

第6章 分子荧光分析法

分子荧光分析法是一种建立于物质与光子作用过程中所表现出的发光性质基础上的仪器分析方法。

荧光分析法具有信号参数丰富、灵敏度高（比分光光度法一般高 $10^3 \sim 10^4$ 倍）、线性范围宽、方法简便快速、选择性较好等诸多优点。随着激光、计算机和电子学新技术的引入，各式各样的新型荧光分析仪不断问世，荧光分析法发展迅速，应用范围日益拓宽，尤其是在生物样品分析及生命信息探索领域展现出广阔的应用前景。

第一节 基本原理

6.1.1 分子荧光的产生

当具有一定能量的光子作用于物质时，物质可能部分或全部地吸收入射光的能量。在物质吸收入射光的过程中，光子的能量传递给物质分子，导致分子中的电子从能量较低的能级跃迁至能量较高的能级。所吸收的光子能量，等于跃迁所涉及的两个能级间的能量差（式 4.1）。这种吸收了光子能量、电子处于较高能级的分子，称为电子激发态分子。处于激发态的分子是不稳定的，它可能通过辐射跃迁或非辐射跃迁等分子内或分子间的去活化过程，丧失多余的能量而返回基态。

辐射跃迁去活化过程，发生光子的发射，产生荧光或磷光现象；而对于分子内非辐射跃迁的去活化过程，其结果是电子激发能转化为振动能或转动能。分子间非辐射跃迁的去活化过程是指激发态分子与溶剂分子或溶质分子间所发生的导致激发态分子数变少的物理或化学作用过程：如激发态分子与激发态分子或基态分子之间的碰撞，导致激发态分子去活化；又如激发态分子发生化学反应等。

假设分子在吸收辐射后被激发到第二电子激发单重态以上的某个电子激发单重态的不同振动能级上，一般情况下处于较高振动能级上的分子会很快地发生振动松弛，将多余的振动能传递给介质而降落到该电子激发态的最低振动能级，此后又经由内转换及振动松弛而降落到第一电子激发单重态的最低振动能级。处于该激发态的分子若以辐射形式去活化跃迁至电子基态的任一振动能级，便产生了荧光。

6.1.2 分子荧光光谱与物质的结构

任何荧光化合物，都具有两种特征的荧光光谱：激发光谱与发射光谱。固定测量的发射光波长，扫描激发单色器，以不同波长的入射光激发荧光体，所测得的荧光强度与激发

波长的关系曲线，即为荧光激发光谱。固定激发光波长，以同一能量的光子激发荧光体，扫描发射单色器，检测各种波长下相应的荧光强度，所测得的荧光强度与发射波长的关系曲线，即为荧光发射光谱，又称荧光光谱。

荧光物质的光谱特性与物质的结构及其所处环境有着密切的关系。

荧光体的荧光是产生于荧光体吸光之后，因此荧光体都有吸光的结构基元。影响荧光体吸光性质的因素，也影响着荧光体的荧光特性。发荧光的有机物，其分子一般都含有共轭双键体系，大部分荧光物质都具有芳环或杂环。一般来说，发色团共轭程度愈大，其荧光峰愈移向长波方向，且荧光发光效率往往也较高。发光效率高的荧光体，其分子多为平面构型，且具有一定的刚性。取代基的性质对荧光体的荧光特性和强度均有强烈的影响：芳烃和杂环化合物的荧光光谱和荧光量子产率常随取代基而变。最低电子激发态的性质（ $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁态或 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁态）也对荧光量子产率有显著的影响：最低电子激发单重态为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁者，属于非禁阻跃迁，摩尔吸光系数较大，荧光发光效率也高。此外，环境因素对分子荧光也可能产生强烈的影响，诸如环境温度、溶剂性质、介质的 pH 值和粘度等等，对荧光光谱和荧光强度都有不同程度的影响。但是，在实验条件恒定时，分子的荧光光谱特性决定于物质的结构，研究分子荧光光谱可以得到分子的结构信息。

6.1.3 荧光强度与浓度的关系

根据光吸收定律，吸收的光强度为：

$$I_0 - I = I_0 (1 - e^{-\varepsilon b C}) \quad (6.1)$$

总的荧光强度正比于吸收的光强度与发光的量子产率 φ ：

$$F = \varphi I_0 (1 - e^{-2.303 \varepsilon b C}) \quad (6.2)$$

对于稀溶液，吸收的光强度一般不会超过总激发光强度的 5%， $2.303 \varepsilon b C$ 项小于 0.05，可以略去 $(1 - e^{-2.303 \varepsilon b C})$ 展开项中的高次项， $1 - e^{-2.303 \varepsilon b C} \approx 2.303 \varepsilon b C$ ，则荧光强度为：

$$F = 2.303 \varepsilon b \varphi I_0 C = k \varphi I_0 C \quad (6.3)$$

式中， k 为常数，等于 $2.303 \varepsilon b C$ ； φ 为荧光体的量子产率，即发射光量子与吸收光量子之比； I_0 为激发光强度， C 为被测物质的浓度。当测试条件确定，对特定的荧光体，有：

$$F = K C \quad (6.4)$$

式中， K 为常数，即在一定的实验条件下，发光体的浓度与荧光强度成正比。此式为荧光分析法进行定量分析的依据。

第二节 荧光分光光度计

荧光分光光度计主要由光源、激发单色器、样品池、发射单色器、检测系统及信号显

示系统六个部分组成，仪器的结构框图见图 5.1。光源用来激发试样；激发单色器将光源发出的复合光色散成单色光组成的光谱带，并分离出所需的单色激发光；发射单色器则是用来将试样发出的多波长光色散成光谱带，并滤出所需检测的单色光。

