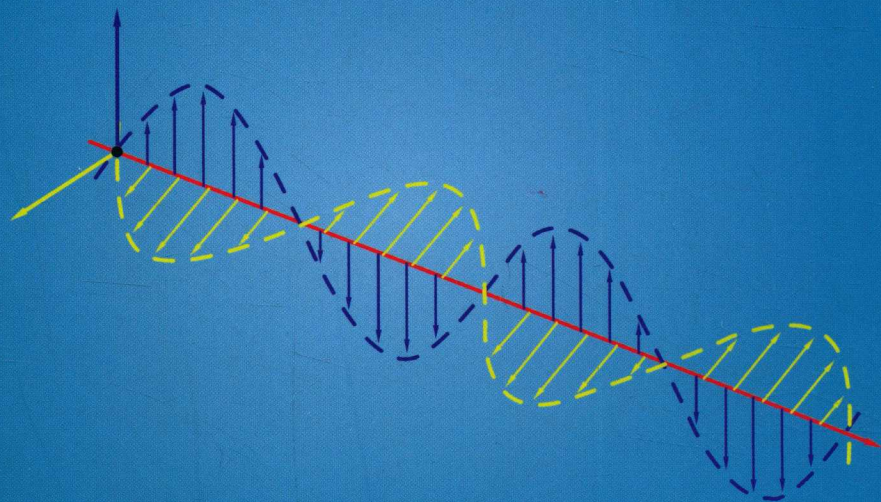


纳米贵金属组装体 表面增强荧光效应

顾雪凡 著



科学出版社

纳米贵金属组装体 表面增强荧光效应

顾雪凡 著



“西安石油大学优秀学术著作出版基金”

国家自然科学基金“分子识别功能纳米核壳组装体构造及其
金属增强荧光效应”(21505103) 资助出版

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书对纳米贵金属组装体表面增强荧光效应作了较为全面的介绍。从荧光光谱法基本概念和原理入手,阐述了表面荧光增强现象、机理、理论基础;特别关注了能够作为具有优良表面增强荧光效应贵金属纳米颗粒组装体组件的金、银纳米颗粒制备,着眼于不同尺寸和形貌金、银纳米颗粒的制备方法,探讨了不同构造子以不同组装方式构建不同结构组装体;阐述了拥有多级结构和形貌的贵金属纳米颗粒组装体能够有效调控其局域表面等离子体共振的典型实例,展现了表面增强荧光效应的多样性应用。

本书可作为化学、材料、物理以及生命科学等相关专业科研人员的参考书籍,也可供高等院校相关专业师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

纳米贵金属组装体表面增强荧光效应/顾雪凡著. —北京:科学出版社, 2015. 9

ISBN 978-7-03-045830-8

I. ①纳… II. ①顾… III. ①贵金属-纳米材料-荧光分析 IV. ①TB383

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 230389 号

责任编辑:祝 洁 杨向萍 孙静惠/责任校对:桂伟利

责任印制:徐晓晨/封面设计:红叶图文

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>

北京中石油彩色印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 10 月第 一 版 开本:720×1000 B5

2015 年 10 月第一次印刷 印张:21 1/4

字数:426 000

定价:125.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

表面等离子体共振促使粒子表面局域电磁场激增,进而引起金属纳米颗粒表面产生类似“光学天线”的效应,并产生表面增强光谱这一奇妙的物理现象。基于这一原理,可实现金属纳米颗粒表面探针分子光谱信号的显著增强,从而极大地提高光谱分析的灵敏度。与此相关的研究已经成为纳米光学领域的研究热点之一,本书所阐述的表面增强荧光光谱就是其中典型的一种。

本书在系统论述荧光光谱法、局域表面等离子体共振(LSPR)效应、金属增强荧光(MEF)效应相关理论的基础上,集中阐述了具有优良MEF效应贵金属纳米颗粒组装体组件的Au、Ag纳米颗粒制备,尤其介绍了对MEF效应密切相关的Au、Ag纳米颗粒尺寸和形貌的调控方法、不同结构纳米贵金属组装体构建方法;从组装体结构与LSPR关联性,阐述了纳米贵金属组装体MEF效应的优势及多样性应用。

