

第6章 分子发光分析法

教学时数：4 学时

教学要求：

1. 理解分子荧光和分子磷光的基本原理；
2. 理解分子荧光激发光谱、发射光谱的含义；
3. 掌握分子荧光发射光谱的特性；
4. 了解荧光光谱仪的组成及各部分的作用；
5. 了解磷光分析法的特点和仪器；
6. 了解化学发光分析法的原理及应用

教学重点与难点：

1. 荧光分析法，荧光现象的基本原理、特点和分子的结构特征；荧光物的量子产率和荧光猝灭现象，分子荧光发射光谱的特性；
2. 荧光分析的定量原理，荧光分光光度计的原理和结构；
3. 磷光分析法的特点和仪器；
4. 化学发光现象及其产生的基本条件，化学发光分析方法的特点。

室温下，大多数分子处于基态的最低振动能级，处于基态的分子吸收能量（光能、化学能、电能或热能）后被激发为激发态，激发态不稳定，将很快衰变到基态，若返回到基态时伴随着光子的辐射，这种现象称为“发光”。分子发光包括荧光，磷光，化学发光，生物发光等。

6-1 荧光分析法原理

一. 荧光产生的机理

每个分子中都具有一系列严格分立相隔的能级，称为电子能极，而每个电子能级中

又包含有一系列的振动能级和转动能级。分子中电子的运动状态除了电子所处的能级外，还包含有电子的多重态，用 $M=2S+1$ 表示， S 为各电子自旋量子数的代数和，其数值为 0 或 1。根据 Pauli 不相容原理，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。若分子中所有电子都是自旋配对的，则 $S=0, M=1$ 该分子便处于单重态(或叫单重线)，用符号 S 表示。大多数有机化合物分子的基态都处于单重态。基态分子吸收能量后，若电子在跃迁过程中，不发生自旋方向的变化，这时仍然是 $M=1$ ，分子处于激发的单重态；如果电子在跃迁过程中伴随着自旋方向的变化，这时分子中便具有两个自旋不配对的电子，即 $S=1, M=3$ ，分子处于激发的三重态，用符号 T 表示。

