

厦门大学



厦门大学精品课程  
仪器分析(含实验)

# 《仪器分析》课程

## 第十二章

分子发光—荧光、磷光

*Chapter Twelve*

分子荧光:*Fluorescence*

分子磷光:*Phosphorescence*

## § 12.1 分子发光的基本原理

- ❖ 第一次记录荧光现象的是16世纪西班牙的内科医生和植物学家 N.Monardes , 1575年他提到在含有一种称为“Lignum Nephriticum”的木头切片的水溶液中, 呈现了极为可爱的天蓝色。
- ❖ 直到1852年, Stokes在考察奎宁和叶绿素的荧光时, 用分光光度计观察到其荧光的波长比入射光的波长稍微长些, 才判断这种现象是这些物质在吸收光能后重新发射不同波长的光, 而不是由光的漫射作用所引起的, 从而导入了荧光是光发射的概念, 他还由发荧光的矿石“萤石”推演而提出“荧光”这一术语。
- ❖ 1867年, Goppelsroder进行了历史上首次的荧光分析工作, 应用铝—桑色素配合物的荧光进行铝的测定。
- ❖ 19世纪以前, 荧光的观察是靠肉眼进行的, 直到1928年, 才由 Jette和West提出了第一台荧光计。

# 一. 分子荧光与磷光的产生

1. 单重态与三重态
2. 分子的活化与去活化
3. 分子发光的类型

按激发的模式分类：**分子发光**

光致发光  
化学发光/生物发光  
热致发光  
场致发光  
摩擦发光

按分子激发态的类型分类：

**分子发光**

荧光 { 瞬时荧光  
迟滞荧光  
磷光

按光子能量分类：

**荧光**

斯托克斯荧光(Stokes):

$$\lambda_{\text{ex}} < \lambda_{\text{em}}$$

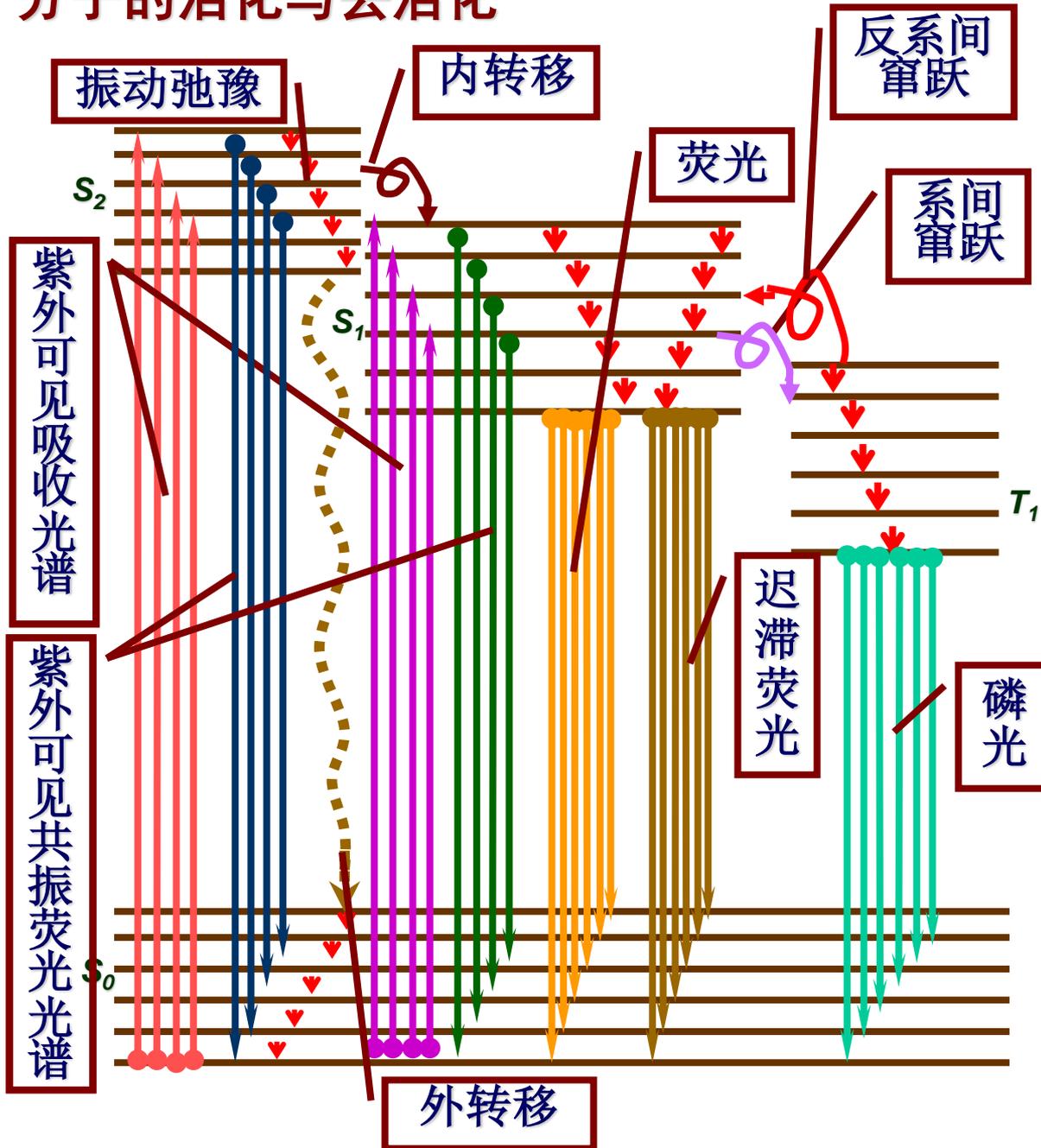
反斯托克斯荧光 (Antistokes):

$$\lambda_{\text{ex}} > \lambda_{\text{em}}$$

共振荧光(Resonance):

$$\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$$

# 分子的活化与去活化



## 1. 辐射跃迁的类型

共振荧光:  $10^{-12}$  sec  
 荧光:  $10^{-8}$  sec  
 磷光:  $1 \sim 10^{-4}$  sec  
 迟滞荧光:  $10^2 \sim 10^{-4}$  sec