本书分为6章。第1章概述了荧光光谱,包括荧光现象、荧光光谱特点、荧光光谱产生原理以及荧光光谱法发展与应用。第2章介绍了局域表面等离子体共振效应,系统介绍了包括光的偏振、光散射、经典Mie光散射理论、Gans理论在内的LSPR效应相关理论基础,比较分析了时域有限差分法(FDTD)、离散偶极近似理论(DDA)、边界元方法(BEM)等三种常用理论模拟方法;详细讨论了金属纳米粒子种类、尺寸、形貌以及所处介质微环境对于LSPR效应的影响。第3章着重介绍了表面增强荧光效应及其产生机制,并将其与表面拉曼增强效应进行了比较。第4章从胶体化学角度不仅论述了制备具有不同LSPR效应的多种尺寸和形貌无机纳米颗粒的方法,而且阐述了拥有多级结构和形貌的贵金属纳米颗粒组装体典型实例。第5章介绍了贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应,深入分析了贵金属纳米颗粒组装体耦合LSPR机制及其对表面增强荧光效应的影响,全面讨论了贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应适宜距离调控策略和常见研究体系。第6章介绍了贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应的应用研究,包括生命分析、单分子荧光检测以及荧光共振能量转移作用等方面的应用研究。在上述各章节内容的介绍中,引用了国际相关专业主流学术期刊的研究工作,尤其是业内具有一定影响力的课题组的工作。在内容撰写过程中,尽量遵从原文,避免过多的主观分析和推断,便于读者进行独立的思考与判断,体会研究

工作本身的科学性和创造性。

感谢西安石油大学优秀学术著作出版基金和博士启动资金 [2015BS (5)] 资助出版, 感谢国家自然科学基金青年基金项目 (21505103) 资助, 感谢西安石油大学“快速分离分析新材料及新技术”学术创新团队的大力支持。

本书的撰写自始至终得到了陕西师范大学材料科学与工程学院胡道道教授、西安交通大学生命科学与技术学院吴道澄教授和吴宥伸博士、西安石油大学化学化工学院张智平教授的指导与关怀, 在此向他们表示由衷的感谢。本书选用了参考文献中的部分图表, 在此向有关作者表示衷心感谢。

本书自筹备之日起即得到西安石油大学化学化工学院秦芳玲副教授的鼓励与帮助, 方能有幸与科学出版社结缘, 在此特别感谢这位良师益友。科学出版社的祝洁编辑拥有扎实的专业素养与极强的敬业精神, 对于本书的顺利出版给予了莫大的帮助与推动, 在此对她表示由衷的感谢。

最后感谢我的家人们, 没有他们长期以来的鼎力扶持, 我无法专注地倾入学术研究。尤其是我的母亲无私而忘我的付出成全了我的专业诉求, 我的爱人朴素而真挚的爱让我邂逅了我所追寻的自己, 我的儿子稚嫩而珍贵的理解化作了排除万难的动力。

作者力求将理想的各章节内容奉献给读者, 但由于学识有限, 加之时间仓促, 书中难免有不当之处, 恳请读者批评指正。

顾雪凡

2015年8月于西安

目 录

前言

1 荧光光谱概述	1
1.1 荧光现象	1
1.2 荧光光谱特点	2
1.3 荧光光谱产生原理	5
1.4 荧光光谱法发展与应用	8
参考文献	9
2 局域表面等离子体共振效应	10
2.1 概述	10
2.2 理论基础	14
2.2.1 光的偏振特征	14
2.2.2 光散射基本知识	20
2.2.3 经典 Mie 光散射理论	23
2.2.4 Gans 理论	26
2.3 理论模拟	26
2.3.1 时域有限差分法	26
2.3.2 离散偶极近似理论	34
2.3.3 边界元方法	38
2.3.4 三种方法的比较	40
2.4 金属纳米粒子 LSPR 效应的影响因素	41
2.4.1 金属纳米粒子种类的影响	42
2.4.2 金属纳米粒子尺寸的影响	46
2.4.3 金属纳米粒子形貌的影响	50
2.4.4 金属纳米粒子所处介质微环境的影响	53
参考文献	54
3 表面增强荧光效应	62
3.1 表面光谱增强现象	62

