

分析化学译丛

分子发光分析法

(荧光法和磷光法)

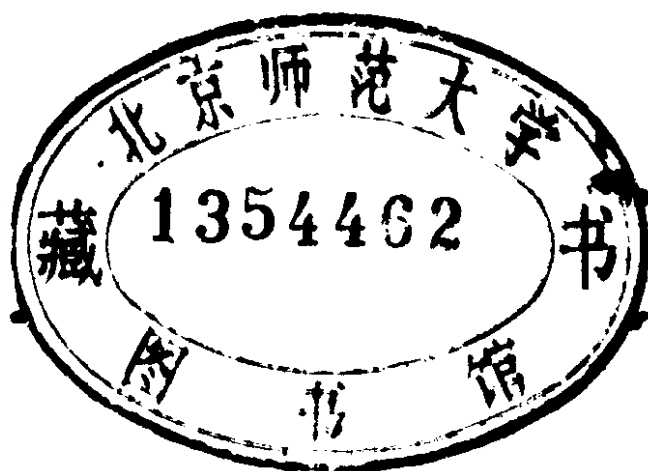
复旦大学出版社

591/204/14

分子发光分析法

(荧光法和磷光法)

祝大昌 陈剑铤 朱世盛 译



复旦大学出版社

一九八五年二月

分子发光分析法
(荧光法和磷光法)

复旦大学出版社出版
新华书店上海发行所发行
复旦大学印刷厂印刷

字数 198千字 开本 787×1092 1/32 印张 8.5
1985年12月第一版 1985年12月第一次印刷
印数: 1—6,000

书号: 13253·022

定价: 1.60元

译者的话

本集收入了“分子发射光谱(荧光和磷光)”、“测定微量有机物的色谱-荧光法”、“无机物的化学发光分析”以及“荧光分光光度法测定无机阴离子:综述”等四篇文章,旨在对无机分析、有机分析和生物化学领域里分子发光分析法的近期进展作一比较全面的评述。

“分子发射光谱(荧光和磷光)”一文选自《供生物化学家用的光谱法引论》一书,它曾得到荧光分析的著名权威、美国的E. L. Wehry教授的称赞和推荐。

在这一章里,作者彭采尔一方面深入浅出地介绍了荧光分析法的基本原理、仪器设备、实验技术和方法的优缺点,写得图文并茂、通俗易懂,很容易为广大初学者所接受;另一方面又以一定深度介绍了其他荧光分析书籍中很少介绍的荧光寿命、偏振、各向异性以及荧光探针技术的原理和应用,因此对荧光分析法已有一定了解的读者也会感到饶有兴趣、颇有收获。

近年来,色谱分离方法和荧光检测技术的联用已日益普遍,愈来愈显示出其强大的生命力。“测定微量有机物的色谱-荧光法”一文详细介绍了利用丹磺酰氯及其同类物或者茈胺等制备荧光衍生物的方法以及进行色谱分离,尤其是高压液相色谱和薄层色谱分离的条件。详细介绍了测定水、空气、土壤、食品、饲料和许多其他环境样品中的多核芳烃、黄曲霉素、各种生物活性物质和毒物、色素、核蛋白、生物碱、维生素、药物、农药、硝基化合物、胺、亚硝胺、氨基酸、蛋白质、生物胺、酚、醛酮、酸、硫醇等

各类有机物的方法。还介绍了通过环化、缩合、氧化反应来制备荧光化合物的色谱荧光分析法。内容非常丰富，对环境保护和化学分析工作有很大的实际指导意义。

近年来，无机物发光分析得到了迅速发展。由苏联科学家 A. П. 高洛维娜等编写的“无机物的化学发光分析”一文对1980年为止有关发光分析法在无机物方面的应用情况作了全面的评述，较为系统地叙述了化学发光的各种类型、发光机理以及有关的定律。文章按发光类型对各种元素的荧光测定、磷光测定、敏化发光测定、自身发光测定、化学发光测定、非金属的发光测定以及发光滴定法逐一作了评述，引用文献达 746 篇。

