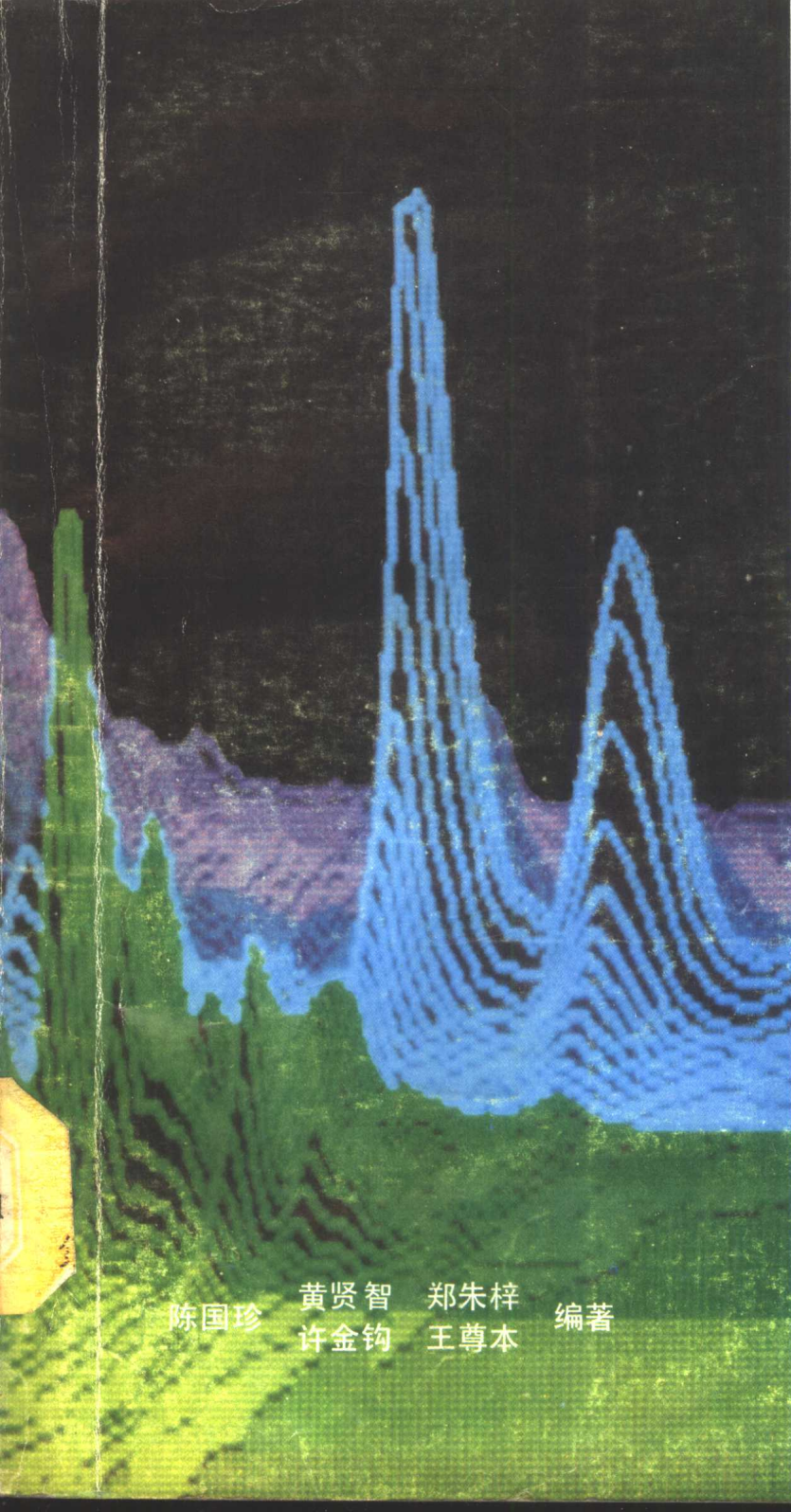


荧光分析法

(第二版)

科学出版社

The background of the cover is a dark, textured image showing several fluorescence spectra. The spectra are represented as multiple overlapping peaks of varying heights and widths, colored in shades of blue and green. The peaks are set against a dark, almost black background, with some green and purple hues visible in the lower and middle sections. The overall appearance is that of a scientific plot or a microscopic image related to fluorescence analysis.

