

第六章 分子荧光与磷光光谱法 4 学时

一、目的要求

- 1、掌握分子荧光和磷光光谱产生的机理
- 2、掌握分子产生荧光的条件
- 3、掌握荧光与有机物分子结构的关系
- 4、了解分子荧光产生的过程
- 5、了解荧光光谱与吸收光谱之间的关系
- 6、了解影响荧光强度的因素
- 7、了解荧光猝灭的原因
- 8、了解荧光仪器的构造与其它光谱仪的区别
- 9、了解磷光产生的原因和种类
- 10、了解磷光仪器

二、主要内容

- 6.1 分子荧光和磷光的基本原理
 - 6.1.1 荧光和磷光的产生
 - 6.1.2 激发光谱曲线和荧光、磷光光谱曲线
 - 6.1.3 荧光和分子结构的关系
 - 6.1.4 溶液的荧光（或磷光）强度
- 6.2 荧光分析仪
- 6.3 分子荧光分析法及其应用
- 6.4 磷光分析法

三、重点与难点

重点：分子荧光产生的机理、荧光与有机物结构的关系、影响荧光强度的因素

难点：各种能量传递方式在荧光和磷光产生过程中的作用

第六章 分子荧光与分子磷光光谱法

分子发光分析 Molecular Luminescence Analysis

分子发光分析包括荧光、磷光、化学发光、生物发光和散射光谱等。

一、基本原理

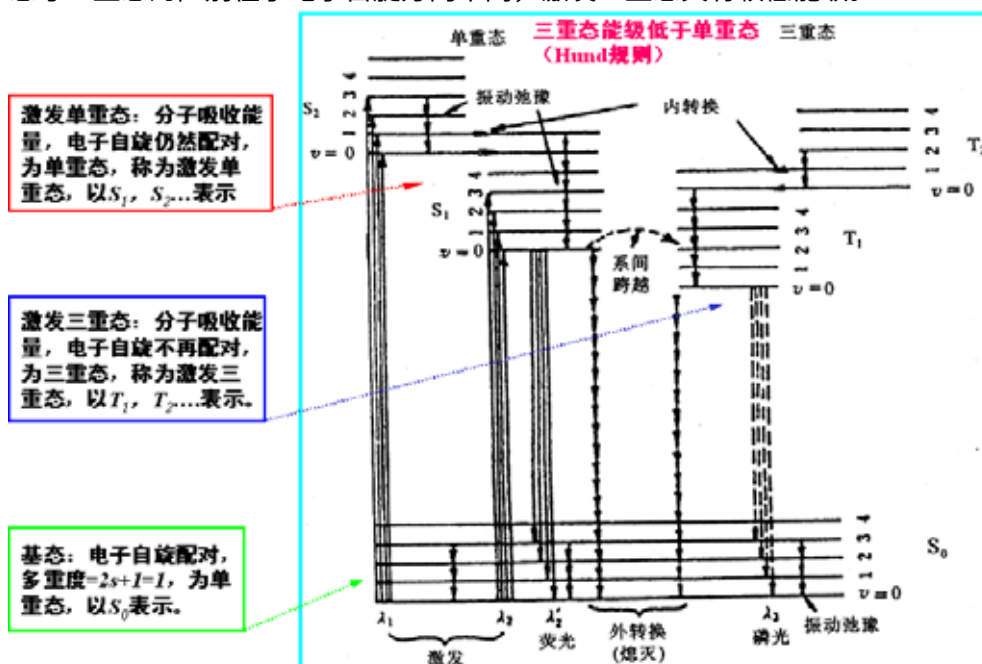
分子发光：处于基态的分子吸收能量（电、热、化学和光能等）被激发至激发态，然后从不稳定的激发态返回至基态并发射出光子，此种现象称为发光。发光分析包括荧光、磷光、化学发光、生物发光等。

物质吸收光能后所产生的光辐射称之为**荧光和磷光单重态和三重态**：

分子中的电子运动包括电子轨道的运动和电子的自旋运动。分子中电子的自旋状态可用多重态 $2S+1$ 描述， S 为总自旋量子数。若分子中没有未配对的电子，即 $S=0$ ，则 $2S+1=1$ 称为单重态；若分子中有两个自旋平行的未配对电子，即 $S=1$ ，则 $2S+1=3$ 称为三重态，用 T 表示。通常的情况下分子的电子处于最低的能级状态，用 S_0 表示。若分子受激发，其电子从基态的电子能级跃迁到较高的电子能级，即激发态，用 $S_1, S_2, \dots$ 表示。

