

94.11.21

荧光分析进展

陈国珍 黄贤智 许金钩 编著



厦门大学出版社

06573
941

教师阅览室

712419

荧光分析 进展



90023368



陈国珍 黄贤智 许金钩 编著

厦门大学出版社

(闽)新登字 09 号

荧光分析进展

陈国珍 黄贤智 许金钩 编著

*

厦门大学出版社出版发行

福建省新华书店经销

福建连城县印刷厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 8.125 印张 2 插页 200 千字

1992 年 10 月第 1 版 1992 年 10 月第 1 次印刷

印数 1—2000 册

ISBN 7-5615-0498-5/O · 41

定价:5.60 元

北 京 春 日

总编辑刘三寿 总编辑刘三寿 总编辑刘三寿 总编辑刘三寿 总编辑刘三寿

荧光分析进展

陈国珍 黄贤智 许金钩 编著

1991年春

厦门大学出版社

内 容 简 介

本书由我国著名的分析化学家陈国珍等三位教授总结多年科研、教学经验编写而成。其特点在于着重介绍近年来荧光分析法的最新进展(如超速光谱法、超声喷气同步荧光法、免疫荧光法以及荧光分析在生物学、医学及其他相关学科中的应用等)。本书内容新颖,文字流畅,它将帮助读者较快进入荧光分析的最前沿,是分析化学教学、科研难得的参考书。

普通化学入门

712419

编 者 的 话

本书是在编者于 1987 年至 1989 年为三届分子发光分析方向博士研究生讲授荧光分析法课程所使用的部分教材的基础上编写的。在编印成册的过程中,编者还补充了近两年来的若干文献,以冀能包括荧光分析法在若干方面的最新发展内容。

与其它学科一样,荧光分析随着现代科学技术的进步也在日新月异飞速发展。编写本书的目的在于使已经了解并掌握荧光分析法基本原理、方法、仪器和应用(有关这方面内容可参阅科学出版社 1990 年 10 月出版的《荧光分析法》的第二版)的分析化学工作者对荧光分析法在若干方面的最新进展有一大致了解,以冀促进我国在这一领域研究工作的深入开展。

编写出版博士研究生教材在我国尚不多见,因此缺乏经验,加上编者们水平有限,错误之处希读者不吝指正。

编 者

1991 年春

目 录

第一章 时间分辨荧光法	(1)
§ 1.1 时间分辨荧光法用于芘被吸附在 固体表面上机理的探索	(1)
§ 1.2 超速光谱法	(17)
第二章 相分辨荧光法	(31)
§ 2.1 相分辨法同时测定金属螯合物二组份混合物	(31)
§ 2.2 相分辨荧光法与同步激发联用于 多组份多环芳烃混合物的分析	(40)
第三章 同步荧光法	(48)
§ 3.1 超声喷气同步荧光法	(48)
第四章 免疫荧光法	(57)
§ 4.1 应用铈的螯合剂作多重荧光标记	(57)
第五章 固体表面室温发光法	(65)
§ 5.1 α -环糊精诱导固体表面室温发光法的 机理探索及其应用	(65)
§ 5.2 荧光光谱和荧光寿命用于荧光体固定化在 固体表面上和共价键聚合固定相的 机理的探索	(77)
§ 5.3 潜在指纹的激光检测	(85)
第六章 二光子荧光法	(92)
§ 6.1 二光子激发荧光法(TPEF)	(92)
第七章 偏振荧光法	(101)