图 14.1 为电子重态示意图。

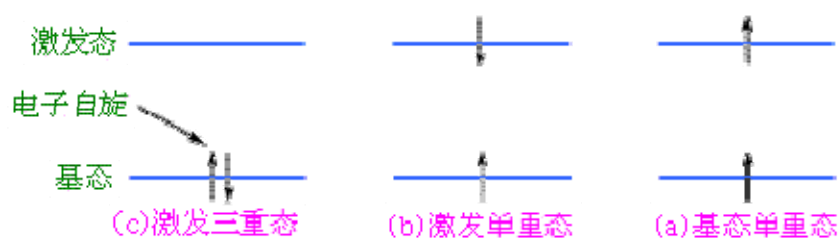


图14.1 单重态系三重态激发示意图

处于分立轨道上的非成对电子，自旋平行要比自旋配对更稳定些(洪特规则)，因此在同一激发态中，三重态能级总是比单重态能级略低。图 14.2 为能级及跃迁示意图，

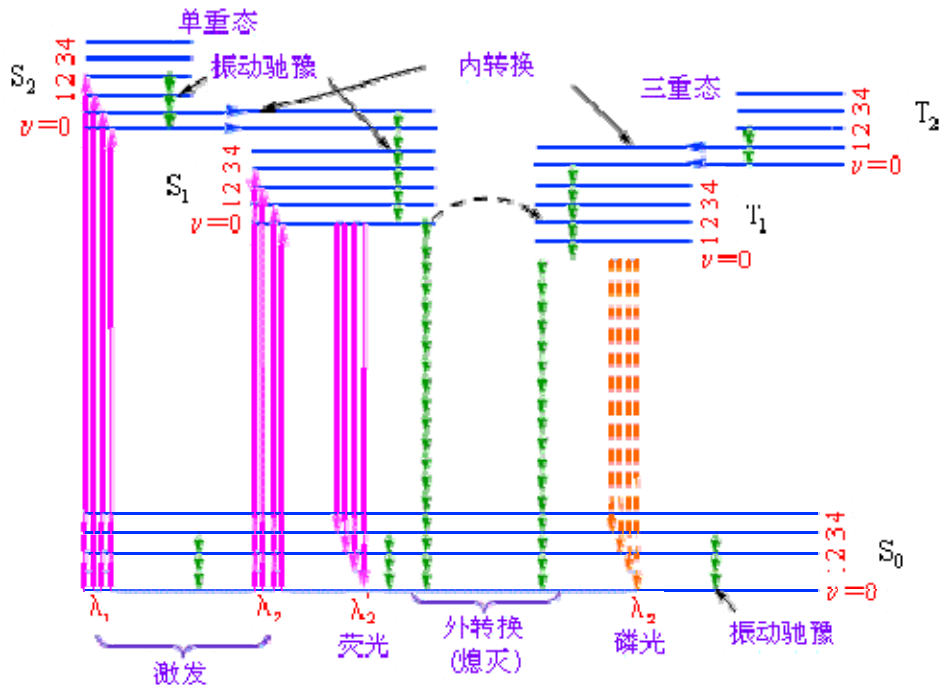


图14.2 荧光和磷光体系能级图

其中 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的单重态； T_1 和 T_2 则分别表示分子的第一和第二电子激发的三重态。 $v=0, 1, 2, 3, \dots$ 表示基态和激发态的振动能级。处于激发态的分子是很不稳定的，它可能通过辐射跃迁和非辐射跃迁和形式支活化(去激发)释放出多余的能量而返回基态。

辐射跃迁主要涉及到荧光，延迟荧光或磷光的发射；无辐射跃迁是指以热的形式释放多余的能量，包括振动弛豫、内部转移、系间跨越及外部转移等过程。图 14.2 表示分子激发和去活化的能量传递过程：

- (1) 振动弛豫(Vibration relaxation, 简称为VR)——当分子吸收光辐射(为图 14.2 中的 λ_1 、 λ_2)后可能从基态的最低振动能级($v=0$)跃迁到激发单重态 S_n (如图中 S_1 、 S_2)的较高振动能级上。然后，在液相或压力足够高的气相中，分子间的碰撞几率很大，分子可能收过剩的振动能量以热的形式传递给周围环境，而自身从激发态的高振动能级跃迁至该电子能级的最低振动能级上，这个过程称为振动弛豫。发生振动弛豫的时间为 10^{-12} S数量级。

(2) 内部转移(Internal conversion, 简称为IC)——当高电子能级中的低振动能级与低电子能级中的高振动能级发生重叠时,常发生电子从高电子能级以无辐射跃迁形式转移至低电子能级。如图 14.2 中, S_2 和 T_2 中的低振动能级与 S_1 和 T_1 中的高振动能级重叠,电子可通过振动能级的重叠从 S_2 跃迁至 S_1 , 或从 T_2 跃迁至 T_1 。这个过程称为内部转移。内部转移的时间为 $10^{-11}\text{S}\sim 10^{-13}\text{S}$ 数量级。振动弛豫及内部转移的速率比由高激发态直接发射光子的速率快得多,所以,分子吸收辐射能后不管激发到哪一个激发单重态,都能通过振动弛豫及内部转移而跃迁到最低(第一)激发单重态的最低振动能级。

(3) 荧光发射(Fluorescence emission,FE)——处于激的单重态的电子经振动弛豫及内部转移后到达第一激发单重态(S_1)的最低振动能级($v=0$)后,以辐射的形式跃迁回基态(S_0)的各振动能级,这个过程为荧光发射,发射的荧光波长为 λ'_2 。电子经过振动弛豫和内部转移的能量损失,因此荧光发射的能量比分子吸收的能量要小,荧光发射的波长比分子吸收的波长要长,即 $\lambda'_2 > \lambda_2, \lambda'_2 > \lambda_1$ 。第一激发单重态最低振动能级的平均寿命得为 $10^{-9}\sim 10^{-4}\text{S}$,因此荧光寿命也在这一数量级。

(4) 系间跨跃(Intersystem Crossing, ISC)——系间跨跃是指不同多重态之间的无辐射跃迁过程,它涉及到受激发电子自旋状态的改变。如由第一激发单重态 S_1 跃迁至第一激发三重态 T_1 ,使原来两个自旋配对的电子不再配对。这种跃态的改变。如由第一激发单重态 S_1 跃迁至第一激发三重态 T_1 ,使原来两个自旋配对的电子不再配对。这种跃迁是禁阻的(不符合光谱选择),但如果两个能态的能层有较大重叠时,如图 16.2 中 S_1 的最低振动能级与 T_1 的较高振动能级重叠,就有可能通过自旋-轨道耦合等作用实现这一跃迁。系间跨跃的速度很小,经历的时间较长。