3.2	表面荧光增强现象	63
3.3	表面增强荧光效应机制	67
3.3.1	LSPR 增强荧光辐射	68
3.3.2	RP 模型	70
3.4	与表面拉曼增强现象的比较	70
3.4.1	表面拉曼增强现象	70
3.4.2	与表面拉曼增强现象的比较	74
	参考文献	75
4	用于表面荧光增强的贵金属纳米颗粒及其组装体制备	81
4.1	贵金属纳米颗粒制备及其光谱特征	81
4.1.1	贵金属纳米颗粒制备概述	81
4.1.2	Au 纳米颗粒的制备及其光谱特征	83
4.1.3	Ag 纳米颗粒的制备及其光谱特征	114
4.1.4	贵金属合金纳米颗粒的制备及其光谱特征	130
4.2	贵金属纳米颗粒组装策略	141
4.2.1	纳米颗粒组装策略	141
4.2.2	Au 纳米颗粒组装体制备及其光谱特征	147
4.2.3	Ag 纳米颗粒组装体制备及其光谱特征	159
	参考文献	165
5	贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应	198
5.1	贵金属纳米颗粒组装体耦合 LSPR 现象概述	198
5.2	贵金属纳米颗粒组装体耦合 LSPR 机制	199
5.2.1	金属纳米组装体的“热点”现象	199
5.2.2	杂化等离子体理论	203
5.2.3	金属纳米粒子低聚物耦合 LSPR	204
5.2.4	复杂结构金属纳米粒子自身耦合 LSPR	212
5.2.5	金属纳米粒子组装体耦合 LSPR	214
5.3	耦合 LSPR 对表面增强荧光效应的影响	223
5.3.1	发生表面增强荧光效应适宜的距离	223
5.3.2	耦合 LSPR 对表面增强荧光效应距离的影响	225
5.3.3	发生表面增强荧光效应适宜距离的调控	228
5.4	贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应常见体系	252
5.4.1	以平板为基质的贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应	252
5.4.2	以微球为基质的贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应	260
5.4.3	水溶胶体系贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应	265

参考文献	268
6 贵金属纳米颗粒组装体表面增强荧光效应的应用研究	290
6.1 在生命分析中的应用研究	290
6.1.1 DNA 相关检测	290
6.1.2 蛋白质相关检测	297
6.1.3 重要生理物质的检测	304
6.2 在单分子荧光检测的应用研究	308
6.2.1 单分子检测概述	308
6.2.2 单分子 MEF 效应检测应用研究	310
6.3 在荧光共振能量转移作用方面的应用研究	312
6.3.1 荧光共振能量转移概述	312
6.3.2 荧光共振能量转移应用研究	316
参考文献	321

1 荧光光谱概述

1.1 荧光现象

荧光是一种光致发光现象,通常认为是 1575 年由西班牙植物学家和内科医生 Monardes 首次记录^[1]。当时,Monardes 观察到在日光照射下,疮木切片水溶液呈现天蓝色,但是尚不知道这就是荧光。17 世纪,波义耳和牛顿等著名科学家再次观察到荧光现象,并给予了更为详细的描述,然而关于这一现象的光发射机制却未有进展。由于不少荧光现象是在植物提取液和矿物中观察到的,有人甚至错误地推测这一发光现象是由光漫射作用所致。直到 1852 年,斯托克斯使用分光计观测奎宁和叶绿素的荧光现象时发现,其荧光发射波长比入射光波长稍长。据此判明荧光现象是由于荧光物种吸收光能后重新发射不同波长的光,并非是由光的漫射所致;并以能发此类光的矿物“萤石”推演而正式提出“荧光”这一术语。在此基础上,斯托克斯系统地对荧光发射强度与荧光物种浓度之间的关系进行了研究,并描述了高浓度时以及加入外来物质时存在的荧光猝灭现象^[1]。1867 年,Goppelsröder 报道了基于铝-桑色素配合物荧光分析法实现了铝的测定,这是历史上首次进行的荧光分析定量研究。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,认为荧光通常产生于具有共轭双键体系的分子,因此绝大多数能够产生荧光的物种含有芳香环或者杂环结构。19 世纪末,人们已经探明包括荧光素、曙红、多环芳烃在内的 600 多种荧光物种。

值得一提的是,关于中药秦皮水浸液在自然光照射下产生的发光现象,我国历代本草和相关典籍中均有记载,最早见于汉代高诱对《淮南子》的注文:“剥取其皮,以水渍之,正青”^[2]。这应该是世界荧光史上的最早记载,比通常人们所认为的 1575 年 Monardes 所观察到的荧光早 1300 多年。当时,“青”作为颜色包括黑、蓝、绿三种,这里所述“青”正如《本草经集注》中“水浸以和墨书,微青”所指的“青”,是与墨的黑色不同的蓝色或者绿色。这一蓝/绿色不同于水浸液本身的淡棕色,实际上即为荧光现象。当时虽然尚不知晓这就是荧光,但是使用“青莹”、“浸碧”加以描述,准确而有意义。近代研究表明,中药秦皮中确有秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮甙及秦皮素等多种香豆精类化学物质,分别呈现乳蓝色、淡蓝色、黄绿色、淡绿色^[3,4]。因此,秦皮的水浸液所显示的荧光事实上是复合荧光。不同的本草书中对这一复合荧光的描述有所差异。将这一荧光特性

用于鉴别药物的最早记录始于唐代所著的《新修本草》：“取皮水渍便碧色，书纸看皆青色者是”^[2]，意为将秦皮浸于水中，或者以水在其上书写，能够见到青碧色者方为正品。而且这应该是世界上关于荧光分析的最早记载，比 19 世纪国外运用荧光分析进行矿物鉴定早约 1300 年。

