



药品



第十章 荧光分析法

目录



第一节 荧光分析法的基本原理



第二节 荧光分光光度计



第三节 定量分析及应用

学习目标

- ☑ **掌握** 物质结构与荧光的关系；荧光分光光度法的定性及定量分析；荧光分光光度计的使用方法
- ☑ **熟悉** 荧光分光光度法在有机化合物结构分析中的应用
- ☑ **了解** 荧光分析新技术的发展



第一节

荧光分析法的基本原理





- ◆ **某些物质吸收紫外-可见光后，可以发射其波长比吸收光更长的光，并且随照射光的消失而消失，这种发射光称为荧光（fluorescence）。**
- ◆ **荧光分析法（fluorometry）是利用某些物质发射荧光的特性进行定性、定量分析的光学分析方法，又称荧光光谱法。**



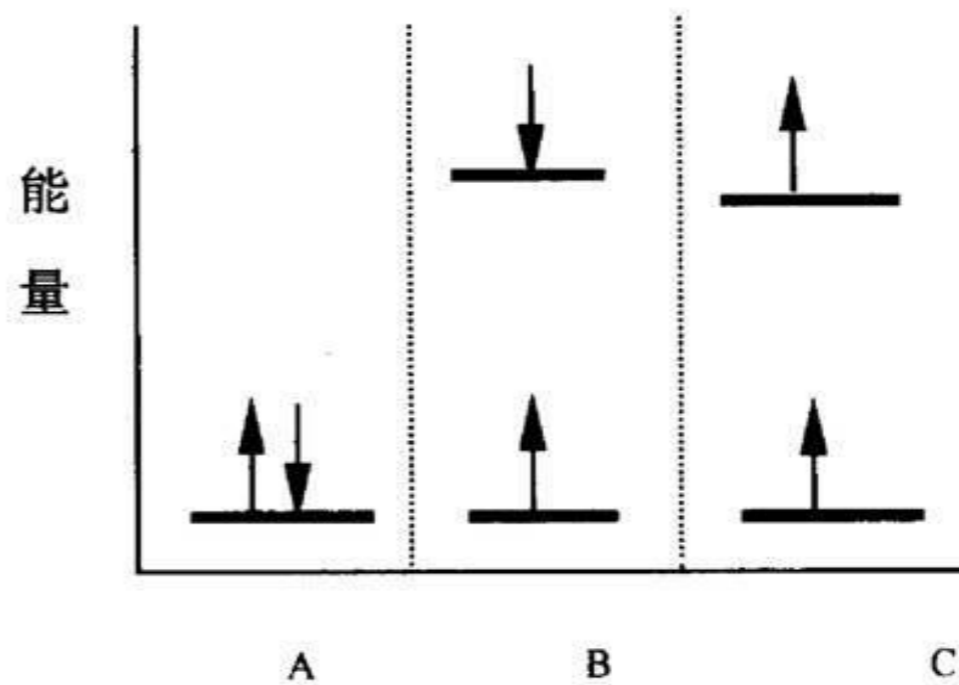
1. 荧光与磷光的产生

(1) 荧光的产生

A. 单重基态

B. 激发单重态

C. 激发三重态

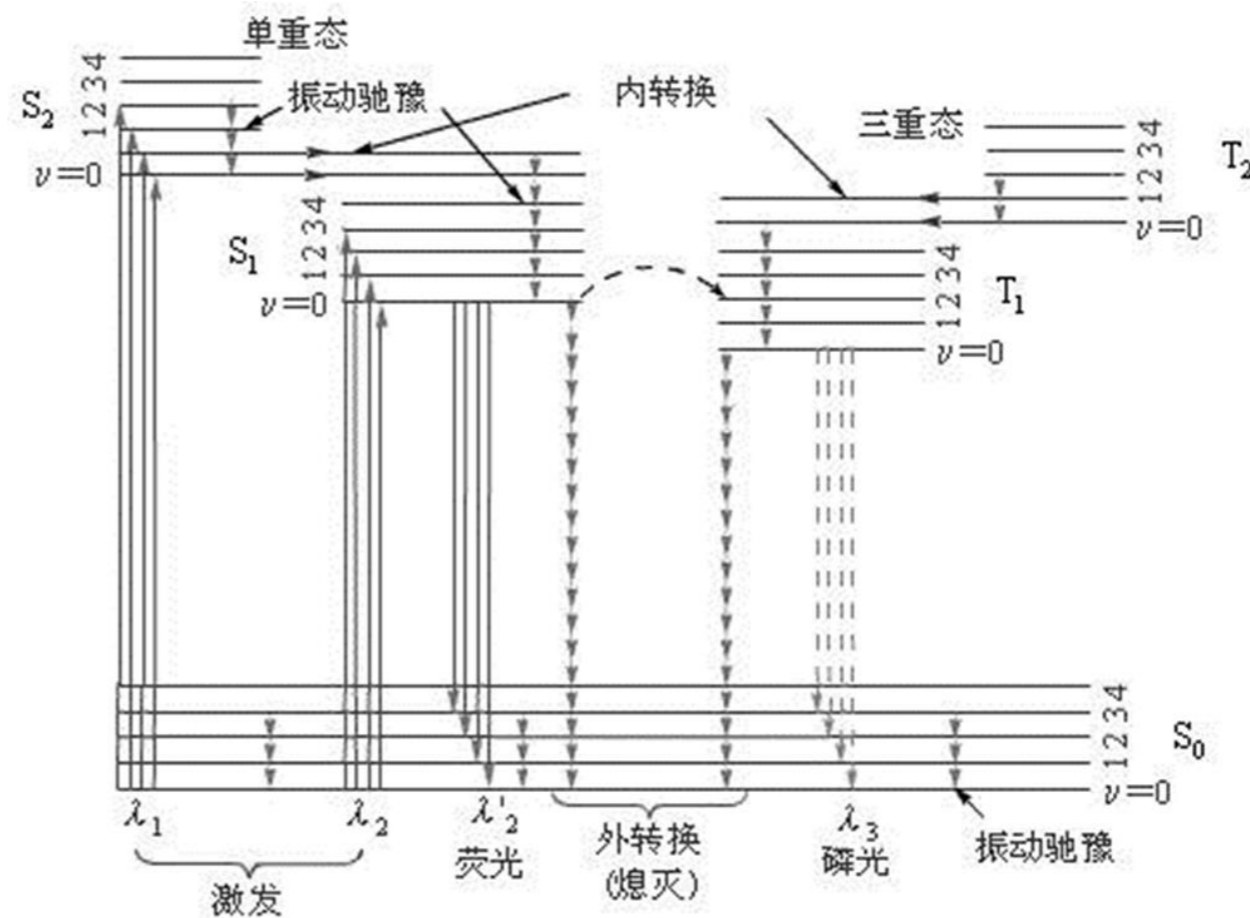


单重态与三重态



1. 荧光与磷光的产生