陈国珍 黄贤智 郑朱梓 编著
许金钧 王尊本

荧光分析法

(第二版)

陈国珍 黄贤智 郑朱梓 编著
许金钧 王尊本

科学出版社

1990

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、环境因素对溶液荧光强度的影响以及溶液荧光的猝灭;介绍了荧光计的组成部件及荧光激发光谱、发射光谱的校正;介绍了各种荧光分析方法,其中包括同步荧光、导数荧光、时间分辨荧光、相分辨荧光、荧光偏振、免疫荧光、低温荧光、固体表面荧光、动力学荧光和三维荧光等荧光测定方法;对近 70 种元素和脂肪族、芳族、维生素、氨基酸、蛋白质、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;还对磷光分析法作了简要的介绍。

本书内容新颖,应用面广,既可供科研、生产部门的有关分析工作人员参考,也可作为高等院校分析专业本科生、研究生的教材和参考书。

荧 光 分 析 法

(第二版)

黄贤智 郑朱梓
陈国珍 许金钧 王尊本 编著

责任编辑 操时杰

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1975 年 4 月第 一 版

1990 年 10 月第 二 版 开本: 850×1168 1/32

1990 年 10 月第二次印刷 印张: 19

字数: 平 11 001—13 700 插页: 平 1 精 3

稿 1—900 字数: 503 000

ISBN 7-03-001728-5/O · 338(平)

ISBN 7-03-001729-3/O · 339(精)

平 装 12.80 元
定价: 布脊精装 14.40 元

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的时间标度。荧光发射发生在吸光之后约 10^{-8} s (10ns),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粘度和生物分子间的缔合

EA 07/09

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依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

第一章 荧光分析导论	1
§ 1.1 概述.....	1
§ 1.2 分子的激发与去活化.....	3
§ 1.3 分子发光的类型.....	5
§ 1.4 荧光的激发光谱和发射光谱.....	8
§ 1.5 荧光的寿命和量子产率.....	15
§ 1.6 荧光偏振.....	18
§ 1.7 荧光强度与溶液浓度的关系.....	25
§ 1.8 荧光分析方法的灵敏度和选择性.....	28
参考文献.....	30
第二章 荧光与结构的关系	31
§ 2.1 有机物的荧光.....	31
§ 2.2 无机盐的荧光.....	58
§ 2.3 二元配合物的荧光.....	61
§ 2.4 三元配合物的荧光.....	68
参考文献.....	72
第三章 环境因素对荧光光谱和荧光强度的影响	75
§ 3.1 溶剂的影响.....	75
§ 3.2 温度的影响.....	81
§ 3.3 pH 的影响.....	83
§ 3.4 氢键的影响.....	88
§ 3.5 重原子效应.....	92
§ 3.6 表面活性剂的影响.....	93
§ 3.7 光解作用和光互变异构现象.....	98
§ 3.8 散射光和拉曼光的影响.....	101

§ 3.9 其它溶质的影响·····	107
参考文献·····	109
第四章 溶液荧光的猝灭·····	112
§ 4.1 荧光猝灭作用·····	112
§ 4.2 碰撞猝灭·····	113
§ 4.3 组成化合物的猝灭·····	118
§ 4.4 电荷转移猝灭·····	119
§ 4.5 能量转移猝灭·····	122
§ 4.6 光化学反应猝灭·····	132
§ 4.7 自猝灭·····	134
§ 4.8 转入三重态的猝灭·····	136
§ 4.9 氧的猝灭·····	138
§ 4.10 在刚性介质中的发光·····	141
参考文献·····	144
第五章 荧光仪器·····	146
§ 5.1 荧光仪器组件·····	147
§ 5.2 荧光分光计·····	169
§ 5.3 荧光光谱的校正和荧光仪器的灵敏度·····	181
参考文献·····	188
第六章 荧光分析方法·····	190
§ 6.1 常规的荧光分析法·····	190
参考文献·····	200
§ 6.2 同步荧光测定·····	201
参考文献·····	212
§ 6.3 三维荧光光谱技术·····	213
参考文献·····	223
§ 6.4 导数荧光测定·····	224
参考文献·····	233
§ 6.5 时间分辨荧光测定·····	234
参考文献·····	245