20 世纪以来，伴随人们对荧光现象的深入认识，有关研究日新月异。其中，能够作为里程碑的研究工作包括：1905 年，Wood 发现荧光共振现象；1914 年，Frank 和 Hertz 使用电子冲击发光实现荧光定量分析；1922 年，Frank 和 Cario 发现增敏荧光；1924 年，Wawillow 实现荧光产率的绝对测量；1926 年，Gaviola 实现荧光寿命的直接测量。在我国，50 年代初期从事荧光分析方面的科研工作者很少；但从 70 年代后期开始，荧光分析相关研究工作得以广泛重视。迄今为止，我国已经涌现出大量从事这一领域的科研队伍，研究水平不断提升。

1.2 荧光光谱特点

荧光物种对光具有选择性吸收，不同波长的入射光具有不同的激发效率。当固定荧光发射波长而不断改变激发光波长时，记录相应荧光强度，绘制荧光强度-激发波长曲线即获得荧光激发光谱。与之类似，当固定荧光激发波长和强度，不断改变发射光波长时，记录相应荧光强度，此时绘制荧光强度-发射波长曲线即获得荧光发射光谱。二者均可以用于鉴别荧光物种，并作为荧光分析法中测定荧光强度时选择最佳发射/激发波长的依据。需要指出的是，通常实验观测到的荧光光谱均为表观光谱。同一荧光样品，在不同荧光仪器上所得表观光谱往往存在差异。只有经过校正后的光谱才具有可比性。理论上讲，荧光激发光谱应与其吸收光谱谱形一致；实际测量中二者常有所差异，只有荧光激发光谱经校正后才与吸收光谱谱形接近。

一般情况下，荧光物种的发射光波长总是大于激发光的波长。这一现象由斯托克斯于 1852 年首次发现^[5]，因此这一波长红移的现象被称为斯托克斯位移。究其原因，这是因为激发过程与发射过程之间不可避免地存在能量损失。如前所述的荧光产生过程中，激发态分子在发射荧光之前，在极短时间内所经历的振动松弛、内转化等非辐射跃迁过程均造成激发能量一定程度的损失，这是产生斯托克斯位移的主要原因。其二，辐射跃迁过程并非完全以荧光形式衰变，可能仅仅使激发态分子衰变至基态的不同振动能级，随后通过振动松弛等过程损失振动能量。其三，包括溶剂效应等因素在内的其他因素将进一步加大斯托克斯位移现象。但在某些特殊情况下，也会出现荧光发射波长比激发光波长短，即反斯托克斯位移现象；或者荧光发射与激发光波长相同的情况，即共振荧光现象。例

如，以激光为光源双光子吸收时，即会出现。这里不加特别说明均为斯托克斯荧光。

荧光光谱的又一个显著特征是，发射光谱谱形通常与激发波长无关，习惯上称之为 Kasha 规则^[6]（尽管早在 1926 年 Vavilov 就曾指出荧光量子产率与激发波长无关）。虽然分子的吸收光谱可能存在几个吸收带，但其发射光谱一般仅有一个发射带。如前所述， S_2 以上激发单重态的寿命极短，大约仅为 10^{-12} s，以至于经过内转化、振动松弛等途径快速衰变至 S_1 最低振动能级再发射荧光。因而荧光发射光谱通常仅含一个发射带，且谱形与激发波长无关，仅与基态振动能级的分布情况以及各振动带的跃迁概率有关。但某些特殊情况下，也存在例外。例如，某些荧光物种拥有两个电离态，而且每个电离态显示不同的吸收和发射光谱。严格来讲，荧光物种发射光谱与其吸收光谱第一吸收带（ $S_0 \rightarrow S_1$ ）之间呈“镜像对称”关系，如图 1-1 所示。

