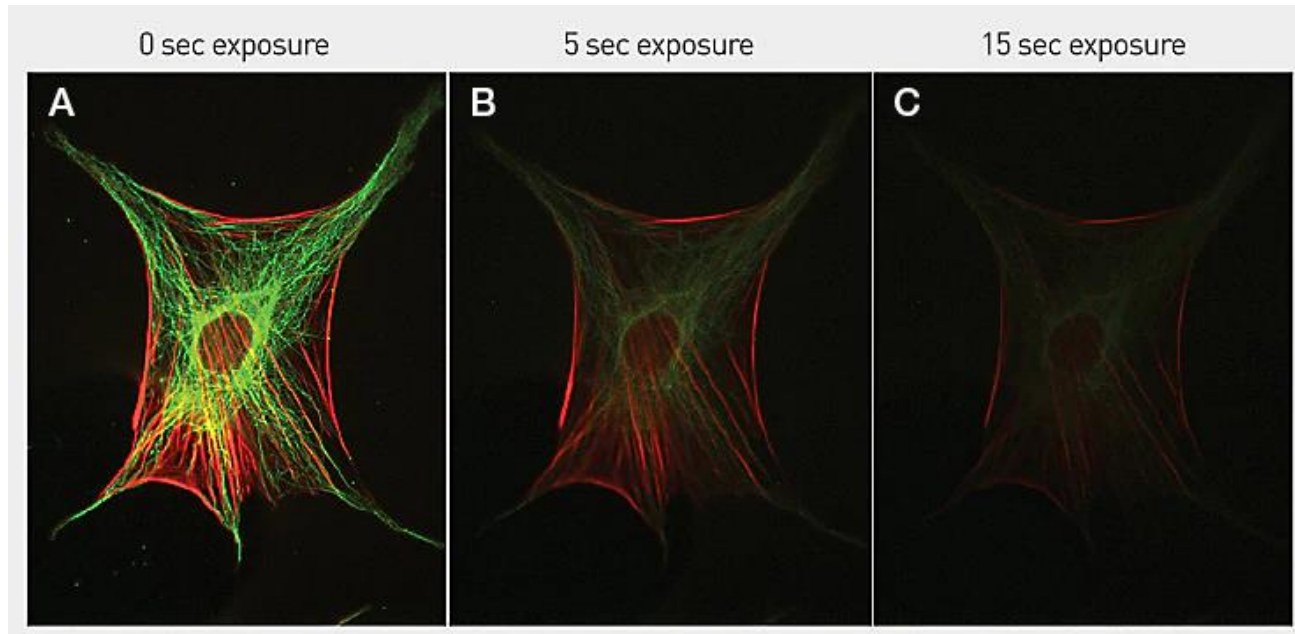
图 4 不同温度条件下罗丹明 B 的激发-发射光谱<sup>[3]</sup>

# 影响荧光发射的环境因素

---

## 4. 荧光漂白 (Photobleaching)

激发光使荧光分子慢慢分解而失去荧光的过程。



- 避免强光长时间照射
- 利用荧光漂白恢复技术进行生物学研究

# 影响荧光发射的环境因素

---

## 5. 荧光猝灭

**1) 静态猝灭：**猝灭剂与荧光物质基态分子作用。

**2) 动态猝灭：**猝灭剂与荧光物质激发态分子作用

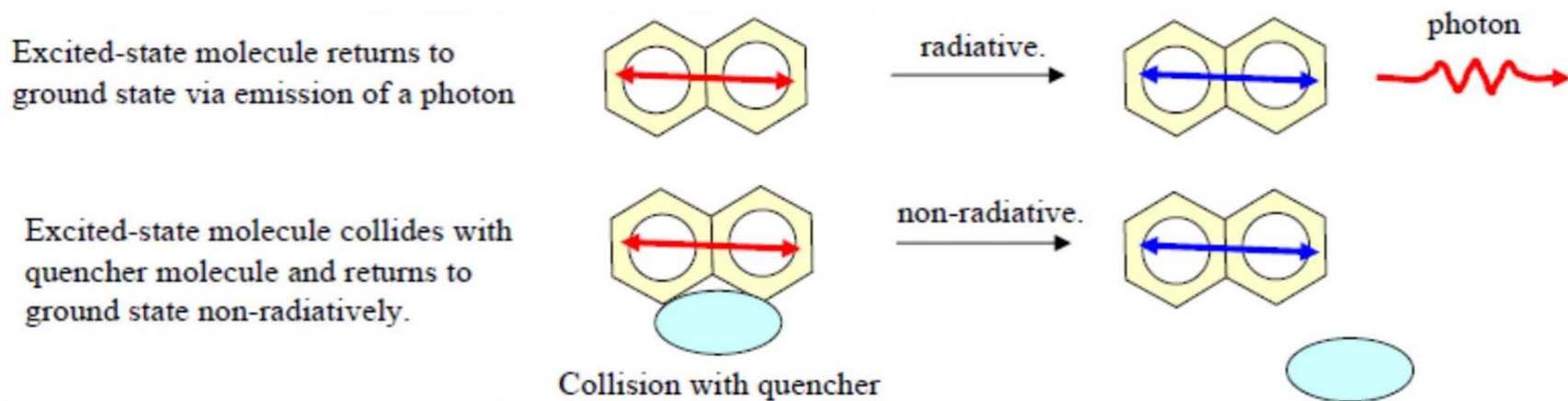
定量分析：荧光强度的减弱  $\propto$  荧光猝灭剂

**3) 荧光能量转移**

# 影响荧光发射的环境因素

## 1) 动态猝灭

动态猝灭（或碰撞猝灭）指激发态荧光分子与环境分子动态接触而使荧光分子由激发态通过非辐射跃迁回到基态的现象。常见猝灭剂包括 $O_2$ 、 $I^-$ 、 $Cs^+$ 、丙烯酰胺。