§ 6.6	相分辨荧光测定	246
	参考文献	262
§ 6.7	荧光偏振测定	262
	参考文献	281
§ 6.8	荧光免疫检测	283
	参考文献	293
§ 6.9	低温荧光测定	294
	参考文献	305
§ 6.10	固体表面荧光测定	306
	参考文献	313
§ 6.11	荧光动力学分析法	313
	参考文献	325
第七章	无机化合物的荧光分析	328
§ 7.1	锂、钠、钾的荧光分析	329
	参考文献	332
§ 7.2	铜、银、金的荧光分析	332
	参考文献	339
§ 7.3	铍、镁、钙、锶的荧光分析	340
	参考文献	351
§ 7.4	锌、镉、汞的荧光分析	353
	参考文献	360
§ 7.5	硼、铝、镓、铟、铊的荧光分析	361
	参考文献	381
§ 7.6	钪、钇的荧光分析	385
	参考文献	388
§ 7.7	稀土元素的荧光分析	388
	参考文献	396
§ 7.8	钍、铀的荧光分析	398
	参考文献	402
§ 7.9	硅、锗、锡、铅的荧光分析	403
	参考文献	408

§ 7.10 钛、锆、铪的荧光分析	409
参考文献.....	412
§ 7.11 氮化物的荧光分析	412
参考文献.....	418
§ 7.12 磷、锑、铋的荧光分析	419
参考文献.....	422
§ 7.13 钒、铌、钽的荧光分析	422
参考文献.....	425
§ 7.14 氧、臭氧、过氧化氢的荧光分析	425
参考文献.....	427
§ 7.15 硫化物的荧光分析	428
参考文献.....	431
§ 7.16 硒、碲的荧光分析.....	432
参考文献.....	434
§ 7.17 铬、钼、钨的荧光分析	435
参考文献.....	438
§ 7.18 氟、氯、溴、碘的荧光分析.....	439
参考文献.....	441
§ 7.19 锰、铈的荧光分析.....	442
参考文献.....	443
§ 7.20 铁、钴、镍的荧光分析	444
参考文献.....	448
§ 7.21 钨、钼、钽、铀的荧光分析.....	449
参考文献.....	450
第八章 有机化合物的荧光分析.....	451
§ 8.1 脂肪族有机化合物的荧光分析.....	451
参考文献.....	463
§ 8.2 芳族有机化合物的荧光分析.....	465
参考文献.....	478
§ 8.3 维生素的荧光分析.....	481
参考文献.....	490

§ 8.4 氨基酸和蛋白质的荧光分析·····	491
参考文献·····	504
§ 8.5 胺类化合物的荧光分析·····	506
参考文献·····	518
§ 8.6 甾族化合物的荧光分析·····	520
参考文献·····	523
§ 8.7 酶和辅酶的荧光分析·····	524
参考文献·····	539
§ 8.8 药物、毒物及农药的荧光分析·····	541
参考文献·····	558
第九章 磷光分析·····	561
§ 9.1 概述·····	561
§ 9.2 低温磷光分析·····	562
§ 9.3 室温磷光分析·····	568
§ 9.4 磷光分析仪器·····	579
§ 9.5 磷光分析法应用·····	587
参考文献·····	594

第一章 荧光分析导论

§ 1.1 概 述

当紫外光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，而当紫外光停止照射时，这种光线也随之很快地消失，这种光线称为荧光。

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。在 17 世纪，Boyle (1626—1691) 和 Newton (1624—1727) 等著名科学家再次观察到荧光现象，并且给予更详细的描述。尽管在 17 世纪和 18 世纪中还发现了其它一些发荧光的材料和溶液，然而在解释荧光现象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为长些，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，Liebeman 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 Wo-

od 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 Wawillous 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 提出了第一台光电荧光计。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，在其它学科迅速发展的影响下，随着激光、微处理机和电子学的新成就等一些新的科学技术的引入，大大推动了荧光分析法在理论方面的进展，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、荧光反应速率法、三维荧光光谱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，遍及于工业、农业、医药卫生、环境保护、公安情报和科学研究等各个领域。如今，荧光分析法已经发展成为一种重要且有效的光谱化学分析手段。

在我国，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研究工作，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。近年来，国内发表的有关荧光分析方面的论文数量增长较快，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，在我国四化建设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 分子的激发与去活化

每种物质分子中都具有一系列紧密相隔的能级，称为电子能级，而每个电子能级中又包含一系列的振动能级和转动能级。物质受光照射时，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，光子的能量便传递给物质分子，于是便发生电子从较低能级到较高能级的跃迁。这个过程进行极快，费时大约 10^{-15} s。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。当物质吸收紫外光或可见光时，这些光子的能量较高，足以引起物质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 为电子自旋量子数的代数和，其数值为 0 或 1。分子中同一轨道所占据的两个电子必须具有相反的自旋方向，即自旋配对。假如分子中全部轨道里的电子都是自旋配对的，即 $S = 0$ ，该分子体系便处于单重态（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，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。