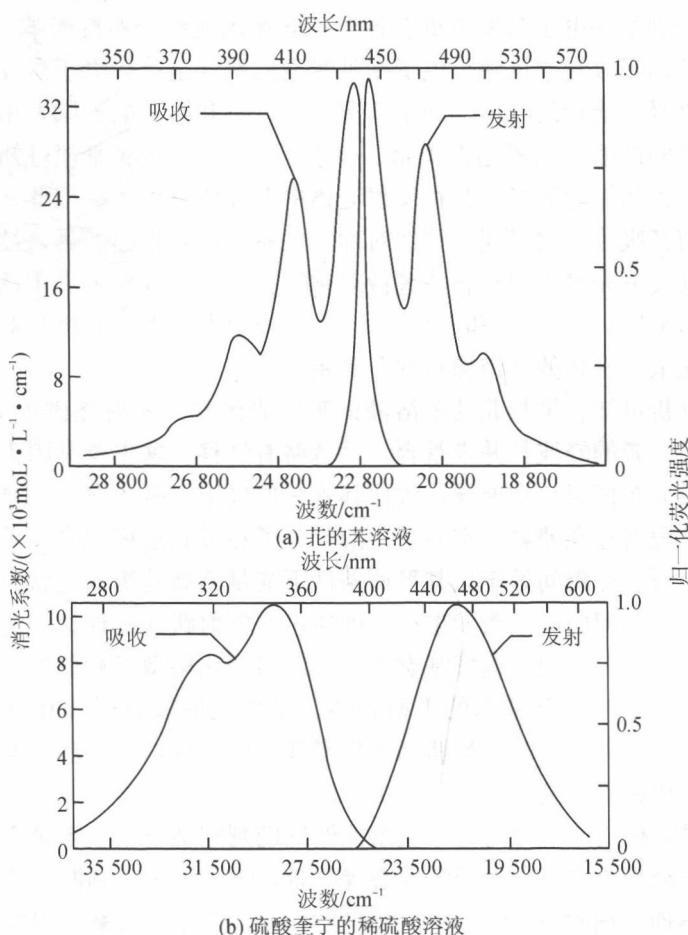


图 1-1 花的苯溶液、硫酸奎宁的稀硫酸溶液的荧光吸收光谱和荧光发射光谱^[7]

可以看出,图 1-1 所示的萘的苯溶液、硫酸奎宁的稀硫酸溶液的发射光谱与其吸收光谱第一吸收带均遵循“镜像对称”规律,但二者存在显著差异。后者激发光谱分别在 315nm、340nm 出现吸收峰,而其发射光谱仅出现一个发射峰。315nm 处的吸收峰值对应于电子激发跃迁至 S_2 以上激发单重态所需能量,而发射光谱主要是由激发态电子从 S_1 最低振动能级辐射跃迁返回 S_0 所得,即激发态电子由 S_2 以上激发单重态经非辐射跃迁途径衰变至 S_1 最低振动能级的过程不能从发射光谱观测到。因此,表现表现为硫酸奎宁的稀硫酸溶液的荧光发射光谱($S_1 \rightarrow S_0$)与其第一吸收带($S_0 \rightarrow S_1$)之间呈“镜像对称”,而非与其整个吸收带($S_0 \rightarrow S_2$)之间呈“镜像对称”。

然而,萘的苯溶液的荧光发射光谱却表现为与其整个吸收带之间呈现“镜像对称”关系。吸收光谱中的第一吸收带是由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所致。由于基态分子通常处于最低振动能级,因此第一吸收带的形状受到第一电子激发单重态各个不同振动能级分布的影响。图 1-1 所示的萘的苯溶液的吸收光谱反映出电子受到激发后跃迁至第一电子激发单重态各个不同振动能级吸收能量的峰值。通常情况下,基态和第一电子激发单重态各个不同振动能级之间的能量间隔情况类似。结合 Frank-Condon 原理可知,在吸收光谱中跃迁概率大的振动能级,其在发射光谱中跃迁概率也大。因此,此时荧光物种发射光谱与其吸收光谱呈现“镜像对称”关系。需要指出的是,欲使荧光物种吸收光谱与其发射光谱之间符合“镜像对称”关系,二者必须采用适当的单位加以表示^[8]。当采用 $\epsilon(\bar{\nu}) \sim \bar{\nu}$ 和 $F(\bar{\nu}) \sim \bar{\nu}^3$ 和分别表示吸收光谱与对应发射光谱时,二者存在最为密切的“镜像对称”关系。

进一步分析可知,虽然萘的苯溶液的吸收光谱与其发射光谱中 0—0 振动带能量相等,但二者的峰波长并未重合,后者略有红移。这主要是因为电子处于基态和激发态时分布情况存在差异,致使其永久偶极矩和极化率存在差异,表现为二者的溶剂化程度存在差异。室温下,溶剂分子在吸光过程中尚未重新取向,使得荧光分子在激发后瞬间处于比其平衡条件下能量略高的溶剂化状态。在荧光发射之前,在极短时间内电子激发态分子即通过非辐射跃迁过程达到能量较低的平衡构型;在荧光发射瞬间,返回基态的分子的溶剂化构型起初仍处于能量略高的非平衡构型,最终松弛至基态的平衡构型。虽然光的吸收过程和发射过程均为 0—0 跃迁,但是前者所需的能量略高于后者释放的能量,这一能量差在松弛过程中以热的形式传递给溶剂。