电子由激发单重态→
基态单重态的跃迁



荧光与磷光产生示意图



1. 荧光与磷光的产生

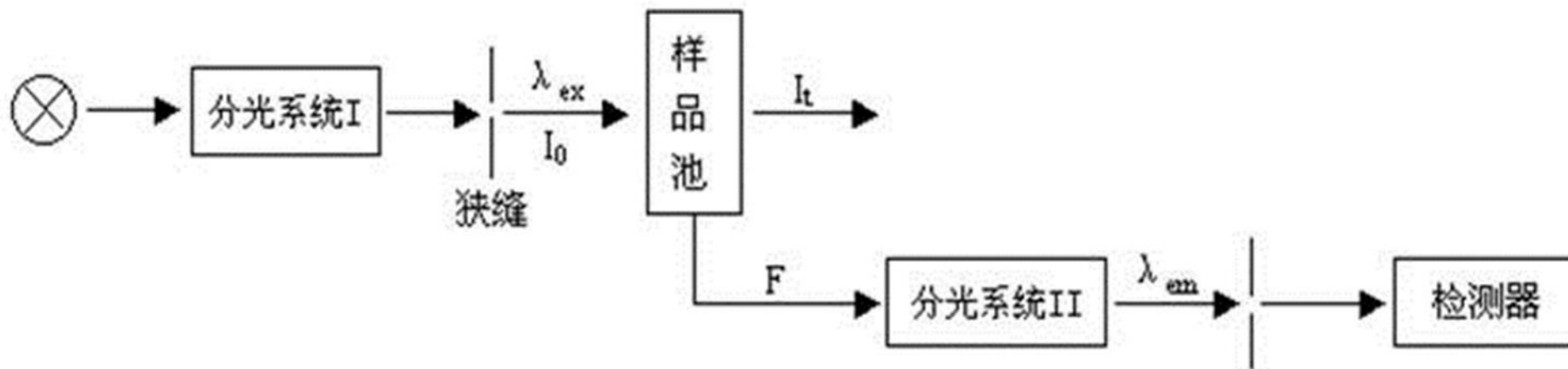
(2) 磷光的产生

电子由激发三重态→基态单重态的跃迁

! 请比较荧光和磷光的主要区别



2. 激发光谱和荧光光谱（发射光谱）



● 荧光检测示意图

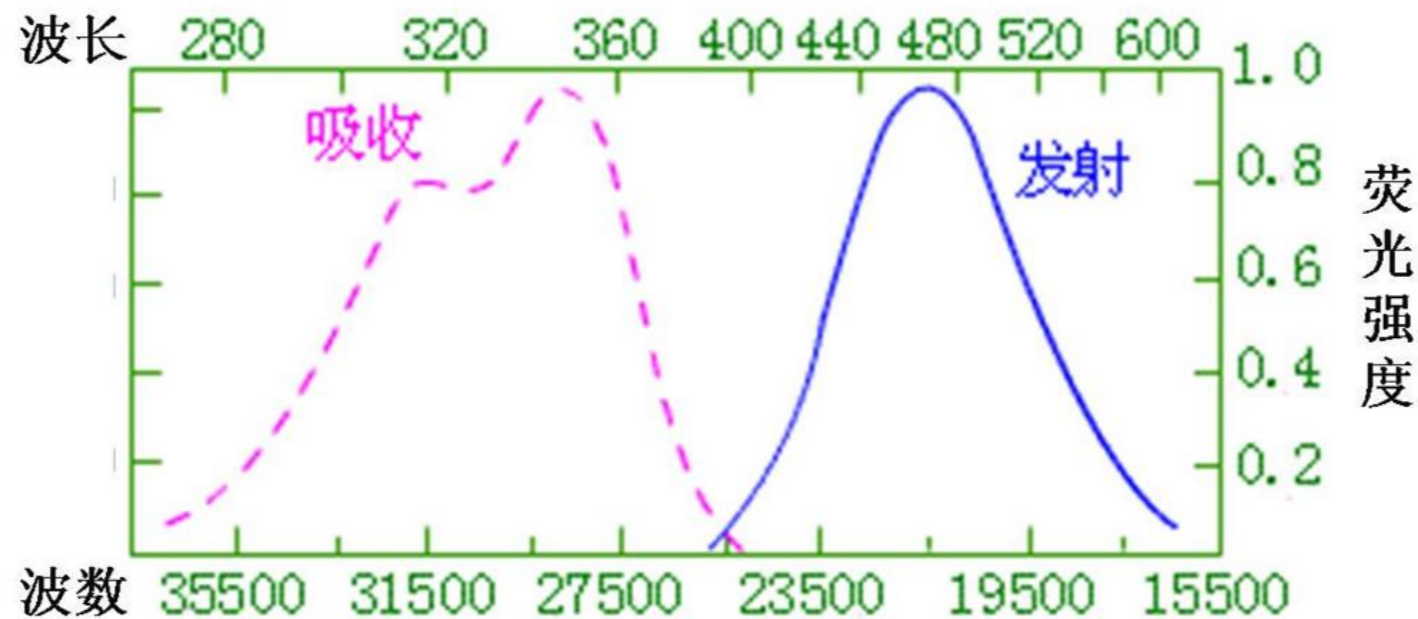
任何荧光物质都具有两个特征光谱：

激发光谱和荧光光谱（发射光谱）