§ 7.1	圆二色性的荧光检测	(101)
§ 7.2	荧光各向异性选择性技术 ——一种多组份荧光分析新方法	(113)
第八章	光纤荧光传感器	(125)
§ 8.1	相位移光导纤维传感器	(125)
§ 8.2	光纤荧光免疫传感器	(128)
第九章	胶束荧光	(145)
§ 9.1	胶束荧光简介	(145)
§ 9.2	胶束介质对各种喹啉盐荧光的影响和金属 离子对胶束溶液中多环芳烃荧光的影响	(157)
§ 9.3	分子内激态二聚体荧光法(IEF)用于胶囊的研究	(165)
第十章	包络物荧光	(174)
§ 10.1	β -环糊精包络物生成机理的探索	(174)
第十一章	荧光分析在生物学和医学上的应用	(188)
§ 11.1	Förster 能量传递及其在 蛋白质动力学上的应用	(188)
§ 11.2	激光微荧光法及其在 抗癌机理研究中的应用	(203)
§ 11.3	恶性肿瘤的光化学治疗和 激光诱导荧光(LIF)诊断(定位)	(209)
§ 11.4	荧光法用于视觉色素的研究	(218)
§ 11.5	异氯四环素的 pH/荧光行为	(224)
第十二章	发光分析仪器	(232)
§ 12.1	电荷转移检测器(CTD)及其在 荧光分析上的应用	(232)
§ 12.2	相荧光计的进展	(243)

第一章 时间分辨荧光法

§ 1.1 时间分辨荧光法用于芘被吸附在固体表面上机理的探索

时间分辨荧光法可以同时记录时间分辨和能量分辨发射光谱,能够提供有关激发分子的动力学信息^[1,2]。

在不均匀的体系如固体基质中,光化学和光物理性质较为复杂,曾报告芘被吸附在多孔玻璃、铝矾土、氧化镁上发生单体荧光和激态二聚体荧光,但某些被吸附物的缔合物则存在于基态^[3,4]。

芘分子因具有很长激态单线寿命和较高的量子效率,故选用其作为研究不均匀体系的探针。

一、芘被吸附在硅胶上^[1,5]

图 1.1 为芘被吸附在硅胶上的时间分辨光谱。从图可看出在 390nm 的振动结构相当于单体荧光,而在 475—480nm 的无结构宽带相当于溶液中激态二聚体荧光。但和溶液中的时间分辨光谱不同^[6],被吸附的芘的单体荧光和类似激态二聚体荧光是单调地衰变,单体的寿命约为 200ns,类似激态二聚体的寿命约为 70ns。芘在环己烷中的单体寿命为 450ns,激态二聚体寿命为 65ns,晶体芘的激态二聚体寿命为 113ns^[7]。

从图 1.2 和图 1.3 可看出,从单体荧光波长 390nm 和类似激态二聚体波长 475—480nm 所取得的激光光谱并不相同,前者和溶液中芘的吸收光谱相似,而后者并不同。这些激发谱表明类似激

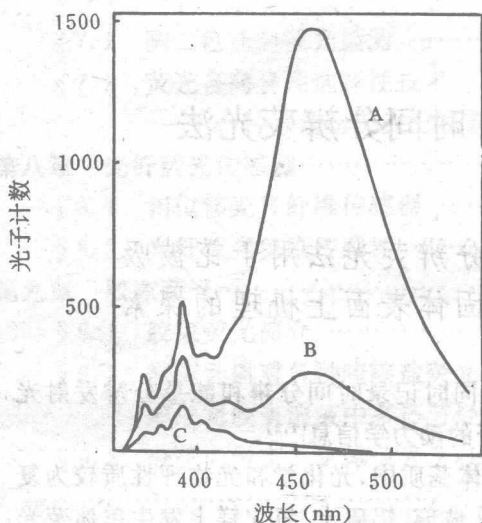


图 1.1

芘被吸附在硅胶上
(24mg 芘/gSiO₂)的时间
分辨荧光光谱
(A)闪光后 7—52ns, (B)
108—162ns, (C) 347—
404ns.