总体来讲,根据“镜像对称”关系能够辅助判别某个吸收带是否为第一吸收带中的某个振动带或是更高电子激发态吸收带,也可以用来判断是否存在散射光或者杂质。然而,尚存在少数偏离“镜像对称”关系的现象。例如,当激发前后,荧光分子原子核几何构型发生改变、电子激发态分子发生质子转移或者形成

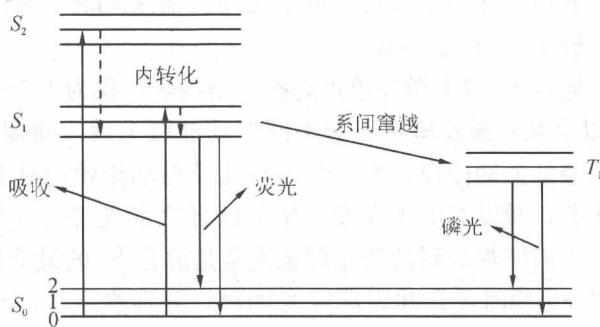
激发态复合物等，会引起这一偏离现象。

1.3 荧光光谱产生原理

荧光属于光致发光，当物质吸收入射光后，分子由于被激发发生了电子从较低能级到较高能级的跃迁；处于此状态的分子，称为电子激发态分子。跃迁所涉及的两个能级之间的能量差值，等于所吸收光子的能量。紫外、可见光区的光子能量较高，足以满足引起分子中电子在电子能级间跃迁所需能量。享有“荧光光谱之父”美誉的 Alexander Jablonski 教授 [图 1-2 (a)] 提出的 Jablonski 图式正是描述了物质在吸收入射光能量后，随之产生于分子内的各种复杂的激发和衰变过程，如图 1-2 (b) 所示^[9]。



(a)



(b)

图 1-2 Alexander Jablonski 教授 (1898~1980 年) (a) 和 Jablonski 图式 (b)^[9]

电子激发态的多重态使用 $2S+1$ 表示，其中 S 是电子自旋角动量量子数的代数和，其数值为 0 或者 1。当分子中所有电子均为自旋配对（分子中同一轨道里所占据的两个电子具有相反的自旋方向）时， $S=0$ ；此时该分子处于单重态，用符号 S 表示；当电子在跃迁过程中因发生自旋方向的改变而使得电子处于自旋不配对时， $S=1$ ；此时该分子处于激发三重态，用符号 T 表示。通常，大多数有机物分子的基态处于单重态。具体而言，分子的基态、第一电子激发单重态、第二电子激发单重态分别以 S_0 、 S_1 、 S_2 表示；第一电子激发三重态、第二电子激发三重态分别以 T_1 、 T_2 表示。特别强调的是，Jablonski 图式中上述各种状态之间的转换采用垂线描述，这表明荧光物种对于光的吸收作用具有瞬时性特征。研究表明，电子跃迁的过程极为迅速，所经历的时间仅为 10^{-15} s。跃迁后电子状态虽有所改变，但在如此短的时间内无法改变原子核的运动状态，使得电子在跃迁过程中原子核间距离基本保持不变，即为 Frank-Condon 原理，它成功地解释了零谱带系的强度分布。

由于处于激发态的分子不稳定,通常通过辐射跃迁和非辐射跃迁两种途径回到基态。通常,由 S_1 产生的辐射跃迁过程中所伴随光子发射的现象,称为荧光;而由最低电子激发三重态 T_1 产生的辐射跃迁过程中所伴随的发光现象,则称为磷光^[9]。非辐射跃迁衰变过程包括振动松弛、内转化,及系间窜越,它们会将激发能转化为热能传递给介质。转动松弛是分子将多余的振动能量传递给介质而衰变到同一电子态最低振动能级的过程;内转化是两个相同多重态电子态之间的非辐射跃迁过程(如 $S_1 \rightarrow S_0$);系间窜越是两个不同多重态电子态之间的非辐射跃迁过程(如 $S_1 \rightarrow T_1$)。其中,激发态单重态间的内转化速率极快,速率常数为 $10^{11} \sim 10^{13} \text{ s}^{-1}$;系间窜越则是自旋禁阻的,速率常数仅为 $10^2 \sim 10^6 \text{ s}^{-1}$ 。实际上,这两个过程的速率,与其所涉及的两个电子态的最低振动能级之间的能量间隔有关;能量间隔越大,速率越小。由于 S_1 与 S_0 最低振动能级之间的能量差通常远大于其他相邻两个激发单重态之间的能量差值,因而 $S_1 \rightarrow S_0$ 的内转化速率常数相对较小,为 $10^6 \sim 10^{12} \text{ s}^{-1}$ 。