激发光谱是当荧光波长一定时，荧光强度随激发光波长而变化的关系曲线（以激发光波长 λ_{ex} 为横坐标、荧光的发光强度 F 为纵坐标的光谱）。



2. 激发光谱和荧光光谱 (发射光谱)



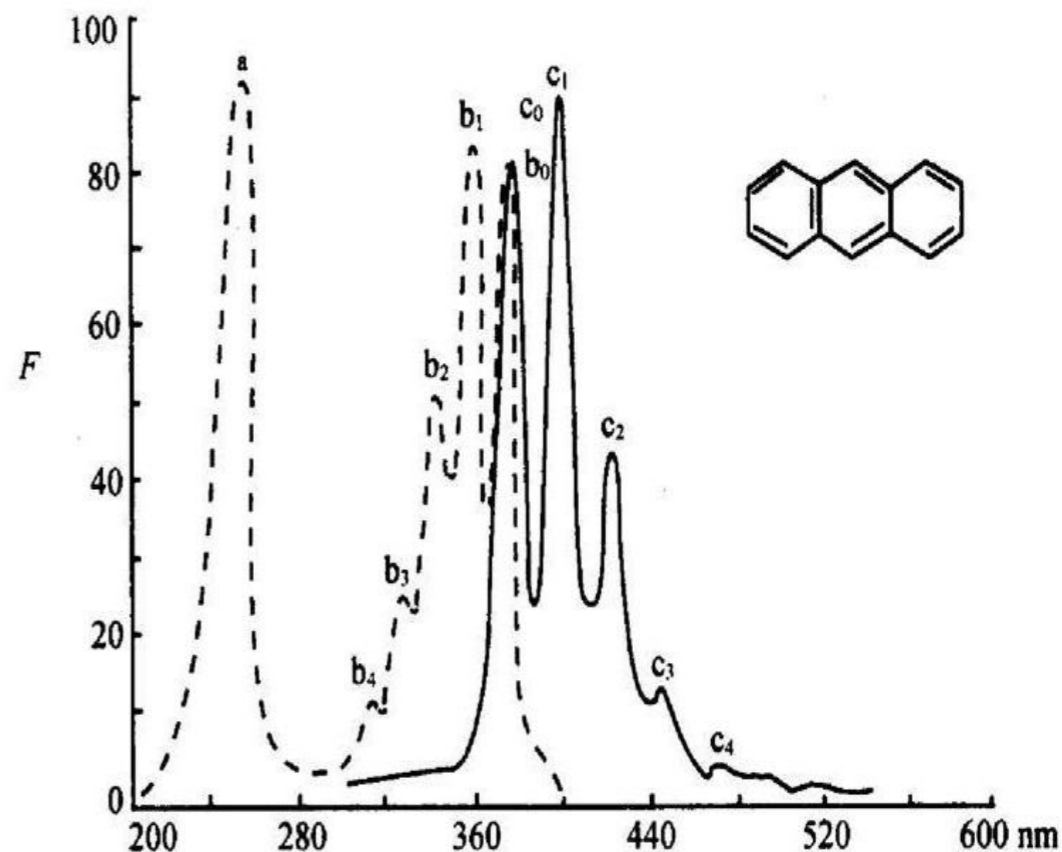
● 激发光谱及荧光光谱

荧光光谱是当使激发光波长和强度不变，而让物质所产生的荧光通过发射分光系统 (II) 分光，测定每一发射波长的荧光强度 F ，以发射光波长 λ_{em} 为横坐标、荧光的发光强度 F 为纵坐标作图所得的关系曲线。

