

分析化学

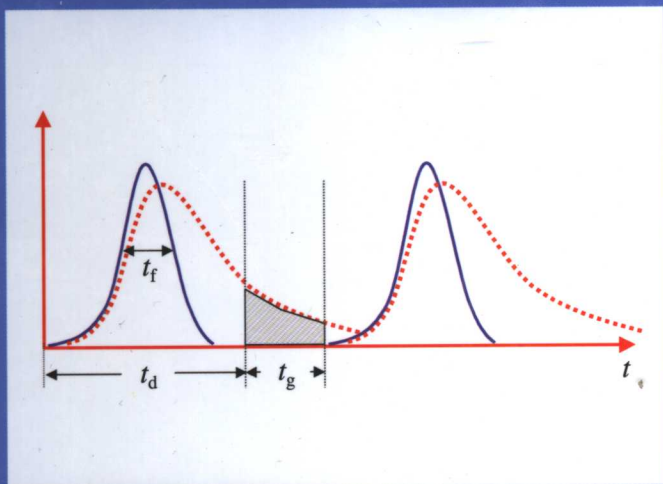
新方法
新技术

丛书

室温磷光分析法 原理与应用

朱若华 晋卫军 编著

CH



科学出版社

内 容 简 介

本书系统地介绍了室温磷光分析法的历史、应用和发展趋势,分章节讨论室温磷光分析技术(包括流体室温磷光法和固体基质室温磷光法等)的原理、发生机理、实验方法和应用范围;讨论各种分析技术的特点和影响因素。本书共分9章:首先阐述了室温磷光的光物理基础;然后介绍了室温磷光仪器和测量技术,固体基质室温磷光分析法,流体室温磷光技术,包括环糊精诱导室温磷光、胶束增敏室温磷光、敏化/猝灭室温磷光和无保护及不除氧室温磷光法,最后着重介绍了室温磷光传感器的原理和发展,并系统地讨论了生物大分子蛋白质和核酸的室温磷光 and 内源性以及外源性室温磷光探针技术在生命科学中的应用。

本书可供高等院校发光分析或分子光谱分析专业研究生和教师使用,也可供从事分析化学、生命科学、环境、医学等工作的科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

室温磷光分析法原理与应用/朱若华,晋卫军编著. —北京:科学出版社, 2006

(分析化学新方法、新技术丛书)

ISBN 7-03-016469-5

I. 室… II. ①朱…②晋… III. 磷光分析 IV. O657.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 133679 号

责任编辑:黄 海 吴伶俐/责任校对:包志虹

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

*

2006年3月第 一 版 开本:A5(890×1240)

2006年3月第一次印刷 印张:12 7/8

印数:1—3 000 字数:390 000

定价:50.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

首都师范大学研究生课程建设经费
资 助 出 版

分析化学新方法新技术丛书

编 委 会

顾 问 周同惠 (中国科学院院士,中国医学科学院药物研究所
研究员,博士生导师)

汪尔康 (中国科学院院士,中国科学院长春应用化学研
究所研究员,博士生导师)

主 编 程介克 (武汉大学化学系教授,博士生导师)

副主编 陈洪渊 (中国科学院院士,南京大学化学系教授,博士
生导师)

常文保 (北京大学化学系教授,博士生导师)

邹汉法 (中国科学院大连化学物理研究所研究员,博士
生导师)

前 言

21 世纪将是科学技术迅猛发展的新世纪,被称为“生物工程时代”和“高度信息化时代”。科学技术将成为经济社会发展的首要动力。“人类有科技就有化学,化学始于分析化学。”

21 世纪分析化学将面临巨大的挑战和机遇。分析化学不断吸取化学、生物、物理和数学等传统学科的最新成就,新兴的纳米技术中微电子学、显微光学及微工程学等微加工技术,正在对分析化学带来巨大的冲击。

21 世纪分析化学将处于广泛的、深刻的、激烈的巨大变革时期,不断向微型化(纳米芯片、生物芯片及芯片实验室)、仿生化(电子鼻和电子舌等传感器)、自动化(原位及体内实时在线监测)、信息化(临床、环境及生产过程监测的网络化)的方向发展。现代分析化学已成为科学技术和经济发展的重要基础,也是衡量一个国家科学技术发展水平的主要标志之一。