通常 S_2 以上激发单重态的寿命极短,仅为 $10^6 \sim 10^{12} \text{ s}^{-1}$ 。倘若分子被激发到 S_2 以上某一激发单重态的不同振动能级上后,随即发生振动松弛衰变至该电子态的最低振动能级,然后经内转化及振动松弛而衰变至 S_1 的最低振动能级。这意味着,激发态电子在发生辐射跃迁之前便经过非辐射跃迁过程衰变至 S_1 。因此,人们所观测到的荧光现象通常是源自 S_1 的最低振动能级的辐射跃迁。荧光又可细分为瞬时荧光和迟滞荧光两种,分别表示为: $S_1 \longrightarrow S_0 + h\nu$; $S_1 + S_0 \rightleftharpoons (S_1 \cdot S_0)^* \longrightarrow 2S_0 + h\nu$ ^[1]。如不加特殊说明,这里均指前者,即由激发过程最初产生的 S_1 或 S_1 和 S_0 形成的二聚体所产生的发射。后者发射光谱谱带波长与前者相符,但寿命却与磷光相似,主要包括 E-型迟滞荧光、P-型迟滞荧光及复合荧光三种类型。

荧光寿命 (τ)、荧光量子产率 (Y_f) 及荧光发射强度 (I_f) 是荧光过程中最为重要的三个参数。

τ 定义为切断激发光之后,荧光发射强度衰减至原有强度的 $1/e$ 时所经历的时间,即荧光分子 S_1 的平均寿命。

$$\tau = 1/(k_f + \sum K) \quad (1-1)$$

式中, k_f 为荧光发射的速率常数; $\sum K$ 为各种分子内非辐射衰变过程的速率常数总和。当不存在非辐射衰变过程时,荧光分子的寿命称为内在寿命,用 τ_0 表示。此时 $\sum K$ 为零,上式可表示为:

$$\tau_0 = 1/k_f \quad (1-2)$$

此外, τ 与 I_f 的关系通常遵从如下方程式:

$$\ln I_0 - \ln I_t = t/\tau \quad (1-3)$$

式中, I_0 与 I_t 分别对应 $t=0$ 和 $t=t$ 时刻的荧光强度。这表明, 通过实验测量出不同时刻 I_t 值, 以此绘制 $\ln I_t-t$ 的关系曲线, 则根据拟合直线的斜率即可计算 τ 值。实际上, 荧光发射是一种随机过程, 仅有少数激发态分子在 $t=\tau$ 时发射光子, 其衰变通常属于单指数衰变过程。 τ 值与跃迁概率有关, 二者的定量关系大致可以表示为

$$\tau \approx 10^{-5} / \epsilon_{\max} \quad (1-4)$$

式中, $\epsilon_{\max}$ 为最大吸收波长时的摩尔吸光系数 (m^2/mol)。一般情况下, $S_0 \rightarrow S_1$ 为许可跃迁, $\epsilon_{\max}$ 值约为 $10^3 \text{m}^2/\text{mol}$, 所以典型的荧光过程中, τ 值通常为 10^{-8}s 。

Y_f 定义为荧光物质吸收入射光后, 发射荧光的光子数与其吸收激发光的光子数的比值^[1]。由于激发态分子的衰变过程包括辐射跃迁和非辐射跃迁两种过程, 因此 Y_f 也可表示为

$$Y_f = k_f / (k_f + \sum K) \quad (1-5)$$

显然, Y_f 值的大小取决于辐射跃迁和非辐射跃迁两种衰变过程的竞争结果。由于非辐射跃迁过程不可避免, 因此通常情况下, Y_f 值总是小于 1。拥有分析应用价值的荧光物种, 其 Y_f 值通常处于 0.1~1。当辐射跃迁的速率远大于非辐射跃迁的速率, 即 $k_f \gg \sum K$ 时, Y_f 值近似为 1。 Y_f 值越大, 荧光物种荧光发射强度越强。 Y_f 值的大小, 主要取决于荧光物种的结构特征, 同时也与其所处环境因素有关。从 τ 和 Y_f 的定义可以看出, 任何能够影响激发态分子光物理过程中速率常数的因素, 都将引起 τ 值和 Y_f 值的变化。

目前, 已有多种方法用于测量 Y_f 值, 其中参比法最为常见。参比法是通过比较待测荧光物种与已知 Y_f 值的参比荧光物种二者稀溶液在相同激发条件下所测得的积分荧光强度、对该激发波长入射光的吸光度而获得待测荧光物种 Y_f 值。

$$Y_f = Y_s \cdot \frac{F_f}{F_s} \cdot \frac{A_s}{A_f} \quad (1-6)$$

式中, Y_f 、 F_f 以及 A_f 分别为待测荧光物种的荧光量子产率、积分荧光强度以及吸光度; Y_s 、 F_s 以及 A_s 则分别代表参比荧光物种的荧光量子产率、积分荧光强度以及吸光度。