2. 激发光谱和荧光光谱 (发射光谱)

溶液的荧光光谱具有如下特征：

- ① 斯托克斯位移。
- ② 荧光光谱的形状与激发波长无关。
- ③ 荧光光谱与激发光谱的镜像关系。



● 蒽的激发光谱 (虚) 和荧光光谱 (实)



3. 荧光与分子结构

(1) 荧光物质的特征

① 具有强的可见-紫外吸收，即具有 K 带强吸收。

② 具有高的荧光效率。

$$\text{荧光效率 } \varphi_F = \frac{\text{发射荧光的光量子数}}{\text{吸收激发光的光量子数}}$$



3. 荧光与分子结构

(2) 分子结构与荧光的关系

① 具有长的共轭 π 键结构。

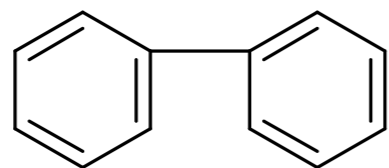
不同分子结构物质的激发光波长和荧光波长 (nm)

	λ_{ex} (激发)	λ_{em} (激发)	ϕ_F
苯	205	278	0.11
萘	286	321	0.29
蒽	365	400	0.46
四苯	390	480	0.60

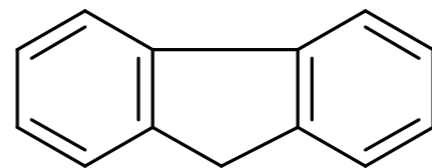


3. 荧光与分子结构

② 分子的刚性和共平面性。



联苯 ($\varphi_F=0.18$)



芴 ($\varphi_F=1.0$)

③ 取代基的影响。



4.影响荧光强度的外界因素

温度

溶剂

溶液的酸碱性

荧光熄灭剂

散射光

激发光源



第二节

荧光分光光度计





1. 荧光分光光度计

荧光分光光度计是用于扫描液相荧光标记物所发出的荧光光谱的一种仪器。其能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参数，从各个角度反映了分子的成键和结构情况。