1979 年以来,为了适应我国生产、教学和科学研究的需要,科学出版社已陆续出版了一套比较系统、完整的《分析化学丛书》,深受广大读者喜爱和好评,有力地推动了我国分析化学的发展。

十多年来,科学技术日新月异,分析化学新方法和新技术不断推陈出新,分析化学整个面貌已发生了巨大的变化。为了更好地适应我国生产、教学和科学研究工作的需要,及时总结国内外的最新成就和研究成果,科学出版社计划组织出版一套《分析化学新方法新技术丛书》。为此,专门成立了编委会,确定了撰写这套丛书的方针和任务;推荐高等院校和科学研究单位的分析化学专家分头撰写,由科学出版社陆续出版。

本丛书突出一个“新”字,旨在反映新方法、新技术、新进展、新应用,鼓励学科之间交叉及渗透,不拘一格,充分体现 21 世纪分析化学的先进性、前沿性、创见性和代表性。力求选题新颖,立论严谨;论据充足,结构合理;兼收并蓄,着意创新;深入浅出,文字通顺;科学性和实用性并重。使生产、教学和科研战线上的广大读者,都能获得新理论、新知识和新技能,对工作有所帮助,以推动我国分析化学的新发展。

由于编者水平所限,经验不足,本丛书各分册中难免有缺点和错误,诚恳欢迎读者批评指正,以使这一套丛书越出越好。

《分析化学^{新方法}
新技术^{丛书}》
编委会

序 言

自从 1974 年 Paynter 等连续发表利用滤纸作基质的固体表面室温磷光分析方面的论文以来, 室温磷光分析技术的发展已经有 30 多年的历史, 在方法学上, 历经了从固体基质室温磷光到各种流体室温磷光体系, 从有序介质到无保护的自由溶液室温磷光体系等发展过程; 在应用方面, 从无机元素分析、有机药物分析、环境污染物分析到生物大分子研究等, 研究内容不断丰富。室温磷光分析技术已经成为重要的发光分析方法之一。

在国内, 最初黄素梅 [化学通报, 1982, (3): 23] 和郑用熙等 (分析化学, 1985, 13: 548; 1987, 15: 852) 介绍了室温磷光分析法在美国的发展情况。后来, 在清华大学郑用熙教授积极倡导下, 山西大学刘长松教授、冯克聪教授和山西农业科学院张苏社助理研究员于 20 世纪 80 年代初率先开展了室温磷光分析的研究, 清华大学、陕西师范大学、厦门大学等相继开始了室温磷光的研究。他们的工作各具特色, 研究成果受到了国内和国际同行专家的关注。如清华大学在无保护室温磷光方面, 陕西师范大学在磷光传感器方面, 厦门大学在磁效应室温磷光、敏化/猝灭室温磷光、环糊精诱导室温磷光等方面, 均取得很大进展。目前, 室温磷光研究已经辐射到许多研究组, 如首都师范大学、军事医学科学院、贵州大学、漳州师范学院、西北师范大学、韶关学院、忻州学院、井冈山师范学院等, 这说明室温磷光研究队伍在不断壮大。

综观国内外的的发展, 室温磷光研究成果丰硕, 迫切需要一部全面总结和深入讨论室温磷光分析法理论与应用的历史发展及科学现状的学术专著。虽然从 1984 年以来, 已经有几部关于室温磷光分析法的专著出版, 如 *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis* (T. Vo-Dinh, 1984)、*Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Applications* (R. J. Hurtubise, 1990) 等, 但是这些专著已经不能概括当前室温磷光技术的研究内容了。十余年前, 清华大学郑用熙教授就曾提议出版一部室温磷光方面的专著, 1999 年在已故著名分析化学家常

文保先生的鼓励和刘长松教授的筹划下，以及科学出版社操时杰先生的积极支持下，开始了本书的筹备工作，最后由朱若华和晋卫军成稿。本书原本由刘长松教授总策划，计划参与编写工作的有张苏社、魏雁声、朱若华、谢剑炜、李文友、双少敏、董川和晋卫军等，但由于工作繁忙或其他原因，有些人未能参加本书的最后成稿工作。但是他们都为本书提供了有益的帮助和建议，在此表示衷心感谢。对所有为室温磷光分析法做出贡献的国内学者和研究生表示感谢，他们的杰出工作也是促成本书面世的动力之一。