（一）荧光和磷光的产生

处于分子基态单重态中的电子对，其自旋方向相反，当其中一个电子被激发时，通常跃迁至第一激发态单重态轨道上，也可能跃迁至能级更高的单重态上。这种跃迁是符合光谱选律的，如果跃迁至第一激发三重态轨道上，则属于禁阻跃迁。单重态与三重态的区别在于电子自旋方向不同，激发三重态具有较低能级。



在单重激发态中，两个电子平行自旋，单重态分子具有抗磁性，其激发态的平均寿命大约为 $10^{-8}s$ ，而三重态分子具有顺磁性，其激发态的平均寿命为 $10^{-4} \sim 1s$ 以上（通常用 S 和 T 分别表示单重态和三重态）。

处于激发态的电子，通常以辐射跃迁方式或无辐射跃迁方式再回到基态。辐射跃迁主要涉及到荧光、延迟荧光或磷光的发射；无辐射跃迁则是指以热的形式辐射其多余的能量，包括振动弛豫 (VR)、内部转移 (IR)、系间窜跃 (IX) 及外部转移 (EC) 等，各种跃迁方式发生的可能性及程度，与荧光物质本身的结构及激发时的物理和化学环境等因素有关。

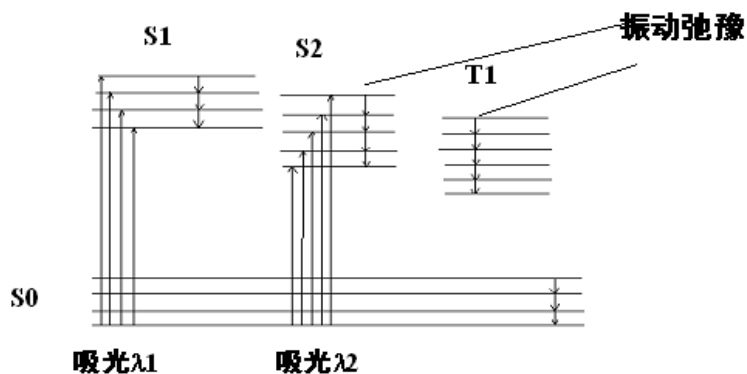
下面结合荧光和磷光的产生过程，进一步说明各种能量传递方式在其中所起的作用。

设处于基态单重态中的电子吸收波长为 λ_1 和 λ_2 的辐射光之后，分别激发至第二单重态 S_2 及第一单重态 S_1 。

处于激发态分子不稳定，通过辐射或非辐射跃迁等去活化过程返回至基态。这些过程包括：

振动弛豫 (Vibrational Relaxation, VR)

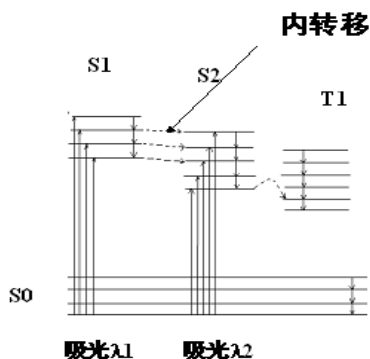
它是指 在同一电子能级中，电子由高振动能级转至低振动能级，而将多余的能量以热的形式发出。发生振动弛豫的时间为 $10^{-12}s$ 数量级。



荧光、磷光 能级图 (→ 振动弛豫)

内转移 (Internal Conversion, IC) 内转换

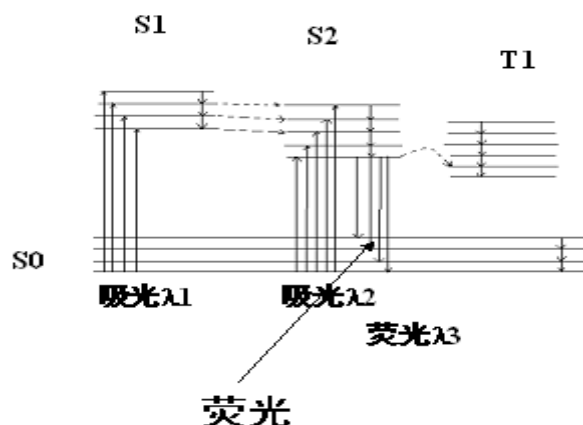
当两个电子能级非常靠近以至其振动能级有重叠时,常发生电子由高能级以无辐射跃迁方式转移至低能级。右图中指出,处于高激发单重态的电子,通过内转移及振动弛豫,均跃回到第一激发单重态的最低振动能级。



