

# 荧光物质的荧光特性及其定量分析

## 一. 实验目的

1. 测量荧光物质的激发光谱和荧光光谱；
2. 掌握荧光物质的定量测定方法；
3. 熟悉 F-2500（日立）荧光光谱仪结构及操作。

## 二. 实验原理

### （一）荧光的产生过程

荧光是发射光。物质分子或原子在一定条件下吸收辐射能而被激发到较高电子能态后，在返回基态的过程中将以不同的方式释放能量。如在分子吸收分光光度法中，受激分子以热能的形式释放多余的能量，测量的是物质对辐射的吸收，属吸收光谱法；而发光分析是受激分子或原子以发射辐射的形式释放能量，测量的是物质分子或原子自身发射辐射的强度，属发射光谱法。

**激发光谱曲线：**固定测量波长（选最大发射波长），化合物发射的荧光强度与激发光波长的关系曲线。

**荧光（发射）光谱曲线：**固定激发光波长（选最大激发波长），化合物发射的荧光强度与发射光波长关系曲线。

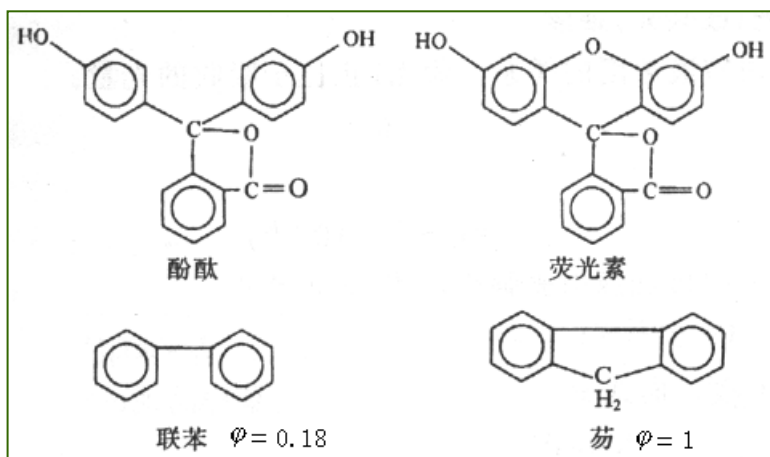
电子跃迁到不同激发态能级，吸收不同波长的能量，产生不同吸收带，但均回到第一激发单重态的最低振动能级再跃迁回到基态，产生波长一定的荧光，所以**发射光谱的形状与激发波长无关**。

### （二）荧光的产生与分子结构的关系

1. 跃迁类型： $\pi^* \rightarrow \pi$ 的荧光效率高，系间跨越过程的速率常数小，有利于荧光的产生；
2. 共轭效应：提高共轭度有利于增加荧光效率并产生红移；

3. 刚性平面结构：可降低分子振动，减少与溶剂的相互作用，故具有很强的荧光。如荧光素和酚酞有相似结构，荧光素有很强的荧光，酚酞却没有；

4. 取代基效应：芳环上有供电基，使荧光增强。



### (三) 荧光分析

荧光分析可应用于物质的定性及定量，由于物质结构不同，所吸收的紫外—可见光波长不同，所发射荧光波长也不同，利用这个性质可鉴别物质。在一定频率和一定强度的激发光照射下，荧光物质（稀溶液体系）所产生的荧光强度与浓度呈线性关系，可进行定量分析。

### (四) 荧光光谱仪

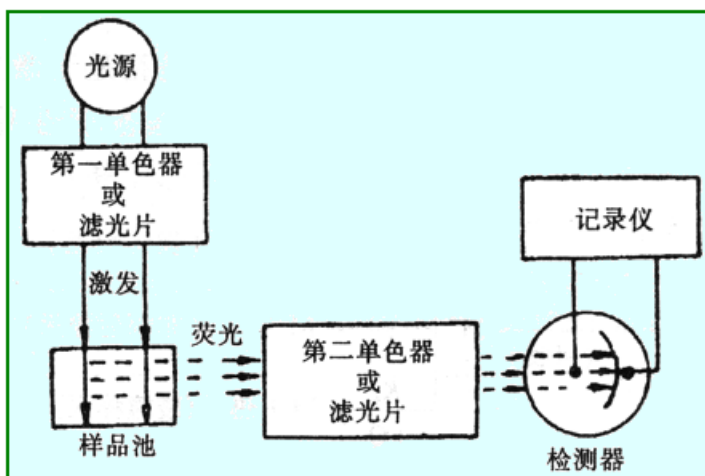
荧光光谱仪主要由四个部分组成：激发光源、样品池、双单色器系统、检测器。

特殊点：有两个单色器，光源与检测器通常成直角。

## 三. 仪器和试剂

仪器：F-2500型荧光光谱仪（日立）。50 mL容量瓶10个。

试剂：罗丹明B储备液 5  $\mu$ g/mL；荧光素储备液 5  $\mu$ g/mL，罗丹明B未知溶液，荧光素未知溶液。



荧光分析仪基本部件示意图

## 四. 实验内容

1. 标准溶液的配制：按要求分别配置罗丹明 B 和荧光素的系列标准溶液各 4 个。

2. 选取其中一个溶液，分别测绘罗丹明 B 和荧光素的激发光谱和荧光光谱，并找到它们各自的最佳激发波长 $\lambda_{Ex}$ 和最强发射波长 $\lambda_{Em}$ 。
3. 分别以罗丹明 B 和荧光素的最大激发波长 $\lambda_{Ex}$ 和发射波长 $\lambda_{Em}$ ，测定标准溶液的荧光强度，在相同条件下测定未知样品的荧光强度。

## 五. 结果处理

1. 从测量的激发光谱曲线和发射光谱曲线确定罗丹明 B 和荧光素的最佳激发波长 $\lambda_{Ex}$ 和最强发射波长 $\lambda_{Em}$ 。
2. 分别绘制罗丹明 B 和荧光素的标准曲线，从标准曲线上确定试样溶液浓度。

## 六. 思考题

1. 在测量荧光光谱曲线时如何区分荧光发射峰和激发光散射峰？
2. 为什么荧光光谱仪要配备 2 个单色器？为什么光源与检测器通常成直角？
3. 在发射波长相同但激发波长不同的情况下，测量得到的标准曲线斜率为什么相差很大？

附：罗丹明 B 分子结构