本书融入了国内外的室温磷光分析法的研究成果和最新进展。由于篇幅所限，原理、仪器和技术方面与荧光分析法相同的部分和低温磷光技术等已有相关的著作出版，在此不再赘述。

虽然经过反复修改，但由于作者水平有限，书中存在各种问题以及不当在所难免，敬请广大读者不吝赐教。

目 录

前言

序言

第 1 章 磷光物理基础	1
1.1 磷光发展简史	1
1.2 光致发光的光物理基础	2
1.2.1 分子轨道理论	2
1.2.2 基态和激发态性质	3
1.2.3 激发态的失活过程	7
1.3 磷光特征	10
1.3.1 激发光谱和发射光谱	10
1.3.2 量子产率	12
1.3.3 磷光寿命	13
1.3.4 磷光强度	15
1.3.5 偏振和各向异性	15
1.4 结构效应和环境影响	20
1.4.1 共轭电子体系和环大小的影响	20
1.4.2 重原子效应和顺磁效应	24
1.4.3 溶剂效应	27
1.4.4 温度效应	28
1.5 磷光猝灭	28
1.5.1 光学均匀和完全透明溶液中猝灭过程的一般描述	28
1.5.2 常见磷光猝灭剂的猝灭机理	30
1.5.3 内滤效应	33
1.6 三线态的研究方法及相关过程的应用	33
1.6.1 瞬时三线态-三线态 ($T_1 \rightarrow T_n$)* 吸收光谱	33
1.6.2 基态耗尽(亏蚀)三线态吸收各向异性(TAA)	34
1.6.3 延迟荧光	34
1.6.4 磁共振光学检测	35
参考文献	35

第 2 章 室温磷光测量仪器、装置与技术	38
2.1 磷光仪器的基本组成	38
2.1.1 光源	40
2.1.2 单色器	43
2.1.3 样品池	44
2.1.4 检测器	48
2.1.5 常见的商品仪器	50
2.2 磷光测量技术	53
2.2.1 时间分辨模式	54
2.2.2 磷光测量参数	60
2.3 除氧技术	63
2.3.1 通气除氧	63
2.3.2 酶反应除氧	64
2.3.3 化学除氧	64
2.3.4 溶液中氧浓度的测定	66
参考文献	68
第 3 章 固体基质室温磷光	69
3.1 固体基质	69
3.1.1 滤纸	70
3.1.2 纤维素膜、离子交换膜和硅胶板	81
3.1.3 固体盐晶体	84
3.2 重原子微扰剂	93
3.3 刚性化机理	98
3.3.1 表面吸附机理	98
3.3.2 氢键机理	99
3.3.3 基质隔离机理	102
3.3.4 基质填塞机理	102
3.3.5 微晶包埋刚性化机理	104
3.3.6 弱色散作用机理	106
3.4 氧气和湿度对 SS-RTP 的影响	107
3.5 固体表面发光量子产率的测定	111
3.6 SS-RTP 实验技术	114
3.6.1 提高实验精密度的方法	115
3.6.2 SS-RTP 的测量技术	118

3.6.3 SS-RTP 联用技术	125
3.7 应用	131
参考文献	136
第4章 表面活性剂有序介质增稳室温磷光	143
4.1 表面活性剂胶束有序介质及胶束动力学	143
4.1.1 表面活性剂有序介质特点	144
4.1.2 胶束的增溶作用及动力学	150
4.2 胶束增稳室温磷光法 (MS-RTP)	159
4.2.1 表面活性剂在 MS-RTP 中的应用	159
4.2.2 重原子微扰剂的作用原理及其选择	167
4.2.3 MS-RTP 中的除氧方法	170
4.3 其他有序介质体系的应用	172
4.3.1 微乳状液有序介质	172
4.3.2 微囊有序介质	173
4.3.3 共聚物粒子和嵌段共聚物胶束	175
4.3.4 合成酶模型-表面活性剂混合有序体系	175
4.3.5 脱氧胆酸盐体系: 非除氧的流体室温磷光测量	177
4.4 MS-RTP 的应用	183
参考文献	186
第5章 环糊精诱导室温磷光	190
5.1 大环化合物简介	190
5.2 主-客体包配平衡	193
5.2.1 环糊精对客体的包配形式及包配比	193
5.2.2 环糊精对客体包配过程的热力学和动力学特征	196
5.3 CD-RTP 中的重原子微扰剂和第三、第四组分	205
5.3.1 重原子微扰剂	205
5.3.2 第三组分	209
5.3.3 第四组分对 CD-RTP 的影响	223
5.4 除氧方法	225
5.5 非除氧 CD-RTP 的机理	226
5.6 应用与展望	228
参考文献	230
第6章 敏化和猝灭流体室温磷光	235