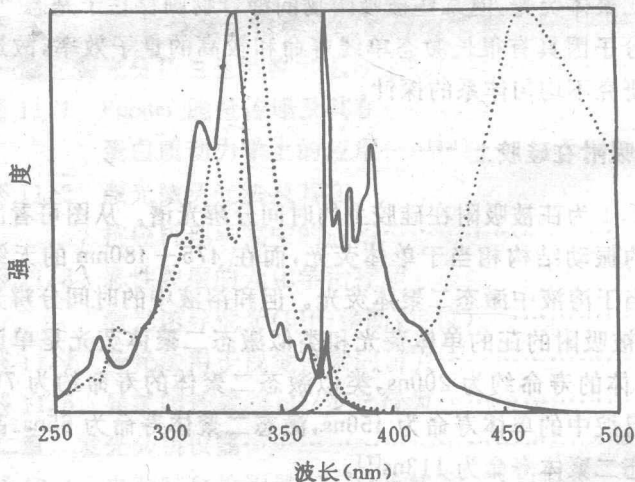


图 1.2 芘被吸附在硅胶上的激发光谱和荧光光谱

激发光谱 荧光光谱

— $\lambda_{em} 390, \theta=1$ $\lambda_{ex} 330, \theta=1$

..... $\lambda_{em} 480, \theta=1$ $\lambda_{ex} 345, \theta=3$

态二聚体荧光主要来自某些缔合苊络合物,但又不是典型的激发态二聚体,因为在单体发射波长 390nm 和在宽带发射波长 475—480nm 的激发光谱并不相同。类似激发态二聚体荧光也并非来自硅胶表面上的苊晶体,而是来自缔合吸附分子,故它们的荧光光谱并不一样。苊被吸附在硅胶上的荧光峰比晶体苊的荧光峰显著红移,如图 1.3 所示。

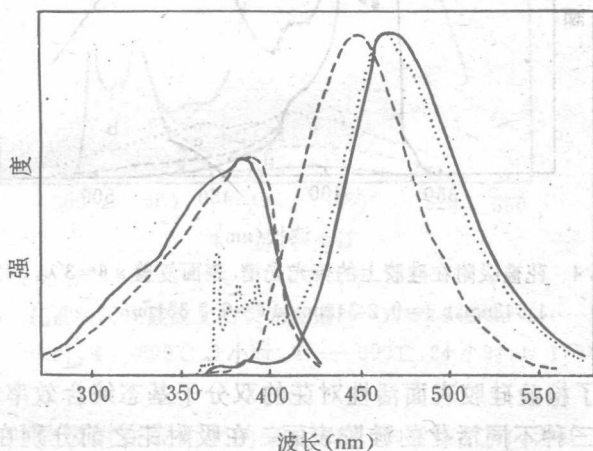


图 1.3 苊的激发光谱和荧光光谱。——苊被吸附在硅胶上,130%,……苊的乙醇溶液,---苊晶体粉末。激发光谱 λ_m 475nm, 荧光光谱 λ_x 318nm。

所谓类似激发态二聚体被认为是在硅胶表面上形成的基态缔合苊络合物,单体与络合物同时被激发。该络合物被称为双分子基态缔合物(BGSA)。

图 1.4 表示苊被吸附在硅胶上不同复盖层的荧光光谱。甚至在其浓度远远低于单层复盖($\theta=0.2$)时,类似激发态二聚体的宽带还存在,而当 $\theta=3$ 时,单体和类似激发态二聚体的积分荧光强度几