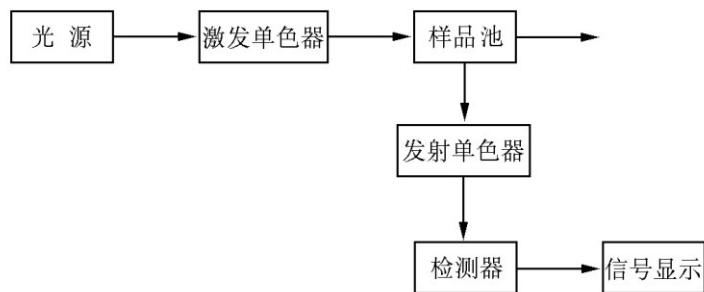


图 6.1 荧光分光光度计基本构造框图

常用的荧光分光光度计有手控自动扫描式荧光分光光度计（如国产 YF-2 型、Hitachi 650-10S 型等）和微机化荧光分光光度计（如国产 960 型、岛津 RF-5000 型、日立 F-4500 型等）。前一类可通过手控方便地调节扫描波长、测量灵敏度、狭缝宽度等实验参数，以获得理想的荧光光谱。后一类则视微机功能的强弱，或通过键盘指令、或启动随机软件、或自编程序自动进行扫描，输出谱图或进行各种方式的数据处理等。

下面介绍日立 F-4500 型荧光分光光度计。日立 F-4500 型荧光分光光度计的激发波长扫描范围一般是 200 nm ~ 900 nm，发射波长扫描范围是 200 nm ~ 900 nm，可用于液体、固体样品的光谱扫描。该仪器采用的分析方法一般包括波长扫描、时间扫描、光度值法、同步扫描和三维扫描。

6.2.1 F-4500 型荧光分光光度计简要操作规程

一、开机

- (1) 开启主机正面面板左下侧的总电源开关。
- (2) 按“START”键触发点燃氘灯，黄色指示灯亮表示氘灯已点燃。
- (3) 开启主机系统（MAIN）电源开关。
- (4) 依次开启显示器、计算机、打印机电源开关。

二、运行 F-4500 软件

计算机进入 Windows95 视窗后，双击桌面上 F-4500 的 **F1_mnu** 快捷图标启动 **F1_mnu** 应用程序，主机开始初始化 **Initialize**。初始化结束后，屏幕显示功能选择 **Menu Select** 界面。

三、波长扫描测定功能的使用

1. 从功能选择 **Menu Select** 界面中选取波长扫描 **Wavelength Scan**，点击运行 **Run**，进

入波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口。

2. 选取窗口主菜单中参数 **Parameter** 选项，在其下拉菜单中点击仪器参数 **Instrument Parameters**，进入仪器参数对话框。仪器参数选项包括：

- (1) 选择激发/发射狭缝 **EX/EM Slit** (根据样品性质进行设定)
- (2) 选择光电倍增管负高压 **PMT Voltage** (一般选 700V)
- (3) 选择仪器响应 **Response** (一般选 Auto)
- (4) 选择光闸控制 **Shutter Control** (一般选√, 以使仪器在光谱扫描时光闸自动开启)

点击 **OK** 确认设置的参数，回到波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口。

3. 选取窗口主菜单中参数 **Parameter** 选项，在其下拉菜单中点击扫描参数 **Scan Parameters**，进入扫描参数对话框。扫描参数选项包括：

- (1) 选择扫描模式 **Scan Mode** (有激发光谱 **Excitation**、发射光谱 **Emission** 和同步光谱 **Synchronous**: 三种模式，同步光谱的横坐标为激发波长。)
- (2) 选择数据模式 **Data Mode** (有荧光测量 **Fluorescence**、磷光测量 **Phosphorescence** 和化学发光 **Luminescence** 测量三种模式。)
- (3) 选择扫描速度 **Scan Speed** (通常选 240 nm/min)
- (4) 设定波长范围：扫描荧光激发光谱时，需设定激发光的起始/终止波长 **EX Start/End WL** 和一固定的荧光发射波长 **EM WL**；扫描荧光发射光谱时，需设定发射光的起始/终止波长 **EM Start/End WL** 和一固定的荧光激发波长 **EX WL**；扫描同步光谱时，需设定激发光的起始/终止波长 **EX Start/End WL** 和发射光起始波长 **EM Start WL**，($EM Start WL = EX Start WL + \Delta\lambda$)。激发光波长扫描范围不小于 10 nm。
- (5) 设定纵坐标荧光强度测量范围 **Ordinate Maximum/Minimum** (最大值与最小值之差不小于 0.01)；或将盛有样品溶液的样品持装入样品室，点击预扫描 **Pre-Scan** (在所设定条件下以 3000 nm/min 快速扫描) 自动设定纵坐标最佳范围。