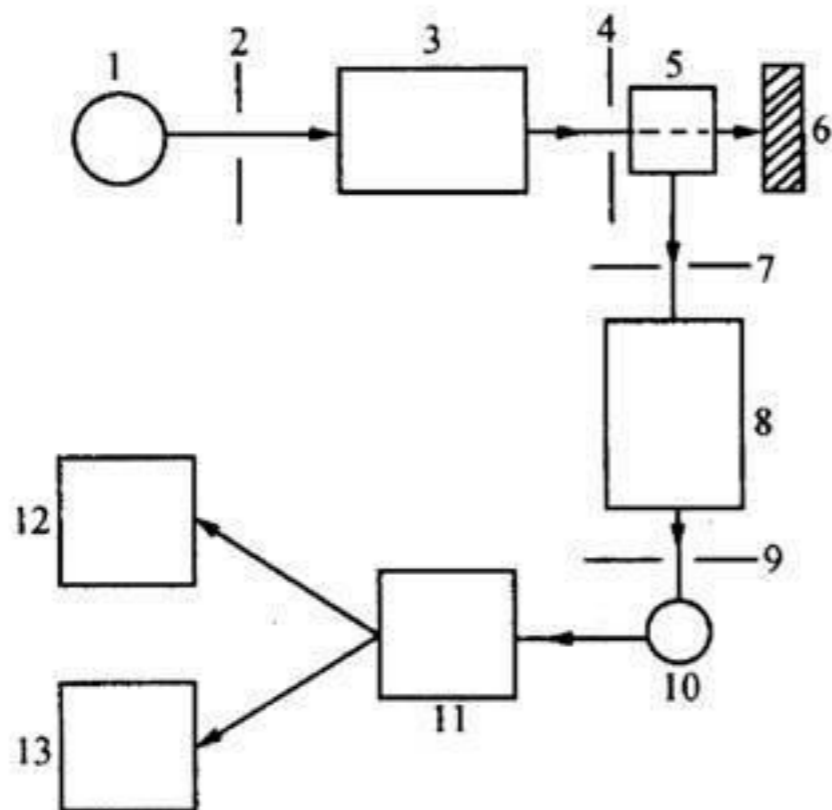
(1) 仪器类型

- ① 滤光片荧光计
- ② 滤光片-单色器荧光计
- ③ 荧光分光光度计



1. 荧光分光光度计

(2) 荧光分光光度计的基本结构



- 1.光源 2、4、7、9. 狭缝
- 3. 激发单色器 5. 样品池
- 6. 表面吸光物质
- 8. 发射单色器
- 10. 检测器 11. 放大器
- 12. 指示器 13. 记录器

● 荧光分光光度计结构示意图



1. 荧光分光光度计


- ①光源：目前最常用的是氙灯。
- ②单色器（分光系统）：激发单色器、发射单色器。
- ③样品池：测定荧光用的样品池必须用低荧光材料或石英。
- ④检测器：光电倍增管。



1. 荧光分光光度计

(3) 仪器校准

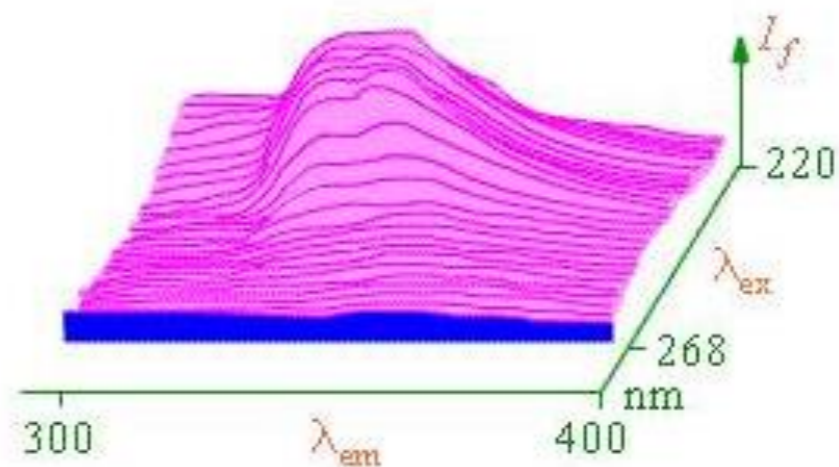
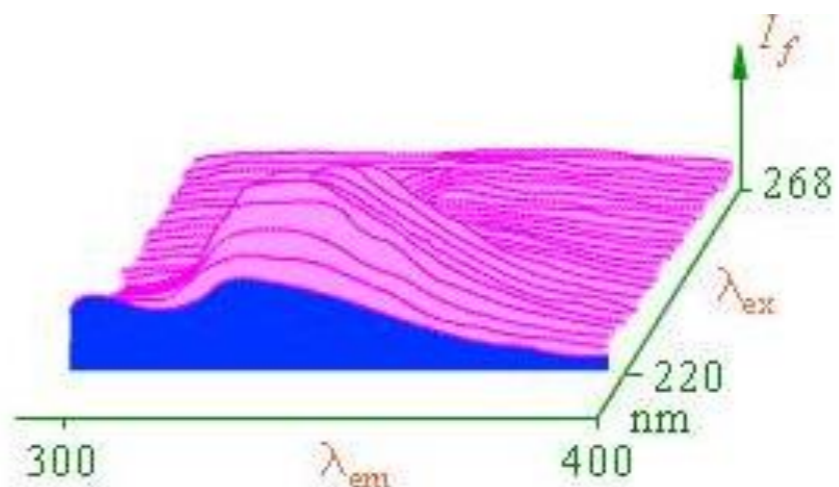
- ① 灵敏度校准。
- ② 波长校准。
- ③ 激发光谱和发射光谱校准。