在科学和技术的许多领域内，阴离子起着重要的作用，因此对它们进行测定极为重要。荧光分析法在灵敏度和选择性方面比光度法占有明显的优势，因此，近年来它已成为广泛采用的技术。“荧光分光光度法测定无机阴离子：综述”一文对测定各种物质中微量无机阴离子的荧光分光光度法作了评论性研究。根据光度法所基于的反应，划分成氧化还原反应，络合物形成反应、离子缔合络合物形成反应、置换反应和酶反应方法，并对每一种方法测定各种无机阴离子时所用的试剂、光谱特性、反应条件、灵敏度以及干扰情况等作了详细介绍。

目前，国内有关分子发光分析法的出版物还很少，译者希望本书的出版能起到补充作用，对从事无机、有机、生物、医学、冶金、地质、环保等工作的读者有所帮助。

一九八四年九月

目 录

分子发射光谱(荧光和磷光).....	1
测定微量有机物的色谱-荧光法	54
无机物的化学发光分析.....	116
荧光分光光度法测定无机阴离子: 综述.....	215

分子发射光谱

(荧光和磷光)

G. R. 彭采尔

引言

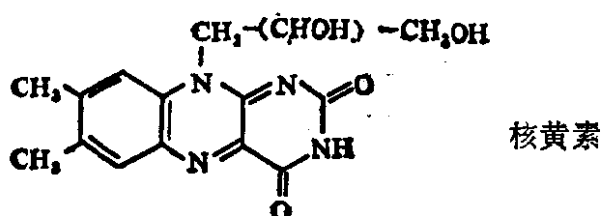
荧光是发射光。当分子从一种电子态向另一种能量较低电子态弛豫时,便产生荧光。根据起始激发态形成的方式,可以将荧光同其他的发光类型(例如生物发光、热发光、化学发光和摩擦发光)区别开来。在荧光现象中,这一过程是光化学的。激发态系通过吸收光子而形成,与吸收光谱法所研究的过程完全一致。因此,很自然地会提出这样的问题:“荧光光谱能提供哪些从吸收光谱中无法发现的信息?”这一问题的详细答案在本章的后面部分将会明白,但在一开始就指出为什么人们可以期望吸收测量和发射测量能传递不同的信息这一点将是有益的。

光子被一个分子吸收是一种单一的、几乎瞬息的相互作用。荧光则涉及两种相互作用和两个光子,即吸收,接着再发射。每一种过程实际上都是瞬间的,但在过程之间存在一时间间隔(一般为约 10^{-8} 秒)。在这段时间里分子处于电子激发态。这一时间间隔是可变的,因为它依赖于与荧光去活化过程相竞争的、使激发态去活化的各种非辐射过程。这些非辐射猝灭过程的效率取决于分子的环境,因此,辐射的强度也与环境有关。这样,从

某种意义上来说，一种发射体的荧光是它的周围环境的探测器(指示器)，但吸收光谱则不然。

对于核黄素(维生素B₂)——一种典型的芳香族荧光物质及其衍生物 FMN 和 FAD* 来说，这些性质示于表 3.1 中。摩尔吸光系数比荧光量子产额(吸光度的一种近似模拟，定义为发射的光子数与吸收的光子数之比)对溶剂的依赖关系要弱得多。

表3.1 pH 7 的水溶液中黄素光谱的环境灵敏度^a



环境	吸收峰波长 (nm)	摩尔吸光系数 (M ⁻¹ cm ⁻¹)	荧光峰波长 (nm)	荧光的量子 产额
核黄素	445	12000	525	0.25
FMN	445	12000	525	0.25
FAD	445	11000	525	0.05
硫辛酸脱氢酶中的 FAD	455	11000	520	0.11
硫氧还蛋白还原酶 中的 FAD	455	11000	520	0.04
L-氨基酸氧化酶中 的 FAD	460	11000	未能检出	
老黄酶中的 FMN	465	11000	530	0.01
乳酸氧化酶中的 FMN	460	11000	未能检出	

^a 在非水溶剂中，光谱峰值和摩尔吸光系数的变化不大(例如在二噁烷中吸收峰位置不变而发射位于 520nm 处)但量子产额对环境更加灵敏(例如核黄素在二噁烷中的量子产额为 0.71; FMN 在 50% 水-二甲基亚砷中的量子产额为 0.20; FAD 在 50% 水-二甲基亚砷中的量子产额为 0.12)。