## 2. 无辐射跃迁的类型

振动弛豫:  $10^{-12}$  sec  
 外转移: 无辐射跃迁  
 回到基态

内转移:  $S_2 \sim S_1$  能级  
 之间有重叠

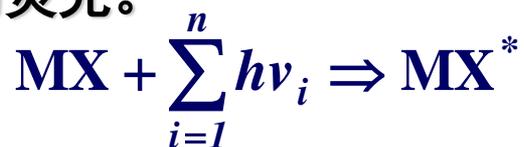
系间窜跃:  $S_2 \sim T_1$  能级  
 之间有重叠

反系间窜跃: 由外部获取能量后  
 $T_1 \sim S_2$

## 二. 分子荧光(磷光)光谱

### 1. 荧光(磷光)激发光谱与发射光谱

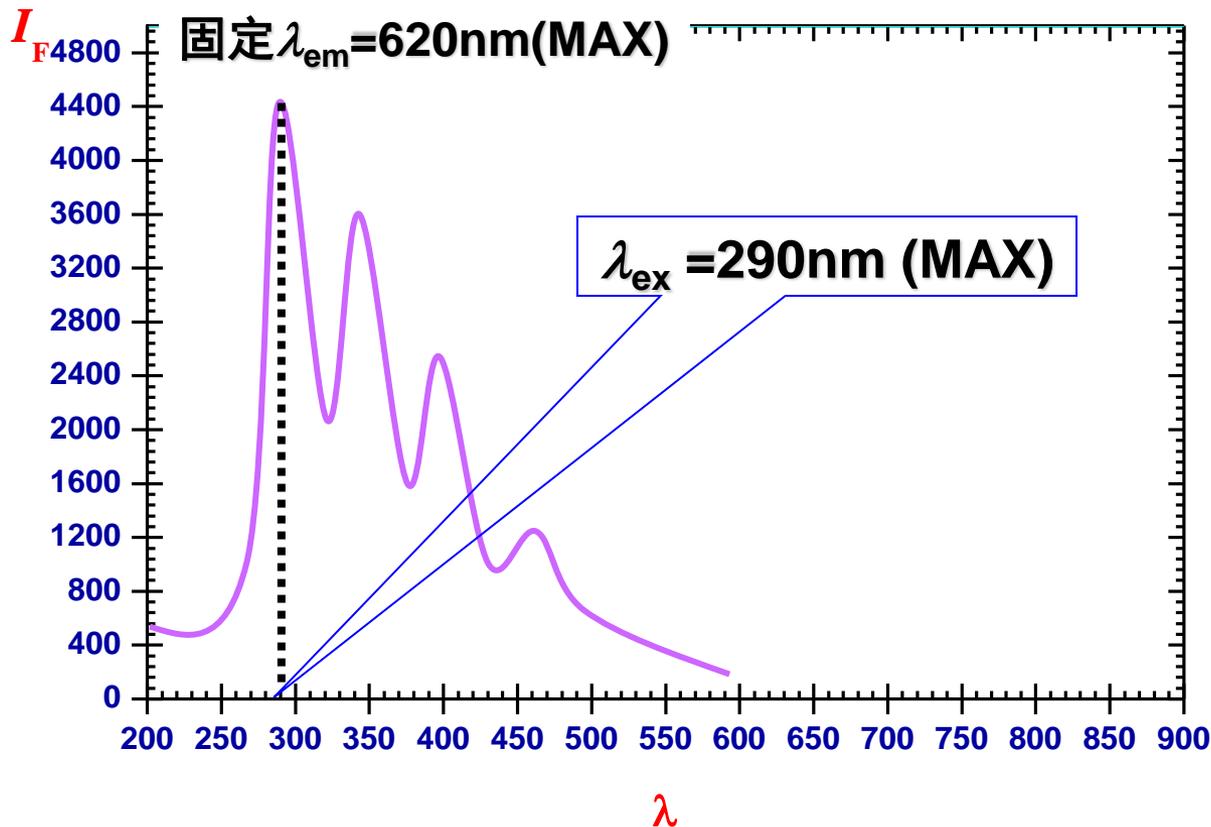
荧光(磷光)均为光致发光，在光辐射的作用下，荧光物质发射出不同波长的荧光。



#### A. 激发光谱

固定发射波长  
扫描激发波长

荧光激发光谱与  
紫外-可见吸收光  
谱类似



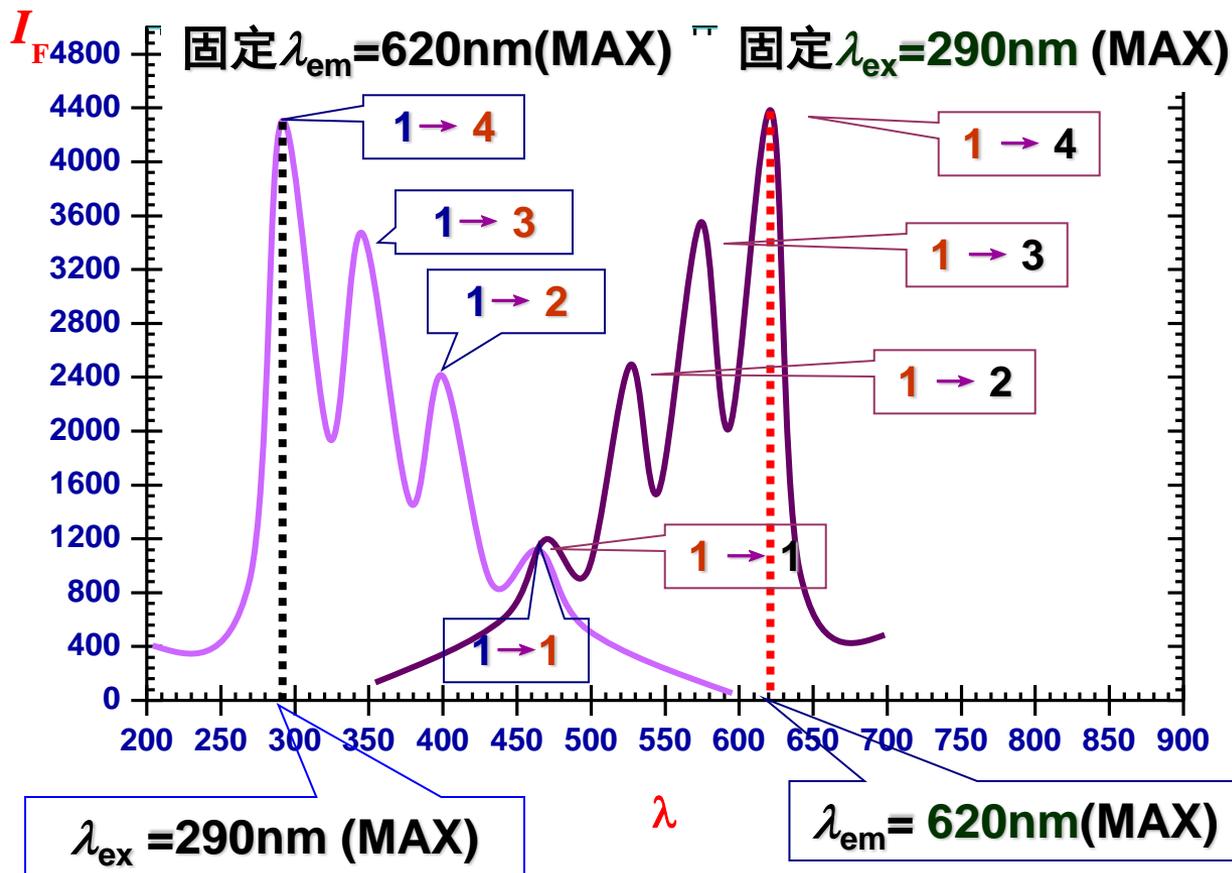
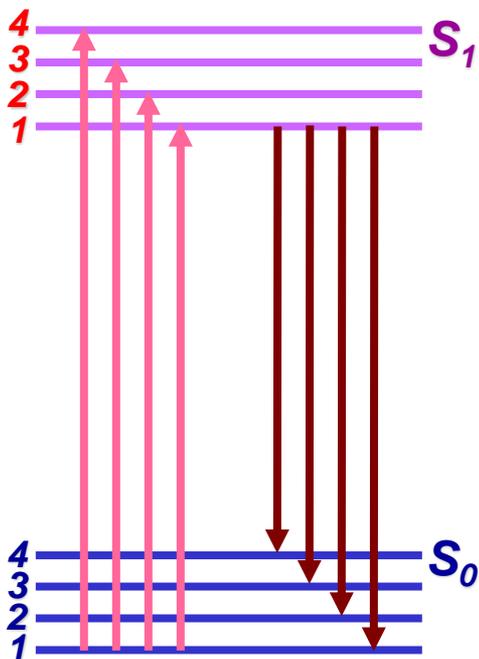
## B. 发射光谱(荧光光谱)

固定激发波长 扫描发射波长

发射光谱的形状与激发波长无关：

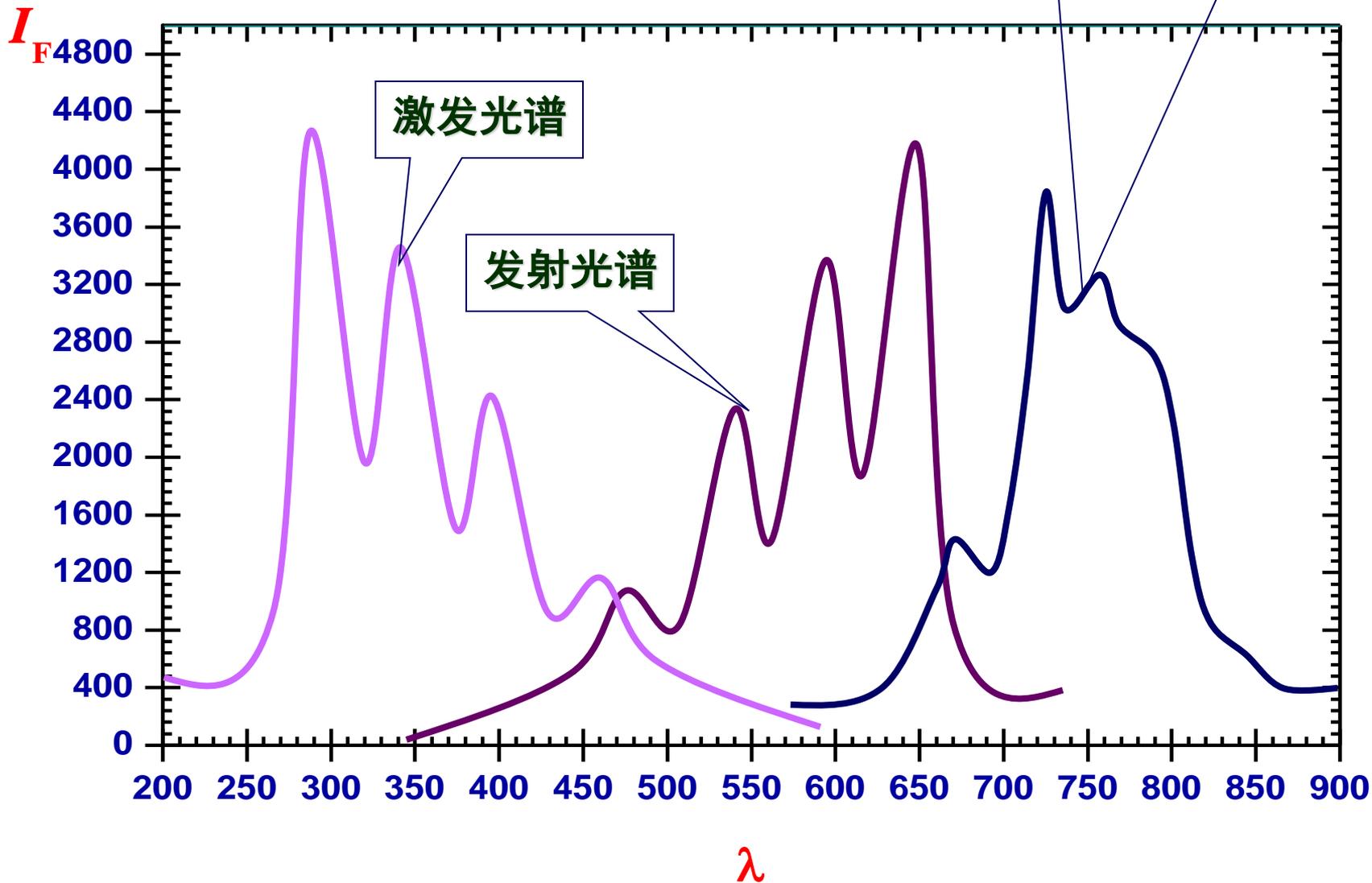
分子的激发光谱可能含有几个激发带，但发射光谱只含一个发射带；即使分子被激发到高于 $S_1$ 的电子态，由于经过极快的内转换和振动弛豫降到 $S_1$ 电子态的最低振动、转动能级，然后以辐射形式释放能量回到基态。