 请比较荧光分光光度计与紫外-可见分光光度计的主要区别。



2. 荧光分析新技术

- ① 激光荧光分析。
- ② 时间分辨荧光分析。
- ③ 同步荧光分析。
- ④ 胶束增敏荧光分析。
- ⑤ 三维荧光光谱分析。



原油试样在环乙烷中的等角三维投影光谱图



第三节

定量分析及应用





1. 荧光强度与物质浓度的关系

由于荧光物质的结构不同，其吸收光的波长不同，发射出荧光的波长也不同，这就是荧光分光光度法对能产生荧光的物质进行定性分析的依据。实验证明，在稀溶液中，荧光强度与荧光物质的浓度成正比，这是荧光分光光度法对荧光物质进行定量分析的依据。



1. 荧光强度与物质浓度的关系

当溶液中荧光物质的浓度为 c 、液层厚度为（吸收池内径） L 时，由于荧光强度 F 正比于被荧光物质吸收光的强度： $F \propto (I_0 - I)$ ，用线性方程表示为：

$$F = K' (I_0 - I)$$

K' 为常数，称为荧光比率，其大小取决于一定条件下的荧光效率，结合比尔定律可得到下式：

$$F = 2.303 \varphi_F I_0 \varepsilon c L$$

入射光强度 I_0 在波长一定、光源稳定时为固定值，因此可以将 $2.303 \varphi_F I_0 \varepsilon L$ 视为常数 K ，故：

$$F = Kc$$



1. 荧光强度与物质浓度的关系

当其他条件也一定时，荧光物质在稀溶液中的荧光强度与浓度呈线性关系，这是荧光定量分析的依据。

但只有当荧光物质的浓度很小时，即 $\varepsilon \cdot c \cdot L \leq 0.05$ ，这种关系才成立。

! 请分析为什么荧光分光光度法的灵敏度比紫外-可见分光光度法要高？



2.定量分析方法

①**标准曲线法**：配制一系列浓度为 c_1 、 c_2 、 $c_3 \dots$ 的对照品溶液，分别测其 F_1 、 F_2 、 $F_3 \dots$ 值，用 $F-c$ 作图绘制标准曲线。然后在同样条件下测定试样溶液的 F_x ，在标准曲线上查找对应的浓度 c_x 。



2.定量分析方法

②比例法：若荧光分析标准曲线过原点，则可选择其线性范围用比例法测定。即配制一对照品溶液 (c_s) 测其荧光强度 (F_s)，再测定试样溶液 (c_x) 的荧光强度 (F_x)，然后进行比较。测定时同样要以空白 (F_0) 校正：

$$\frac{F_s - F_0}{F_x - F_0} = \frac{c_s}{c_x} \Rightarrow c_x = \frac{F_x - F_0}{F_s - F_0} c_s$$



2.定量分析方法

③多组分混合物测定：与吸光度一样，荧光强度也有加和性，因此混合物不需经过分离，可用解联立方程的方法测定。可选择两物质不同的激发波长处的荧光强度测定，也可选择不同荧光波长处的荧光强度测定，这样选择范围比紫外-可见分光光度法广泛。



3. 荧光分析法的应用

(1) 有机化合物的荧光分析：芳香族及具有芳香结构的化合物因存在共轭体系在紫外光照射下很多能发射荧光。为提高测定的灵敏度和选择性，可使弱荧光物质与某些荧光试剂作用，以得到强荧光性产物。因此，荧光分析法在有机物测定方面的应用很广。

