

中国科学院科学出版基金资助出版

21 世纪科学版化学专著系列

荧光分析法

(第三版)

许金钩 王尊本 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书对荧光分析法作了较全面的介绍。阐述了荧光分析法的基本概念和原理、荧光与分子结构的关系、环境因素对荧光光谱和荧光强度的影响以及溶液荧光的猝灭;介绍了荧光仪器的组件、荧光光谱的校正和荧光仪器的灵敏度以及市场上常见仪器的性能;介绍了各种荧光分析方法,其中包括常规的荧光分析法、同步荧光分析法、三维荧光光谱分析法、时间分辨和相分辨荧光分析法、荧光偏振测定、低温荧光分析法、固体表面荧光分析法、动力学荧光分析法、空间分辨荧光分析技术、单分子荧光检测、荧光免疫分析法和导数荧光分析法等;对近 70 种元素和脂肪族、芳族、维生素、氨基酸、蛋白质、核酸、胺类、甾族、酶、辅酶、药物、毒物以及农药等有机化合物的荧光分析法作了简要的评述。

本书内容丰富,应用面广,可作为高等院校相关专业本科生和研究生的教材或教学参考书,也可供科研和生产部门的有关科学技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

荧光分析法/许金钩,王尊本主编.—3 版.—北京:科学出版社,2006
(21 世纪科学版化学专著系列)

ISBN 7-03-017295-7

I . 荧… II . ①许…②王… III . 荧光分析 IV . O657.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 052462 号

责任编辑:黄 海 / 责任校对:张 琪
责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮 政 编 码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1975 年 4 月第 一 版 开本:B5(720×1 000)

2006 年 7 月第 三 版 印张:30

2006 年 7 月第三次印刷 字数:588 000

印数:13 701—16 200

定价:60.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈路通〉)

第三版前言

本书为《荧光分析法》的第三版，内容包括荧光分析法的基本原理、荧光分析方法和化合物的荧光分析等三个部分。自本书第二版于1990年出版后的十多年来，荧光分析法又有了长足的进步，尤其是在荧光分析方法及其应用方面又有了很大的进展。第三版系在第二版的基础上除个别章节外重新编写，增添了大量的内容和文献资料。

荧光分析法在生命科学、环境科学、材料科学、食品科学、公安情报以及工农业生产等诸多领域中的应用与日俱增，其原因在于荧光分析法具有灵敏度高、线性范围宽以及可供选择的参数多而有利于提高方法的选择性等优点。荧光分析法已经发展成为一种十分重要且有效的光谱化学分析手段，正在并将继续在有关的领域发挥其应有的作用。

与第二版相比，第三版在荧光分析方法部分增加了空间分辨荧光分析技术和单分子荧光检测等几章的内容。这些新方法和新技术进一步提高了荧光分析法的各方面性能，同时也扩展了荧光分析法的应用范围。其他方面的内容也做了一定的修改和补充。

在本书第三版出版之际，我们深切地怀念本书第一版和第二版的主编者、我们敬爱的导师陈国珍教授。陈国珍教授在倡导和推进荧光分析法在我国的发展和应用方面作出了不懈的努力和很大的贡献。在筹备编写本书第三版时，他还与我们一起研究书稿的大纲，但终因病于2000年2月2日离开了我们，未能见到本书第三版的面世。

参加本书第三版编写工作的有许金钩、王尊本、李耀群、郭祥群、张勇、李庆阁、杨薇、朱庆枝和杨黄浩等同志。本专业方向的几位研究生在收集资料和制图等方面予以协助，谨表谢意。

由于水平所限，本版错误之处在所难免，望读者不吝指正。

编著者

2006年春于厦门大学

第二版前言

本书为《荧光分析法》的第二版，内容仍包括基本原理、分析仪器、分析方法及无机化合物与有机化合物的测定方法等四部分。自从第一版于 1975 年出版以后，十余年来荧光分析法有长足的进步，尤其是在荧光分析仪器和荧光分析方法方面已有巨大的进展。第二版系在第一版的基础上重新编写，增添大量资料，以冀能包括最新发展内容。

荧光分析法在生物化学、医学、工业和化学研究中的应用与日俱增，其原因在于荧光分析法具有本身的高灵敏度的优点，且因荧光现象具有有利的时间标度。荧光发射发生在吸光之后约 10^{-8} s (10 ns)，在此时间内会发生许多时间差异的分子过程，而这些过程会影响荧光化合物的光谱特征。据此建立的时间分辨荧光法和相分辨荧光法，对于复杂的多组分荧光体混合物的分析和许多生物化学现象的研究大有帮助。

有机化合物常因其荧光谱带宽阔、相互重叠而不易识别，自从发现在适当溶剂中和在低温条件下可呈现尖锐谱线的低温荧光法以及其后固体表面荧光法的建立，这方面的工作大有改善。

采用同步荧光法可使谱带众多的光谱简化和使谱带宽度窄化，以减小或消除谱带重叠现象，并可删除拉曼、瑞利散射光的干扰。同步荧光法与导数荧光法以及三维荧光技术的使用，可使复杂混合物的组分易于识别和测定。

免疫分析用于生物样品的分析，以往多采用放射免疫分析法。荧光免疫分析法既具有与放射免疫分析法同等的灵敏度，又免除了放射性的防护问题，近年来不断发展，颇有取代放射免疫分析之势。

偏振荧光法可用以测量分子膜的微黏度和生物分子间的缔合反应等，对于生物化学方面的研究工作颇有帮助。

动力学分析法与荧光检测手段结合而成的荧光动力学分析法，可使测定的灵敏度进一步提高，故亦常为分析工作者所采用。

上述各种新的荧光分析方法的发展实倚赖于荧光分析仪器的改进，这两者相互促进，相辅相成。氮分子、氩离子激光器及染料激光器等激发光源，激发光的调制器、偏振器，同步与导数设备，高灵敏度快速响应的光电倍增管与光二极管阵列等检测器以及电子计算机和光导纤维的采用，使荧光分析法蓬勃发展。

荧光分析法的灵敏度比分光光度法高约两个数量级，又具有荧光寿命、荧光

量子产率、激发峰波长、发射峰波长等多种参数，因而有较好的选择性，且仪器设备亦不复杂、昂贵，近年来已为地质、冶金、化工、环保、医学、生物、化学等方面所采用，实有良好的发展前途。

本书对荧光分析法的原理作系统的阐述，对荧光分析方法及分析仪器，尤其是十余年来的进展，作了较详细的介绍，对文献上发表的各种无机化合物和有机化合物的分析方法分别按元素和种类进行介绍。此外，由于磷光分析与荧光分析在方法原理和测定手段方面有许多相似之处，近年来磷光分析法也有很大发展，可与荧光分析法相互补充以扩大应用范围，故本书另辟专章对磷光分析法的发展与应用作一简要介绍。

作者们水平有限，错误之处希读者不吝指正。

作 者

1989 年春

目 录

第三版前言

第二版前言

第一部分 荧光分析法的基本原理

第一章 荧光分析导论	3
§ 1.1 概述	3
§ 1.2 分子的激发与弛豫	4
§ 1.3 分子发光的类型	6
§ 1.4 荧光的激发光谱和发射光谱	7
§ 1.5 荧光寿命和荧光量子产率	11
§ 1.6 荧光强度与溶液浓度的关系	12
§ 1.7 散射光对荧光分析的影响	13
§ 1.8 荧光分析法的灵敏度和选择性	15
§ 1.9 荧光表征	16
参考文献	17
第二章 荧光与分子结构的关系	18
§ 2.1 有机化合物的荧光	18
§ 2.2 无机盐的荧光	36
§ 2.3 二元配合物的荧光	39
§ 2.4 三元配合物的荧光	43
参考文献	47
第三章 环境因素对荧光光谱和荧光强度的影响	49
§ 3.1 溶剂性质的影响	49
§ 3.2 介质酸碱性的影响	53
§ 3.3 温度的影响	56
§ 3.4 重原子效应	57
§ 3.5 有序介质的影响	58
§ 3.6 其他溶质的影响	61
参考文献	62

第四章 溶液荧光的猝灭	64
§ 4.1 荧光猝灭作用	64
§ 4.2 动态猝灭	65
§ 4.3 静态猝灭	68
§ 4.4 动态和静态的联合猝灭	69
§ 4.5 电荷转移猝灭	70
§ 4.6 能量转移猝灭	72
§ 4.7 光化学反应猝灭	79
§ 4.8 其他类型的猝灭	81
参考文献	85
第五章 荧光仪器	87
§ 5.1 荧光仪器组件	88
§ 5.2 荧光仪器	104
§ 5.3 荧光光谱的校正和荧光仪器的灵敏度	118
§ 5.4 目前市场上常见仪器性能简介	124
参考文献	127
第二部分 荧光分析方法	
第六章 常规的荧光分析法	131
§ 6.1 直接测定法	131
§ 6.2 间接测定法	131
§ 6.3 多组分混合物的荧光分析	133
参考文献	136
第七章 同步荧光分析法	137
§ 7.1 概述	137
§ 7.2 恒波长同步荧光分析法	138
§ 7.3 恒能量同步荧光分析法	140
§ 7.4 可变角（或可变波长）同步荧光分析法	143
§ 7.5 恒基体同步荧光分析法	146
§ 7.6 分析应用	148
参考文献	150
第八章 三维荧光光谱分析法	154
§ 8.1 方法原理	154