* FMN——黄素单核苷酸; FAD——黄素腺嘌呤二核苷酸——译者注。

1965年以来,在对荧光光谱的兴趣激增的时期,生物化学家主要利用的正是荧光法的这种环境灵敏度联同它的高的绝对灵敏度(不需要许多分子便能产生可察觉的发射)以及能从各种类型的样品(固体和液体,透明的和不透明的)观察到荧光这样一个事实。

本章大致被划分成四个部分。第一部分(3~28页)讨论原则性问题,即荧光的本质及其分子基础;接着(28~38页)讨论荧光的实际测量;评价荧光法作为研究生物化学问题的手段时所具有的优缺点(38~44页);最后较详细地讨论某些有前途的战略(44~51)。

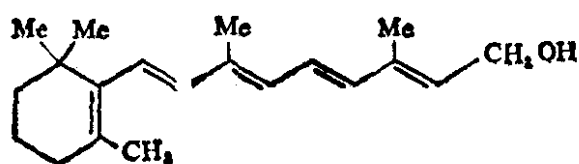
生 荧 团*

并非所有的分子都能呈现易察觉之荧光。能显示易察觉荧光的分子称做生荧团。一般地说,这样的分子都具有低能量的激发态(因此,以波长 $>220\text{nm}$,即能量小于550千焦耳/摩尔的辐射进行激发是可能的)。只吸收更短波长的分子,在激发时,由于所涉及的光子的能量较高,便易于分解。实际上,波长 $>220\text{nm}$ 时的光化学活性是很常见的,它会给荧光光谱工作者带来很大的问题。

如同在(原书)第二章里已经见到的那样,能吸收波长大于220nm的光的有机分子主要是那些带有延伸的 π -电子轨道的分子——例如核黄素和色氨酸(氨基酸)之类的芳香族化合物;或带有共轭双键的分子,例如维生素A[视黄醇,(I)]。

但并非所有这样的分子都能有效地发射荧光,例如核酸碱

* Fluorophores,也可译成荧光物质——译者注。



(I)

基(nucleic acid bases)实际上是非荧光的, 虽然许多类似的杂环化合物有强烈的荧光辐射。卟啉是强荧光性的, 而它们的铁络合物(血红蛋白)是非荧光的。这些差别的原因在于某些分子比另一些分子更易非辐射地失去激发能。只有非辐射过程缓慢的那些物种才会有强烈的发射。表 3.2 列出了常见的生物生色团, 荧光太弱而不能测量的生物生色团, 以及许多用作生物体系

表 3.2 生物化学中常见的生色团

a) 天然生色团	普通金属离子
芳香氨基酸	
吡啶核苷酸(还原型)	c) 荧光指示剂*
吡哆醛	丹磺酰氯(二甲胺基萘磺酰氯)
黄素	ANS 及其衍生物(苯胺基萘磺酰
维生素A	盐)
卟啉	1,N ⁶ -etheno 腺嘌呤和
叶绿素	3,N ⁴ -etheno 胞嘧啶
甾族化合物	苣-3-磷酸盐
转移核糖核酸中的“Y”-碱基	溴化乙锭
b) 非生色团	间型霉素
核苷酸和核酸	葱酰氧基硬脂酸盐(简称12-AS,
脂类	译者注)及类似衍生物
碳水化合物	氯化四环素
羧酸和酯	铜系离子
非芳香氨基酸	荧光素异硫氰酸酯

* 欲知上述和其他荧光指示剂的结构式可参阅 Modern Fluorescence Spectroscopy, Vol.2, p.130, E. L. Wehry ed., Plenum, New York, 1976
——译者注。

中的荧光指示剂的非生物生发团。

过渡金属离子和它们的络合物具有低能量的激发态，但通常并无荧光。然而，有不少镧系元素“逃避”了快速非辐射猝灭，能产生可察觉的荧光发射。这些离子可以作为同功异质体(analogues)用来代替那些生物学上很重要但不具有象荧光那样易被观察的光谱性质，以便监测其行为的离子。例如，铽(Ⅲ)能与膜蛋白上跟钙有高亲和力的部位相互作用；铈(Ⅲ)能与转移核糖核酸上的镁结合部位相互作用。