乎相等。

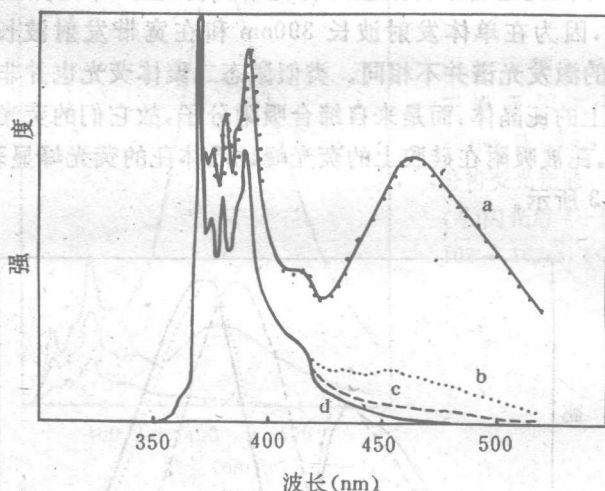


图 1.4 芘被吸附在硅胶上的荧光光谱. 表面复盖 a $\theta=3 \lambda_{\text{ex}} 342\text{nm}$, b $\theta=1 342\text{nm}$, c $\theta=0.2 342\text{nm}$, d $\theta=0.2 331\text{nm}$.

为了检验硅胶表面活性对芘的双分子基态缔合效率的影响, 制备了三种不同活化的硅胶表面。在吸附芘之前分别在真空下 500°C 除气 2 小时, 在空气中 800°C 加热 3 小时, 在空气中 900°C 加热 24 小时, 后两种冷却至 200°C , 然后进行吸附。其荧光光谱载于图 1.5。其 R 值为 I_{460}/I_{390} , 可作为芘的双分子基态缔合物生成效率的量度。其数据列下, 可看出该缔合物的生成效率以在最活化的硅胶表面上(950°C , 24 小时)为最大。

$R = \frac{I_{460}}{I_{390}}$	I	I	II	(IV)
	0.48	0.24	2.76	0.12

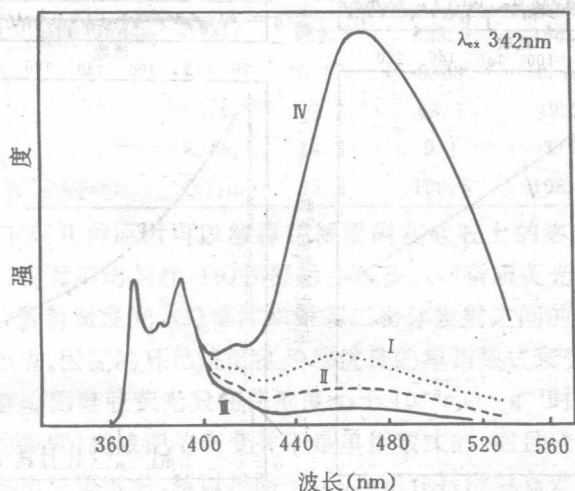


图 1.5 芑被吸附在硅胶上的荧光光谱. $\theta=1, \lambda_{ex} 342nm$. I500℃, 2 小时, II ---800℃, 3 小时, III ——900℃, 24 小时, IV 170℃.

芑单独被吸附在表面上的衰变均非单指数式的, 无论表面复盖、样品制备温度及老化时间, 激发波长与发射波长的改变都是如此。图 1.6 和图 1.7 是其典型的荧光衰变曲线。

假设其为双指数式衰变, 用计算机依下式进行重复最小二乘法去拟合^[8,9], 并计算平均寿命:

$$I_f = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} \quad (1.1)$$

$$\bar{\tau} = \frac{A_1 \tau_1^2 + A_2 \tau_2^2}{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2} \quad (1.2)$$

其结果如表 1.1 所示。

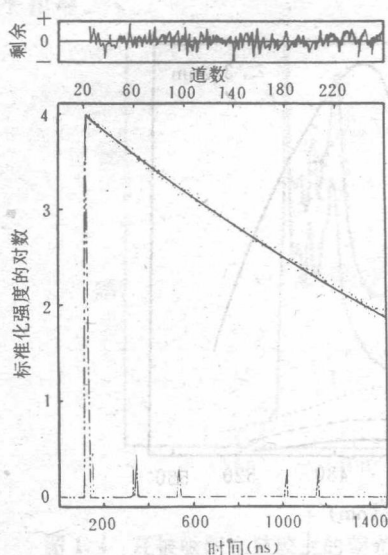


图 1.6 芘被吸附在硅胶上的衰变曲线. $\theta=1, \lambda_{ex} 331\text{nm}, \lambda_{em} 390\text{nm}$.