荧光、磷光 能级图

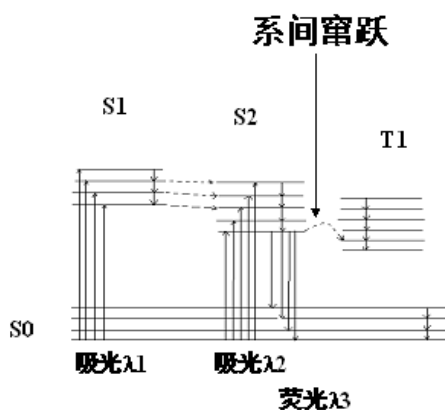
荧光发射

处于第一激发单重态中的电子跃回至基态各振动能级时,将得到最大波长为 λ_3 的荧光。注意:基态中也有振动弛豫跃迁。很明显, λ_3 的波长较激发波长 λ_1 或 λ_2 都长,而且不论电子开始被激发至什么高能级,最终将只发射出波长 λ_3 为的荧光。荧光的产生在 10^{-7} - 10^{-9} s 内完成。



系间窜跃 (Intersystem Conversion, ISC) 系间跨跃

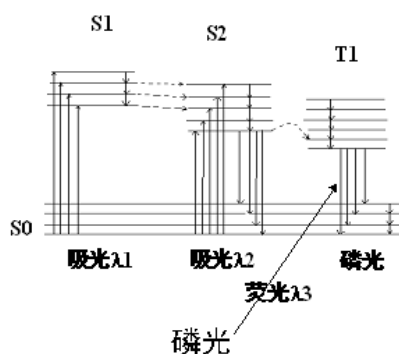
指不同多重态间的无辐射跃迁，例如 $S1 \rightarrow T1$ 就是一种系间窜跃。通常，发生系间窜跃时，电子由 $S1$ 的较低振动能级转移至 $T1$ 的较高振动能级处。有时，通过热激发，有可能发生 $T1 \rightarrow S1$ ，然后由 $S1$ 发生荧光。这是产生延迟荧光的机理。



荧光、磷光 能级图

磷光发射

电子由基态单重态激发至第一激发三重态的几率很小，因为这是禁阻跃迁。但是，由第一激发单重态的最低振动能级，有可能以系间窜跃方式转至第一激发三重态，再经过振动弛豫，转至其最低振动能级，由此激发态跃回至基态时，便发射磷光，这个跃迁过程 ($T1 \rightarrow S0$) 也是自旋禁阻的，其发光速率较慢，约为 10^{-4} - 10^5 s。因此，这种跃迁所发射的光，在光照停止后，仍可持续一段时间。



荧光、磷光 能级图

外转移 (External Conversion, EC) 外转换

指激发分子与溶剂分子或其它溶质分子的相互作用及能量转移,使荧光或磷光强度减弱甚至消失。这一现象称为“熄灭”或“猝灭”。荧光与磷光的根本区别: 荧光是由激发单重态最低振动能层至基态各振动能层间跃迁产生的;而磷光是由激发三重态的最低振动能层至基态各振动能层间跃迁产生的。

(二) 激发光谱曲线和荧光、磷光光谱曲线

荧光和磷光均为光致发光,因此必须选择合适的激发光波长,可根据它们的激发光谱曲线来确定。绘制激发光谱曲线时,固定测量波长为荧光(或磷光)最大发射波长,然后改变激发波长,根据所测得的荧光(磷光)强度与激发光波长的关系,即可绘制 激发光谱曲线。

应该指出,激发光谱曲线与其吸收曲线可能相同,但激发光谱曲线是荧光强度与波长的关系曲线,吸收曲线则是吸光度与波长的关系曲线,两者在性质上是不同的。当然,在激发光谱曲线的最大波长处,处于激发态的分子数目是最多的,这可说明所吸收的光能量也是最多的,自然能产生最强的荧光。

如果 固定激发光波长为其最大激发波长,然后测定不同的波长时所发射的荧光或磷光强度,即可绘制荧光或磷光光谱曲线。

在荧光和磷光的产生过程中,由于存在各种形式的无辐射跃迁,损失能量,所以它们的最大发射波长都向长波方向移动,以磷光波长的移动最多,而且它的强度也相对较弱。

荧光发射光谱的普遍特性:

(1) Stokes 位移

在溶液中,分子荧光的发射相对于吸收位移到较长的波长,称为 Stokes 位移。这是由于受激分子通过振动弛豫而失去转动动能,也由于溶液中溶剂分子与受激分子的碰撞,也会有能量的损失。因此,在激发和发射之间产生了能量损失。

(2) 荧光发射光谱的形状与激发波长无关

因为分子吸收了不同能量的光子可以由基态激发到几个不同的电子激发态,而具有几个吸收带。由于较高激发态通过内转换及转动弛豫回到第一电子激发态的几率较高,远大于由高能激发态直接发射光子的速度,故在荧光发射时,不论用哪一个波长的光辐射激发,电子都从第一电子激发态的最低振动能层返回到基态的各个

振动能层，所以荧光发射光谱与激发波长无关。

(3) 镜像规则

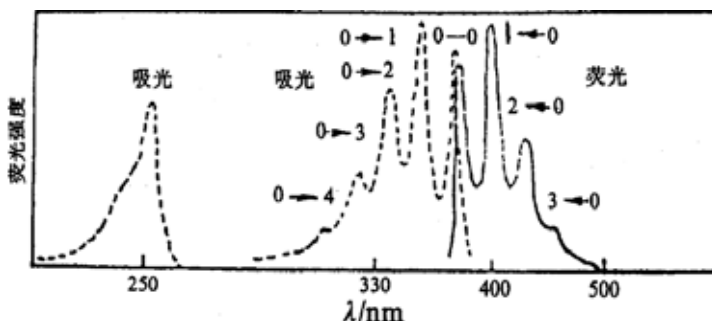
通常荧光发射光谱和它的吸收光谱呈镜像对称关系。

吸收光谱是物质分子由基态激发至第一电子激发态的各振动能层形成的。其形状决定于第一电子激发态中各振动能层的分布情况。

荧光光谱是激发分子从第一电子激发态的最低振动能层回到基态中各不同能层形成的。所以荧光光谱的形状决定于基态中各振动能层的分布情况。

基态中振动能层的分布和第一电子激发态中振动能层的分布情况是类似的。因此荧光光谱的形状和吸收光谱的形状极为相似。

荧光光谱与吸收光谱呈镜像对称关系。



由基态最低振动能层跃迁到第一电子激发态各个振动能层的吸收过程中，振动能层越高，两个能层之间的能量差越大，即激发所需的能量越高，所以吸收峰的波长越短。反之，由第一电子激发态的最低振动能层降落到基态各个振动能层的荧光发射过程中，基态振动能层越高，两个能层之间的能量差越小，荧光峰的波长越长。

另外，也可以从位能曲线解释镜像规则。由于光吸收在大约 10^{-15} 的短时间内发生，原子核没有发生明显的位移，即电子与核之间的位移没有发生变化。假如在吸收过程中，基态的零振动能层与激发态的第二振动能层之间的跃迁几率最大，那么，在荧光发射过程中，其相反跃迁的几率也应该最大。也就是说，吸收和发射的能量都最大。

(三) 荧光和分子结构的关系

分子产生荧光必须具备两个条件：

- ① 分子必须具有与所照射的辐射频率相适应的结构，才能吸收激发光；
- ② 吸收了与其本身特征频率相同的能量之后，必须具有一定的荧光量子产率。

1. 量子产率

荧光量子产率也叫荧光效率或量子效率，它表示物质发射荧光的能力，通常用下式表示

$$j = \text{发射荧光分子数} / \text{激发分子总数}$$

或 $j = \text{发射荧光量子数} / \text{吸收光量子数}$ 在产生荧光的过程中，涉及到许多辐射和无辐射跃迁过程，如荧光发射、内转移，系间窜跃和外转移等。很明显，荧光的量子产率，将与上述每一个过程的速率常数有关。

若用数学式来表达这些关系, 得到 $j = k_f / (k_f + \sum k_i)$

式中 k_f 为荧光发射过程的速率常数, $\sum k_i$ 为其它有关过程的速率常数的总和。凡是能使 k_f 值升高而使其它 k_i 值降低的因素, 都可增强荧光。实际上, 对于高荧光分子, 例如荧光素, 其量子产率在某些情况下接近 1, 说明 $\sum k_i$ 很小, 可以忽略不计。一般来说, k_f 主要取决于化学结构, 而 $\sum k_i$ 则主要取决于化学环境, 同时也与化学结构有关。