处于激发态的分子是不稳定的，它可能通过辐射跃迁和非辐射跃迁等分子内的去活化过程丧失多余的能量而返回基态。当然，

激发态分子的去活化,也可能经由分子间的作用过程,这种过程将在第四章里加以讨论。

辐射跃迁的去活化过程,发生光子的发射,伴随着荧光或磷光现象;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。非辐射跃迁包括内转化(internal conversion, 简写为 ic)和体系间窜跃(intersystem crossing, 简写为 isc), 前一种过程指的是相同多重态的两个电子态间的非辐射跃迁(例如 $S_1 \rightsquigarrow S_0$, $T_2 \rightsquigarrow T_1$); 后一种过程指的是不同多重态的两个电子态间的非辐射跃迁(例如 $S_1 \rightsquigarrow T_1$, $T_1 \rightsquigarrow S_0$)。图 1.1 表示分子内所发生的各种光物理过程,包括分子的激发过程和辐射跃迁、非辐射跃迁以及振动松弛(VR)等去活化过程的示意图。

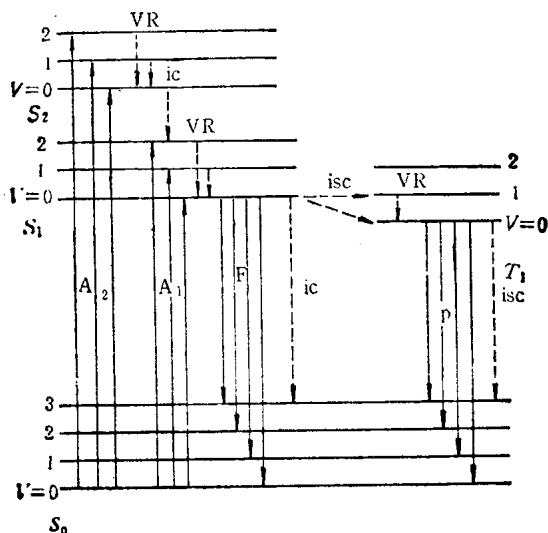


图 1.1 分子内的光物理过程

A_1, A_2 . 吸收; F . 荧光; P . 磷光; ic . 内转化;
 isc . 体系间窜跃; VR . 振动松弛。

假设分子在吸收辐射后被激发到 S_2 以上的某个电子激发单重态的不同振动能级上,处于较高振动能级上的分子,很快地(约 $10^{-12} - 10^{-14}$ s)发生振动松弛,将多余的振动能量传递给介质而降

落到该电子态的最低振动能级 ($v = 0$), 此后又经由内转化及振动松弛而降落到 S_1 电子态的最低振动能级。处于 S_1 电子态的激发分子, 其分子内的去活化作用有如下几种途径: (1) 发生 $S_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而伴随荧光现象; (2) 发生 $S_1 \rightsquigarrow s_0$ 的内转化过程; (3) 发生 $S_1 \rightsquigarrow T_1$ 的体系间窜跃。而处于 T_1 态的最低振动能级的激发分子, 则可能发生 $T_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而伴随磷光现象, 也可能发生 $T_1 \rightsquigarrow S_0$ 的体系间窜跃。

激发单重态间的内转化速率很快 (速率常数约为 $10^{11} - 10^{13} \text{ s}^{-1}$), 因而更高激发单重态的寿命通常很短 (约 $10^{-11} - 10^{-13} \text{ s}$), 处于这种电子态的激发分子, 除极少数例外, 在可能发生辐射跃迁之前, 便发生了到达 S_1 电子态的非辐射去活化。所以, 所观察到的荧光现象, 在通常情况下是发生自 S_1 态的最低振动能级的辐射跃迁。发生于单重态-三重态之间的体系间窜跃, 由于该过程是自旋禁阻的, 因而其速率常数远小于内转化过程的速率常数 (约为 $10^2 - 10^6 \text{ s}^{-1}$)。