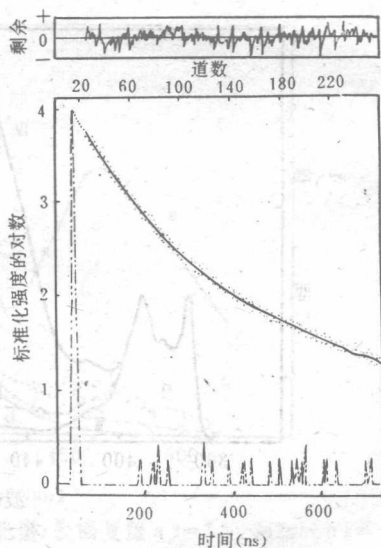


图 1.7 芘被吸附在硅胶上的衰变曲线. $\theta=3, \lambda_{ex} 342\text{nm}, \lambda_{em} 460\text{nm}$.

表 1.1 芘被吸附在硅胶上的荧光衰变

		表面复盖		
		3%	1%	0.2%
激发: 331nm	A_1	0.12	0.07	0.08
发射: 390nm	τ_1, ns	288.0	346.2	310.1
	A_2	0.04	0.07	0.05
	τ_2, ns	86.5	170.3	140.7
	A_2/A_1	0.37	0.91	0.65
	$(\tau), \text{ns}$	268.2	290.0	271.7
激发: 342nm	A_1	0.01	0.01	0.05

表面复盖

		3%	1%	0.2%
发射:460nm	τ_1, ns	192.4	233.5	168.1
	A_2	0.17	0.08	0.17
	τ_2, ns	58.3	59.5	49.2
	A_2/A_1	14.3	9.1	3.5
	$(\tau), \text{ns}$	85.2	106.5	108.1

下列几种原因可以解释芘被吸附在硅胶上的多指数衰变行为:(a)表面不均匀性,(b)仪器后生现象,(c)杂质荧光,(d)硅胶荧光,(e)散射激发光,(f)单体和激态二聚体发射之间的干扰,(g)微晶的形成。因芘的环己烷溶液呈现优良的单指数式衰变,所以排除了b和c。因硅胶荧光只在芘浓度小于 $10^{-8} \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 时才会歪曲吸附芘的强度,高浓度芘的衰变并不是单指数式的,而且硅胶荧光的衰变时间比芘短得多,所以排除了d。当用包括散射光效应进行双指数拟合分析衰变曲线时,衰变常数并没有变化,且散射光脉冲宽度远远小于在单体和在 BGSA 区取得的衰变时间,所以排除了e。至于f的可能性尚不能完成排除。g 则二个或三个缔合分子不能组成一个微晶,关于激态二聚体和微晶之间的光物理还不清楚。

对于芘的荧光多指数衰变行为最可能的解释似乎是a,即芘和吸附表面之间的不均匀相互作用。在硅胶上芘分子主要与硅醇的“端基”即羟基相互作用,吸附的力量被认为是静电相互作用、氢键合^[10]、分散力^[11]、电荷转移相互作用等。相互作用的形式决定于被吸附有机物的性质,吸附表面及其活化处理,吸附的特定位置。决定于硅醇分布,邻近吸附位置的局部几何(孔径、表面曲率)等。一个硅醇可以与任何苯环相互作用,在同一环上可以结合多个硅醇,决定于特定烃的形状。某些区域具有更有效的结合,可和更多的硅醇重叠,即所谓“优选位置”。吸附剂和被吸附物之间的相互作用可能导致具有激态的不同去活化速率的发光中心。

二、苝被吸附在 Al_2O_3 和 CaF_2 上^[6]