(5) 磷光发射(Phosphorescence emission,PE)——激发态的电子经系间跨跃后到达激发三重态,经过迅速的振动弛豫而跃迁至第一激发三重态的最低振动能级,然后以辐射形

式跃迁回基态的各振动能级，这个过程为磷光发射。磷光发射的跃迁仍然是自旋禁阻的，所以发光速度很慢。磷光的寿命为 $10^{-4} \sim 100\text{s}$ 。因此，外光源照射停止后，磷光仍可持续一短时间。由于经过系间跨跃及 T_1 中振动弛豫丢失了一部分能量，所以磷光波长比荧光波长要长，即 $\lambda_3 > \lambda'_2$ 。

必须指出的是 T_1 还可能通过热激发而重新跃回 S_1 即 $T_1 \xrightarrow{\text{热}} S_1$ ，然后再由 S_1 经辐射跃迁回 S_0 ，即 $S_1 \xrightarrow{\text{辐射}} S_0$ ，发出荧光，这种荧光称为延迟荧光，其寿命与磷光相近，但波长比磷光短。

(6) 外部转移(External conversion, EC)——激发态分子与溶剂分子或其它溶质分子相互碰撞，并发生能量转移的过程称为外部转移。外部转移能使荧光或磷光的强度减弱甚至消失，这种现象称为猝灭或熄灭。

二、激发光谱与发射光谱

1. 激发光谱

固定发射波长,化合物发射的荧光强度与照射光波长的关系曲线。

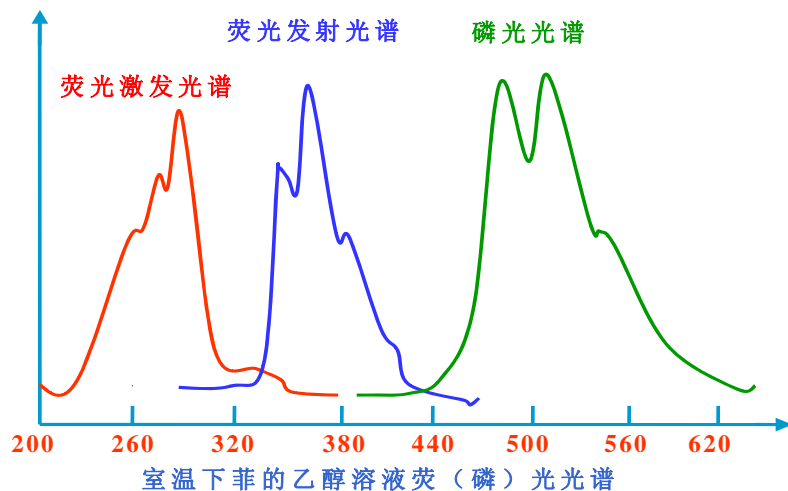
2. 荧光发射光谱

通过测量荧光(或磷光)体的发光通量(强度)随发射光波长的变化而获得的光谱，称为发射光谱。

3. 激发光谱与发射光谱的特征

a. Stokes 位移

在溶液荧光光谱中，所观察到的荧光发射波长总是大于激发波长($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$)，这种波长位移现象，称 Stokes 位移。

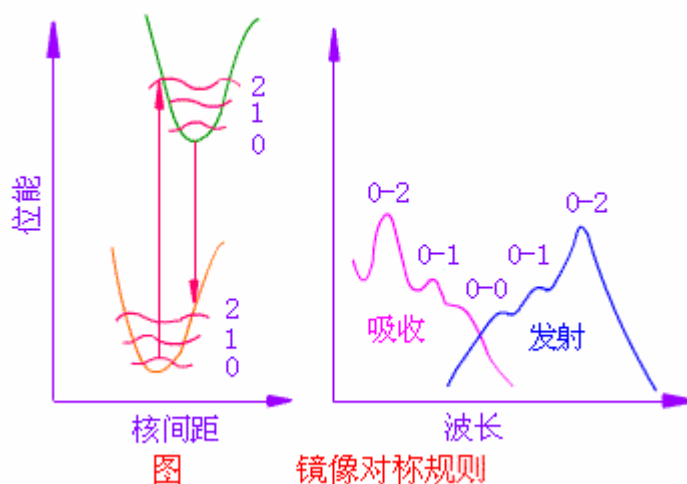


b. 发射光谱的形状与激发波长无关

由于荧光发射是激发态的分子由第一激发单重态的最低振动能级跃迁回基态的各振动能级所产生的，所以不管激发光的能量多大，能把电子激发到种激发态，都将经过迅速的振动弛豫及内部转移跃迁至第一激发单重态的最低能级，然后发射荧光。