发 射 过 程

能量

大多数有机分子在基态时是单重态(所有的电子是成对的，见第二章)。当吸收辐射时，一个电子被激发到较高的能级但自旋不变，这种状态便是激发单重态，而具有最低能量的激发态是第一激发单重态。当第一激发单重态弛豫回到基态时便产生荧光。如果最初的吸收产生出能量较高的激发态，它便会快速弛豫并非辐射地回到第一激发单重态，然后再发射出荧光。例如，核黄素在紫外-可见区有四个强吸收带，其中只有波长最长的那个吸收带(以 445nm 为中心)相当于基态→第一激发单重态的跃迁，其他吸收带是由跃迁到更高的激发态引起的。然而，只观察到一个发射光谱($\lambda_{\text{max}}^{\text{发射}}$ 约525nm)，它与激发波长无关(图 3.1)。

在一固定的波长下激发样品，并观察发射强度与发射波长间的函数关系，便得到发射光谱(如图 3.1 所示)；选定某一个发射波长(位于发射光谱谱带中的某个位置)，并记录发射强度作

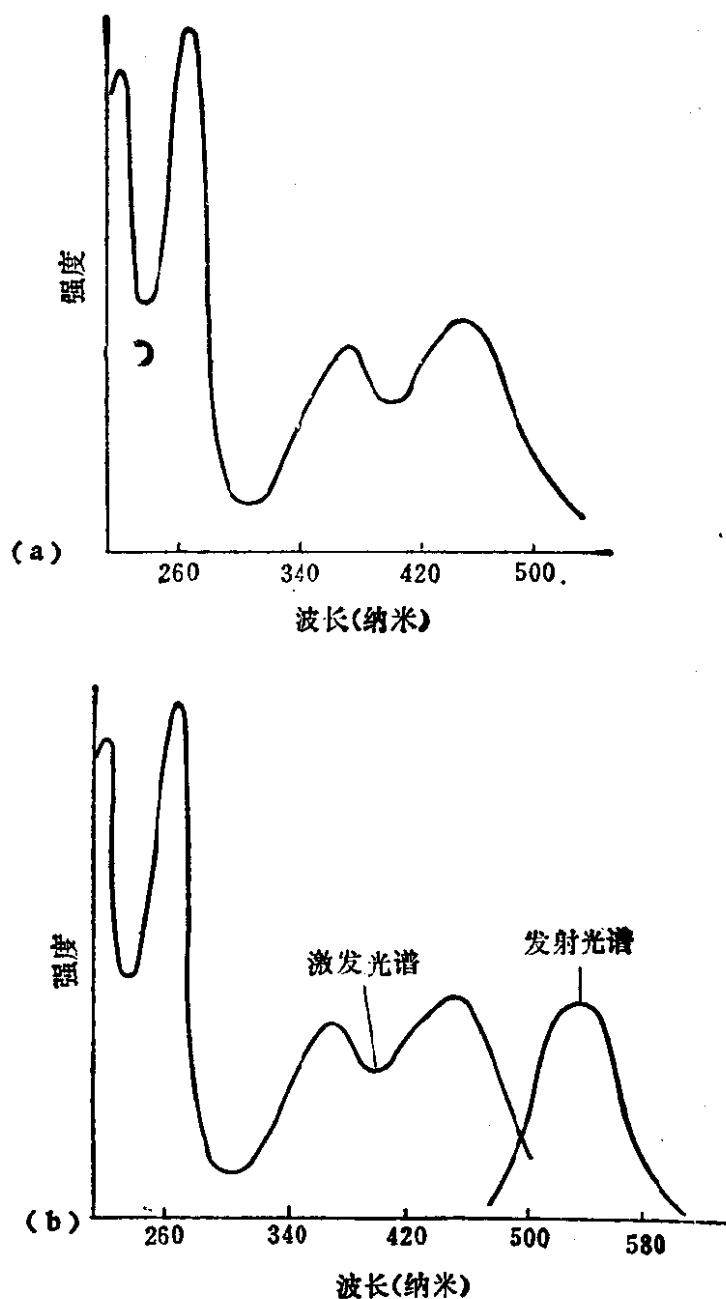


图 3.1 FMN 的水溶液(pH7)的吸收光谱(a)以及荧光激发光谱和发射光谱(b)

为激发波长的函数,便测得激发光谱。通常,激发光谱看起来很像生荧团的吸收光谱,因为较高激发态弛豫回到第一激发单重态的效率是很高的。这样,不管吸收的波长如何,最终总是以与激发波长处的吸光度成正比的速度产生出第一激发单重态。因