6.1	溶液中的能量转移	235
6.1.1	能量转移机制	235
6.1.2	能量转移过程与判据	238
6.2	敏化和猝灭室温磷光原理和条件	239
6.3	敏化和猝灭 RTP 的实验技术及应用	242
6.3.1	有机溶剂/水介质中的敏化和猝灭 RTP	242
6.3.2	有序介质中的敏化和猝灭 RTP	247
6.3.3	有序介质中的敏化/猝灭镧系离子室温磷光	252
6.3.4	敏化和猝灭室温磷光在高效毛细管电泳检测中的应用	255
	参考文献	259
第 7 章	流体介质中的无保护和胶态纳/微晶体自保护室温磷光	262
7.1	无保护介质室温磷光	262
7.1.1	纯流体中产生室温磷光的条件	262
7.1.2	取代芳烃和取代杂环化合物的无保护介质室温磷光	263
7.1.3	多环芳烃母体化合物的无保护介质室温磷光	266
7.1.4	无保护介质室温磷光的典型应用	270
7.2	胶态纳/微悬浮晶体自保护室温磷光	271
7.2.1	磷光性分子胶态纳米/微米悬浮晶体的制备及影响晶体尺寸的因素	272
7.2.2	磷光性分子胶态纳米/微米悬浮晶体的发光特性	273
7.2.3	磷光性分子胶态纳米/微米悬浮晶体可能的应用前景	275
	参考文献	276
第 8 章	室温磷光光化学传感器	279
8.1	传感器的基本特征	279
8.1.1	传感器的定义、组成、分类	279
8.1.2	光化学传感器的识别原理	283
8.1.3	光化学传感器的主要性能指标	284
8.2	室温磷光传感器	286
8.2.1	RTP 传感器的结构与组装	287
8.2.2	RTP 传感器活性相的制备	292
8.2.3	磷光信号测试的分类	300
8.3	RTP 传感器的应用	301
8.3.1	分子氧传感: 现场监测、活细胞和组织氧压的成像分析和临床应用	301

8.3.2	大气或汽车尾气中 SO_2 和 NO_x 的监测	309
8.3.3	湿度传感	309
8.3.4	温度传感	310
8.3.5	金属离子和阴离子传感	312
8.3.6	pH 传感	315
8.3.7	药物分析	317
8.3.8	环境中多环芳烃、杂环化合物和农残的测定	319
8.3.9	核酸、蛋白质、血糖、磷光免疫等生物医学传感器	320
8.4	结论和展望	322
	参考文献	322
第9章	生物大分子的室温磷光研究与应用	330
9.1	蛋白质的室温磷光研究	330
9.1.1	蛋白质内源性荧光	332
9.1.2	蛋白质中的内源性磷光基团	334
9.1.3	蛋白质的室温磷光	343
9.1.4	表征蛋白质中色氨酸残基所处区域的结构特点及动力学性 质的磷光参数	347
9.2	核酸的室温磷光研究	366
9.2.1	低温磷光	366
9.2.2	室温磷光	369
9.3	外源性磷光探针在生物医学领域的应用	370
9.3.1	卟啉和金属卟啉	370
9.3.2	钯/铂卟啉的室温磷光	373
9.3.3	钯/铂卟啉室温磷光探针在生物医学方面的应用研究	376
9.3.4	其他金属卟啉配合物探针	379
9.3.5	其他类型的磷光探针	380
	参考文献	382
	主题索引	386

第 1 章 磷光物理基础

发光 (luminescence) 通常定义为原子或分子从激发态到较低能态经历的辐射发射。如果激发态是通过吸收入射辐射 (incident radiation) 而产生的, 那么源于这种激发态的发射 (emission) 称为光致发光 (photoluminescence)。荧光 (fluorescence) 和磷光 (phosphorescence) 现象作为光致发光的两种姊妹技术, 在分析科学中具有重要地位。对许多样品而言, 磷光和荧光信息可以同时获得。除了作为成分测试工具外, 磷光方法也可以作为分子旋转动力学、小分子与生物大分子相互作用机理、生物大分子 (如蛋白质和核酸) 结构及构象变化动力学监测等的有力工具。