点击 **OK** 回到波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口。

4. 选取窗口主菜单的扫描 **Scan** 选项，在其下拉菜单中点击开始扫描 **Start Scan** (或直接按快捷键 **F5**)，窗口在线出现扫描的谱图。欲中断扫描可直接按快捷键 **F6**。

5. 选取窗口主菜单中数据处理 **Data Processing** 选项，在其下拉菜单中点击 **Cursor** 对话框，谱图上出现一光标，用鼠标左键点击，使光标移至所需波长附近，以←或→键微调光标至所需波长，从显示屏上读出波长及各条荧光光谱相应的荧光强度值；点击右键退出 **Cursor**。

5. 其它相关功能:

- (1) 存储所扫描的谱图: 先在 D 盘的 USER 文件夹内新建个人文件夹; 在波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口的[UTILITY]下拉菜单中点击[DEFINING PATH], 填写 d:\user\个人文件夹名, 点击[OK]; 在波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口的[UTILITY]下拉菜单中点击[DEFINING FILE], 命名实验名称, 设定扫描谱图的起始号码, 点击[OK], 再进行谱图的扫描。
- (2) 从当前显示的谱图中选择性清除某些谱图: 在波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口的 [DATA PROCESSING] 的下拉菜单中点击[CLEAR SPECTRUM] (或直接按快捷键 **F10**), 单击所欲清除谱图的对应编号 (√), 再单击[RUN]即可。
- (3) 选择性显示谱图: 在波长扫描 **Wavelength Scan** 窗口的[OUT PUT]项下的下拉菜单中点击[LOAD SPECTRUM(OVERLAY)], 单击所欲选择显示的谱图的对应编号 (√), 再单击[RUN]即可。

6. 取出样品池, 关闭 **Wavelength Scan** 窗口。

四、关机

先关闭 **Menu** 主菜单窗口, 退回 Windows 桌面, 依次关闭计算机、显示器、打印机电源开关, 主机系统开关 (MAIN), 最后关闭荧光计总电源开关。

五、注意事项:

1. 注意开关机的顺序;
2. 氙灯触发“Start”键按下片刻即可点燃氙灯, 若氙灯未亮, 按“Start”键不宜超过一秒;
3. 荧光分光光度计主机工作时, 不得再按“Start”键, 以免损坏主机;
4. 为延长仪器的使用寿命, 扫描速度、负高压、狭缝的设置一般不宜选在最高档。

6.2.2 固定荧光的测定方法简介

测试固体样品的荧光时需要对荧光光谱仪的样品槽进行改造，很多厂家生产的荧光光谱仪都配备了固体支架。大多数固体荧光支架是固定角度的，激发光和样品表面的夹角为45°；还有一种是可旋转的样品台（设有角度刻度线），可通过旋转样品台改变激发光和固体样品表面的夹角。测定固定样品荧光时需要注意以下环节：

一、 样品放置角度的调整

调节合适的光源入射角度是进行高质量固态荧光测量的基础。如果用的可旋转的样品台，可根据光谱图形状和强度选择最佳的角度，优化固体荧光测试条件。通常将样品放置在光路的交叉点，压片表面和入射光的角度不宜为45°，最好是30°或60°。

二、 上样

(1) 夹具（或载体）的选择：不少荧光光谱仪有不同类型的固体样品夹具，可根据样品的具体情况进行选择。如果试样为固体膜，可以将其直接放在固体支架上进行测试。有的荧光光谱仪使用石英玻片作为固体粉末样品的载体，如果粉末样品的量很少，可以滴加少量惰性且无光谱背景的有机溶剂使其固载于石英玻片上，再进行测试。

(2) 样品量的选择：固体样品的厚度越大，产生的散射就越严重。因此，在满足测试要求的条件下(若采用固体粉末盒或微量样品夹具装样，一般要求至少有10 μL的样品)，样品应尽量放少。如果测试的晶体样品，仅选择一个晶体进行测试即可。

三、 对光

根据激发光打在样品上的光斑大小，调整支架角度和高度，使落在样品上的光斑小而亮。

四、 滤光片的选择

在做固态荧光测量时常需放置滤光片，以消除光栅分光过程中产生的次级光的影响和屏蔽杂散光。测试时将滤光片放置在发射单色器端。扫描激发光谱时，选用的滤光片波长要小于发射波长，且越接近发射波长越好；扫描发射光谱时，选用的滤光片波长宜大于激发波长15~20 nm，并注意使图谱上尽量不出现滤光片的上升沿。

五、 荧光测试（光谱仪的操作规程同前）