c. 镜像规则

通常荧光发射光谱与吸收光谱（激发光谱）成镜像对称关系。



三、荧光与分子结构的关系

1. 荧光量子产率

荧光量子产率 (ϕ_f): 表示物质发射荧光的能力。

$$\phi_f = \frac{\text{发射的光量子数}}{\text{吸收的光量子数}} = \frac{\text{发荧光的分子数}}{\text{激发态分子总数}}$$

荧光量子产率与激发态能量释放各过程的速率常数有关, 可以用以下数学式表示。

$$\phi_f = \frac{K_f}{K_f + \sum K_i}$$

K_f — 荧光发射过程的速率常数, $\sum K_i$ — 其他有关过程的速率常数的总和。 K_f 主要决定于物质的化学结构, $\sum K_i$ 则主要决定于物质所处的化学环境。

2. 荧光与分子结构的关系

(1) 共轭效应

实验表明, 大多数能发荧光的化合物都是由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 或 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁激发, 然后经过振动弛豫等无辐射跃迁, 再发生 $\pi^* \rightarrow \pi$ 或 $\pi^* \rightarrow n$ 跃迁而产生荧光。

发生荧光(或磷光)的物质, 其分子都含有共键双键(π 键)的结构体系。共轭体系越大, 电子的离域性越大, 越容易被激发, 荧光也就越容易发生, 且荧光光谱向长波移动。

(2) 刚性平面结构:

实验发现, 多数具有性平面结构的有机化合物分子都具有强烈的荧光, 因为这种结构可为减少分子的振动, 使分子与溶剂或其他溶质分子之间的相互作用减少, 即可减少能量处部转移的损失, 有利于荧光的发射。

(3) 取代基效应:

芳环族化合物苯环上不同取代基对该化合物的荧光强度和荧光光谱有很大的影响, 可归为下列几种类型:

a 给电子取代基使荧光加强;

-NH₂, -NHR, -NR₂, -OH, -OR, -CN 等

b 吸电子基团使荧光减弱, 而磷光增强

c 重原子效应

荧光体取代上重原子后, 荧光减弱, 而磷光往往相应增强。

所谓重原子取代, 一般指的是卤素(Cl、Br 和 I)原子取代。

芳烃取代上卤素原子这后, 其荧光强度随卤素原子量增加而减弱, 而磷光通常相应地增强, 这种效应称为“(内)重原子效应”。

(4) 最低单线激发态 S₁ 的性质

a 最低单线激发态 S₁ 为 Π, Π^*

不含杂原子 O、N、S 的荧光体属于该类型。特点: $\Pi-\Pi^*$, ϵ 大, 荧光强

b 最低单线激发态 S₁ 为 n, Π^*

大多数含杂原子 O、N、S 的荧光体属于该类型。特点: $n-\Pi^*$, ϵ 小, 荧光弱, 磷光强。

四、荧光强度

1 荧光强度与荧光物质浓度的关系

$$I_f = 2.3\phi_f I_0 \epsilon bc$$

式中, I_f 为荧光强度, ϵ 为摩尔吸光系数, b 为样品溶液的光程(即液池的厚度), C 为样品的摩尔浓度, ϕ_f 荧光量子产率。

当 I_0 及 b 一定时: $I_f = KC$ 。上式表明, 荧光强度与荧光物质的浓度成正比, 这是荧光分析法是量分析的依据。

2、影响荧光强度的环境因素

(1) 溶剂的影响

由于溶质分子与溶剂分子间的作用，使同一种荧光物质在不同的溶剂中的荧光光谱的位置和强度都会有显著的不同

(2) 温度的影响

荧光强度对温度变化敏感，一般来说，溶液的荧光强度随着温度升高而降低。

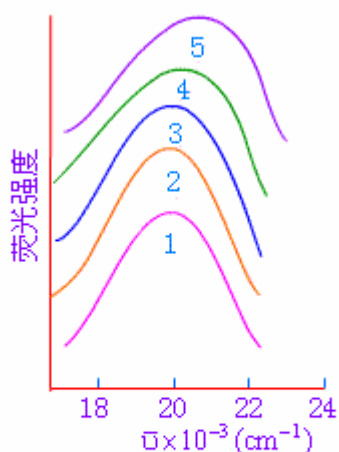


图 不同温度下邻菲绕啉的
荧光光谱(在邻二苯中)
1. 24; 2. -78; 3. -150; 4. -168;
5. -196(°C)