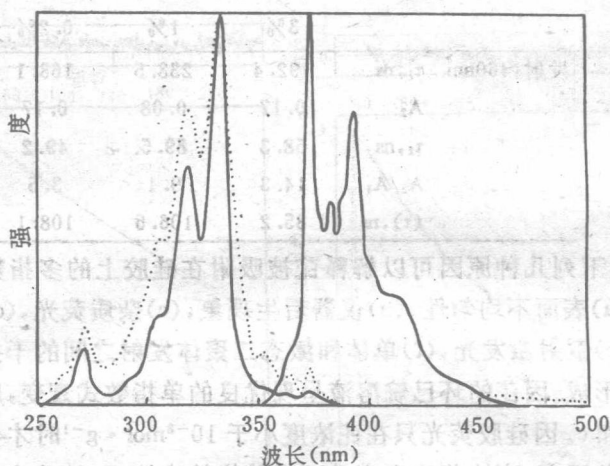


图 1.8 苝被吸附在 CaF_2 上的激发光谱和荧光光谱. — 0.2

$\lambda_{\text{ex}} 331\text{nm}, \lambda_{\text{em}} 392\text{nm}, \cdots \cdots 0.5, \lambda_{\text{em}} 392\text{nm}.$

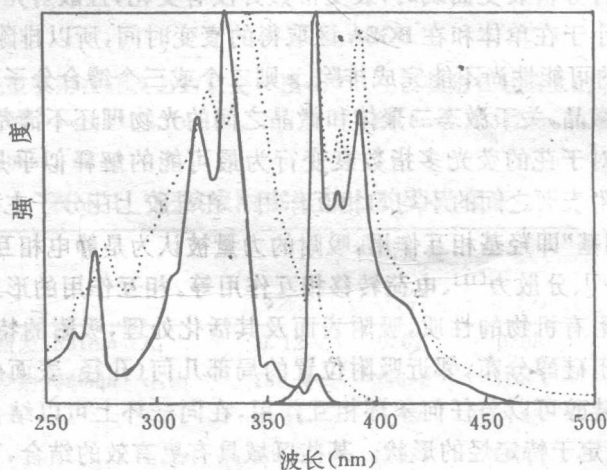


图 1.9 苝被吸附在 Al_2O_3 上的激发光谱和荧光光谱. — 0.2, λ_{ex}

$334\text{nm}, \lambda_{\text{em}} 390\text{nm}, \cdots \cdots 0.5, \lambda_{\text{ex}} 344, \lambda_{\text{em}} 460\text{nm}.$

图 1.8、1.9 和图 1.2 比较, 苾被吸附在 CaF_2 上的荧光光谱, 其结构比被吸附在 Al_2O_3 上的更为精致, 但还比不上被吸附在硅胶上的, 比在硅胶上的少了一个 378nm 振动峰。

苾被吸附在 Al_2O_3 上 $\theta=5$ 的激发光谱既加宽又红移。但吸附在 CaF_2 上的, 仅加宽而不红移。

苾被吸附在 CaF_2 上, 甚至 $\theta=5$, 其荧光光谱与激发波长无关, 所以缺少任何络合物的荧光。但从寿命测量结果看来, 其衰变还不能单指数衰变函数表示。

表 1.2 苾被吸附在 CaF_2 上的荧光衰变

	表面复盖		
	5%	1%	0.2%
A_1	0.014	0.091	0.035
τ_1, ns	125.0	100.7	88.2
A_2	0.064	0.140	0.100
τ_2, ns	222.9	226.6	228.9
A_2/A_1	1.45	1.54	2.86
$(\tau), \text{ns}$	195.6	198.4	212.2

激发: 331nm, 发射: 392nm.

表 1.3 苾被吸附在 Al_2O_3 上的荧光衰变

	表面复盖		
	5%	1%	0.2%
激发: 334nm A_1	0.079	0.110	0.142