§ 8.2 仪器设备	156
§ 8.3 方法应用	159
参考文献	160
第九章 时间分辨和相分辨荧光分析法	162
§ 9.1 时间分辨荧光分析法	162
§ 9.2 相分辨荧光分析法	170
参考文献	182
第十章 荧光偏振测定	184
§ 10.1 荧光偏振与荧光各向异性	184
§ 10.2 时间相关荧光各向异性	192
§ 10.3 荧光偏振与荧光各向异性的应用	197
参考文献	200
第十一章 低温荧光分析法	201
§ 11.1 冷冻溶液 Shpol'skii 法	201
§ 11.2 其他低温荧光法	205
§ 11.3 仪器设备	207
§ 11.4 方法应用	208
参考文献	211
第十二章 固体表面荧光分析法	213
§ 12.1 方法原理	213
§ 12.2 仪器设备	214
§ 12.3 方法应用	215
参考文献	219
第十三章 动力学荧光分析法	221
§ 13.1 方法原理	221
§ 13.2 仪器设备	225
§ 13.3 方法应用	226
参考文献	236
第十四章 空间分辨荧光分析技术	241
§ 14.1 共焦荧光法	241
§ 14.2 多光子激发荧光法	246
§ 14.3 全内反射荧光法	248
§ 14.4 近场荧光法	252

参考文献	256
第十五章 单分子荧光检测	258
§ 15.1 单分子检测的理论意义	258
§ 15.2 单分子检测原理与荧光特征	258
§ 15.3 单分子荧光检测方法及其发展	260
§ 15.4 单分子检测的应用	262
参考文献	265
第十六章 荧光免疫分析法	267
§ 16.1 荧光免疫分析法的原理	267
§ 16.2 荧光免疫分析中的标记物	268
§ 16.3 荧光检测信号放大技术	275
§ 16.4 荧光免疫分析检测技术	277
§ 16.5 结合高效分离技术的荧光免疫分析	281
§ 16.6 荧光免疫传感器	285
§ 16.7 芯片上的荧光免疫分析	285
§ 16.8 荧光免疫分析法的发展趋势	286
参考文献	287
第十七章 导数荧光分析法	299
§ 17.1 基本原理	299
§ 17.2 获得导数光谱的方法	300
§ 17.3 方法应用举例	302
§ 17.4 导数同步荧光分析法	305
参考文献	307

第三部分 化合物的荧光分析

第十八章 无机化合物的荧光分析	311
§ 18.1 锂、钠、钾的荧光分析	312
§ 18.2 铜、银、金的荧光分析	313
§ 18.3 铍、镁、钙、锶的荧光分析	316
§ 18.4 锌、镉、汞的荧光分析	318
§ 18.5 硼、铝、镓、铟、铊的荧光分析	321
§ 18.6 钪、钇的荧光分析	327
§ 18.7 稀土元素的荧光分析	328

§ 18.8	钍、铀、钍的荧光分析·····	335
§ 18.9	碳、硅、锗、锡、铅的荧光分析·····	336
§ 18.10	钛、锆、铪的荧光分析 ·····	338
§ 18.11	氮化物的荧光分析 ·····	339
§ 18.12	磷、砷、锑、铋的荧光分析 ·····	343
§ 18.13	钒、铌、钽的荧光分析 ·····	345
§ 18.14	氧、臭氧、过氧化氢、羟自由基的荧光分析 ·····	347
§ 18.15	硫化物的荧光分析 ·····	351
§ 18.16	硒、碲的荧光分析 ·····	353
§ 18.17	铬、钼、钨的荧光分析 ·····	354
§ 18.18	氟、氯、溴、碘的荧光分析 ·····	357
§ 18.19	锰、铈的荧光分析 ·····	359
§ 18.20	铁、钴、镍的荧光分析 ·····	361
§ 18.21	钨、钼、钽、铋的荧光分析 ·····	363
参考文献·····		364
第十九章 有机化合物的荧光分析·····		380
§ 19.1	脂肪族有机化合物的荧光分析·····	380
§ 19.2	芳族有机化合物的荧光分析·····	393
§ 19.3	维生素的荧光分析·····	403
§ 19.4	氨基酸和蛋白质的荧光分析·····	409
§ 19.5	核酸的荧光分析·····	415
§ 19.6	胺类化合物的荧光分析·····	420
§ 19.7	甾族化合物的荧光分析·····	425
§ 19.8	酶和辅酶的荧光分析·····	427
§ 19.9	药物、毒物及农药的荧光分析·····	429
参考文献·····		448

第一部分

荧光分析法的基本原理

第一章 荧光分析导论

§ 1.1 概 述^[1]

当紫外线照射到某些物质的时候，这些物质会发射出各种颜色和不同强度的可见光，而当紫外线停止照射时，所发射的光线也随之很快地消失，这种光线被称为荧光。

1575 年西班牙的内科医生和植物学家 N. Monardes 第一次记录了荧光现象。17 世纪，Boyle 和 Newton 等著名科学家再次观察到荧光现象，并给予了更详细的描述。尽管在 17 世纪和 18 世纪中还陆续发现了其他一些发荧光的材料和溶液，然而在荧光现象的解释方面却几乎没有什么进展。直到 1852 年 Stokes 在考察奎宁和叶绿素的荧光时，用分光计观察到其荧光的波长比入射光的波长稍长，才判明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。他还由发荧光的矿物“萤石”推演而提出“荧光”这一术语。Stokes 还对荧光强度与浓度之间的关系进行了研究，描述了在高浓度时以及外来物质存在时的荧光猝灭现象。此外，他似乎还是第一个（1864 年）提出应用荧光作为分析手段的人。1867 年，Goppelsröder 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。1880 年，Liebman 提出了最早的关于荧光与化学结构关系的经验法则。到 19 世纪末，人们已经知道了包括荧光素、曙红、多环芳烃等 600 种以上的荧光化合物。

20 世纪以来，荧光现象被研究得更多了。例如，1905 年 Wood 发现了共振荧光；1914 年 Frank 和 Hertz 利用电子冲击发光进行定量研究；1922 年 Frank 和 Cario 发现了增感荧光；1924 年 Wawillow 进行了荧光产率的绝对测定；1926 年 Gaviola 进行了荧光寿命的直接测定等等。

荧光分析方法的发展，与仪器应用的发展是分不开的。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 研制出第一台光电荧光计。早期的光电荧光计的灵敏度是有限的，1939 年 Zworykin 和 Rajchman 发明光电倍增管以后，在增加灵敏度和容许使用分辨率更高的单色器等方面，是一个非常重要的阶段。1943 年 Dutton 和 Bailey 提出了一种荧光光谱的手工校正步

骤, 1948 年由 Studer 推出了第一台自动光谱校正装置, 到 1952 年才出现商品化的校正光谱仪器。

近十几年来, 在其他学科迅速发展的影响下, 激光、微处理机、电子学、光导纤维和纳米材料等方面的一些新技术的引入, 大大推动了荧光分析法在理论和应用方面的进展, 促进了诸如同步荧光测定、导数荧光测定、时间分辨荧光测定、相分辨荧光测定、荧光偏振测定、荧光免疫测定、低温荧光测定、固体表面荧光测定、近红外荧光分析法、荧光反应速率法、三维荧光光谱技术、荧光显微与成像技术、空间分辨荧光技术、荧光探针技术、单分子荧光检测技术和荧光光纤化学传感器等荧光分析方面的某些新方法、新技术的发展, 并且相应地加速了各式各样新型的荧光分析仪器的问世, 使荧光分析法不断朝着高效、痕量、微观、实时、原位和自动化的方向发展, 方法的灵敏度、准确度和选择性日益提高, 方法的应用范围大大扩展, 遍及工业、农业、生命科学、环境科学、材料科学、食品科学和公安情报等诸多领域。如今, 荧光分析法已经发展成为一种十分重要且有效的光谱化学分析手段, 并不断地有介绍其新方法、新技术、新应用和研究进展的专著出版^[2~18]。

在我国, 20 世纪 50 年代初期仅有极少数的分析化学工作者从事荧光分析方面的工作, 但到了 70 年代后期, 荧光分析法已引起国内分析界的广泛重视, 在全国众多的分析化学工作者中, 已逐步形成一支从事这一领域工作的队伍。而且, 在除分析学科以外的其他科学领域里, 应用荧光光谱法作为研究手段的也日益增多。近年来, 国内发表的有关荧光分析方面的论文数量增长很快, 所涉及的内容也已从经典的荧光分析法逐步扩展到新近发展起来的一些新方法和新技术。在仪器应用方面, 也陆续有几种类型的国产的商品化荧光分光光度计问世, 为这一分析方法的发展和普及提供了一定的物质条件。有了上述的基础, 相信在今后一段时间内, 在我国社会发展需要的推动下和广大分析化学工作者的共同努力下, 荧光分析法必将在我国得到更迅速的发展。

§ 1.2 分子的激发与弛豫

物质在吸收入射光的过程中, 光子的能量传递给了物质分子。分子被激发后, 发生了电子从较低的能级到较高能级的跃迁。这一跃迁过程经历的时间约 10^{-15} s。跃迁所涉及的两个能级间的能量差, 等于所吸收光子的能量。紫外、可见光区的光子能量较高, 足以引起分子中的电子发生电子能级间的跃迁。处于这种激发状态的分子, 称为电子激发态分子。