# 影响荧光发射的环境因素

---

## 2) 静态猝灭

静态猝灭（或基态复合物猝灭）指基态态荧光分子与环境分子结合形成稳定的、无荧光的复合物的现象。

Static quenching:



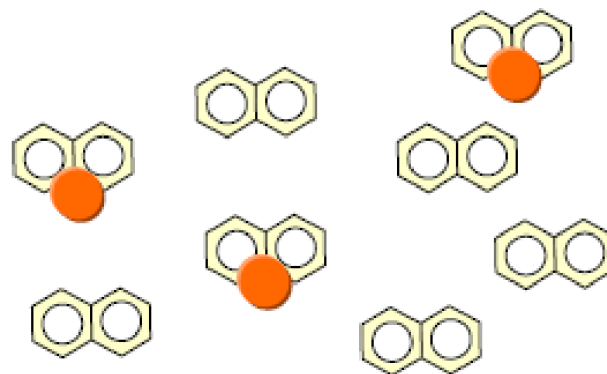
Ground-state fluorophore  
(fluorescent)



nonfluorescent quencher



Quencher-fluorophore ground-state  
complex (non-fluorescent)



# 影响荧光发射的环境因素

---

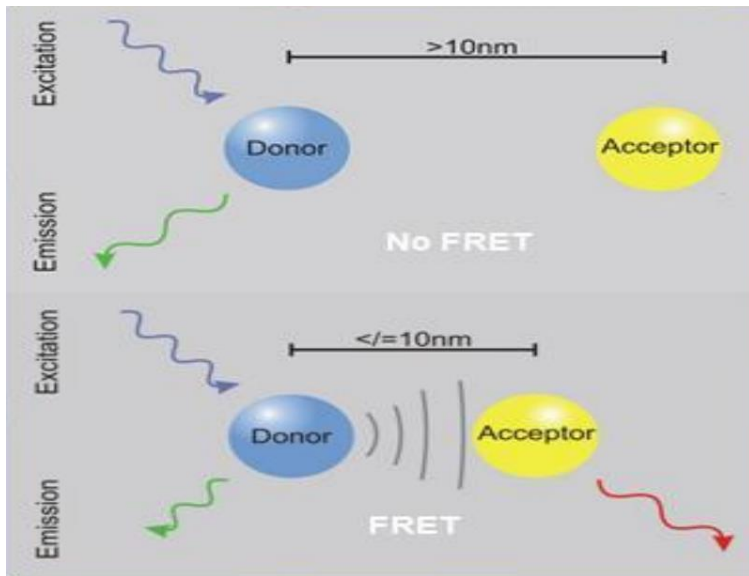
- 动态猝灭与扩散有关, **升高温度**增大动态猝灭的程度, 减小静态猝灭的程度。
- **动态猝灭**只影响分子的激发态, **不改变**其吸收光谱。 **基态**配合物的生成会引起荧光物质吸收光谱的**改变**。



# 影响荧光发射的环境因素

## 3) 荧光共振能量转移

所谓荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是指当一个荧光分子(又称为供体分子)的荧光光谱与另一个荧光分子(又称为受体分子)的激发光谱相重叠时, 供体荧光分子的激发能诱发受体分子发出荧光, 同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减的现象。



用途：应用能量转移测量分子内和分子间的距离

# 影响荧光发射的环境因素

---

**6. 散射光：** 方向改变，波长不变 - - - 瑞利散射  
                  方向改变，波长改变 - - - 拉曼散射

} 干扰荧光

选择适当溶剂、适当的波长

---

# 荧光定量分析方法

---

荧光强度与该溶液中荧光物质的浓度成**正比**  
与激发光强度成正比

$$F = I_a \phi = 2.3k I_0 \varepsilon bc = K \cdot c$$

$\varepsilon bc \leq 0.05$ ,  $F$  与  $c$  呈线性关系

比紫外-可见分光光度法**灵敏度高、适用性窄**

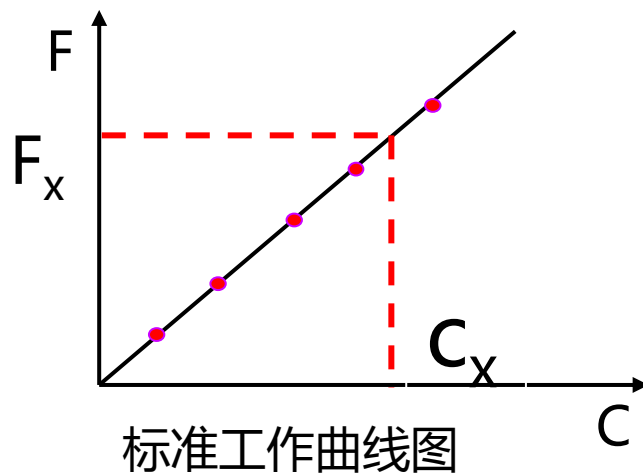
---

# 荧光定量分析方法

---

## 定量测定:

标准曲线法



## 对照品比较法:

$$\frac{F_s - F_0}{F_x - F_0} = \frac{C_s}{C_x}$$

# 荧光定量分析方法

---

## 偏离线性关系的影响:

**内滤效应:** 浓度过高时,溶液中杂质对入射光的吸收作用增大, 相当于降低激发光的强度。

**自吸收:** 当发射光谱和吸收光谱部分重叠时, 发射的荧光部分被再吸收。

---

# 学习重点

- 各类能量传递的过程
  - 荧光和磷光的区别
  - 荧光光谱特征
  - 荧光与分子结构的关系
  - 影响荧光发射的环境因素
-