## C. 激发光谱与发射光谱的镜像关系



# D.磷光光谱

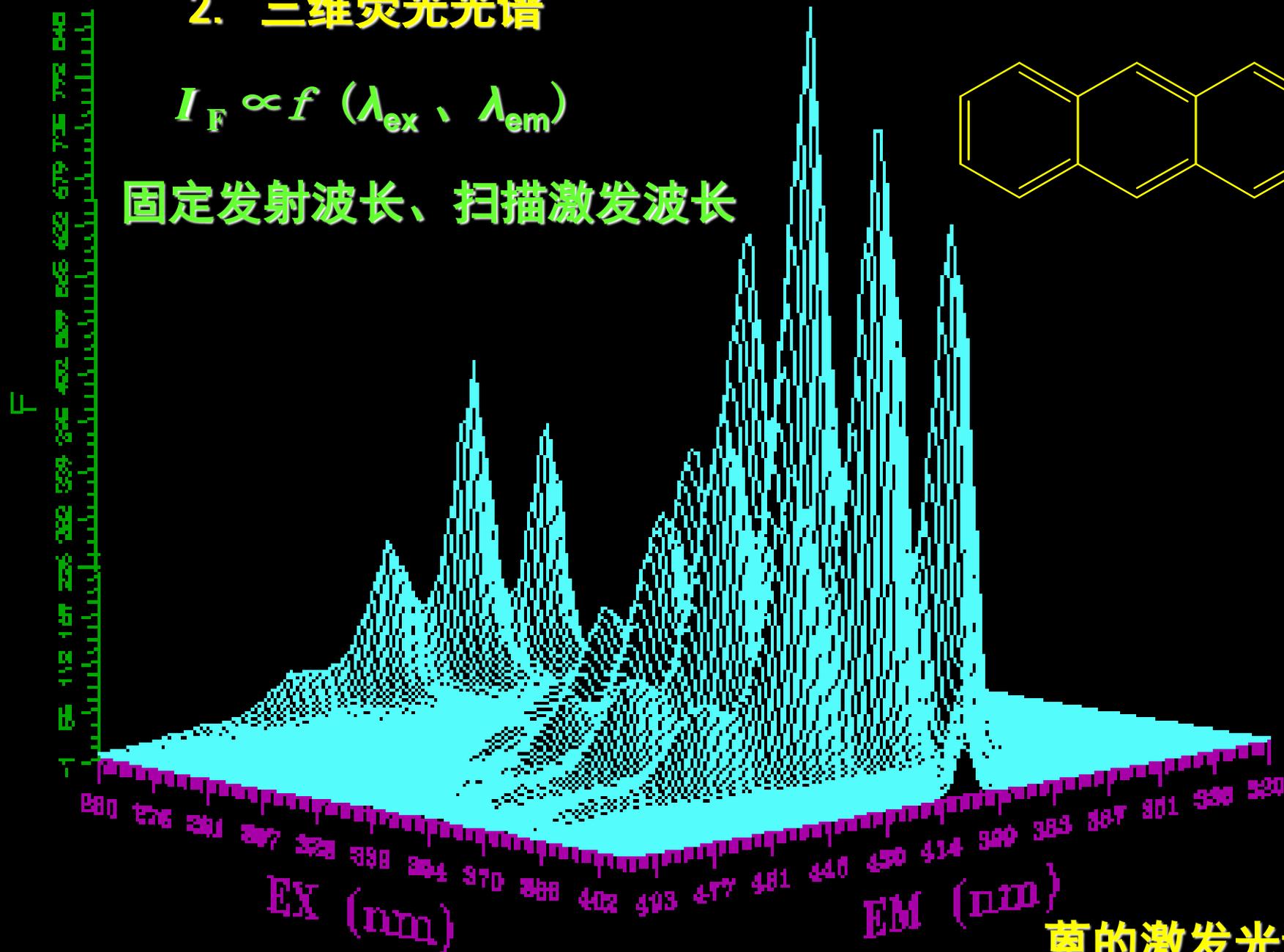
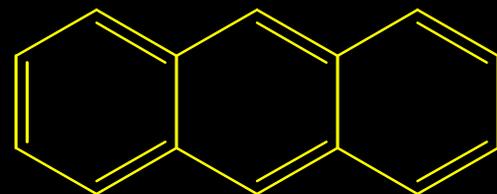
与发射光谱相同条件下的磷光光谱



## 2. 三维荧光光谱

$$I_F \propto f(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$$

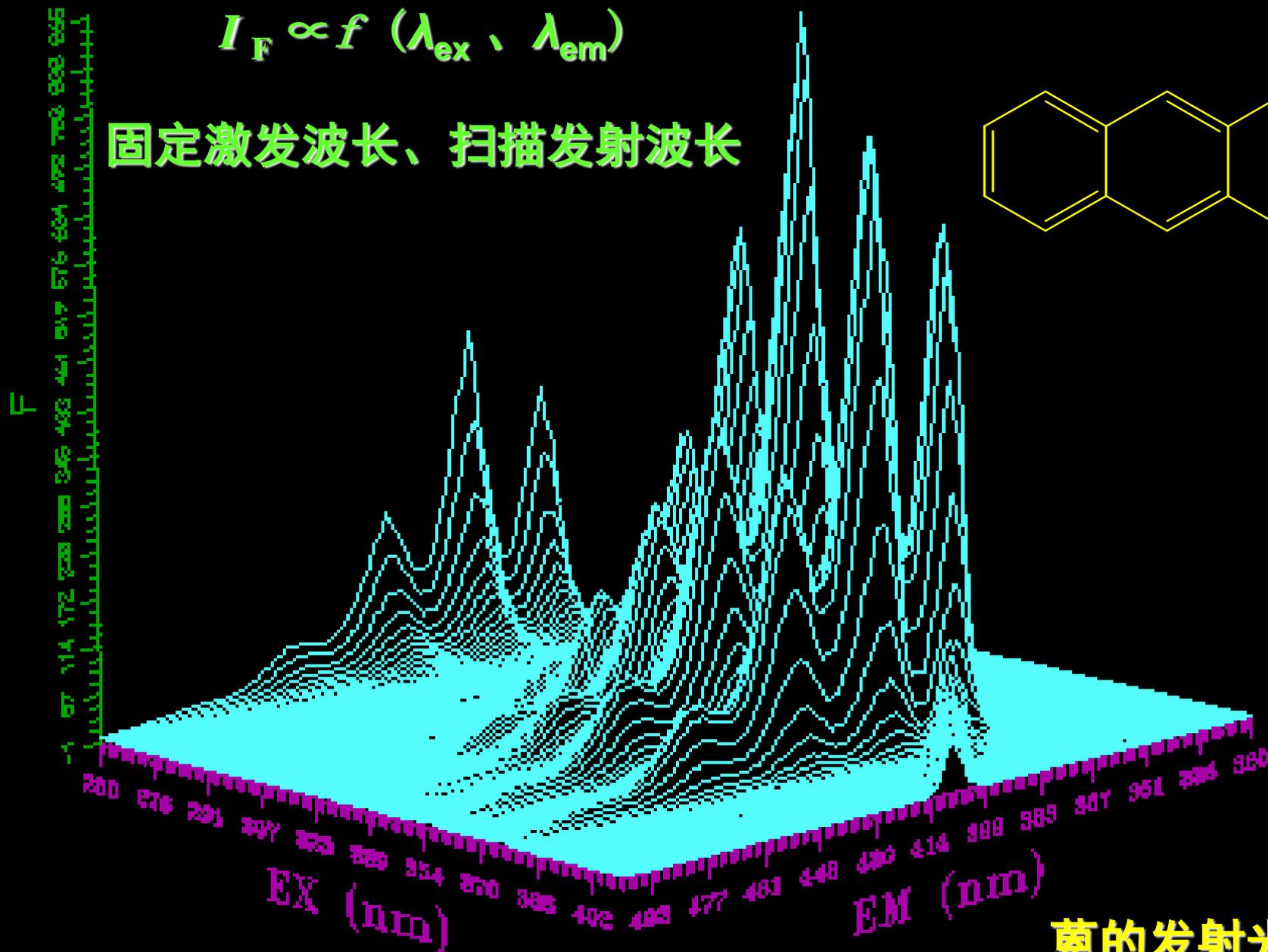
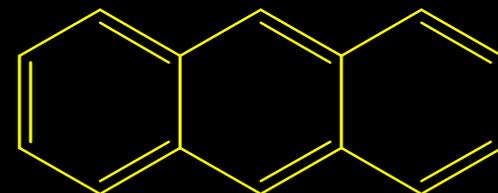
固定发射波长、扫描激发波长



蒽的激发光谱

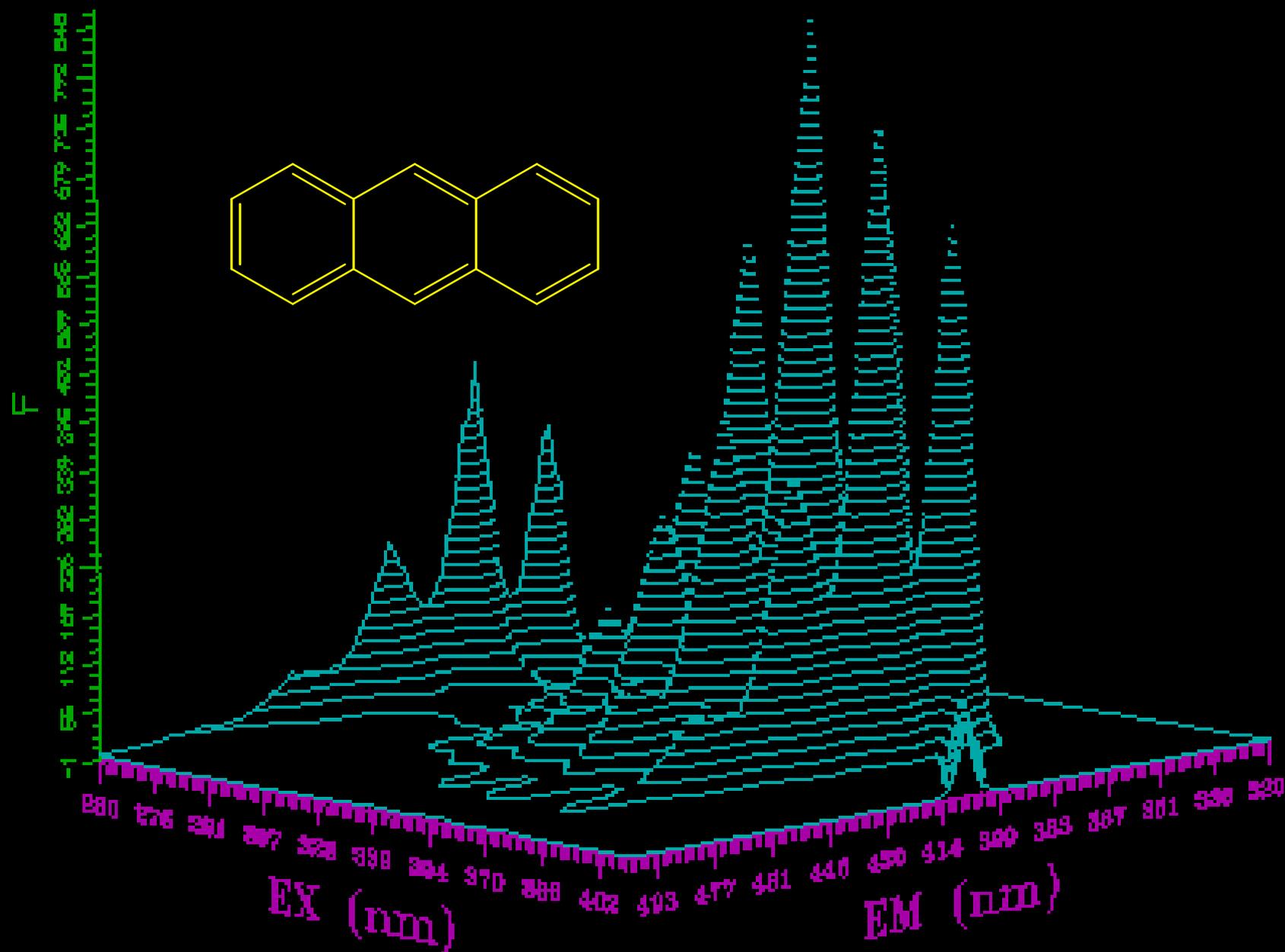
$$I_F \propto f(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$$