此,荧光的发射强度正比于激发波长处的吸光度*。

人们也许会预料,分子的荧光发射光谱将与其波长最长的那部分吸收光谱相重叠,因为两者都涉及基态和第一激发态之间的跃迁。图3.1(b)中的光谱表示通常观察到的情况,证明这种预言是不正确的。发射光谱比相应的吸收所处的波长更长(红移)。这里存在着两种主要的理由:

1. 在室温下,几乎所有的分子都处在它们所占有的某个特定电子态的最低振动能级上。这对于基态和激发单重态同样地适用。与通常的吸收相对应的波长带,0 振动能级间的跃迁是在能量的最低端;相反,组成荧光光谱的谱带,其 0—0 跃迁是在能量的高端(图 3.2)。这样,如果只是这一种效应在起作用,发射与吸收就应该近似地成镜像对称,只是在 0—0 跃迁的边缘上光

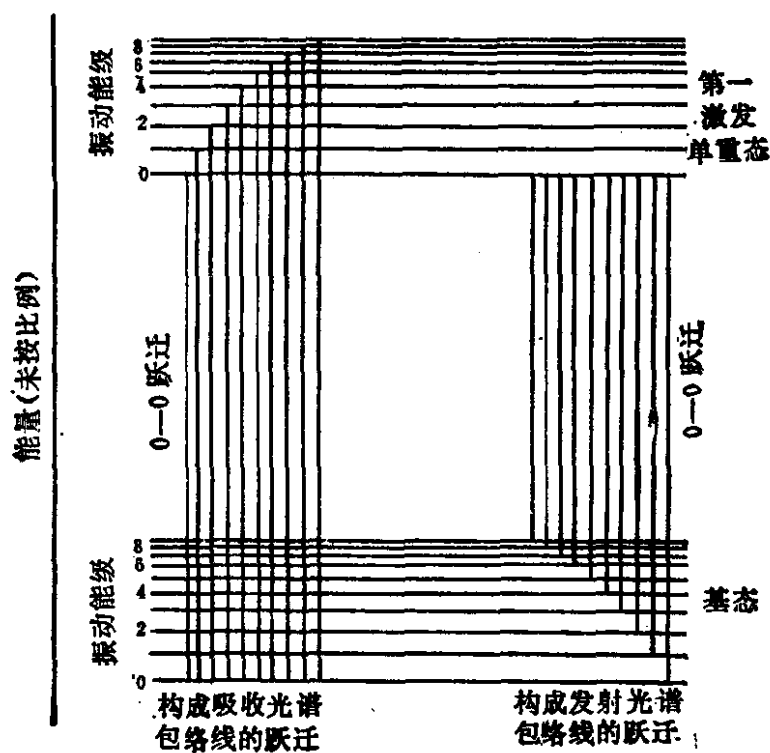


图 3.2 描述基态→第一激发单重态跃迁的能级图

* 当内部过滤效应严重时,这种说法必须修正(见35页)。

谱才有重叠。但图 3.1 中所画的光谱表明,实际的位移比预料的更大,因为两种光谱根本不存在明显的重叠。

2. 分子吸收光子只化费 10^{-15} 秒。在此短时间内原子核移动的距离可以忽略(典型的振动频率为 10^{13} 秒⁻¹),因此激发态分子中的原子位置以及分子周围的溶剂壳层最初是同由之产生的基态分子中的原子位置一致的(称作弗兰克-康登原理)。但基态和激发态的最稳定的原子构型不大可能完全相同。电子的跃迁当然会改变分子中电子的分布(分子的极性),因此,很可能原子及周围溶剂分子的位置稍有变化后的构型才是能量最低的构型。在第一激发单重态的寿命期内(典型的是 10^{-8} 秒),使激发态的能量降至最低的重排过程可能发生。发射时也有相反的类似效应。刚形成时,基态并不具有最佳的原子位置和溶剂化壳层。这两种效应相互增强,结果使发射比吸收所涉及的能量变化为小(图 3.3)。这一种红移的大小取决于溶剂。具有强溶剂化作用的极性溶剂(例如水)比弱溶剂化作用的非极性溶剂引起的红移更大。表 3.1 中核黄素的数据说明了这种倾向(在二噁烷中的极大发射波长比在水中的极大发射波长短一些),尽管在此例中这种影响是微小的。