电子激发态的多重态用 $2S+1$ 表示, S 为电子自旋角动量量子数的代数和, 其数值为 0 或 1。分子中同一轨道里所占据的两个电子必须具有相反的自旋方

向，即自旋配对。假如分子中的全部电子都是自旋配对的，即 $S=0$ ，该分子便处于单重态（或称单线态），用符号 S 表示。大多数有机物分子的基态是处于单重态的。倘若分子吸收能量后电子在跃迁过程中不发生自旋方向的变化，这时分子处于激发的单重态；如果电子在跃迁过程中还伴随着自旋方向的改变，这时分子便具有两个自旋不配对的电子，即 $S=1$ ，分子处于激发的三重态（或称三线态），用符号 T 表示。符号 S_0 、 S_1 和 S_2 分别表示分子的基态、第一和第二电子激发单重态， T_1 和 T_2 则分别表示第一和第二电子激发三重态。

处于激发态的分子不稳定，它可能通过辐射跃迁和非辐射跃迁的衰变过程而返回基态。当然，激发态分子也可能经由分子间的作用过程而失活，这种过程将在第四章里加以讨论。

辐射跃迁的衰变过程伴随着光子的发射，即产生荧光或磷光；非辐射跃迁的衰变过程，包括振动松弛（VR）、内转化（ic）和系间窜越（isc），这些衰变过程导致激发能转化为热能传递给介质。振动松弛是指分子将多余的振动能量传递给介质而衰变到同一电子态的最低振动能级的过程。内转化指相同多重态的两个电子态间的非辐射跃迁过程（例如 $S_1 \rightsquigarrow S_0$ ， $T_2 \rightsquigarrow T_1$ ）；系间窜越则指不同多重态的两个电子态间的非辐射跃迁过程（例如 $S_1 \rightsquigarrow T_1$ ， $T_1 \rightsquigarrow S_0$ ）。图 1.1 为分子内所发生的激发过程以及辐射跃迁和非辐射跃迁衰变过程的示意图。

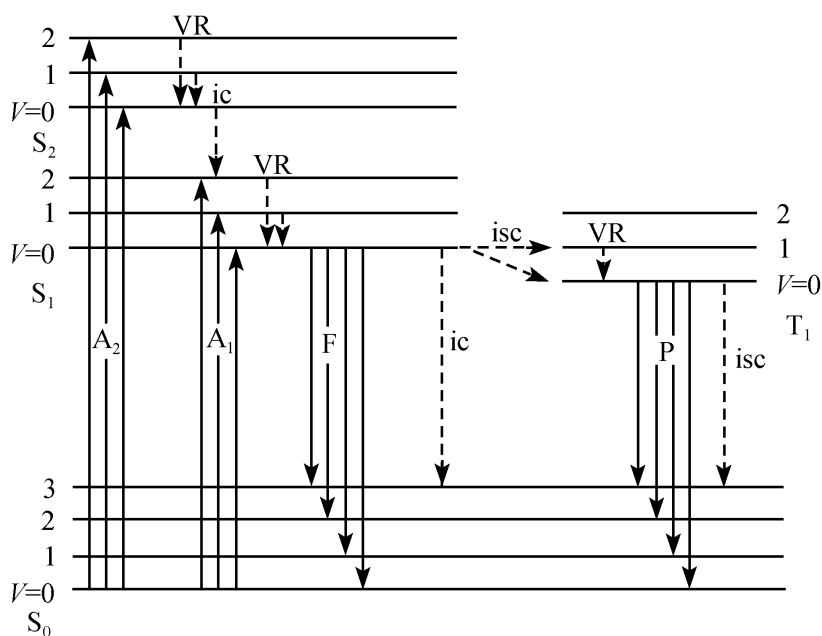


图 1.1 分子内的激发和衰变过程

A_1 ， A_2 ，吸收； F ，荧光； P ，磷光； ic ，内转化； isc ，系间窜越； VR ，振动松弛

假如分子被激发到 S_2 以上的某个电子激发单重态的不同振动能级上，处于这种激发态的分子很快（约 $10^{-12} \sim 10^{-14}$ s）发生振动松弛而衰变到该电子态的最低振动能级，然后又经由内转化及振动松弛而衰变到 S_1 态的最低振动能

级。接着，有如下几种衰变到基态的途径：① $S_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而发射荧光；② $S_1 \rightsquigarrow S_0$ 内转化；③ $S_1 \rightsquigarrow T_1$ 系间窜越。而处于 T_1 态的最低振动能级的分子，则可能发生 $T_1 \rightsquigarrow S_0$ 的辐射跃迁而发射磷光，也可能同时发生 $T_1 \rightsquigarrow S_0$ 系间窜越。

激发单重态间的内转化速率很快（速率常数约为 $10^{11} \sim 10^{13} \text{ s}^{-1}$ ）， S_2 以上的激发单重态的寿命通常很短（ $10^{-11} \sim 10^{-13} \text{ s}$ ），因而除了极少数例外，通常在发生辐射跃迁之前便发生了非辐射跃迁而衰变到 S_1 态。所以，所观察到的荧光现象通常是自 S_1 态的最低振动能级的辐射跃迁。由于系间窜越是自旋禁阻的，因而其速率常数小得多（约为 $10^2 \sim 10^6 \text{ s}^{-1}$ ）。

内转化和系间窜越过程的速率，与该过程所涉及的两个电子态的最低振动能级间的能量间隔有关；能量间隔越大，速率越小。 S_0 和 S_1 态两者的最低振动能级之间的能量差，通常远比其他相邻的两个激发单重态之间的能量差大，因而 $S_1 \rightsquigarrow S_0$ 的内转化速率常数相对较小（约为 $10^6 \sim 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ）。类似地， $T_1 \rightsquigarrow S_0$ 的系间窜越速率常数也较小（约为 $10^2 \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ ）。

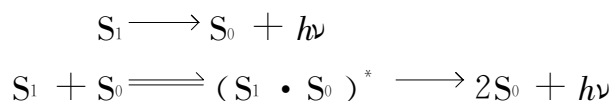
§ 1.3 分子发光的类型

分子发光的类型，可按激发模式即提供激发能的方式来分类，也可按分子激发态的类型加以分类。

按激发的模式分类时，如分子通过吸收辐射能而被激发，所产生的发光称为光致发光；如果分子的激发能量是由反应的化学能或由生物体释放出来的能量所提供，其发光分别称为化学发光或生物发光。此外，还有热致发光、场致发光和摩擦发光等。本书所讨论的内容，仅涉及光致发光的有关问题。

按分子激发态的类型分类时，由第一电子激发单重态所产生的辐射跃迁而伴随的发光现象称为荧光；而由最低的电子激发三重态发生的辐射跃迁所伴随的发光现象则称为磷光。应当指出的是，荧光和磷光之间并不总是能够很清楚地加以区分，例如某些过渡金属离子与有机配体的配合物，显示了单-三重态的混合态，它们的发光寿命可以处于 $400\text{ns} \sim$ 数 μs 之间。

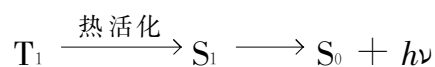
荧光可分为瞬时（prompt）荧光（即一般所指的荧光）和迟滞（delayed）荧光。瞬时荧光是由激发过程最初生成的 S_1 激发态分子或 S_1 激发态分子与基态分子形成的激发态二聚体（excimer）所产生的发射。这两种过程可分别表示如下：



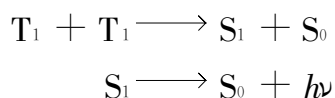
这两种过程所产生的荧光现象有所差别，后者的荧光光谱相对红移，且缺乏结构特征。某些物质在浓度较高的溶液中，可能观察到激发态二聚体的荧光现象。

偶尔在刚性的或黏稠的介质中，可以观察到磷光和迟滞荧光的现象。迟滞荧光发射的谱带波长与瞬时荧光的谱带波长相符，但其寿命却与磷光相似。迟滞荧光有以下三种类型：

(1) E-型迟滞荧光 它是由处于 T_1 态的分子经热活化后处于 S_1 态，然后自 S_1 态经历辐射跃迁而发射荧光。在这种情况下，单重态与三重态的布居是处于热平衡的，因而 E-型迟滞荧光的寿命与所伴随的磷光的寿命相同。该过程可简单表示如下：



(2) P-型迟滞荧光 这种类型的荧光，是由两个处于 T_1 态的分子相互作用（这种过程称为“三重态-三重态粒子湮没”），产生一个 S_1 态分子，再由 S_1 态发射的荧光。其过程可表示如下：



(3) 复合荧光 (recombination fluorescence) 这种荧光，其 S_1 态的布居是由自由基离子和电子复合或具有相反电荷的两个自由基离子复合而产生的。

从比较荧光与激发光的波长这一角度出发，荧光又可分为斯托克斯 (Stokes) 荧光、反斯托克斯荧光以及共振荧光。斯托克斯荧光的波长比激发光的长，反斯托克斯荧光的波长则比激发光的短，而共振荧光具有与激发光相同的波长。在溶液中观察到的通常是斯托克斯荧光。

由荧光在电磁辐射中所处的波段范围，又有 X 射线荧光、紫外荧光、可见荧光和红外荧光之分。

§ 1.4 荧光的激发光谱和发射光谱

既然荧光是一种光致发光现象，那么，由于分子对光的选择性吸收，不同波长的入射光便具有不同的激发效率。如果固定荧光的发射波长（即测定波长）而不断改变激发光（即入射光）的波长，并记录相应的荧光强度，所得到的荧光强度对激发波长的谱图称为荧光的激发光谱（简称激发光谱）。如果使激发光的波长和强度保持不变，而不断改变荧光的测定波长（即发射波长）并记录相应的荧光强度，所得到的荧光强度对发射波长的谱图则为荧光的发射光谱（简称发射光谱）。激发光谱反映了在某一固定的发射波长下所测量的荧光强度对激发波长的依赖关系；发射光谱反映了在某一固定的激发波长下所测量的荧光的波长分布。