内转化和体系间窜跃过程的速率, 与该过程所涉及的两个电子态的最低振动能级间的能量差有关; 能量差越大, 速率越小。 S_0 和 S_1 两个电子态的最低振动能级之间的能量差, 在绝大多数情况下远比其它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地要小得多, 约为 $10^6 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ 。类似情况, $T_1 \rightsquigarrow S_0$ 体系间窜跃的速率常数也较小, 约为 $10^{-2} - 10^5 \text{ s}^{-1}$ 。

§ 1.3 分子发光的类型

§ 1.3.1 分子发光的分类

分子发光的类型, 可以按两种不同的办法加以分类, 其中一种是按激发的模式 (即提供激发能量的方式) 加以分类, 另一种是按分子激发态的类型来分类。

按照激发的模式分类时, 如果分子因吸收外来辐射的光子能量而被激发, 所产生的发光现象称为光致发光; 如果分子的激发能

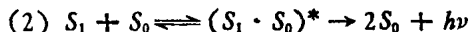
量是由反应的化学能或由生物体释放出来的能量所提供，其发光现象分别称为化学发光或生物发光；由热活化的离子复合激发模式所引起的发光现象，称为热致发光；由电荷注入和摩擦等激发模式所产生的发光，分别称为场致发光和摩擦发光。

在本书中所要讨论的内容，仅涉及由于吸收辐射后所引起的分子发光现象。

按分子激发态的类型来划分时，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所产生的辐射跃迁，其发光现象称为磷光。

§ 1.3.2 荧光的类型及其发射过程

荧光可分为瞬时 (prompt) 荧光和迟滞 (delayed) 荧光。瞬时荧光即一般所说的荧光，它通常在吸收激发光后大约 10^{-8} s 期间内发射的，是由激发过程中最初生成的 S_1 电子态所产生的辐射。瞬时荧光可能由处于 S_1 电子态的分子或 S_1 激发态分子与基态分子所形成的聚合物 (excimer, 激发态二聚体) 产生的。这两种过程可分别用下列式子表示：



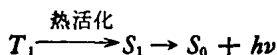
这两种过程所产生的荧光现象彼此间可能有所不同，因而，有时候通过记录不同浓度溶液的荧光光谱，可以检测这种聚合物的存在。例如，低浓度 ($\sim 10^{-6}$ mol/L) 的芘溶液，其荧光是紫色的，荧光光谱具有结构特征；但是，当芘的浓度增大到约 10^{-3} mol/L 时，其荧光便呈现蓝色，且荧光光谱没有结构特征。

偶尔在刚性的或粘稠的介质中，除了磷光谱带外，还可能观察到另一种长寿命的发射谱带，不过，这个谱带的波长比磷光谱带的波长来得短。假如该物质也会发荧光的话，这第二个长寿命发射谱带的波长与荧光谱带的波长相符合，但它的寿命却与磷光相似。这种现象即称为迟滞荧光。

已知的迟滞荧光有如下三种类型：

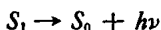
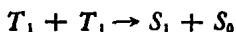
1. E-型迟滞荧光

这是由处于 T_1 电子态的分子，经热活化提高能量后而处于 S_1 电子态，然后自 S_1 电子态经历辐射跃迁而产生的荧光。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。导致 E-型迟滞荧光的过程，可以简单表示如下，



2. P-型迟滞荧光

这种类型的荧光，其 S_1 电子态激发分子的布居，是经由两个处于 T_1 电子态的分子相互作用时所引起的。这种过程称为“三重态-三重态粒子湮没”，其结果产生一个激发单重态分子。P-型迟滞荧光的产生过程可简单表示如下：



这种迟滞荧光的寿命，是相伴随的磷光的寿命的一半。

3. 复合荧光 (recombination fluorescence)

这种荧光，其第一电子激发单重态分子的布居，是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引起的。

从分析化学的角度来看，感兴趣的是瞬时荧光，而迟滞荧光的分析应用目前还很少。

从比较荧光和激发光的波长，或者说从比较两者的光子能量的角度出发，荧光又可分为斯托克斯 (Stokes) 荧光、反斯托克斯 (antistokes) 荧光和共振荧光等。

自溶液中观察到的荧光，通常为斯托克斯荧光，即荧光发射的光子能量低于激发光的光子能量，换句话说，荧光比激发光具有更长的波长。

假如在吸收光子的过程中又附加热能给激发态分子，那么所发射的荧光波长有可能比激发光的波长来得短，这种荧光称为反斯托克斯荧光，在高温的稀薄气体中可能观察到这种现象。