1.1 磷光发展简史

磷光现象很早就已被认识到^[1], Cellini 于 1568 年描述了一种发光的钻石, 这是人们认识的第一个天然磷光体。1600 年, 人们发现一种叫做 Bolognian stone 的著名磷光体, 即意大利产的一种天然重晶石。这一发现成为其后大约 200 年间科学家研究的主题^[1]。1858 年, Edmond Becquerel 研制了第一台磷光显微镜, 于 1861 年建立了磷光衰减的指数规律。1888 年, E. Wiedemann 曾报道过有机染料在固态溶液和凝胶中的磷光发射现象。1896 年, 人们观察到吸附在固态凝胶上的有机染料的磷光。1935 年, Jablonski 提议采用能级图来解释磷光过程, 从此这种能级图构成了理解发光现象的基础^[2]。

20 世纪 40 年代以后, 磷光发展过程中的几个重要的事件包括: ①1944 年, Lewis 和 Kasha 证明有机分子中的磷光就是最低三线态和单线基态间的辐射跃迁, 而且他们预示磷光现象可以作为鉴定有机化合物的工具^[3]。②1962 年, Konev^[4]在他的专著里描述了荧光和磷光在蛋白质和核酸研究方面的应用前景。③1962 年, Parker 和 Hatchard^[5]报道了一种光电子磷光光度计, 并测得了磷光光谱、磷光寿命和量子效率

等。这些结果无疑使化学家对磷光产生更大的兴趣。④1963年, Winefordner 等^[6]第一次报道了复杂样品血液中阿司匹林的低温磷光分析法。

为了最大限度地减少分子碰撞导致的非辐射过程, 早期常将磷光试样冷却到液氮的温度 (77K, -196°C) 形成低温刚性玻璃体以观察磷光, 此即低温磷光 (low temperature phosphorescence, LTP)。虽然, LTP 早在 1957 年就已用于定量分析^[7], 而且灵敏度很高, 线性范围宽, 检测限低, 选择性好, 光谱精细结构 (fine structure) 丰富。然而, 作为常规的磷光光度分析方法, 其主要限制之一是需要深冷实验条件。同时, 为了防止低温玻璃体裂纹, 必须选择具有适当膨胀系数的单一或混合溶剂, 而这些溶剂的种类非常有限。测试后, 样品的更换和石英样品管的洗涤比较困难, 操作繁琐。

在 LTP 获得应用后的第十年, 即 1967 年, Roth^[8]研究了近 30 种有机化合物在几种支持物上的室温磷光发射情况, 其中 17 种化合物, 包括酰基 β -萘氨类、 α -或 β -萘酚及 1, 10-菲咯啉等在纤维表面有足够强的磷光 (室温磷光, RTP), 可以检测到微克级或亚微克级水平。此后, Schulman 和 Walling^[9,10]又报道了吸附在各种支持介质上的离子型有机化合物的 RTP, 并预示该技术可以作为离子型态的有机物及生物化合物的定量分析与定性鉴定的工具。同时, 人们在流体介质中也观察到了 RTP 发射, 这些发射磷光的分子或者本身具有特殊的刚性^[11], 或者受到像二甲基汞这样的自旋禁阻跃迁增强剂的作用^[12]。至此, RTP 已显示出其定量分析的巨大潜力。

1974 年, Paynter 等^[13,14]连续报道了利用滤纸作基质的固体表面室温磷光分析应用, 使室温磷光分析发展到实用的研究阶段, 把 RTP 确立为一类新的分析技术, 并很快在痕量有机分析、生物分析等领域得到广泛应用。Vo-Dinh 撰写的第一部室温磷光分析方面的专著^[15]于 1984 年出版。至今已建立起各种固体基质室温磷光、流体室温磷光、磷光传感及探针等分析方法。

1.2 光致发光的光物理基础

1.2.1 分子轨道理论

根据分子轨道 (molecular orbit) 理论, 两个原子轨道结合时, 既

可以形成成键分子轨道 (bonding molecular orbit), 又可以形成反键分子轨道 (antibonding molecular orbit)。在基态时, 分子中的电子占据成键分子轨道。在有机分子中原子间电子云以头碰头形式形成的单键分子轨道叫做 σ 轨道, 相应的电子叫 σ 电子。双键分子轨道中除了 σ 轨道外, 还有以肩并肩形式形成的 π 分子轨道。相应反键分子轨道分别标记为 σ^* 和 π^* 。此外, 许多有机化合物还包含非键电子 (nonbonding electron), 即未共用电子或孤电子对 (non-shared electron, the non-shared lone pair electron), 用 n 表示。上述分子轨道的相对能级水平如图 1.1 所示。当吸收辐射光时, 在一定能级之间可以产生下列四种类型的电子跃迁: $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。