激发光谱和发射光谱可用以鉴别荧光物质，并可作为进行荧光测定时选择合适的激发波长和测定波长的依据。

由于荧光测量仪器的特性，如光源的能量分布、单色器的透射率和检测器的敏感度都随波长而改变，因而一般情况下测得的激发光谱和发射光谱，皆为表观的光谱。同一份荧光化合物的溶液，在不同的荧光测量仪器上所测得的表观光谱，彼此间往往有所差异。只有对上述仪器特性的波长因素加以校正之后，所获得的校正光谱（或称真实光谱）才可能是彼此一致的。

某种化合物的荧光激发光谱的形状，理论上应与其吸收光谱的形状相同，然而由于上述仪器特性的波长因素，表观激发光谱的形状与吸收光谱的形状大都有所差异，只有校正的激发光谱才与吸收光谱非常相近。在化合物的浓度足够小，对不同波长激发光的吸收正比于其吸光系数，且荧光的量子产率与激发波长无关的条件下，校正的激发光谱在形状上将与吸收光谱相同。

化合物溶液的发射光谱通常具有如下特征。

§ 1.4.1 斯托克斯位移

在溶液的荧光光谱中，所观察到的荧光的波长总是大于激发光的波长。斯托克斯在 1852 年首次观察到这种波长移动的现象，因而称为斯托克斯位移。

斯托克斯位移说明了在激发与发射之间存在着一定的能量损失。如前所述，激发态分子在发射荧光之前，很快经历了振动松弛或/和内转化的过程而损失部分激发能，致使发射相对于激发有一定的能量损失，这是产生斯托克斯位移的主要原因。其次，辐射跃迁可能只使激发态分子衰变到基态的不同振动能级，然后通过振动松弛进一步损失振动能量，这也导致了斯托克斯位移。此外，溶剂效应以及激发态分子所发生的反应，也将进一步加大斯托克斯位移现象。

应当提及的是，在以激光为光源双光子吸收的情况下，会出现荧光测定波长（发射波长）比激发波长来得短的现象。

§ 1.4.2 发射光谱的形状通常与激发波长无关

虽然分子的吸收光谱可能含有几个吸收带，但其发射光谱却通常只含有一个发射带。绝大多数情况下即使分子被激发到 S_2 电子态以上的不同振动能级，然而由于内转化和振动松弛的速率是那样的快，以致很快地丧失多余的能量而衰变到 S_1 态的最低振动能级，然后发射荧光，因而其发射光谱通常只含一个发射带，且发射光谱的形状与激发波长无关，只与基态中振动能级的分布情况以及各振动带的跃迁概率有关。

不过也有例外，例如萘，由于其 S_1 与 S_2 两个电子态之间的能量间隔比一般分子来得大，因而它可能由 S_2 和 S_1 电子态发生荧光。又如某些荧光体具有两个

电离态，而每个电离态显示不同的吸收和发射光谱。

在 $\text{pH} \sim 9$ 的吡啶的甲醇溶液中，若以 313nm 或 365nm 光激发时，观察到的是通常的荧光光谱。然而，若以 385、405 或 436nm 光激发时，便会观察到光谱的突然红移，形状也有改变，该荧光光谱则是相应于吡啶阳离子的发射。这种现象被称为边缘激发红移（edge excitation red-shift，简称 EERS）现象，且被认为是与激发态的质子迁移反应有关。

§ 1.4.3 与吸收光谱呈镜像关系

图 1.2 分别表示遇的苯溶液和硫酸奎宁的稀硫酸溶液的吸收光谱和荧光发射光谱。可以看出，它们的荧光发射光谱与它们的吸收光谱之间存在着“镜像对称”关系。

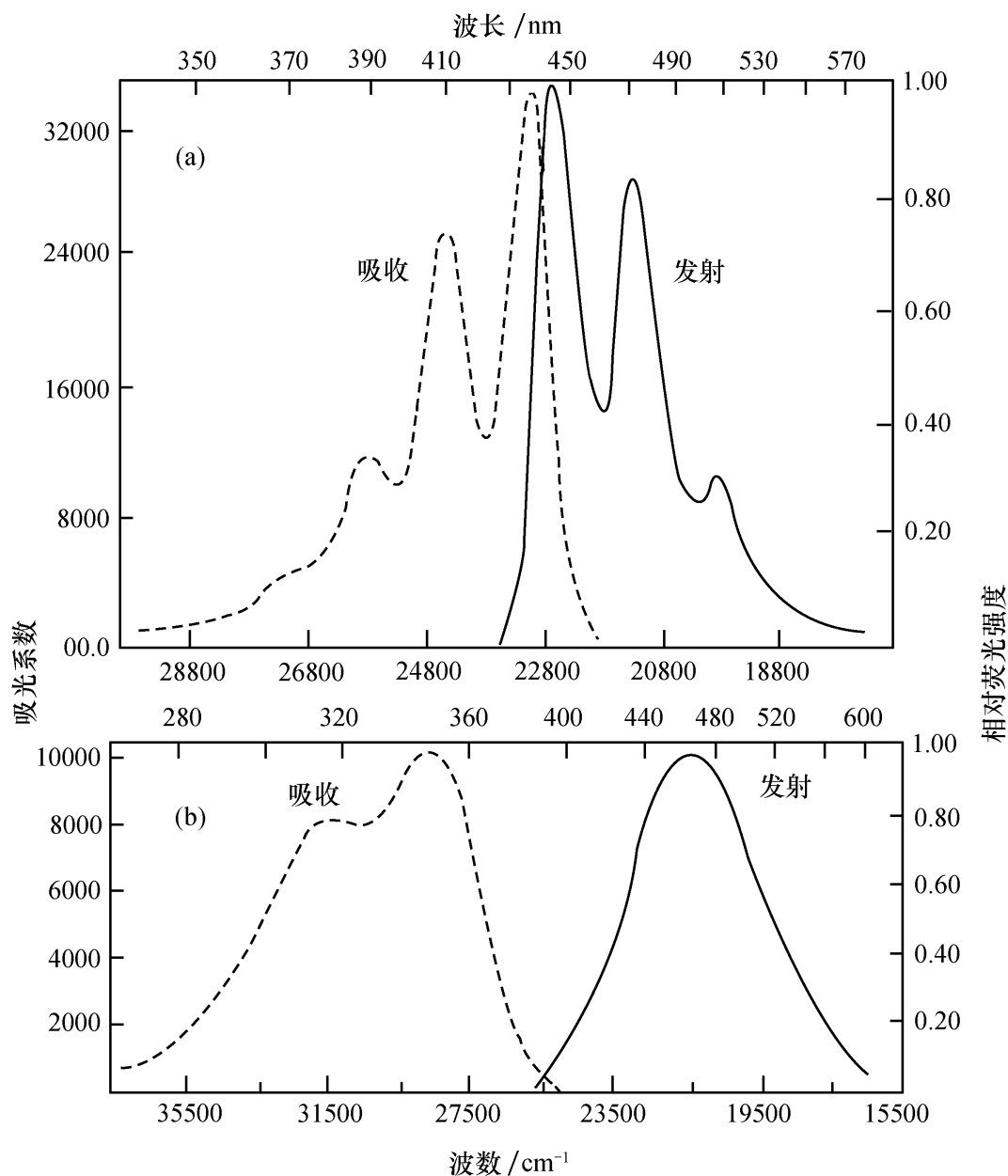


图 1.2 遇的苯溶液 (a) 和硫酸奎宁的稀硫酸溶液 (b) 的吸收光谱和荧光发射光谱

为何发射光谱与吸收光谱的第一吸收带之间呈“镜像对称”？这是因为荧光发射通常是由处于第一电子激发单重态最低振动能级的激发态分子的辐射跃迁而产生的，所以发射光谱的形状与基态中振动能级间的能量间隔情况有关。吸收光谱中的第一吸收带是由于基态分子被激发到第一电子激发单重态的各个不同振动能级而引起的，而基态分子通常是处于最低振动能级的，因而第一吸收带的形状与第一电子激发单重态中振动能级的分布情况有关。一般情况下，基态和第一电子激发单重态中振动能级间的能量间隔情况彼此相似。此外，根据 Frank-Condon 原理可知，如吸收光谱中某一振动带的跃迁概率大，则在发射光谱中该振动带的跃迁概率也大。由于上述两个原因，荧光发射光谱与吸收光谱的第一吸收带两者之间呈现“镜像对称”关系。

吸收光谱与发射光谱必须以适当的单位加以表示时，两者之间才会出现严格的镜像对称关系。当用 $\epsilon(\nu) \sim \nu$ 和 $F(\nu) \sim \nu^3$ 分别表示吸收光谱和发射光谱时，吸收光谱与发射光谱之间存在着最密切的镜像对称关系。 $\epsilon(\nu)$ 表示在波数 ν 的吸收系数， $F(\nu)$ 表示在波数增量 ($\Delta\nu$) 范围内的相对光子通量。

从图 1.2 中还可以看出，虽然吸收光谱与发射光谱中 0-0 振动带具有相同的能量，但两者的峰波长并不重合，发射光谱的 0-0 带略向长波方向移动。其原因是激发态的电子分布不同于基态，从而它们的永久偶极矩和极化率也有所不同，因而两者的溶剂化程度也有差异。室温下，溶液中的溶剂分子在吸光过程中来不及重新取向，因此分子在激发后的瞬间仍是处于一种比平衡条件下具有稍高能量的