(3) 溶液 pH

带有酸性基团或碱性基团的大多数芳香族化合物，其荧光特性都与溶液的酸度(pH)有关。这是因为在不同酸度介质条件下，荧光体的存在型体不同，不同的型体(分子与其离子)在电子构型上有所不同，而且基态的激发态所表现出来的酸，碱性也有所差别。因此不同酸度下，荧光光谱和荧光强度都可能发生变化。所以在荧光分析中一般都要较严格地控制溶液的 pH 值。

3. 荧光猝灭

荧光物质分子与溶剂分子或其他溶质分子的相互作用引起荧光强度降低的现象称为荧光猝灭。能引起荧光强度降低的物质称为猝灭剂。荧光猝灭的形式很多，主要有为

下几种类型:

(1) 碰撞猝灭: 碰撞猝灭是荧光猝灭的主要类型之一。它指的是处于激发单重态的荧光分子 M_1^* 与猝灭剂分子 Q 相碰撞, 使 M_1^* 释放热量给环境以无辐射的形式跃迁回基态, 产生猝灭作用(这种猝灭也称动态猝灭。)

(2) 静态猝灭: 生成化合物的猝灭称为静态猝灭, 它指的是基态的荧光物质与猝灭剂反应生成非荧光的化合物, 导致荧光的猝灭。

(3) 氧的猝灭

(4) 荧光物质的自猝灭: 当荧光物质的浓度较大时, 会使荧光强度降低, 荧光强度与浓度不成线性关系, 称为荧光物质的自猝灭。自猝灭可能有如下几个原因:

★ 荧光物质分子之间的碰撞能量损失, 这实际上能量的外部转移形式:

★ 荧光物质的自吸收, 当荧光物质的吸收光谱与荧光发射光谱重叠时, 会发生自吸收现象, 处于 S_1 激发态的分子发射的荧光被处于基态的分子所吸收, 使荧光强度降低。

★ 荧光物质分子的缔合。某些荧光体分子处于基态时会形成二聚体或多聚体, 或者激发态分子 $1M^*$ 与基态分子 M 形成激发态二聚体 $1(M^*M)$ 。这些聚合物与荧光单体一般都会具有不同的荧光特性, 有的使荧光强度降低甚至不发射荧光, 有的使光谱发生变化。

4.内滤作用和自吸收现象

内滤作用: 溶液中含有能吸收激发光或荧光物质发射的荧光的物质, 就会使荧光减弱, 这种现象称为“内滤作用”。

自吸收现象: 化合物的荧光发射光谱的短波长端与其吸收光谱的长波长端重叠, 产生自吸收。

6-2 荧光分析仪

测量荧光的仪器主要由四个部分组成: 激发光源、样品池、双单色器系统、检测

器。

特殊点：有两个单色器，光源与检测器通常成直角。

光源：氙灯和高压汞灯。其中氙灯，是目前荧光分光光度计中应用最广泛的一种光源。

单色器：荧光分析仪中应用最多的单色器为光栅单色器，称为荧光分光光度计。光栅有两块，第一块为激发单色器，用于选择激发光的波长，第二块为发射单色器，用于选择荧光发射波长，