强度

生色团的光吸收强度(用比尔定律表示)取决于被研究样品的量和它的摩尔吸光系数的乘积。摩尔吸光系数又取决于基态和激发态的电子轨道间重叠的程度。同样的因素支配着荧光强度。但受到监测的样品的量不再是总浓度和光程长的简单乘积,因为有关的物种(species)不是基态而是第一激发单重态。

通常是用生色团总分子数中的一部分来进行荧光测量的,这一部分的数目虽少但数量恒定(稳态),它们是依靠用恒定强

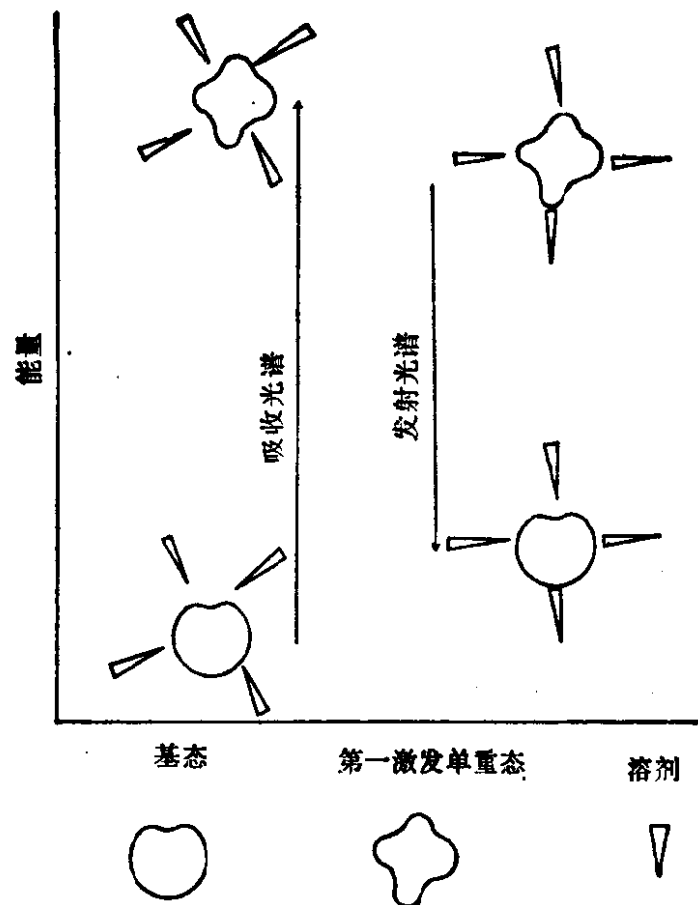
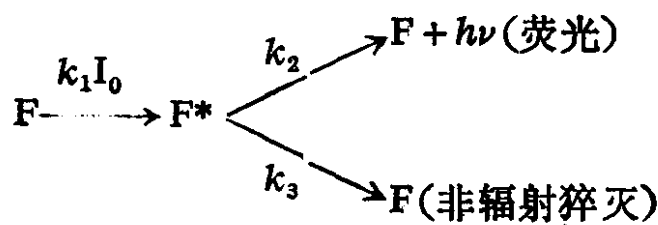


图 3.3 弗兰克-康登原理和状态之间溶剂化的差别对电子跃迁能量的影响

度的激发光辐照样品而处于第一激发单重态的。这种情况可以表示如下：



其中 F 是基态的生荧团，F* 是第一激发单重态，I₀ 是激发光强度，k₁，k₂，k₃ 是速度常数。在稳态时，k₁I₀[F] = (k₂ + k₃)[F*]。荧光发射的强度由 k₂[F*] 给出。将这些式子归并并消去未知的（和不易测量的）第一激发单重态的浓度[F*]，便可得到：

$$\text{荧光强度} = \frac{k_1 k_2 I_0 [F]}{k_2 + k_3} \quad (3.1)$$

除非在异常强烈的光照下,基态生荧团分子的浓度[F]接近于生荧团的总浓度。因为在任何瞬间只有<1%的分子被激发。 k_1 与基态分子吸收光子的本征几率有关(因此与吸收系数有关); k_2 也同样地与第一激发单重态发射的本征几率有关。当有关轨道间的重叠增加时,两者都会增大。