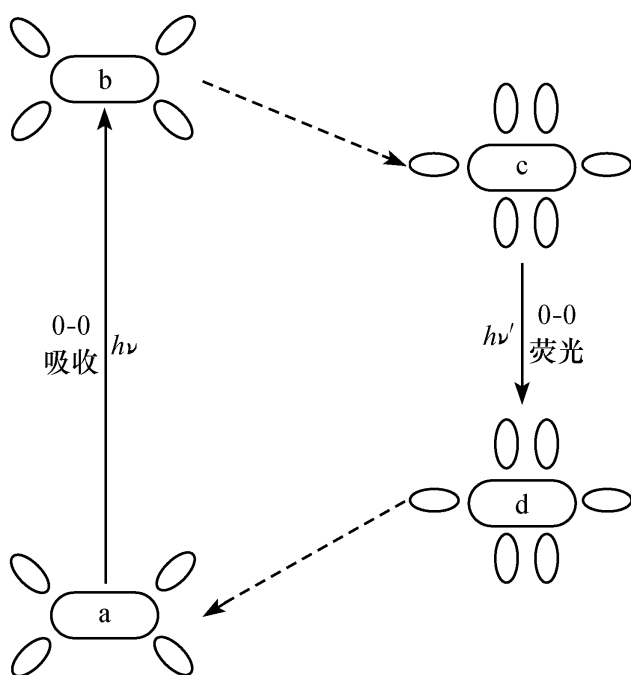


图 1.3 激发与发射后溶剂化的变化

a, c. 分别代表稳定的基态构型和激发态构型；
b, d. 分别代表不稳定的激发态构型和基态构型

的溶剂化状态。在荧光发射之前，分子将有时间松弛到能量较低的平衡构型。荧光发射后的瞬间，返回基态的分子的溶剂化状态还是处于能量稍高的非平衡构型，最后又松弛到基态的平衡构型。这一过程用图 1.3 表示，可以看出，虽然都为 0-0 跃迁，但光吸收过程所需的能量略高于光发射过程所释放的能量。两者的能量差在松弛过程中以热的形式传递给溶剂。

应用镜像对称规则，可以帮助判别某个吸收带究竟是属于第一吸收带中的另一振动带，还是更高电子态的吸收带。根据镜像对称规则，如不是吸收光谱镜像对称的荧光峰出现，表示有散射光或杂质存在。

诚然,也存在少数偏离镜像对称规则的现象,究其原因,或是由于激发态时核的几何构型与基态时不同,或是由于在激发态时发生了质子转移反应或形成激发态二聚体(或激发态复合物)等而引起的。

§ 1.5 荧光寿命和荧光量子产率

荧光寿命和荧光量子产率是荧光物质的重要发光参数。荧光寿命(τ)定义为当激发光切断后荧光强度衰减至原强度的 $1/e$ 所经历的时间。它表示了荧光分子的 S_1 激发态的平均寿命。

$$\tau = 1 / \left[k_f + \sum K \right] \quad (1.1)$$

式中: k_f 表示荧光发射的速率常数; $\sum K$ 代表各种分子内的非辐射衰变过程的速率常数的总和。

荧光发射是一种随机的过程,只有少数激发态分子才是在 $t=\tau$ 的时刻发射光子的。荧光的衰变通常属于单指数衰变过程,这意味着在 $t=\tau$ 之前有 63% 的激发态分子已经衰变了,37% 的激发态分子则在 $t>\tau$ 的时刻衰变。

激发态的平均寿命与跃迁概率有关,两者的关系可大致表示为

$$\tau \approx 10^{-5} / \epsilon_{\max} \quad (1.2)$$

式中: $\epsilon_{\max}$ 为最大吸收波长下的摩尔吸光系数(单位以 m^2/mol 表示)。 $S_0 \rightarrow S_1$ 是许可的跃迁,一般情况下 ϵ 值约为 10^3 ,因而荧光的寿命大致为 10^{-8} s ; $S_0 \rightarrow T_1$ 的跃迁是自旋禁阻的, ϵ 值约为 10^{-3} ,因而磷光的寿命大致为 10^{-2} s 。

没有非辐射衰变过程存在的情况下,荧光分子的寿命称为内在的寿命(intrinsic lifetime),用 τ_0 表示

$$\tau_0 = 1 / k_f \quad (1.3)$$

荧光强度的衰变,通常遵从以下方程式

$$\ln I_0 - \ln I_t = t / \tau \quad (1.4)$$

式中: I_0 与 I_t 分别表示 $t=0$ 和 $t=t$ 时刻的荧光强度。如果通过实验测量出不同时刻所相应的 I_t 值,并作出 $\ln I_t \sim t$ 的关系曲线,由所得直线的斜率便可计算荧光寿命值。

荧光量子产率(Y_f)定义为荧光物质吸光后所发射的荧光的光子数与所吸收的激发光的光子数之比值。由于激发态分子的衰变过程包含辐射跃迁和非辐射跃迁,故荧光量子产率也可表示为

$$Y_f = k_f / (k_f + \sum K) \quad (1.5)$$

可见荧光量子产率的大小取决于荧光发射过程与非辐射跃迁过程的竞争结果。假如非辐射跃迁的速率远小于辐射跃迁的速率,即 $\sum K \ll k_f$, Y_f 的数值便接近于

1. 通常情况下, Y_f 的数值总是小于 1。 Y_f 的数值越大, 化合物的荧光越强。 荧光量子产率的数值大小, 主要决定于化合物的结构与性质, 同时也与化合物所处的环境因素有关。

除荧光量子产率外, 在以往的著作中也曾出现“荧光的能量产率”和“荧光量子效率”等术语, 并且不加区别地应用。 文献上分别给后两个术语以不同的定义。 荧光的能量产率用 Y_{ef} 表示, 定义为荧光所发射的能量与所吸收的能量的比值。 由于存在斯托克斯位移现象, 荧光的能量产率也总是小于 1。 荧光量子效率用 η_f 表示, 定义为处于发射荧光的激发电子态的分子百分数。

荧光量子产率的数值, 有多种测定方法, 这里仅介绍参比的方法。 这种方法是通过比较待测荧光物质和已知荧光量子产率的参比荧光物质两者的稀溶液在同样激发条件下所测得的积分荧光强度(即校正的发射光谱所包括的面积)和对该激发波长入射光的吸光度而加以测量的。 测量结果按下式计算待测荧光物质的荧光量子产率,

$$Y_u = Y_s \cdot \frac{F_u}{F_s} \cdot \frac{A_s}{A_u} \quad (1.6)$$

式中: Y_u 、 F_u 和 A_u 分别表示待测物质的荧光量子产率、积分荧光强度和吸光度; Y_s 、 F_s 和 A_s 分别表示参比物质的荧光量子产率、积分荧光强度和吸光度。

有分析应用价值的荧光化合物, 其荧光量子产率的数值通常处于 0.1~1 之间。

任何能影响激发态分子的光物理过程的速率常数的因素, 都将使荧光的寿命和量子产率发生变化。 例如, 随着温度的升高, 由于增大非辐射跃迁过程的速率常数, 从而使荧光的寿命和量子产率下降; 具有重原子或非键电子的分子, 通常具有较高的 $S_1 \rightsquigarrow T_1$ 系间窜越的速率常数, 从而使荧光的寿命缩短, 量子产率下降。

§ 1.6 荧光强度与溶液浓度的关系

荧光既然是物质在吸光之后所发射的辐射, 因而溶液的荧光强度 (I_f) 应与该溶液吸收的光强度 (I_a) 及该物质的荧光量子产率 (Y_f) 有关, 即

$$I_f = Y_f I_a \quad (1.7)$$

而吸收的光强度等于入射的光强度 (I_0) 减去透射的光强度 (I_t), 于是

$$I_f = Y_f (I_0 - I_t) = Y_f I_0 (1 - I_t / I_0) \quad (1.8)$$

从比尔-朗伯定律可知 $I_t / I_0 = e^{-abc}$, 因此

$$I_f = Y_f I_0 (1 - e^{-abc}) \quad (1.9)$$

而 e^{-abc} 可以表示为

$$e^{-abc} = 1 - abc + (abc)^2 / 2! - (abc)^3 / 3! + (abc)^4 / 4! + \cdots \quad (1.10)$$

当 abc 非常小 ($\ll 0.05$) 时, $e^{-abc} \approx 1 - abc$, 代入式 (1.9) 后得

$$I_f = Y_f I_0 abc \quad (1.11)$$

当用摩尔吸光系数 ϵ 代替 a 时,

$$I_f = 2.303 Y_f I_0 \epsilon bc \quad (1.12)$$

由式 (1.12) 可以知道, 对于某种荧光物质的稀溶液, 在一定的频率及强度的激发光照射下, 当溶液的浓度足够小使得对激发光的吸光度很低时, 所测溶液的荧光强度才与该荧光物质的浓度成正比。然而, 如果 $\epsilon bc \geq 0.05$ 时, 则荧光强度和溶液的浓度不呈线性关系, 此时应考虑幂级数中的二次方甚至三次方项。

随着溶液浓度的进一步增大, 将会出现荧光强度不仅不随溶液浓度线性增大, 甚至随着浓度的增大而下降的现象, 这是由浓度效应而导致的。这种浓度效应可能由以下几方面的原因造成的。