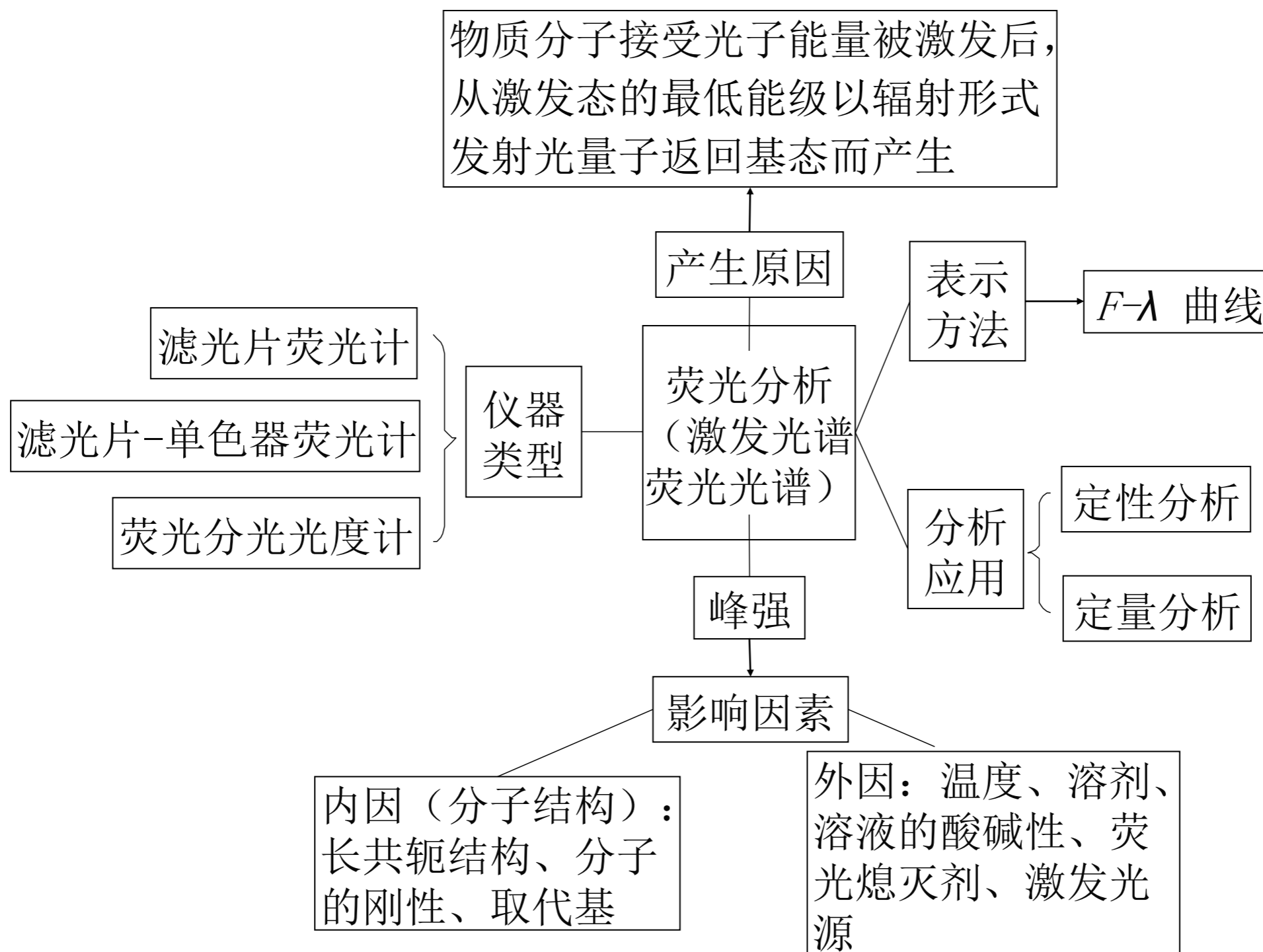
(2) 无机化合物的荧光分析

①直接荧光法

②荧光猝灭法

③催化荧光法

小结





药品

第十章 荧光分析法

THANKS

谢谢观看