样品池：荧光分析的样品池通常用石英材料做成，它与吸光分析法的液池不同在于，荧光样品池的四面均为磨光透明面，同时一般仅有厚度为 1cm 的池。

检测器：光电倍增管。

记录，显示装置。

三、磷光分析法

与荧光相比，磷光具有两个特点

- (1) 磷光辐射的波长比荧光长
- (2) 磷光的寿命比荧光长

1. 磷光强度与磷光物质浓度的关系

当磷光物质浓度很小时，磷光强度 I_p 与磷光物质浓度 c 之间的关系式为：

$$I_p = 2.3\phi_p I_0 \epsilon b c$$

式中： ϕ_p 为磷光效率， I_0 为激发光的强度， ϵ 磷光物质的摩尔吸收系数， b 为试样池的光程。

在一定条件下， ϕ_p 、 I_0 、 ϵ 、 b 均为常数，所以上式可写成： $I_p = Kc$ ，即磷光强度与磷光物质的浓度 c 成正比。

2. 温度对磷光强度的影响

随着温度的降低，磷光逐渐增强。

3. 重原子效应

使用含有重原子的溶剂或在磷光物质中引入重原子取代基都可以提高磷光物质的磷光强度，这种效应称作重原子效应。

5. 室温磷光

由于低温磷光需要低温实验装置、溶剂选择的限制，发展了以下几种室温磷光法：

(1) 固体表面室温磷光法

此法基于测量室温下吸附于固体基质（载体）上的有机化合物所发射的磷光。理想的载体是既能将分析物质牢固地束缚在表面或基质中以增加刚性，并减小三重态的碰撞猝灭等非辐射去活化过程，而本身又不产生磷光背景。

(2) 胶束增稳的溶液室温磷光法

当向溶液中加入适量的表面活性剂，形成胶束，由于胶束的多相性，改变了磷光团的微环境和定向的约束力，从而强烈影响了磷光团的物理性质，减小了内转化和碰撞能量损失等非辐射去活化过程的趋势，明显增加了三重态的稳定性，从而可以实现在溶液中测量室温磷光。

6. 磷光分析仪

和荧光分析仪器基本相似。在荧光分光光度计上配上磷光附件后，即可用于磷光测定。

(1) 试样室

将试样放在盛液氮的石英杜瓦瓶内，即可用于低温磷光测定。

(2) 磷光镜

有些物质同时会发生荧光和磷光，为了能在同时有荧光现象的体系中测定磷光，

通常必须在激发光单色器和液槽之间以及在液槽和发射光单色器之间各装一个斩波片，并由一个同步马达带动，这种装置称作磷光镜。

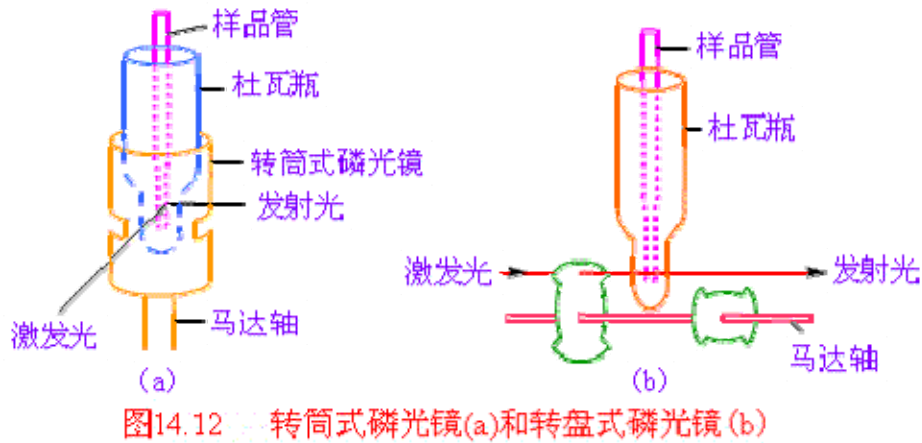


图14.12 转筒式磷光镜(a)和转盘式磷光镜(b)

6-3 化学发光

某些物质在进行化学反应过程中，由于吸收了反应产生的化学能而被激发，从激发态返回基态时，发射出一定波长的光，这种吸收化学能使分子发光的过程称为化学发光。

一、化学发光的基本原理

化学发光是基于化学反应所提供的化学能使分子激发而发射光的，任何一个化学发光反应都包含有活性激发和发光两个关键过程，它必须满足下列条件：

- (1) 化学反应必须提供足够的激发能。
- (2) 要有有利的化学反应历程，使反应产生的化学能用于不断地产生激发态分子。
- (3) 激发态分子跃回基态时，要能释放出光子，或激发态分子能将能量转移给另一种分子，使该分子受激后发射光子。总之，激发态分子不能以热的形式损失能量。

2. 化学发光强度

化学发光反应的发光强度 I_{cl} 是以单位时间内发射的光子数表示，它与化学发光反应的速率有关。

时刻 t 的化学发光强度(单位时间发射的光量子数): $I_{cl}(t) = \varphi_{cl} \times \frac{dc}{dt}$

如果反应是一级动力学反应, t 时刻的化学发光强度 I_{cl} 与该时刻的分析物浓度 c 成正比, 即化学发光峰值强度与分析物浓度 c 成线性关系。在化学发光分析中, 常用已知时间内的发光总强度来进行定量分析。

$$A = \int_0^t I_{cl}(t) dt = \varphi_{cl} \int_0^t \frac{dc}{dt} dt = \varphi_{cl} \cdot c$$