第一方面的原因是内滤效应。当溶液浓度过高时, 溶液中杂质对入射光的吸收作用增大, 相当于降低了激发光的强度。另一方面, 浓度过高时, 入射光被液池前部的荧光物质强烈吸收后, 处于液池中、后部的荧光物质, 则因受到的入射光大大减弱而使荧光强度大大下降; 而仪器的探测窗口通常是对准液池中部的, 从而导致了所检测到的荧光强度大大下降。

其次, 在较高浓度的溶液中, 可能发生溶质间的相互作用, 产生荧光物质的激发态分子与其基态分子的二聚物 (excimer) 或与其他溶质分子的复合物 (exciplex), 从而导致荧光光谱的改变和/或荧光强度的下降。当浓度更大时, 甚至会形成荧光物质的基态分子聚集体, 导致荧光强度更严重地下降。

假如荧光物质的发射光谱与其吸收光谱呈现重叠, 便可能发生所发射的荧光被部分再吸收的现象, 导致荧光强度下降。溶液的浓度增大时会促使再吸收的现象加剧。

§ 1.7 散射光对荧光分析的影响

在测量溶液的荧光强度时, 通常应注意溶剂的散射光 (瑞利散射和拉曼散射)、胶粒的散射光 (丁铎尔效应) 以及容器表面的散射光的影响问题。上述几种散射光除拉曼散射外均具有与激发光相同的波长。拉曼散射光的波长与激发波长不同, 通常要比激发波长稍长一些, 且随激发波长的改变而改变, 但与激发波长维持一定的频率差。

图 1.4 为奎宁的 0.05 mol/L 硫酸溶液在 320 nm 激发波长下所观测到的荧光光谱。谱图中 320 nm 的峰为瑞利散射和丁铎尔散射, 360 nm 的峰为溶剂的拉曼散射, 450 nm 的峰才是奎宁硫酸盐的荧光峰, 而 640 nm 和 720 nm 的峰则分别为二级瑞利散射与丁铎尔散射和二级拉曼散射。除荧光峰外, 其他由散射光引起的峰都将在空白试验中出现。

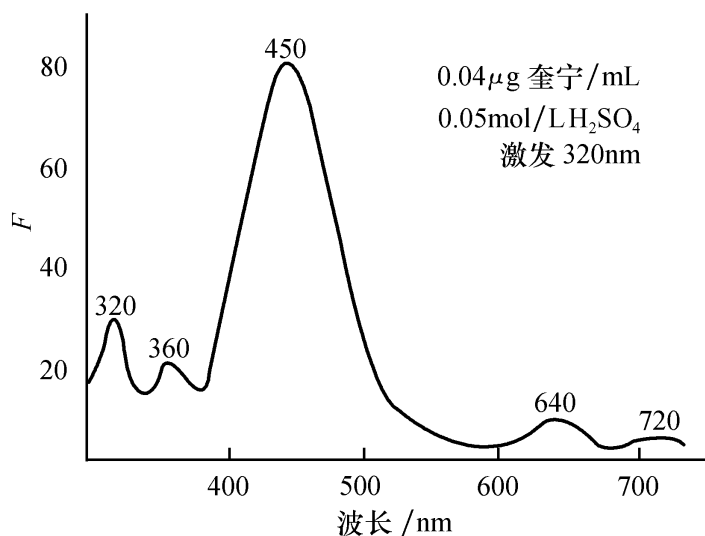


图 1.4 奎宁硫酸盐溶液的荧光光谱

拉曼光发生的时间比荧光发生的时间约快 10^7 倍，但其强度很弱，仅及荧光强度的数千分之一。如上所述，拉曼光没有固定的波长，其波长随激发波长的改变而改变，但拉曼光的频率与激发光的频率却有一定的差值。如将某些双原子分子的主拉曼线和激发光的频率差值，与这些分子的近红外光谱的主吸收谱带的频率相比较，两者数值相当符合，足见主拉曼线的形成是由于分子和光子相互作用时振动能级跃迁的结果。在主拉曼线左右的弱拉曼线，是由于分子和光子相互作用时转动能级发生跃迁的结果。拉曼谱线与激发线的频率差值是分子的振动能级与转动能级跃迁的结果，是分子及分子中各种基团和键的特性。因此，拉曼谱线常用于分子结构的研究。

拉曼光的频率与激发光的频率之间的差值既然相当于分子的振动-转动频率，因此，对于某一给定的物质，频率差值或波数差值是固定的常数值，和激发光的频率无关。例如水在不同的汞射线的照射之下，它的拉曼光的频率随激发光的频率而异，但波数的差值却保持在 $0.335 \sim 0.340 \mu\text{m}^{-1}$ 。

由图 1.5 可看出水溶剂的拉曼光对奎宁硫酸盐溶液的荧光的干扰情况。用 365nm 射线为激发光时，水溶剂的拉曼光的波长是 416nm 。在测绘浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的奎宁硫酸盐溶液的荧光光谱时，因仪器的灵敏度调得不高，溶剂的拉曼光的干扰还不大明显，但在测绘浓度为 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 的溶液的荧光光谱时，因需调高仪器的灵敏度，这时候拉曼光的强度随之加大，它的峰高甚至高过奎宁硫酸盐的荧光峰，干扰相当严重。

散射光的干扰常是提高荧光分析灵敏度的主要限制因素，因而实际工作中要注意加以克服。选择适当的激发波长和测定波长，可以大大降低或排除散射光的影响。在测量微弱的荧光强度时，常要加大狭缝宽度以获得足够的荧光强度测量值，但狭缝加大后散射光的影响也将加大，因而实际测定时应选择合适的狭缝宽

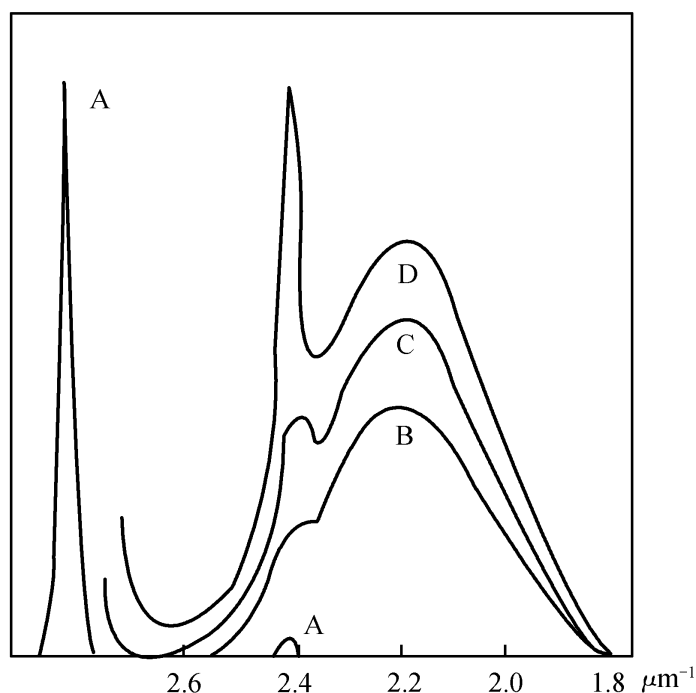


图 1.5 硫酸奎宁的荧光光谱受水溶剂的拉曼光的干扰

A. 水溶剂的拉曼光，低灵敏度；B. $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液，低灵敏度；

C. $0.033\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液，较高灵敏度；D. $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液，更高灵敏度

度。通过空白测定，亦可对散射光的影响进行校正。

§ 1.8 荧光分析法的灵敏度和选择性

荧光分析法之所以发展如此迅速，应用日益广泛，其原因之一是荧光分析法具有很高的灵敏度。在微量物质的各种分析方法中，应用最为广泛的至今仍首推比色法和分光光度法。但在方法的灵敏度方面，荧光分析法的灵敏度一般要比这两种方法高 2~3 个数量级。在吸收光度法中，是由吸光度的数值来测定试样溶液中吸光物质的含量，而吸光度的数值则决定于溶液的浓度、光程的长度和该吸光物质的摩尔吸光系数，几乎与入射光的强度无关。在荧光分析中，是由所测得的荧光强度来测定试样溶液中荧光物质的含量，而荧光强度的测量值不仅和被测溶液中荧光物质的本性及其浓度有关，而且与激发光的波长和强度以及荧光检测器的灵敏度有关。加大激发光的强度，可以增大荧光强度，从而提高分析的灵敏度。不过对于光敏物质来说，激发光强度的增大程度应有所限制，否则会加大荧光物质的光解作用。随着现代电子技术的发展，对于微弱光信号检测的灵敏度已大大提高，因此荧光分析的灵敏度一般都高于吸收光度法。荧光分析的灵敏度常可达亿分之几，目前，在与毛细管电泳分离技术结合、采用激光诱导荧光检测法时，已能接近或达到单分子检测的水平^[19]。荧光分析的另一个优点是选择性高。这主要是指有机化合物的分析而言。吸光物质由于内在本质的差别，不一定会发荧光，况且，发荧光的物质彼此之间

在激发波长和发射波长方面可能有所差异，因而通过选择适当的激发波长和荧光测定波长，便可能达到选择性测定的目的。此外，由于荧光的特性参数较多，除量子产率、激发与发射波长之外，还有荧光寿命、荧光偏振等。因此，还可以通过采用同步扫描、导数光谱、三维光谱、时间分辨和相分辨等一些荧光测定的新技术，以进一步提高测定的选择性。

