

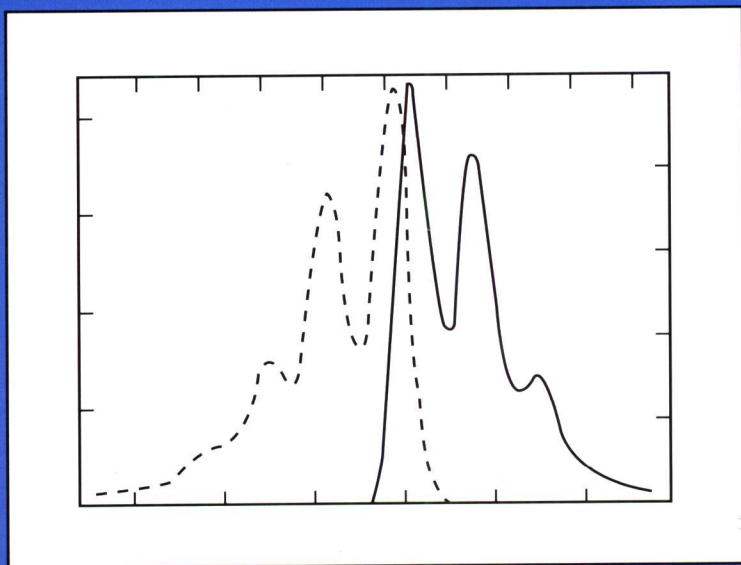
21世纪科学版化学专著系列

荧光分析法

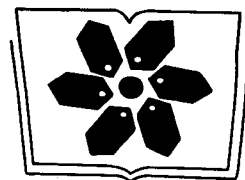
(第三版)

许金钩 王尊本 主编

GH



科学出版社



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>

源海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

*

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(新欣))

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 and 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。陈国珍教授在创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(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、镅的荧光分析·····	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 钕、钐、铕、铈的荧光分析·····	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，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 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。

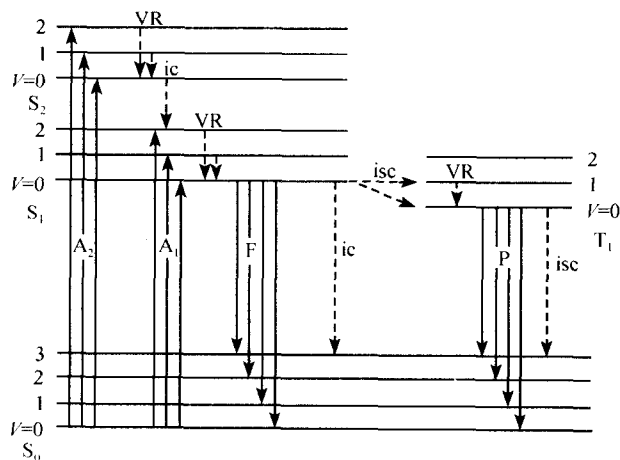


图 1.1 分子内的激发和衰变过程

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：