3. 化学发光反应的类型

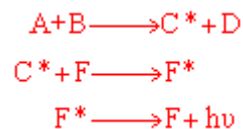
1. 直接化学发光和间接化学发光

化学发光反应可分直接发光和间接发光。直接发光是被测物作为反应物直接参加化学发光反应, 生成电子激发态产物分子, 此初始激发态能辐射光子。表示如下:



式中A或B是被测物, 通过反应生成电子激发态产物 C^* , 当 C^* 跃迁回基态时, 辐射出光子。

间接发光是被测物A或B通过化学反应后生成初始态 C^* , C^* 不直接发光, 而是将其能量转移给F, 使F处于激发态, 当 F^* 跃迁回基态时, 产生发光。如下式表示



式中 C^* 为能量给予体, 而F为能量接受体。例如, 用罗丹明B—没食子酸的乙醇溶液测定大气的 O_3 , 其化学发光反应就属这一类型。

2. 气相化学发光和液相化学发光

按反应体系的状态来分类, 如化学发光反应在气相中进行称气相化学发光, 在液相

或固相中进行称液相或固相化学发光，在两个不同相中进行则称为异相化学发光。

(1) 气相化学发光

主要有 O₃, NO, S 的化学发光反应，可用于监测空气中的 O₃, NO, NO₂, H₂S, SO₂ 和 CO 等。

(2) 液相化学发光

用于这一类化学发光分析的发光物质有鲁米诺、光泽精、洛粉碱等，其中鲁米诺 (Luminol) 化学发光反应机理研究得最久，

3. 化学发光的测量装置

化学发光分析法的测量仪器比较简单，主要包括样品室、光检测器、放大器和信号输出装置 (见图 4.8)。化学发光反应在样品室中进行，反应发出的光直接照射在检测器上，目前常用的是光电流检测器。

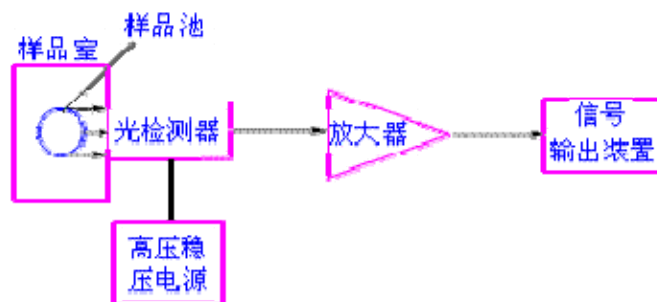


图14.17 化学发光测试仪原理方框图

本章小结

1. 分子发光包括荧光、磷光、化学发光、生物发光等。物质分子吸收了外界能量后，从基态跃迁到激发态，当处于激发态的分子以辐射跃迁的方式返回基态时，就产生了分子发光。
2. 荧光是处于第一激发单重态(S₁)的最低振动能级(v=0)的分子，以辐射的形式跃迁回基态(S₀)的各振动能级所产生的发光现象。荧光是一种光致发光。激发光谱是固定发射

波长,化合物发射的荧光强度与照射光波长的关系曲线。荧光发射光谱是通过测量荧光(或磷光)体的发光通量(强度)随发射光波长的变化而获得的光谱。

3. 荧光发射光谱相对于激发光谱具有 Stokes 位移; 发射光谱的形状与激发波长无关; 通常荧光发射光谱与吸收光谱(激发光谱)成镜像对称关系。
4. 含有共轭双键(π 键)结构、刚性平面结构和给电子取代基使荧光加强。而荧光体取代上重原子后, 荧光减弱, 磷光往往相应增强-重原子效应。
5. 荧光强度或磷光强度与荧光物质的浓度成正比, 这是荧光和磷光分析法定量分析的依据。溶剂、温度、溶液 pH 等因素会影响荧光强度。
6. 荧光的仪器主要由四个部分组成: 激发光源、样品池、双单色器系统、检测器。特点: 有两个单色器, 光源与检测器通常成直角。分子磷光仪器和分子磷光光谱与荧光仪器和光谱相似。
7. 化学发光是基于化学反应所提供的化学能使分子激发而发射光的, 任何一个化学发光反应都包含有活性激发和发光两个关键过程, 它必须满足一定的条件。