根据 Y_f 的定义可知, 其与荧光物种溶液的荧光强度 (I_f)、吸收的光强度 (I_s) 应符合下列关系式:

$$I_f = Y_f \cdot I_a \quad (1-7)$$

结合朗伯-比尔定律, 并做近似处理, 式 (1-7) 可化为

$$I_f = 2.303 Y_f I_0 \epsilon b c \quad (1-8)$$

由此可知, 当某一频率及强度的激发光照射某一荧光物种的稀溶液时, 仅当溶液对激发光的吸光度极低时, 所测得溶液的荧光强度才与该荧光物种呈线性相关。倘若 $\epsilon b c \geq 0.05$ 时, 应考虑高阶幂指数。在实际研究中发现, 溶液浓度增大

到某一值后,继续增大浓度将会出现荧光发射强度下降的现象。这主要是由内滤效应和溶质之间的相互作用所致。此外,如果荧光物种的发射光谱与其吸收光谱表现为光谱重叠,则可能发生所发射的荧光被部分再吸收的现象,从而造成荧光发射强度下降。而溶液的浓度增大,必然会加剧这一再吸收现象的发生。

1.4 荧光光谱法发展与应用

享有极高灵敏度是荧光光谱法最为显著的特点。虽然在微量分析方法中,比色法和分光光度法应用最为广泛,但是荧光光谱法的灵敏度通常比它们高出2~3个数量级,这是由它们固有的光学过程所决定的。具体而言,吸光光度法中用于测定吸光物质含量的吸光度(A)值,取决于溶液的浓度、该吸光物质的摩尔吸光系数以及光程的长度,几乎与入射光的强度无关。荧光光谱法所测定的荧光发射强度则不仅与被测溶液中荧光物种的本性及其浓度相关,也与激发光的波长和强度以及荧光检测器的灵敏度相关。这意味着加大激发光的强度,提高荧光检测器的灵敏度,均能够增大荧光发射强度,从而提高方法的灵敏度。

历史上,荧光光谱法的飞速发展与相关仪器应用的发展密不可分。19世纪之前,荧光现象依靠肉眼观察,直到1928年,Jette和West共同研制出第一台光电荧光计,开启了仪器检测荧光信号的时代。1939年,Zworykin和Rajchman发明了光电倍增管,使之能够使用分辨率更高的单色器,极大地提高了灵敏度。1943年,Dutton和Bailey提出一种荧光光谱手工校正法;1948年,Studer发明了第一台自动光谱校正装置;1952年,第一台商品化校正光谱仪器问世。这些不断的改进,使得荧光光谱法的灵敏度和选择性不断提高。伴随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。目前,将毛细管电泳分离技术与激光诱导荧光检测法联用,已经接近或者达到单分子检测的水平。

选择性高是荧光光谱法另一个显著的特点。对于有机化合物的荧光分析而言,可以基于荧光物种激发波长与发射波长之间的差异,达到选择性测定的目的。除此之外, Y_f 、 τ 、荧光偏振等多种荧光特性参数使得荧光物种荧光行为的信息采集更为多元化,可以采用导数光谱、同步扫描、时间分辨、相分辨以及三维分辨等荧光测定新技术,进一步提高方法的选择性。

如今,伴随科学技术的迅猛发展,激光、微处理器、光导纤维以及纳米材料等一系列新技术融入荧光光谱法中,极大地推动了其理论研究与应用发展,越来越多的新方法、新体系、新技术、新应用出现在荧光光谱法中,使其不断朝着痕量、实时、原位、多尺度、多维度以及自动化的方向发展。方法的灵敏度、选择性、准确度日臻完善,应用范围不断拓展,遍及生命科学、环境科学、材料科学、能源科学、食品科学、公安情报等诸多领域。

参考文献

- [1] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] 邹家林. 我国古代秦皮浸出液荧光的发现和应用. 中国科技史料, 1984, 3: 7-9.
- [3] 梅斌夫, 徐杰诚, 汪猷. 中药秦皮的有效成分. 化学学报, 1962, 28 (1): 25-30.
- [4] 魏秀丽, 杨春华, 梁敬钰. 中药秦皮的化学成分. 中国天然药物, 2005, 3 (4): 228-230.
- [5] Stokes G G. On the Change of refrangibility of lighth. Phil Trans R Soc, 1852, 142: 463-562.
- [6] Kasha M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. Disc Faraday Soc, 1950, 9: 14-19.
- [7] Berlman I B. Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules. 2nd ed. New York: Academic Press, 1971.
- [8] Birks J B. Photophysics of Aromatic Molecules. New York: John Wiley & Sons, 1970.
- [9] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006.