磷光的量子产率与此类似。

2. 荧光与有机化合物的结构

(1) 跃迁类型

实验证明, 对于大多数荧光物质, 首先经历 $\pi \rightarrow \pi^*$ 或 n (非键电子轨道) $\rightarrow \pi^*$ 激发, 然后经过振动弛豫或其他无辐射跃迁, 再发生 $\pi^* \rightarrow \pi$ 或 $\pi^* \rightarrow n$ 跃迁而得到荧光。在这两种跃迁类型中, $\pi^* \rightarrow \pi$ 跃迁常能发出较强的荧光 (较大的量子产率)。这是由于 $p \rightarrow p^*$ 跃迁具有较大的摩尔吸光系数 (一般比 $n \rightarrow \pi^*$ 大 100-1000 倍), 其次, $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的寿命约为 10^{-7} — 10^{-9} s, 比 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的寿命 10^{-5} — 10^{-7} s 要短。

在各种跃迁过程的竞争中, 它是有利于发射荧光的。此外, 在 $p^* \rightarrow p$ 跃迁过程中, 通过系间窜跃至三重态的速率常数也较小 ($S_1 \rightarrow T_1$ 能级差较大), 这也有利于荧光的发射, 总之, $p \rightarrow p^*$ 跃迁是产生荧光的主要跃迁类型。

(2) 共轭效应

实验证明, 容易实现 $\pi \rightarrow \pi^*$ 激发的芳香族化合物容易发生荧光, 能发生荧光的脂肪族和脂环族化合物极少 (仅少数高度共轭体系化合物除外)。此外, 增加体系的共轭度, 荧光效率一般也将增大。例如, 在多烯结构中, $\text{ph}(\text{CH}=\text{CH})_3\text{ph}$ 和 $\text{ph}(\text{CH}=\text{CH})_2\text{ph}$ 在苯中的荧光效率分别为 0.68 和 0.28。

共轭效应使荧光增强的原因: 主要是由于增大荧光物质的摩尔吸光系数, 有利于产生更多的激发态分子, 从而有利于荧光的发生。

(3) 刚性平面结构

实验发现, 多数具有刚性平面结构的有机分子具有强烈的荧光。因为这种结构可以减少分子的振动, 使分子与溶剂或其它溶质分子的相互作用减少, 也就减少了碰撞去活的可能性。

(4) 取代基效应

芳香族化合物苯环上的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。

给电子基团, 如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NR}_2$ 等, 使荧光增强。因为产生了 p - p 共轭作用, 增强了 p 电子共轭程度, 使最低激发单重态与基态之间的跃迁几率增大。

吸电子基团, 如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{C}=\text{O}$ 、卤素等, 会减弱甚至会猝灭荧光。

卤素取代基随原子序数的增加而荧光降低。这可能是由所谓“重原子效应”使系间跨越速率增加所致。在重原子中, 能级之间的交叉现象比较严重, 因此容易发生自旋轨道的相互作用, 增加了由单重态转化为三重态的速率。

取代基的空间障碍对荧光也有影响。

立体异构现象对荧光强度有显著的影响。

3. 金属螯合物的荧光

除过渡元素的顺磁性原子会发生线状荧光光谱外，大多数无机盐类金属离子，在溶液中只能发生无辐射跃迁，因而不产生荧光。但是，在某些情况下，金属螯合物却能产生很强的荧光，并可用于痕量金属元素分析。

(1) 螯合物中配位体的发光

不少有机化合物虽然具有共轭双键，但由于不是刚性结构，分子处于非同一平面，因而不发生荧光。若这些化合物和金属离子形成螯合物，随着分子的刚性增强，平面结构的增大，常会发生荧光。

如 8-羟基喹啉本身有很弱的荧光，但其金属螯合物具有很强的荧光。

(2) 螯合物中金属离子的特征荧光

这类发光过程通常是螯合物首先通过配位体的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁激发，接着配位体把能量转给金属离子，导致 $d \rightarrow d^*$ 跃迁和 $f \rightarrow f^*$ 跃迁，最终发射的是 $d \rightarrow d^*$ 跃迁和 $f \rightarrow f^*$ 跃迁光谱