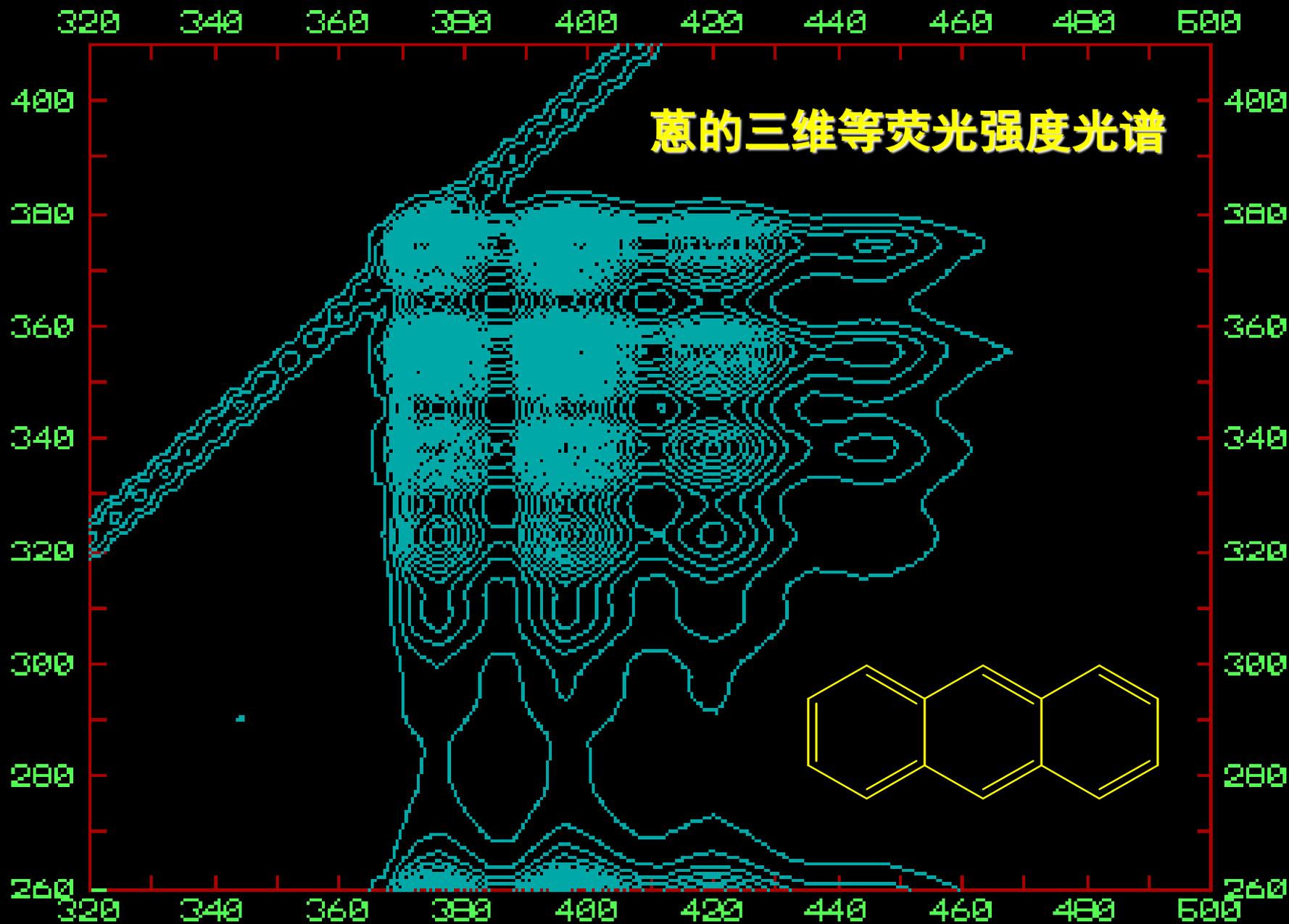
固定激发波长、扫描发射波长



蒽的发射光谱

# 蒽的三维等高线光谱图





### 三. 分子荧光(磷光)强度与荧光物质浓度的关系

#### 1. 荧光强度(磷光)与浓度的关系

光吸收定律 (*Lambert-Beer Law*)

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \epsilon b C, \quad T = e^{-2.303\epsilon b C}$$

相应的吸光分数为:

$$1 - \frac{I_t}{I_0} = 1 - T = 1 - e^{-2.303\epsilon b C}$$

$$I_0 - I_t = I_0 (1 - e^{-2.303\epsilon b C})$$

荧光强度 ( $I_F$ ) 与相应的吸光分数成正比:

$$I_F = \phi (I_0 - I_t) = \phi I_0 (1 - e^{-2.303\epsilon b C})$$

按照级数展开式:

$$e^x = 1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \frac{x^4}{4!} + \dots + \frac{x^n}{n!}$$

$$I_F = \phi I_0 \left( 2.30 \varepsilon b C - \frac{(-2.30 \varepsilon b C)^2}{2!} + \frac{(-2.30 \varepsilon b C)^3}{3!} - \frac{(-2.30 \varepsilon b C)^4}{4!} + \dots \right)$$

对于稀溶液，当  $\varepsilon b c < 0.05$ （磷光  $\varepsilon b c < 0.01$ ）时：

$$I_F = 2.30 k \phi_F I_0 \varepsilon b C$$

$$I_P = 2.30 k \phi_P I_0 \varepsilon b C$$

$I_F$ ----荧光强度

$\phi_F$ ----荧光量子产率

$b$ --吸收光程

$\varepsilon$ --摩尔吸光系数

$C$ --荧光物质浓度

$I_P$ ----磷光强度

$\phi_P$ ----磷光量子产率

$k$ --与仪器灵敏度有关的参数

$I_0$ --入射光强度。

$$I_F = K C$$

$$I_P = K C$$

## 2. 荧光(磷光)的平均寿命

分子在激发态的平均时间或者说处于激发态的分子数目衰减到原来的1/2所经历的时间。

对于处于 $S_1(T_1)$ 电子态的荧光体来说，其平均寿命( $\tau$ )可以左式表示：

$$\tau_{F(P)} = \frac{1}{k_{F(P)} + \sum_{i=1}^n k_i}$$

### 3. 荧光(磷光)的量子产率

荧光量子产率的定义:

$$\phi_F = \frac{\text{发射荧光的分子数}}{\text{激发分子总数}}$$

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_{i=1}^n k_i}$$

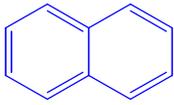
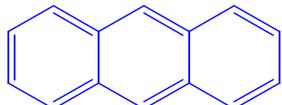
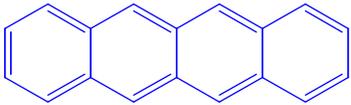
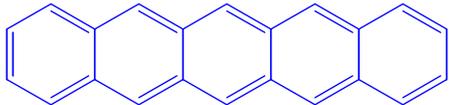
$$\phi_P = \frac{\text{发射磷光的分子数}}{\text{激发分子总数}}$$

$$\phi_P = \phi_{st} \frac{k_P}{k_P + \sum_{i=1}^n k_i}$$

$k_F$ 、 $k_P$ 主要取决于荧光物质的分子结构； $\phi_{st}$ 系间窜跃效率。  
 $\sum k_i$ 主要取决于化学环境，同时也与荧光物质的分子结构有关。

大多数的荧光物质的量子产率在0.1~1之间；

例如：0.05mol/L的硫酸喹啉， $\phi_F=0.55$ ； 荧光素  $\phi_F=1$

化合物					
$\phi_F$	0.11	0.29	0.46	0.60	0.52

## § 12.2 分子荧光与磷光强度的影响因素

### 一. 荧光的量子产率

### 二. 荧光与有机化合物的结构

#### 1. 跃迁的类型 $\pi^* \rightarrow \pi$      $\pi^* \rightarrow n$

对于有机荧光物质:

$n \rightarrow \pi^*$   $\epsilon_{\max} < 100$     平均寿命  $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{sec}$

$\pi \rightarrow \pi^*$   $\epsilon_{\max} \geq 10^4$     平均寿命  $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{sec}$      $k_{S \rightarrow T}$  小

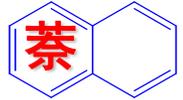
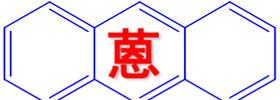
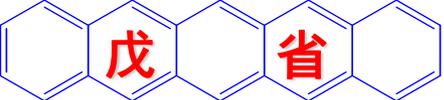
$\pi^* \rightarrow \pi$  是有机化合物产生荧光的主要跃迁类型。

强荧光的有机化合物具备下特征:

- ①具有大的共轭  $\pi$  键结构;
- ②具有刚性的平面结构;
- ③具有最低的单重电子激发态  $S_1$  为  $\pi^* \rightarrow \pi$  型;
- ④取代基团为给电子取代基。

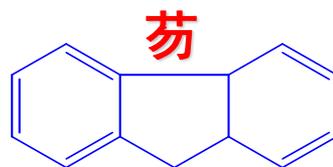
## 2. 共轭效应

产生荧光的有机物质，都含有共轭双键体系，共轭体系越大，离域大 $\pi$ 键的电子越容易激发，荧光与磷光越容易产生。

化合物	 苯	 萘	 蒽	 菲	 省
$\phi_F$	0.11	0.29	0.46	0.60	0.52
$\lambda_{ex}^{max}(nm)$	205	286	365	390	580
$\lambda_{em}^{max}(nm)$	278	321	400	480	640