至于金属离子的荧光分析法，其选择性并不高，这是由于许多金属离子常与同一有机试剂组成结构相近的配合物，而这些配合物的荧光发射波长又极为靠近的缘故。

除灵敏度高和选择性好之外，动态线性范围宽，方法简便，重现性好，取样量少，仪器设备不复杂等等，也是荧光分析法的优点。

当然，荧光分析法也有其不足之处。由于不少物质本身不发荧光，不能进行直接的荧光测定，从而妨碍了荧光分析应用范围的扩展。因此，对于荧光的产生与化合物结构的关系还需要进行更深入的研究，以便合成为数更多的灵敏度高、选择性好的新荧光试剂，使荧光分析的应用范围进一步扩大。

§ 1.9 荧光表征

荧光光谱分析法除了可以用作组分的定性检测和定量测定的手段之外，还被广泛地作为一种表征技术应用于表征所研究体系的物理、化学性质及其变化情况。例如，在生命科学领域的研究中，人们经常可以利用荧光检测的手段，通过检测某种荧光特性参数（如荧光的波长、强度、偏振和寿命）的变化情况来表征生物大分子在性质和构象上的变化。

许多化合物由于本身具有大的共轭体系和刚性的平面结构，因而具有能发射荧光的内在本质，我们称这些化合物为荧光化合物。在某些所要研究的体系中，由于体系自身含有这种荧光团（或称荧光体，fluorophore）而具有内源荧光，人们就可以利用其内源荧光，通过检测某种荧光特性参数的变化，对该体系的某些性质加以研究。例如，由于蛋白质分子中含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等残基，因而具有内源荧光，我们就可能利用蛋白质的内源荧光性质，应用荧光光谱法对蛋白质的结构与性质方面加以研究。然而，如果所要研究的体系本身不含有荧光团而不具有内源荧光，或者其内源荧光性质很弱，这时候就必需在体系中外加一种荧光化合物即所谓荧光探针，再通过测量荧光探针的荧光特性的变化来对该体系加以研究。例如我们要检测体系的 pH（或极性或黏度），便可以将对 pH（或极性或黏度）敏感的荧光探针加入到体系中，然后通过对荧光探针的荧光特性的检测，求得体系的 pH（或极性或黏度），或通过探针的荧光特性的变化来表征体系的 pH（或极性或黏度）的变化情况。

参 考 文 献

- [1] 陈国珍等. 荧光分析法. 第二版. 北京: 科学出版社, 1990: 1~3.
- [2] Wehry E. L. Ed. Modern Fluorescence Spectroscopy. Vol. 1. New York: Plenum Press, 1976.
- [3] Wehry E. L. Ed. Modern Fluorescence Spectroscopy. Vol. 2. New York: Plenum Press, 1976.
- [4] Wehry E. L. Ed. Modern Fluorescence Spectroscopy. Vol. 3. New York: Plenum Press, 1981.
- [5] Wehry E. L. Ed. Modern Fluorescence Spectroscopy. Vol. 4. New York: Plenum Press, 1981.
- [6] Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983.
- [7] Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1999.
- [8] Lakowicz J. R. Ed. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Techniques. Vol. 1. New York: Plenum Press, 1991.
- [9] Lakowicz J. R. Ed. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles. Vol. 2. New York: Plenum Press, 1991.
- [10] Lakowicz J. R. Ed. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Biochemical Applications. Vol. 3. New York: Plenum Press, 1992.
- [11] Lakowicz J. R. Ed. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Probe Design and Chemical Sensing. Vol. 4. New York: Plenum Press, 1994.
- [12] Lakowicz J. R. Ed. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence. Vol. 5. New York: Plenum Press, 1997.
- [13] Schulman S. G. Ed. Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications. Part 1. New York: John Wiley & Sons, 1985.
- [14] Schulman S. G. Ed. Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications. Part 2. New York: John Wiley & Sons, 1988.
- [15] Schulman S. G. Ed. Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications. Part 3. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- [16] Guilbault G. G. Ed. Practical Fluorescence. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1990.
- [17] Baeyens W. R. G., De Keukeleire D., Korkidis K. Eds. Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis. New York: Marcel Dekker, 1991.
- [18] Wolfbeis O. S. Ed. Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.
- [19] 慈云祥等. 生命科学中的荧光光谱分析//高鸿主编. 分析化学前沿. 北京: 科学出版社, 1991: 31.

(本章编写者: 许金钩)

第二章 荧光与分子结构的关系

为了更有效地运用荧光分析技术，人们有必要了解荧光与荧光体结构的关系，以便能把非荧光体转变为荧光体，把弱荧光体转变为强荧光体。下面将对有机物和无机物的荧光特性与结构的关系进行介绍。

§ 2.1 有机化合物的荧光

荧光体的荧光（或磷光）发生于荧光体吸光之后，因此，荧光体要发光首先要吸收光，即荧光体要有吸光的结构。

发荧光的荧光体，大多为有机芳族化合物或它们与金属离子形成的配合物。这类化合物在紫外线区和可见光区的吸收光谱和发射光谱，都是由该化合物分子的价电子重新排列（跃迁）引起的，为此，我们有必要着重探讨荧光体分子价电子和分子轨道的特性。

§ 2.1.1 分子的电子结构^[1,3]

1. σ 键

沿核间连线方向由电子云重叠而形成的化学键称为 σ 键，每个键可容纳两个电子。 σ 键可分为共价键和配位键两种，共价键的两个电子分别来自两个原子，配位键两个电子来自同一原子而后由两个原子共享。当电子云集中于其中一原子时，这种键称为极性共价键。 σ 键的电子云多集中于两原子之间，原子间结合较牢，因此，要使这类电子激发到空着的反键轨道上去，就需要有相当大的能量，这就意味着分子的 σ 键的电子跃迁发生于真空紫外区（波长短于200nm），这种键的跃迁我们不感兴趣，我们感兴趣的是吸收光谱位于近紫外线区至近红外线区，即波长落于220~800nm区。

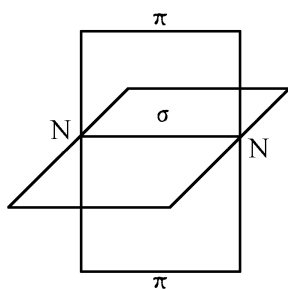


图 2.1 N_2 分子的三键示意图

2. π 键

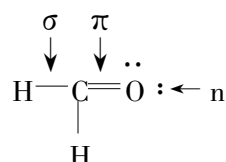
当两个原子的轨道（p 轨道）从垂直于成键原子的核间连线的方向接近，发生电子云重叠而成键，这样形成的共价键称为 π 键。 π 键通常伴随 σ 键出现， π 键的电子云分布在 σ 键的上下方，图 2.1 为 N_2 分子三键的示意图。 σ 键的电子被紧紧地定域在成键的两个原子之间， π 键的电子相反，它可以在分子中自由移动，并且常常分布于若干原子之间。如果

分子为共轭的 π 键体系，则 π 电子分布于形成分子的各个原子上，这种 π 电子称为离域 π 电子， π 轨道称为离域轨道。某些环状有机物中，共轭 π 键延伸到整个分子，例如多环芳烃就具有这种特性。

由于 π 电子的电子云不集中在成键的两原子之间，所以它们的键合远不如 σ 键牢固，因此，它们的吸收光谱出现在比 σ 键所产生的波长更长的光区。单个 π 键电子跃迁所产生的吸收光谱位于真空紫外区或近紫外线区；有共轭 π 键的分子，视共轭度大小而定，共轭度小者其 π 电子跃迁所产生的电子光谱于紫外线区，共轭度大者则位于可见光区或近红外线区。

3. 未成键的电子（亦称 n 电子）

在元素周期表中，有些元素的原子，其外层电子数多于 4（例如 N，O 和 S），它们在化合物中往往有未参与成键的价电子，这些电子称为 n 电子，例如甲醛



中有 4 个未参与键合的 n 电子。因为 n 电子的能量比 σ 电子和 π 电子的都高，因此，在考虑电子光谱时，应该首先考虑 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。

4. 配位共价键

一般地说，分子中的 n 电子对不参与成键，但当它们遇到合适的接受体时，其电子可能转入接受体的空轨道上而形成配位共价键。共价键是否形成，对解释具有 n 电子的荧光体的吸收光谱、发射光谱和荧光强度的变化很有帮助。

5. 反键轨道

物质的分子，除了组成分子化学键的那些能量低的分子轨道外，每个分子还具有一系列能量较高的分子轨道。在一般的情况下，能量较高的轨道是空着的，如果给分子以足够的能量，那么能量较低电子可能被激发到能量较高的那些空着的轨道上去，这些能量较高的轨道称为反键轨道。

根据价键轨道理论，有机物分子中的价电子也是排列在能量不同的轨道上，这些轨道能量高低顺序为 σ 轨道 $<$ π 轨道 $<$ n 轨道 $<$ π^* 轨道 $<$ σ^* 轨道（见图 2.2）。

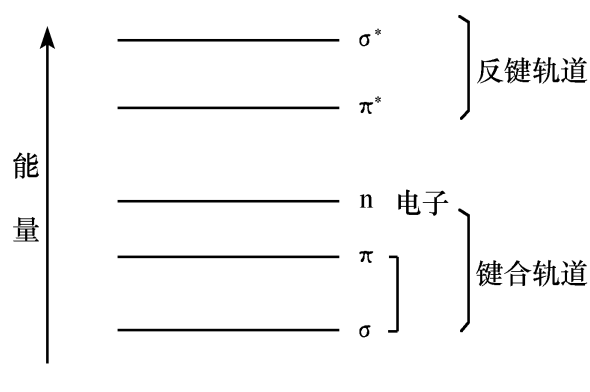


图 2.2 有机分子吸光所涉及的能层

跃迁类型	$\epsilon_{\text{最大}}$	波长区
$n \rightarrow \pi^*$	100	紫外-可见
$\pi \rightarrow \pi^*$	12 000	紫外-可见
$\sigma \rightarrow \pi^*$	200	真空-紫外