(四) 溶液的荧光（或磷光）强度

1. 荧光强度与溶液浓度的关系

荧光强度 I_f 正比于吸收的光量 I_a 与荧光量子产率 j 。

$$I_f = j I_a$$
 式中 j 为荧光量子效率，又根据 Beer 定律

$$I_a = I_0 - I_t = I_0(1 - e^{-\epsilon l C})$$

I_0 和 I_t 分别是入射光强度和透射光强度。代入上式得

$$I_f = j I_0(1 - 10^{-\epsilon l c}) = j I_0(1 - e^{-2.3 \epsilon l c})$$

整理得： $I_f = 2.3 j I_0 \epsilon l c$

当入射光强度 I_0 和 l 一定时，上式为：

$I_f = K c$ 即荧光强度与荧光物质的浓度成正比，但这种线性关系只有在极稀的溶液中，当 $\epsilon l c \leq 0.05$ 时才成立。对于较浓溶液，由于猝灭现象和自吸收等原因，使荧光强度和浓度不呈线性关系。

2. 影响荧光强度的因素

① 溶剂对荧光强度的影响。

溶剂的影响可分为一般溶剂效应和特殊溶剂效应。

一般溶剂效应指的是溶剂的折射率和介电常数的影响。

特殊溶剂效应指的是荧光体和溶剂分子间的特殊化学作用，如氢键的生成和化合作用。

一般溶剂效应是普遍的，而特殊溶剂效应则决定于溶剂和荧光体的化学结构。特殊溶剂效应所引起荧光光谱的移动值，往往大于一般溶剂效应所引起的影响。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可

会有显著不同。有的情况，增大溶剂的极性，将使 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的能量增大， $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的能量减小，而导致荧光增强，荧光峰红移。但也有相反的情况，例如，苯胺奈磺酸类化合物在戊醇、丁醇、丙醇、乙醇和甲醇中，随着醇的极性增大，荧光强度减小，荧光峰蓝移。因此荧光光谱的位置和强度与溶剂极性之间的关系，应根据荧光物质与溶剂的不同而异。

如果溶剂和荧光物质形成了化合物，或溶剂使荧光物质的电离状态改变，则荧光峰位和强度都会发生较大的变化。

② **温度对荧光强度的影响** 温度上升使荧光强度下降。其中一个原因是分子的内部能量转化作用。当激发分子接受额外热能时，有可能使激发能转换为基态的振动能量，随后迅速振动弛豫而丧失振动能量。另一个原因是碰撞频率增加，使外转换的去活几率增加。③ **溶液 pH 值对荧光强度的影响** 带有酸性或碱性官能团的大多数芳香族化合物的荧光与溶液的 pH 有关。不同的 pH 值，化合物所处状态不同，不同的化合物或化合物的分子与其离子在电子构型上有所不同，因此，它们的荧光强度和荧光光谱就有一定的差别。

对于金属离子与有机试剂形成的发光螯合物，一方面 pH 会影响螯合物的形成，另一方面还会影响螯合物的组成，因而影响它们的荧光性质。

④ **内滤光作用 and 自吸收现象** 溶液中若存在能吸收激发或荧光物质所发射光能的物质，就会使荧光减弱，这种现象称为“内滤光作用”。内滤光作用的另一种情况是荧光物质的荧光发射光的短波长的一端与该物质的吸收光谱的长波长一端有重叠。在溶液浓度较大时，一部分荧光发射被自身吸收，产生“自吸收”现象而降低了溶液的荧光强度。