## 3. 刚性平面结构

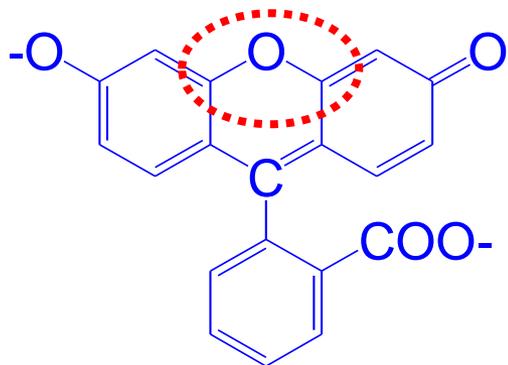
荧光物质的刚性和平面性增加，有利于荧光发射。



$$\phi_F=1$$



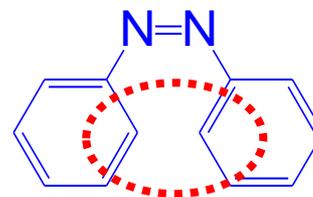
$$\phi_F=0.2$$



荧光黄

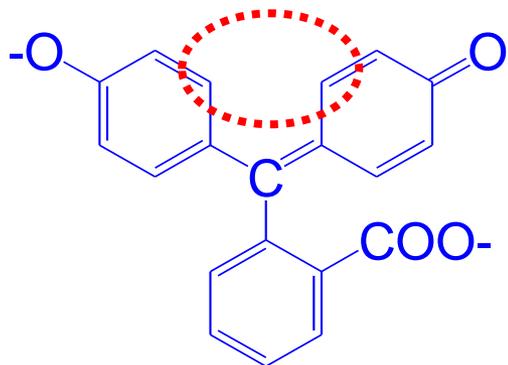
产生荧光

$$\phi_F = 0.92$$



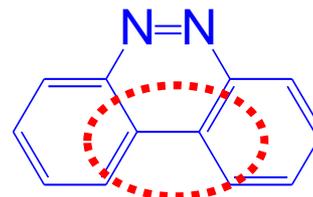
偶氮苯

不产生荧光



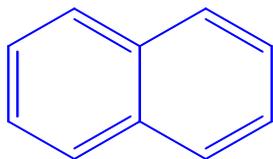
酚酞

不产生荧光

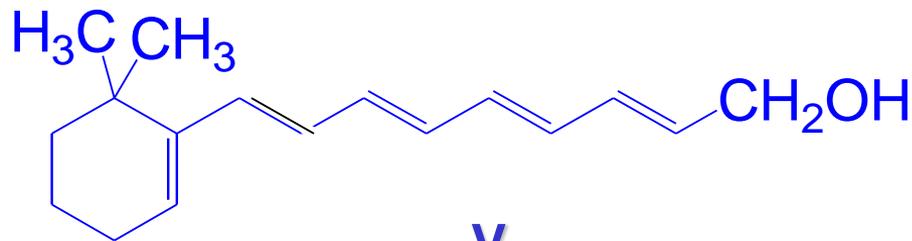


偶氮菲

产生荧光



萘



$V_A$

$$\phi_F(\text{萘}) = 5\phi_F(V_A)$$

## 4. 取代基效应

### 1) 给电子取代剂加强荧光

—HN<sub>2</sub>, —NHR, —NR<sub>2</sub>, —OH, —OR, —CN

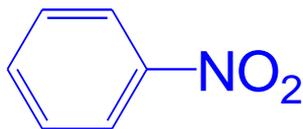
产生  $p \rightarrow \pi$  共轭

化合物	苯	苯酚	苯胺	苯基氰	苯甲醚
$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)	278~310	285~365	310~405	280~390	285~345
相对荧光强度	10	18	20	20	20

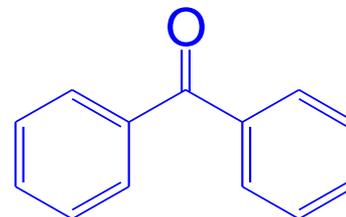
### 2) 得电子取代基减弱荧光、加强磷光

—C=O, —COOH, —NO<sub>2</sub>

不产生  $p \rightarrow \pi$  共轭



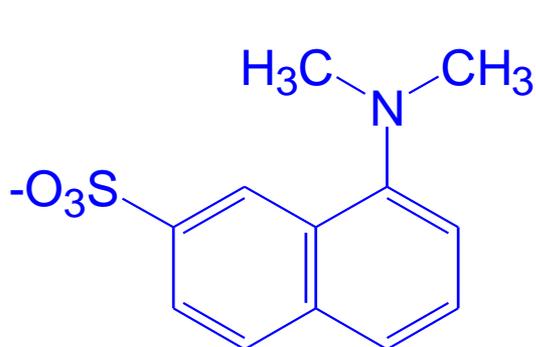
硝基苯：不产生荧光、弱磷光



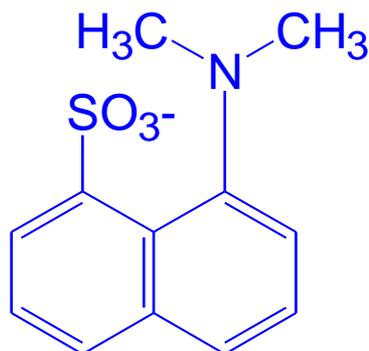
二苯甲酮：弱荧光、强磷光  
 $S_1 \rightarrow T_1$  的系间窜跃产率接近1

### 3) 取代基的位置

空间位阻对荧光发射的影响

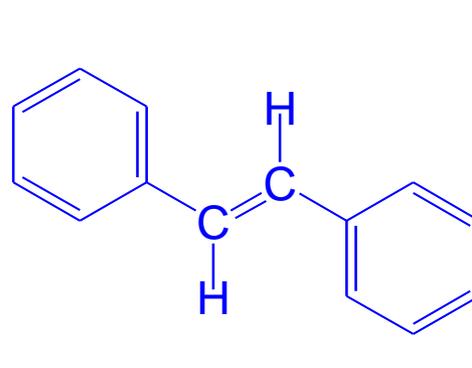


$\phi_F=0.75$

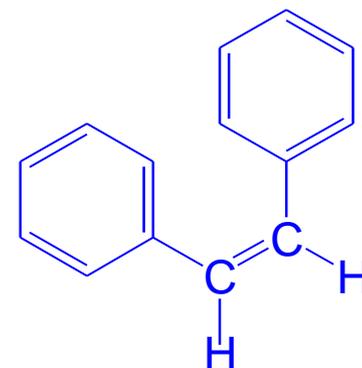


$\phi_F=0.03$

立体异构体对荧光发射的影响

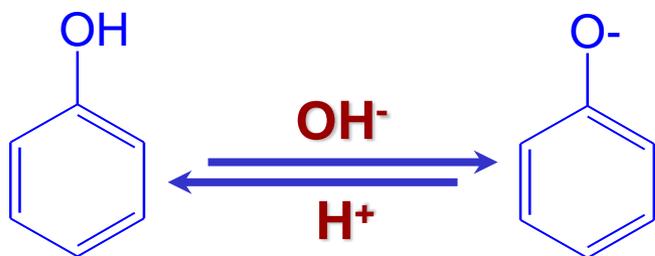


反式二苯乙烯  
强荧光物质



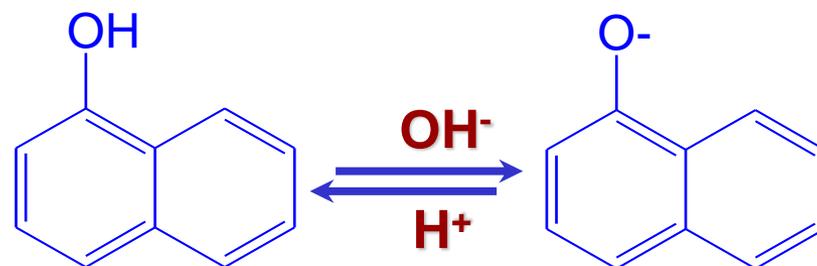
顺式二苯乙烯  
非荧光物质

电离效应对荧光发射的影响



pH=1, 有荧光

pH=13, 无荧光



无荧光

有荧光

## 5.重原子取代基效应

—Cl, —Br, —I

$S_1 \rightarrow T_1$ 的系间窜跃由于重原子的存在增强

化合物	萘	1-甲基萘	1-氟萘	1-氯萘	1-溴萘	1-碘萘
$\phi_p/\phi_f$	0.093	0.053	0.068	5.2	6.4	>1000
$\lambda^F_{max}(nm)$	315	318	316	319	320	~
$\lambda^P_{max}(nm)$	470	476	473	483	484	488
$\tau_p(s)$	2.6	2.5	1.4	0.23	0.014	0.0023

含有重原子的溶剂，由于重原子效应荧光减弱、磷光增强。

## 6.溶剂效应

在极性溶剂中：

红移：

$$\Delta E_{\pi \rightarrow \pi^*} >$$

$$\Delta E_{\pi \rightarrow \pi^*}$$

蓝移：

$$\Delta E_{n \rightarrow \pi^*} <$$

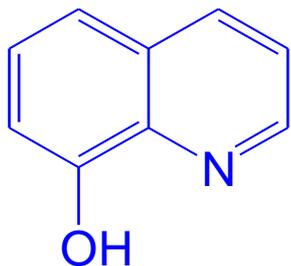
$$\Delta E_{n \rightarrow \pi^*}$$

无溶剂化作用

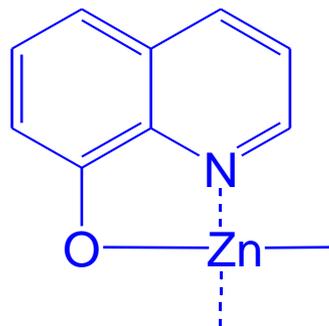
有溶剂化作用

### 三. 金属螯合物的荧光

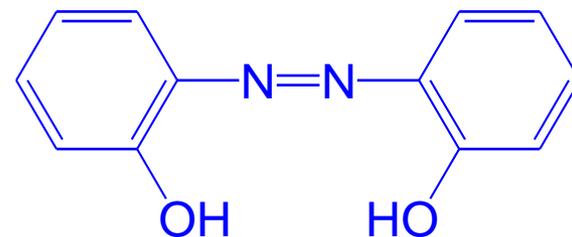
#### 1. 螯合物中配位体的发光



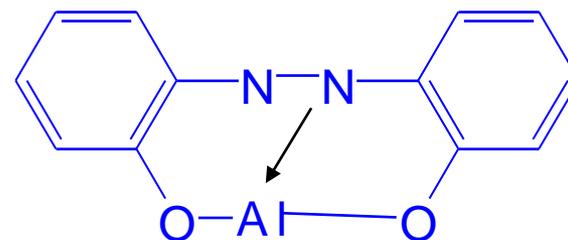
8-羟基喹啉  
弱荧光



8-羟基喹啉-Zn螯合物  
黄绿色强荧光

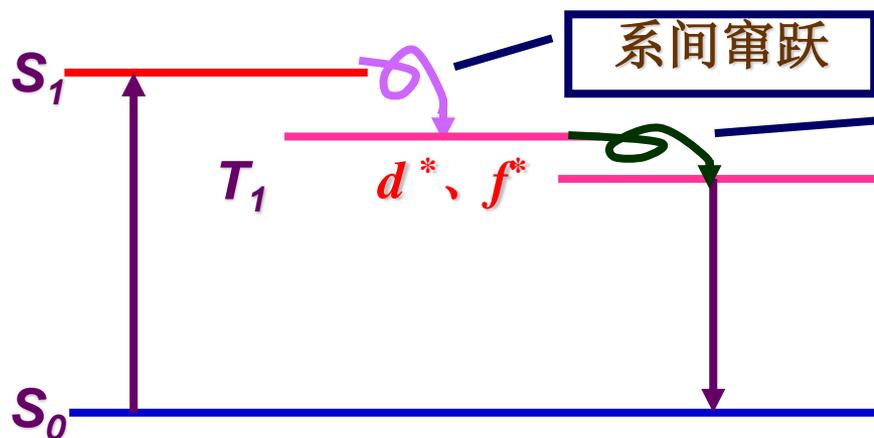


2,2'-二羟基偶氮苯  
无荧光



2,2'-二羟基偶氮苯-Al螯合物  
强荧光

#### 2. 螯合物中金属离子的发光



$d^* \rightarrow d$      $f^* \rightarrow f$  荧光

## 四. 荧光的熄灭

**荧光熄灭:** 荧光分子与溶剂分子或其它溶质分子相互作用引起荧光强度降低或消失的现象。

**荧光熄灭剂:** 这些溶剂分子或其它溶质分子称为荧光熄灭剂。

### 1. 碰撞熄灭

与分子的直径、  
粘度、温度等因素  
有关。

激发



相对速率

1

发射



$K_1 [M^*]$

熄灭



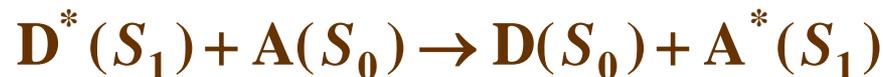
$K_2 [M^*] [Q]$

### 2. 能量转移熄灭

再吸收过程:



共振能量转移:



### 3. 氧的熄灭作用

氧分子是荧光、磷光的熄灭剂，



### 4. 自熄灭与自吸收

当荧光物质的浓度大于1g/L时，常发生荧光的自熄灭(浓度熄灭)



由于  $\phi_F < 1$ ，使荧光强度减弱或消失.

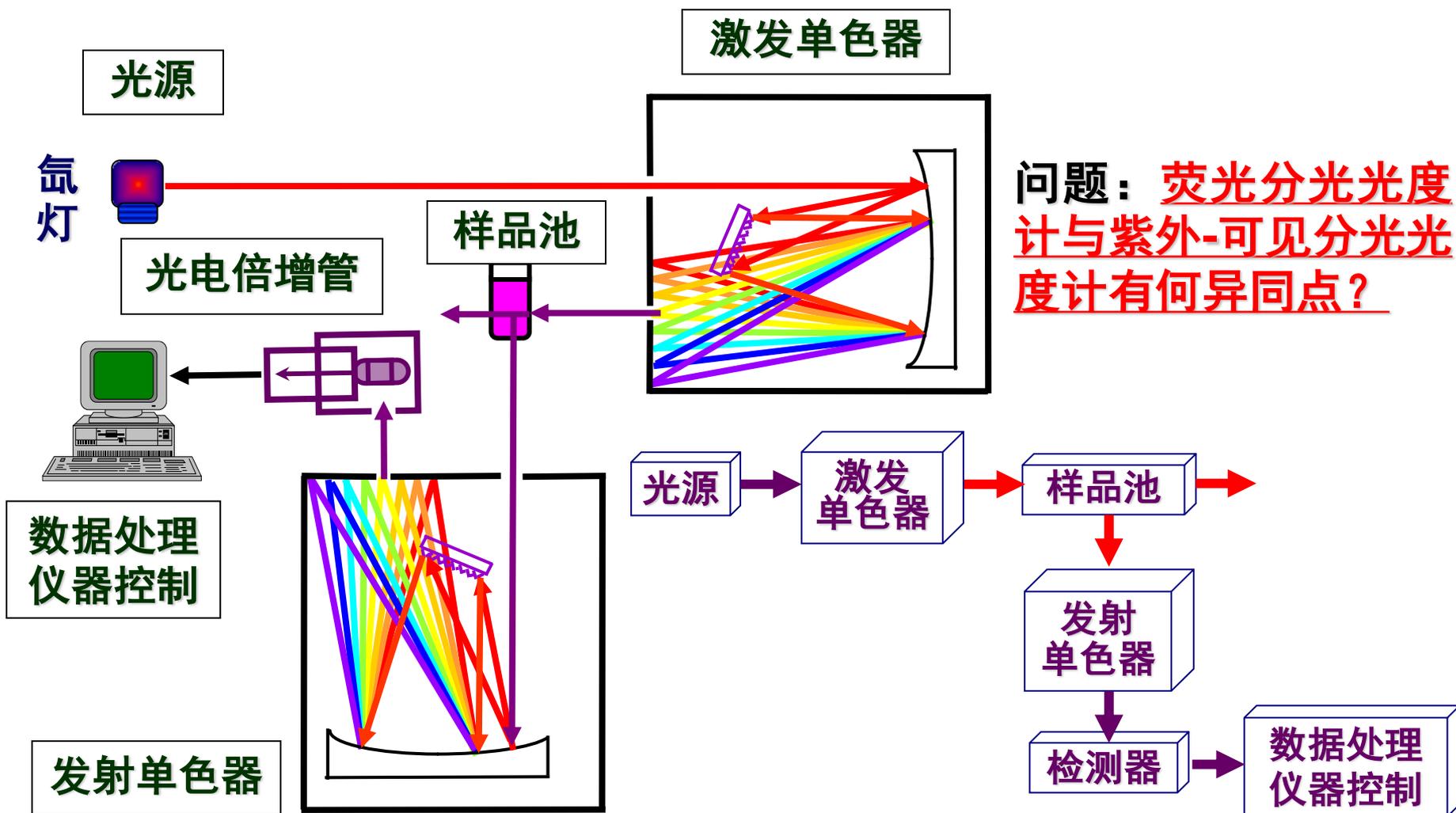


由于二聚体不发荧光，或发射荧光的能量有改变，造成自熄灭现象。

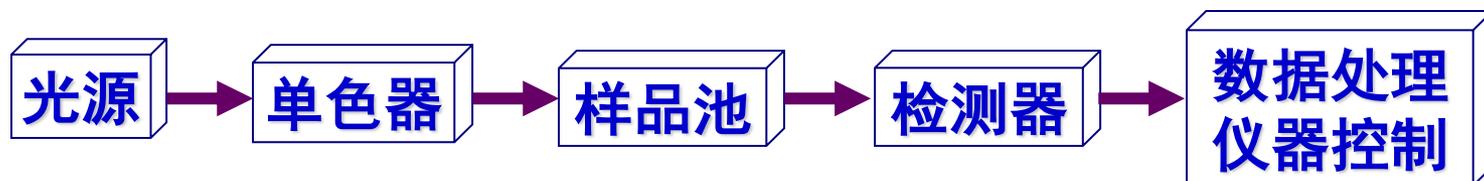
# § 12.3 荧光(磷光)分光光度计

## 一. 主要组成及部件的功能

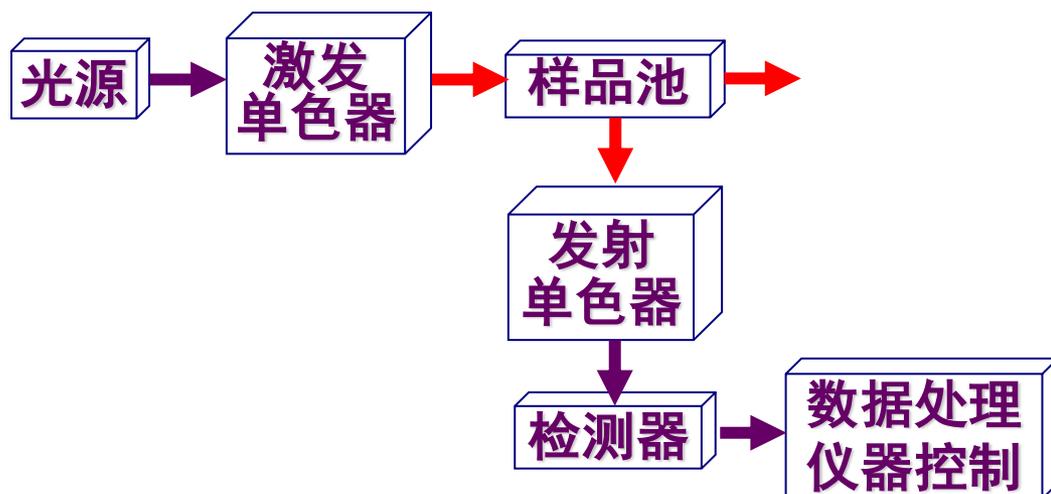
### 荧光分光光度计工作原理基及仪器结构框图



## 紫外-可见分光光度计:



## 荧光(磷光)分光光度计:



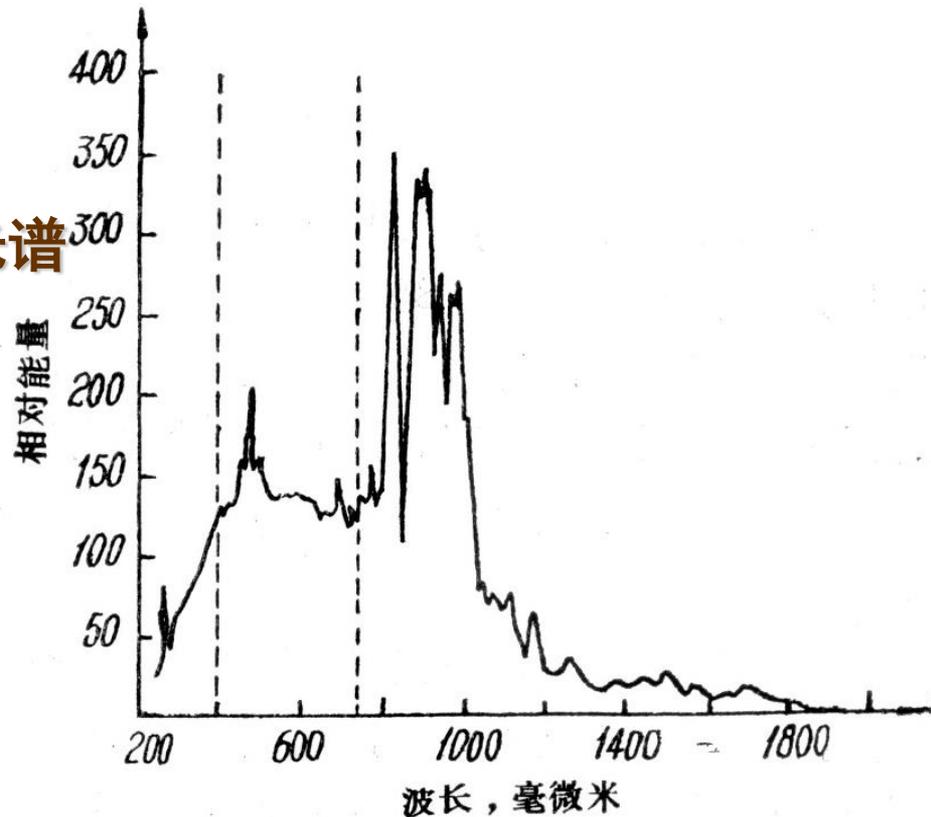
## 二. 光源

### 1. 光源的要求:

- ❖ 发射强度足够且稳定的连续光谱
- ❖ 光辐射强度随波长的变化小
- ❖ 有足够长的使用寿命

常用气体放电灯类型:

氙灯光源 高压汞光源



### 2. 氙灯光源

波长范围: 200~1000nm

工作压力: 5~20 atm

启动电压: 20~40KV

使用寿命: 1000~2000h

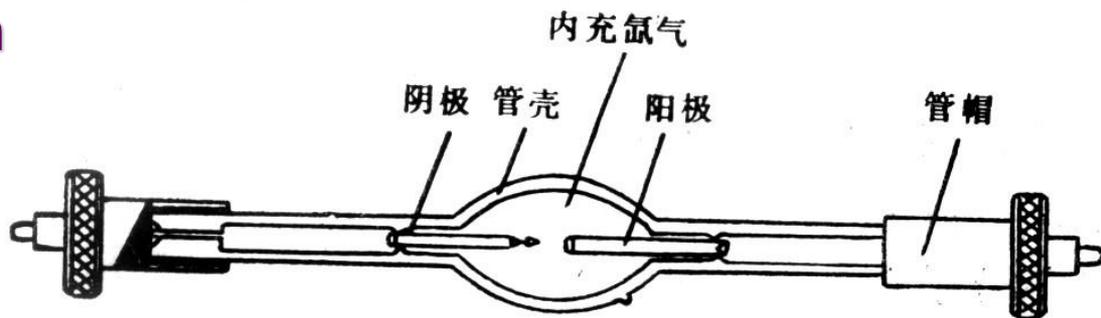


图4.6 短弧氙灯结构示意图

最广泛应用的连续光源:

发射波长范围宽

发射光强度大

### 3. 高压汞灯光源

应用广泛的**线光源**：

253.7 296.5 302.2 312.6  
313.2 365.0 365.5 366.3  
404.7 435.8 546.1 557.0  
579.0 (nm)

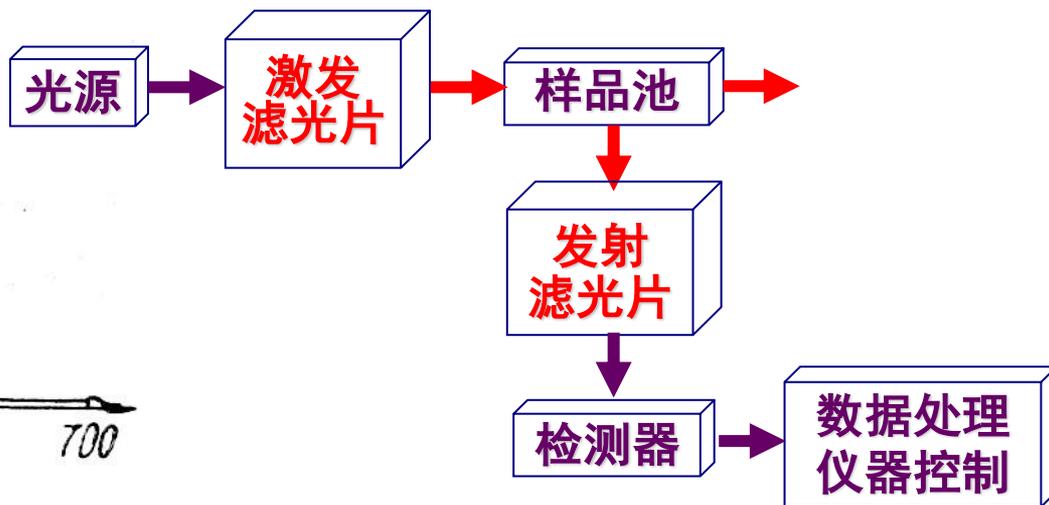
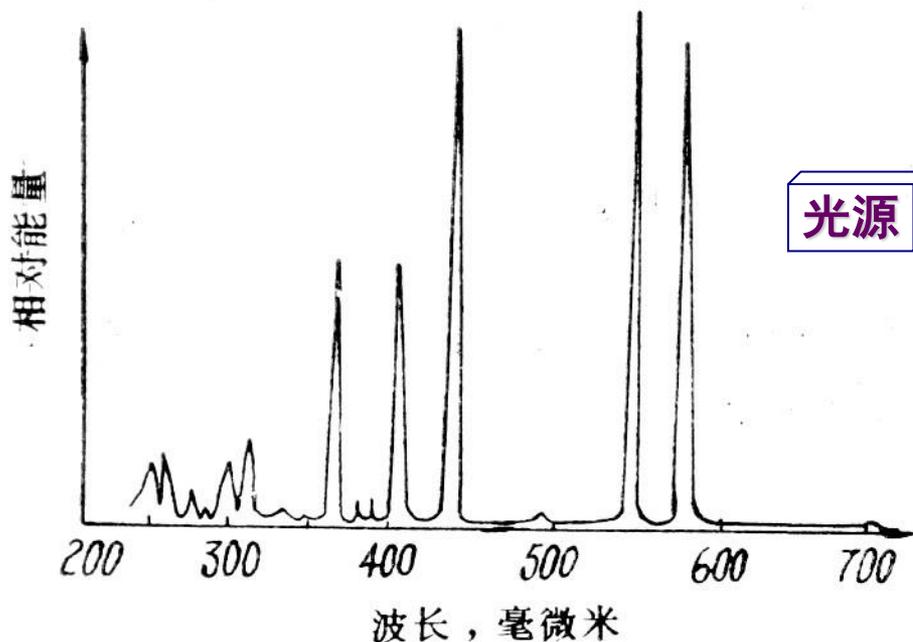
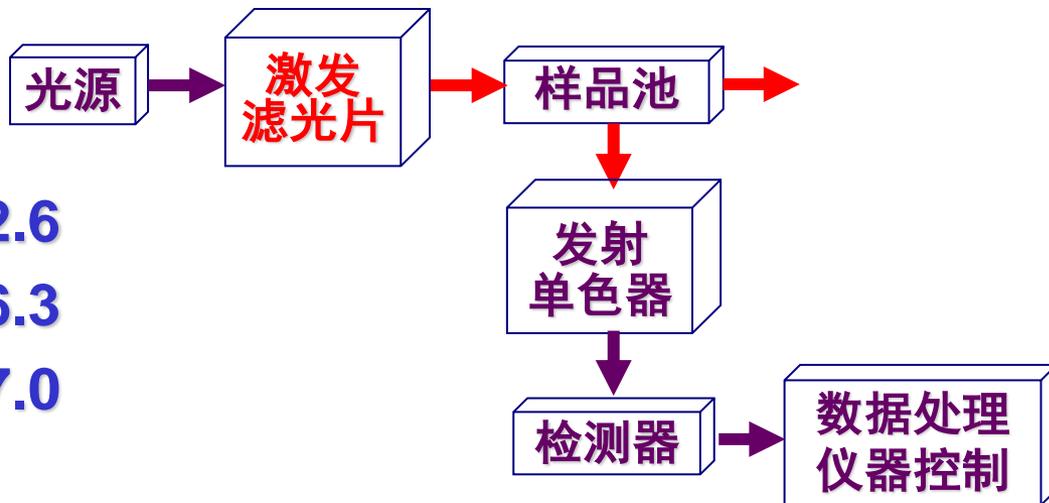


图4.8 高压汞灯光谱能量分布图

### 三. 单色器

平面衍射光栅

线散能力

杂散光水平

### 四. 检测器

光电倍增管

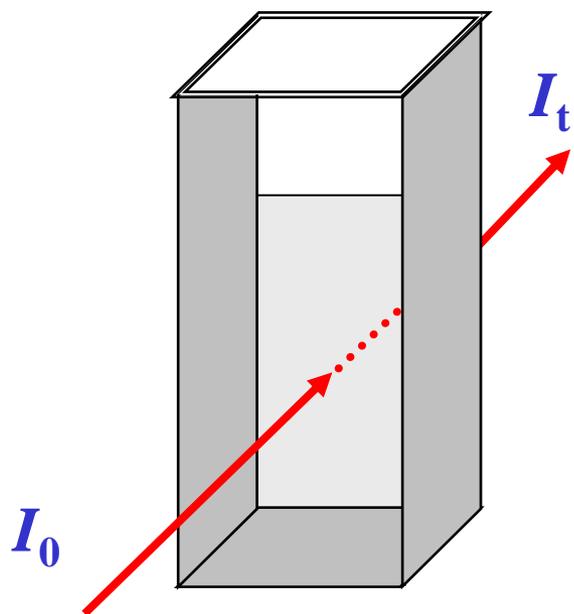
CCD

### 五. 样品池：液池、荧光池

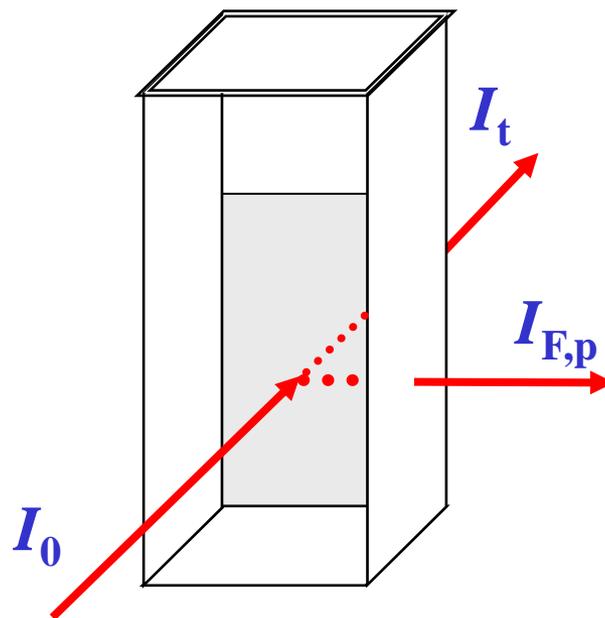
问题：紫外-可见分光光度计的吸收池与荧光分光光度计的样品池有什么区别？

1. 样品池的材料：与紫外-可见分光光度计的吸收池一样
2. 吸收池的形状：紫外-可见分光光度计的吸收池两面透光  
荧光分光光度计的样品池四面透光
3. 使用注意事项  
波长范围      容易破碎      沾污问题