因此,样品的总的发射强度正比于以下各种因素:

- (i) k_1
- (ii) I_0
- (iii) [F]
- (iv) $k_2/(k_2 + k_3)$ 。

其中的前三项或者是常数(k_1),或者是独立变量(I_0 和[F]),但第四项商是难以定量预料的。这主要是因为 k_3 是包含几种非辐射去活化过程的复合速度常数,其中某些过程对于溶剂组成和温度的微小变化是敏感的。

荧光的猝灭

第一激发单重态以发射荧光的方式蜕变成基态是一种一级过程(如同放射性蜕变一样)。这一过程典型的速度常数(k_2)为 $10^6 \sim 10^7 \text{秒}^{-1}$ 。竞争的非辐射过程都是将第一激发单重态过剩的能量转化成热能,常常是开始时先转移到生荧团本身的激发振动能级,但最终(经碰撞后)将转化成溶剂的热能。当这些过程与辐射形式的能量亏损相竞争并“赢”得胜利的情况下,我们就说发生了荧光的猝灭。

非辐射跃迁

电子状态间的非辐射跃迁的限制较之弗兰克-康登原理所规定的辐射跃迁的限制更严格。不仅两种状态中原子的位置必须相同,能量也必须相等。对于双原子分子,这一点可用 Morse 曲线表示。该曲线表示分子的能量(纵坐标)与两个原子间距离的函数关系(图 3.4)。只是在两种电子态的 Morse 曲线相交的那一点上,才能发生两种状态间的非辐射跃迁。对于多原子分子来说,由于涉及许多个原子的位置,类似的曲线太复杂了,不

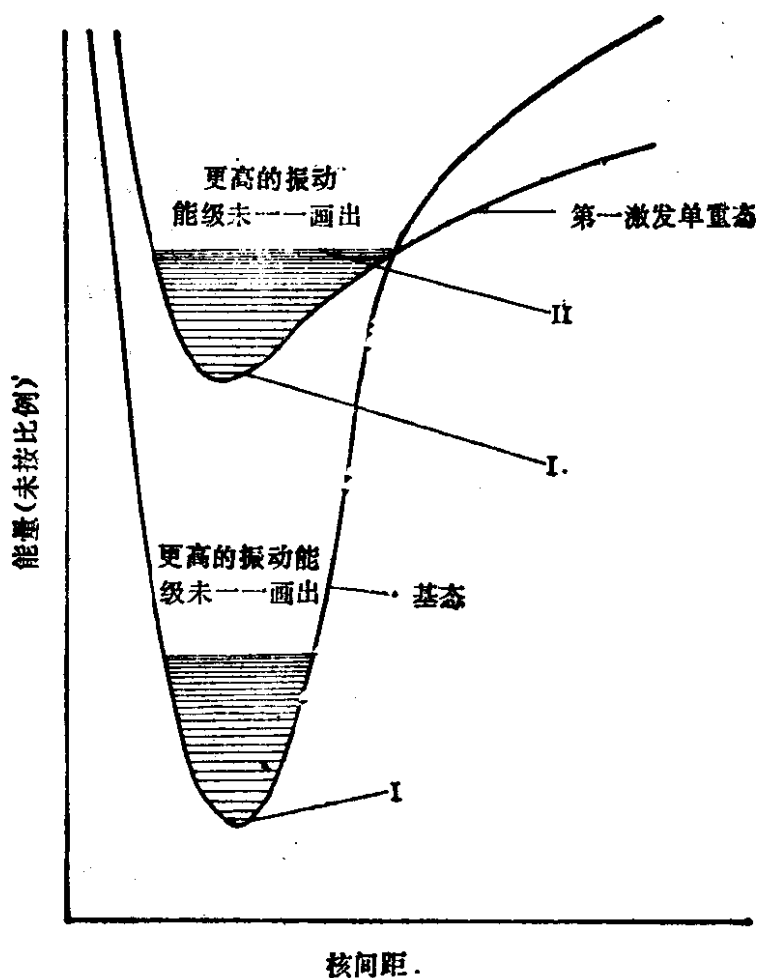


图 3.4 基态和激发态的 Morse 曲线, 用来说明内部转换所需的条件。

I: 能量最低(粒子数最多)的振动能级; I: 需经热激发使在此振动能级上的粒子数增多然后才能发生内部转换。