3. 溶液荧光猝灭 荧光物质分子与溶剂分子或其它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。

导致荧光猝灭的主要类型：① **碰撞猝灭**

碰撞猝灭是指处于激发单重态的荧光分子与猝灭剂分子相碰撞，使激发单重态的荧光分子以无辐射跃迁的方式回到基态，产生猝灭作用。② **静态猝灭（组成化合物的猝灭）**

由于部分荧光物质分子与猝灭剂分子生成非荧光的配合物而产生的。此过程往往还会引起溶液吸收光谱的改变。

③ **转入三重态的猝灭**

分子由于系间的跨越跃迁，由单重态跃迁到三重态。转入三重态的分子在常温下不发光，它们在与其它分子的碰撞中消耗能量而使荧光猝灭。

溶液中的溶解氧对有机化合物的荧光产生猝灭效应是由于三重态基态的氧分子和单重激发态的荧光物质分子碰撞，形成了单重激发态的氧分子和三重态的荧光物质分子，使荧光猝灭。

④ **发生电子转移反应的猝灭**

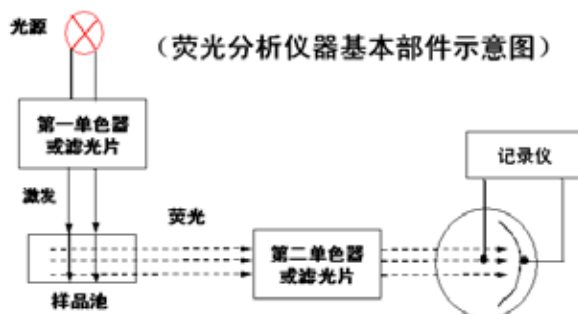
某些猝灭剂分子与荧光物质分子相互作用时，发生了电子转移反应，因而引起荧光猝灭。⑤ **荧光物质的自猝灭**

在浓度较高的荧光物质溶液中，单重激发态的分子在发生荧光之前和未激发的

荧光物质分子碰撞而引起的自猝灭。有些荧光物质分子在溶液浓度较高时会形成二聚体或多聚体，使它们的吸收光谱发生变化，也引起溶液荧光强度的降低或消失。

二、荧光分析仪用于测量荧光的仪器由激发光源、样品池、用于选择激发光波长和荧光波长的单色器以及检测器四部分组成。

目前常用的国内外荧光光谱仪



测定原理：由光源发射的光经第一单色器得到所需的激发光波长，通过样品池后，一部分光能被荧光物质所吸收，荧光物质被激发后，发射荧光。为了消除入射光和散射光的影响，荧光的测量通常在与激发光成直角的方向上进行。为消除可能共存的其它光线的干扰，如由激发所产生的反射光、Raman 光以及为将溶液中杂质滤去，以获得所需的荧光，在样品池和检测器之间设置了第二单色器。荧光作用于检测器上，得到响应的电信号。

(1) 激发光源：在紫外-可见区范围，通常的光源是氘灯和高压汞灯。

(2) 样品池：荧光用的样品池须用低荧光的材料制成，通常用石英，形状以方形和长方形为宜。(3) 单色器：光栅

(4) 检测器：由光电管和光电倍增管作检测器，并与激发光成直角。

三、分子荧光分析法及其应用

1. 荧光分析方法的特点

(1) 灵敏度高 (2) 选择性强 (3) 试样量少和方法简单 (4) 提供比较多的物理参数

荧光分析法的弱点是它的应用范围小。因为本身能发荧光的物质相对较少，用加入某种试剂的方法将非荧光物质转化为荧光物质进行分析，其数量也不多；另一方面，由于荧光分析的灵敏度高，测定对环境因素敏感，干扰因素较多。

2. 定量分析方法

(1) 校准曲线法 (2) 比较法

3. 应用

(1) 元素的荧光测定 (2) 有机化合物的荧光测定。

4. 定性分析

任何荧（磷）光都具有两种特征光谱：激发光谱与发射光谱。它们是荧（磷）光定性分析的基础。1) 激发光谱

改变激发波长，测量在最强荧（磷）光发射波长处的强度变化，以激发波长对荧光强度作图可得到激发光谱。

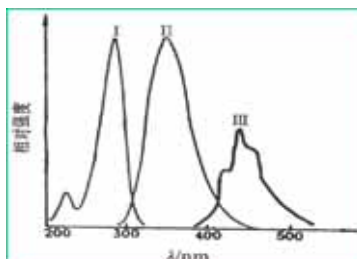
激发光谱形状与吸收光谱形状完全相似，经校正后二者完全相同！这是因为分子吸收光能的过程就是分子的激发过程。

激发光谱可用于鉴别荧光物质；在定量时，用于选择最适宜的激发波长。

2) 发射光谱

发射光谱即荧光光谱。一定波长和强度的激发波长辐照荧光物质，产生不同波长的强度的荧光，以荧光强度对其波长作图可得荧光发射光谱。由于不同物质具不同的特征发射峰，因而使用荧光发射光谱可用于鉴别荧光物质。

如下图所示。



四、磷光分析法分子磷光与分子荧光光谱的主要差别是磷光是第一激发单重态的最低能层，经系间跨越跃迁到第一激发三重态，并经振动弛豫至最低振动能层，然后跃迁回到基态发生的。与荧光相比，磷光具有如下三个特点：