# 紫外-可见分光光度计 测量池(吸收池)

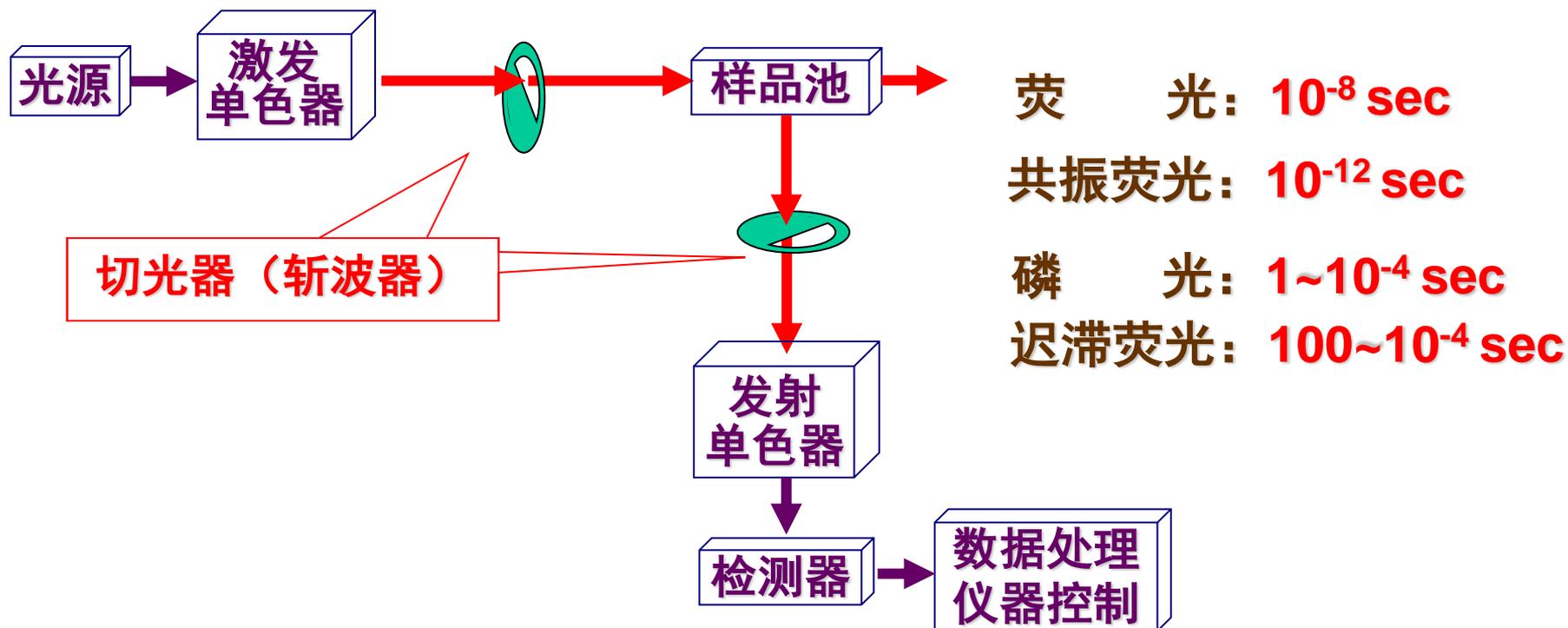


# 荧光分光光度计 样品池



## 六. 磷光分光光度计

### 1. 光学系统与荧光分光光度计的区别



### 2. 样品池与荧光分光光度计的区别

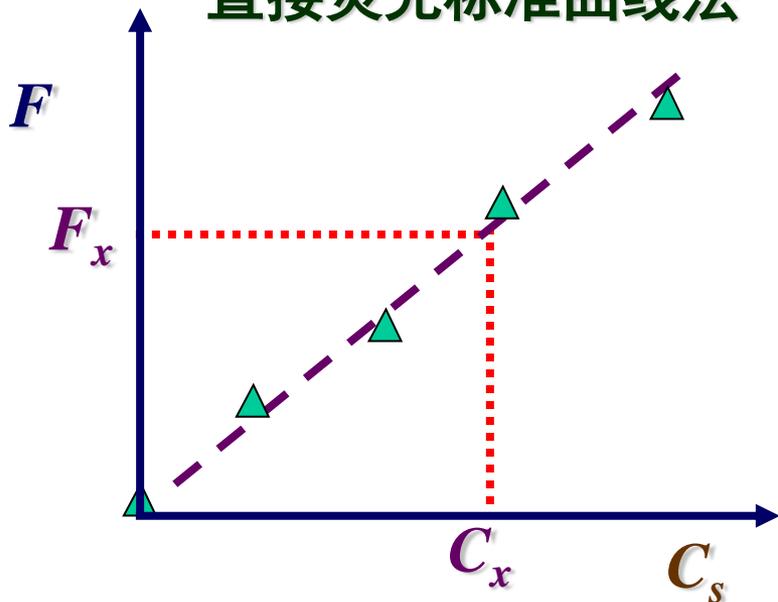
通常情况下，样品池需要放在盛液氮的石英杜瓦瓶内，来测定低温磷光。



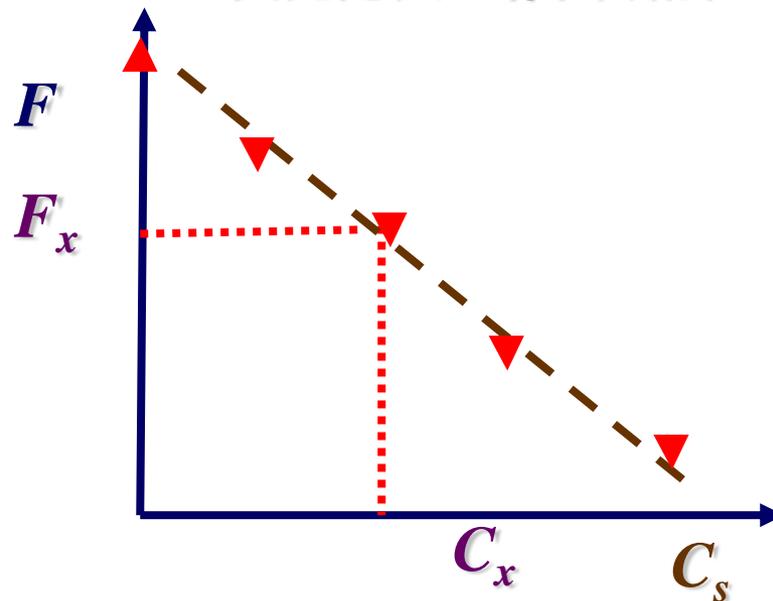
## § 12.4 荧光分析法的应用

### 一. 工作曲线法

直接荧光标准曲线法



荧光熄灭工作曲线法



### 二. 荧光分析法的灵敏度

$$A = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \varepsilon b C$$

$$A \propto \varepsilon$$

$$I_F = 2.30 k \phi_F I_0 \varepsilon b C$$

$$I_F \propto k, \phi_F, I_0, \varepsilon$$

荧光分析的灵敏度比紫外—可见分光光度法高 $10^3 \sim 10^4$ .

## 三. 荧光分析的应用

### 1. 无机化合物

在紫外光照射下会发生荧光的无机化合物很少，主要依赖于有机试剂形成的螯合物。

#### ❖ 直接荧光测定法

自从1867年Goppelsroder进行了历史上首次的荧光分析工作，应用铝—桑色素配合物的荧光进行铝的测定以来，采用有机试剂可以测定70多种元素。

其中，较常测定的元素有：Be、Al、B、Ga、Se、Mg、Zn、Cd与某些稀土元素；测定的灵敏度有些可以达到 $10^{-10}$ ；

#### ❖ 荧光熄灭测定法

某些元素虽然不与有机试剂形成发荧光的配合物，但是它会与发荧光的配合物争夺配位体，组成不发荧光的配合，使其产生荧光熄灭，由荧光熄灭的强度测定该元素的含量。

较常测定的元素有：F、S、Fe、Ag、Co、Ni、Cu、Mo、W

## ❖ 催化荧光测定法

某些元素虽然与有机试剂形成发荧光的配合物，但是反应速度慢，在某些微量元素的催化下，反应速度会加快，在特定的时间内可用来测定微量元素。

某些微量元素存在，会催化发荧光的配合物产生荧光熄灭，在特定的时间内可用来测定微量元素。

常测定的元素有：Cu、Be、Fe、Co、Os、Ag、Au、Zn、  
Al、Ti、V、Mn、Er、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、CN

## ❖ 低温荧光测定法

溶液温度的降低，显著增强溶液的荧光强度。液氮 -196°C

较常测定的元素有：Cr、Nb、U、Te、Pb

## ❖ 固体荧光测定法

固体荧光发在荧光分析中也经常用到。

较常测定的元素有：Ce、Sm、Tb 等稀土元素

Sb、V、Pb、Bi、Nb、Mn

## 2. 有机化合物

芳香族化合物存在共轭的不饱和体系，是有机化合物荧光测定的主要类型。

待测物	试剂	$\lambda_{\max}^{ex}$	$\lambda_{\max}^{em}$	测定范围 ppm
丙三醇	苯胺	紫外	蓝色	0.1~2
糠 醛	葱酮	465	505	1.5~15
氨基酸	氧化酶	315	425	0.01~50
维生素A	无水乙醇	345	490	0~20
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
青霉素	$\alpha$ -甲氧基-6-氯-9-( $\beta$ -氨基乙基)-氨基氮杂葱	420	500	0.0625~0.625
玻璃酸梅	3-乙酰氧基吡啶	395	470	0.001~0.033
胍基丁胺	邻苯二醛	365	470	0.05~5
四氧嘧啶	苯二胺	365	485	$10^{-4}$

## 3. 生命与生物物质

# 化学发光分析法

- 通过化学反应产生的能量激发物质所产生的光辐射
- 定量分析
- 优点：仪器设备简单-无需光源和单色器
- 缺点：有用的发光体系有限
- 基本要求：
  - 1 化学反应释放足够高的激发能
  - 2 反应过程有利于激发态产物生成
  - 3 激发态分子产生辐射跃迁

# 直接化学发光和间接化学发光

直接发光:



式中A或B是被测物

间接发光: (C\*不直接发光, 而是将其能量转移给F)



# 化学发光仪器装置