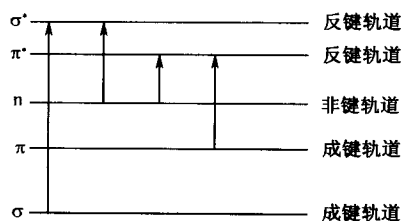


图 1.1 分子轨道及电子能级跃迁示意图

对于甲醛分子: $n \rightarrow \sigma^*$ 为 175nm, $n \rightarrow \pi^*$ 为 290nm, $\pi \rightarrow \pi^*$ 为 156nm

在电子跃迁中所涉及的各种分子轨道的性质, 是决定分子发光特性的重要因素。强发光的有机化合物大都是具有大 π 电子体系的分子, 如果电子跃迁时涉及把一个电子从成键 π 轨道提升到反键 π^* 轨道上去, 这种跃迁称为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。其结果产生的电子态称为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 激发态。对于含有杂原子 (N、O 或 S) 的共轭体系, 或者在取代基中含有 N、O 或 S 原子的共轭体系中, 如果电子跃迁是从一个非键的 n 轨道提升到一个反键的 π^* 轨道上去, 所产生的电子态称为 $n \rightarrow \pi^*$ 激发态。

1.2.2 基态和激发态性质

1.2.2.1 单线态和三线态

电子自旋的状态可以用自旋多重度 $M = 2S + 1 = 2 \sum s_i + 1$ 表示, S 为总自旋, s_i 为第 i 个电子自旋量子数。绝大多数有机分子都含有偶

数数目的电子。在基态时，电子成对地填充在能量最低的各种原子轨道中。根据 Pauli 不相容原理 (Pauli exclusion principle)，对一个给定的轨道中的两个电子，必定具有方向相反的自旋，且其总自旋 S 必定等于零，这种状态叫单线态 (singlet state)。所以，分子基态没有净自旋，这样的分子如果置于外磁场中，能级将不会发生分裂。稳定单自由基的基态是双重态 (doublet state)，因为奇数的电子在磁场中可能有两种取向，其能量略有不同。

通常，如果一个电子从最高占有轨道被激励到最低的或较高的未占有空轨道中，这个过程称为激发，所产生的能量较高的电子态称为激发态。基态一般是单线态（也有许多例外，如双氧分子基态是三线态，稳定的有机自由基的基态为双重态），而激发态可能是单线态，也可能是三线态 (triplet state)，这依赖于激励到较高轨道上的电子的最终自旋状态。为简便起见，图 1.2 表示出一种基态和两种激发态的构型。在未被占满的各轨道中的两个电子的自旋就不再受 Pauli 不相容原理的限制。激发单线态具有两个方向相反的自旋，即激发电子的自旋仍然与基态电子配对。在三线态两个电子不再配对，它们的自旋是平行的，净自旋等于 1，其多重性为 3。

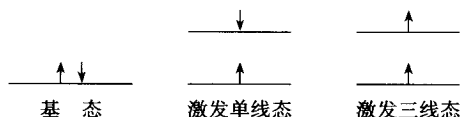


图 1.2 分子轨道中基态、激发单线态和三线态典型的自旋排布示意图

分子的单线态和三线态性质是不同的。三线态能级总是较低于相应的单线态能级，这是由 Hund 规则所决定的。Hund 规则认为，具有相同（平行的）自旋的状态，其能量总是比相应的具有相反（反平行的）自旋的状态要低一些。平行自旋各电子倾向于在空间上要分离得更开一些，其结果是受到较少的库仑相互作用。三线态是顺磁性的 (paramagnetic)，而单线态是反磁性的 (diamagnetic)。相对于单线态-单线态跃迁来说，单线态-三线态跃迁（转换）概率是相当低的，一个基态分子被直接激发到三线态过程的吸收峰强度比前者弱几个数量级，激发三线态的布居 (population) 可以通过激发单线态来完成。激发三线态的寿