6. 轨道及状态

大部分有机物分子，其紫外-可见区的电子光谱（吸光和发光）仅涉及 π 电子和 n 电子的跃迁。为了使分子电子结构的讨论简化，通常都把 σ 电子和原子内层电子的影响略去不计。

分子的电子激发态：分子一旦吸收光子，分子的价电子（或 n 电子）就由基态分子中已被占据的轨道激发到基态未被占据的轨道上去，这种分子称为电子激发态分子。

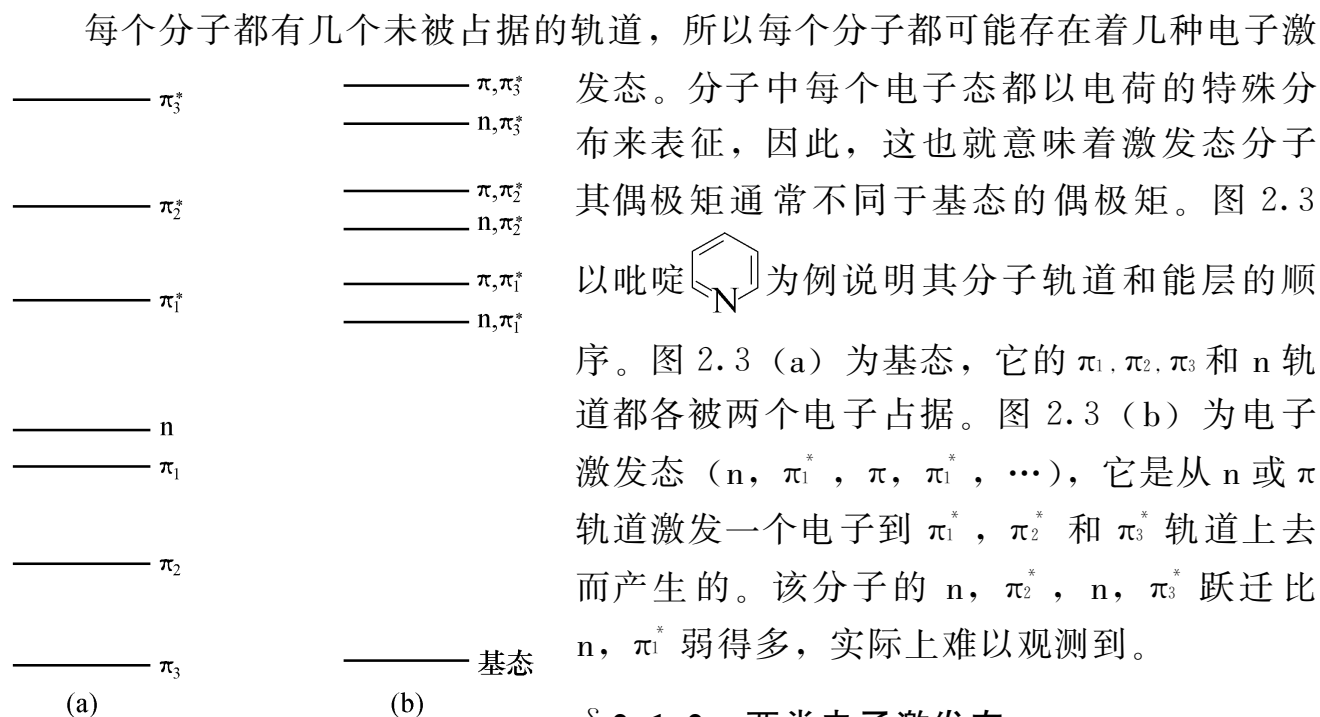


图 2.3

(a) 吡啶的分子轨道及能层顺序；

(b) 吡啶分子较低电子激发态的能层顺序

§ 2.1.2 两类电子激发态

化学中讨论的分子，一般是指处在电子基态的分子。这些分子里的价电子数目大多数是偶数的，即二的整数倍，电子绕着它本身的轴旋转，称为自旋，一半的自旋方向正好和另一半的自旋方向相反，所以价电子自旋的总和（自旋角动量数）刚好互相抵消为 0，这一类分子我们称它为处于单线态。个别物质的分子，正向自旋和反向自旋数并不相等，两者相差为 2，自旋总和抵消不了，我们称这类分子处于三线态（例如 O_2 ）。

激发态和基态分子相似，也有单线态和三线态两类，前者的自旋角动量子数为 0，后者为 1。

单线态的电子基态 (S_0) 的分子被激发时，容易跃迁到单线态的电子激发态 ($S_1, S_2, \dots$)，而不容易跃迁到三线态的电子激发态 ($T_1, T_2, \dots$)，因为后一种为电子自旋不允许的禁戒 (forbidden) 跃迁。同样 $T_0 \rightarrow T_1$ 或 $T_1 \rightarrow T_0$ 容易， $T_1 \rightarrow S_0$ 或 $S_1 \rightarrow T_0$ 难。

荧光（或磷光）所涉及的分子，其基态都处于单线态。当分子吸收适当波长的光子后，一个或多个的成对电子（通常为 π 电子）跃迁到单线态的电子激发态，其电子自旋方向没有变，自旋净结果仍为 0，但在某些情况下，多少总有些单线态的电子激发态分子，通过系间跨越转入三线态的电子激发态（ T_1 ），而后由三线态的最低振动能层返回电子基态并发射出磷光。

图 2.4 表明处于单线态的电子基态和电子激发态分子与处于三线态的电子激发态的差别，图的左边为分子处于单线态电子基态，图中部为分子处于单线态电子激发态，图的右边为分子处于三线态电子激发态。

T_{π, π^*} 通常低于 T_{n, π^*} ：如果单线态 S_1 是 π, π^* 型，那么通过系间跨越将使分子迅速转为三线态 T_1 的 π, π^* 型。可是，如果单线态 S_1 是 n, π^* 型，那么三线态 T_1 可能是 n, π^* 型（例如苯甲醛、乙酰苯和苯乙酮），也可能是 π, π^* 型，后者较为常见。 T_1 的 π, π^* 能层低于 T_1 的 n, π^* 能层的原因被解释为， T_1 的 π, π^* 态电子的离域性比 T_1 的 n, π^* 态的离域性大得多，因而 T_1 的 π, π^* 态电子间的斥力比 T_{n, π^*} 小，造成 S_1 的 π, π^* 与 T_1 的 π, π^* 能层间隔比 S_1 的 n, π^* 与 T_1 的 n, π^* 能层间隔大，结果 T_1 的 π, π^* 能层位于 T_1 的 n, π^* 能层下方（见图 2.5）。

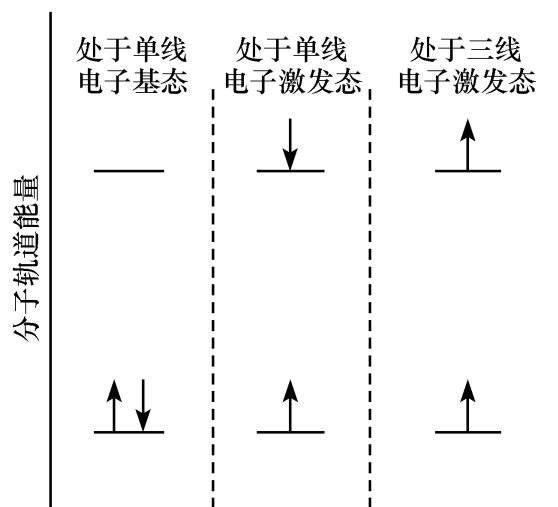


图 2.4 处于单线态和三线态下的分子的 π 电子受激发

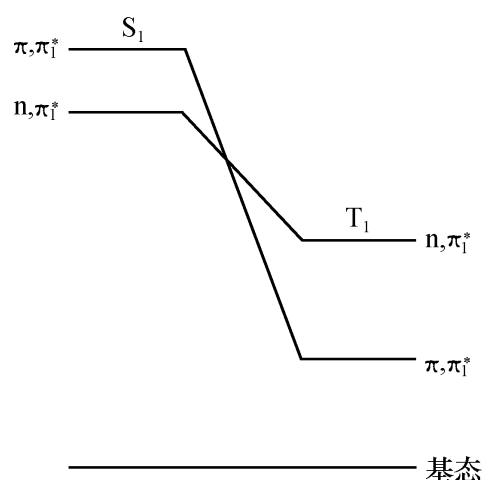


图 2.5 S_1 的 π, π^* ， n, π^* 与 T_1 的 π, π^* ， n, π^* 能层的分布示意图

§ 2.1.3 荧光与分子结构的关系

已知的大量有机和无机物中，仅有小部分会发生强的荧光，它们的激发光谱、发射光谱和荧光强度都与它们的结构有密切的关系。要了解荧光与结构的关系，就必需了解分子的吸光类型（例如 $n \rightarrow \pi^*$ 或 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁），以及分子吸光后各个过程的竞争情况。当分子因吸光而被激发到电子激发态后，它可能以一系列的不同途径失去本身过剩的能量而返回电子基态，这些途径有：①发射荧光；②非辐射衰减（内转换）；③光化学反应。这三者中哪个过程的速率常数最大，