(1) 磷光辐射的波长比荧光长

分子的 T_1 态能量比 S_1 态低。

(2) 磷光的寿命比荧光长

由于荧光是 $S_1 \rightarrow S_0$ 跃迁产生的，这种跃迁是自旋许可的跃迁，因而 S_1 态的辐射寿命通常在 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ s，磷光是 $T_1 \rightarrow S_0$ 跃迁产生的，这种跃迁属自旋禁阻的跃迁，其速率常数要小，因而辐射寿命要长，大约为 $10^{-4} \sim 10$ s，

(3) 磷光的寿命和辐射强度对于重原子和顺磁性离子敏感。

1. 低温磷光

由于激发三重态的寿命长，使激发态分子发生 $T_1 \rightarrow S_0$ 这种分子内部的内转化非辐射去活化过程以及激发态分子与周围的溶剂分子间发生碰撞和能量转移过程，或发生某些光化学反应的几率增大，这些都将使磷光强度减弱，甚至完全消失。为减少这些去活化过程的影响，通常应在低温下测量磷光。

低温磷光分析中，液氮是最常用的合适的冷却剂。因此要求所使用的溶剂，在液氮温度（77K）下应具有足够的粘度并能形成透明的刚性玻璃体，对所分析的试样应具有良好的溶解特性。试样的刚性可减少荧光的碰撞猝灭。溶剂应易于提纯，以除去芳香族和杂环化合物等杂质。溶剂应在所研究的光谱区域内没有很强的吸收和发射。最常用的溶剂是 EPA，它由乙醇、异戊烷和二乙醚按体积比为 2：5：5 混合而成。使用含有重原子的混合溶剂 IEPA（由 EPA：碘甲烷=10：1 组成），有利于系间跨越跃迁，可以增加磷光效应。

含重原子的溶剂，由于重原子的高核电荷引起或增强了溶质分子的自旋-轨道耦合作用，从而增大了 $S_0 \rightarrow T_1$ 吸收跃迁和 $S_1 \rightarrow T_1$ 系间跨越跃迁的几率，有利于

磷光的发生和增大磷光的量子产率。这种作用称为外部重原子效应。当分子中引入重原子取代基，例如，当芳烃分子中引入杂原子或重原子取代基时，也会发生内部重原子效应，导致磷光量子效率的提高。

2. 室温磷光由于低温磷光需要低温实验装置，溶剂选择的限制等因素，从而发展了多种室温磷光法（RTP）。

(1) 固体基质室温磷光法（SS-RTP）

此法基于测量室温下吸附于固体基质上的有机化合物所发射的磷光。所用的载体种类较多，有纤维素载体（如滤纸、玻璃纤维）、无机载体（如硅胶、氧化铝）以及有机载体（如乙酸钠、聚合物、纤维素膜）等。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其刚性，并能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（MS-RTP）当溶液中表面活性剂的浓度达到临界胶束浓度后，便相互聚集形成胶束。由于这种胶束的多相性，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。利用胶束稳定的因素，结合重原子效应，并对溶液除氧，是MS-RTP 的三个要素。

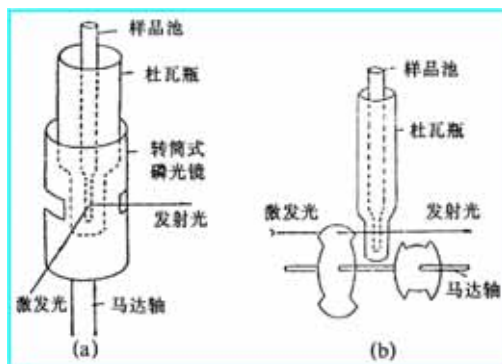
(3) 敏化溶液室温磷光法（SS-RTP）

该法在没有表面活性剂存在的情况下获得溶液的室温磷光。分析物质被激发后并不发射荧光，而是经过系间跨越过程衰减变至最低激发三重态。当有某种合适的能量受体存在时，发生了由分析物质到受体的三重态能量转移，最后通过测量受体所发射的室温磷光强度而间接测定该分析物质。在这种方法中，分析物质本身并不发磷光，而是引发受体发磷光。

3. 磷光仪器

在荧光仪样品池上增加磷光配件：低温杜瓦瓶和斩光片。如右图所示。

斩光片的作用是利用其分子受激所产生的荧光与磷光的寿命不同获取磷光辐射。



4. 应用

磷光分析主要用于测定有机化合物，如石油产品、多环芳烃、农药、药物等方面。

（一些有机化合物的磷光分析实例）