

多波长荧光分光光度法* (一)

黄贤智 许金钧

(厦门大学)

本文叙述了作者提出的多波长荧光分光光度法的原理, 它可应用于二组分和三组分荧光混合物的同时测定或分别测定。

对于荧光发射光谱相互重叠的双组分或多组分荧光混合物的同时测定, 经典的荧光分光光度法往往感到无能为力。虽然近十多年来新发展起来的同步荧光分光光度法(synchronous fluorescence spectrometry)能对多组分荧光混合物进行同时测定, 但它需要具有激发单色器和发射单色器且能进行同步扫描的荧光分光光度计^[1-4], 而一般简易型的荧光分光光度计则难以采用。为使一般荧光分光光度计亦能对多组分荧光混合物不经分离地同时测定, 作者应用近似于分子吸收光谱中的双波长分光光度法原理^[5,6], 建立多波长荧光分光光度法。本文叙述了其方法原理, 具体测定实例见另文。

一、双波长荧光法测定两组分荧光混合物

假设溶液中含有和两种荧光物质, 它们有如图 1 所示的荧光发射光谱, 发射光谱中的重叠部分其荧光强度**有良好的加和性(稀溶液中, 其荧光强度往往有良好的加和性)。那么 A 和 B 组分的测定可按如下方法进行。

(一) A 组分的测定

1. 当 A 组分于参比波长 λ_2 的荧光强度为零时

若 A 和 B 组分有如图 1 所示的荧光发射光谱, A 组分的测定可选择其荧光峰附近的波长 λ_1 为荧光强度测定波长。此时测得的荧光强度为 A 组分和 B 组分在波长 λ_1 的荧光强度之和, 即:

$$F_{\lambda_1}^{A+B} = F_{\lambda_1}^A + F_{\lambda_1}^B \quad (1)$$

移项得:

$$F_{\lambda_1}^A = F_{\lambda_1}^{A+B} - F_{\lambda_1}^B \quad (2)$$

式中:

$F_{\lambda_1}^{A+B}$ 为 A 和 B 组分于波长 λ_1 的荧光强度之和;

$F_{\lambda_1}^A$ 为 A 组分于波长 λ_1 的荧光强度;

$F_{\lambda_1}^B$ 为 B 组分于波长 λ_1 的荧光强度。

* 中国科学院科学基金资助的课题

** 由于仪器检测到的荧光信号与光源、单色器、光电倍增管及仪器的灵敏度有关, 所检测到的信号为荧光相对强度, 为了叙述方便, 下文简称为荧光强度。

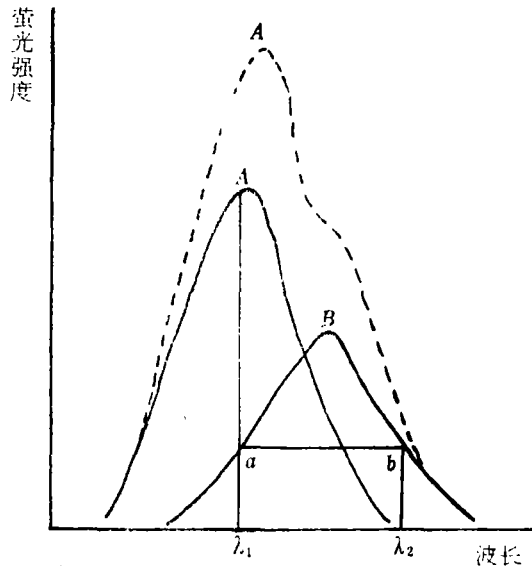


图 1 荧光物质 A 和 B 的荧光发射光谱。曲线 A 为 A 组分的荧光发射光谱; 曲线 B 为 B 组分的荧光发射光谱; 曲线 A+B 为 A 和 B 两组分共存时的荧光发射光谱

为了清除 B 组分对 A 组分测定的干扰, 可于 λ_1 划一直线垂直于波长轴并交于 B 组分发射光谱的 a 点, 由 a 点划一直线平行于波长轴并交于 B 组分发射光谱的 b 点, 再由 b 点划一垂直于波长轴并与其相交于波长 λ_2 处。所得的图形 $ab\lambda_1\lambda_2$ 为一长方形, 线段 $a\lambda_1 = b\lambda_2$, 这意味着 B 组分在 λ_1 和 λ_2 处的荧光强度相等, 即 $F_{\lambda_1}^B = F_{\lambda_2}^B$ 。由于 $F_{\lambda_1}^{A+B}$ 和 $F_{\lambda_2}^B$ 可分别由实验测得, 所以可由式 (2) 计算得 $F_{\lambda_1}^A$, 然后由 $F_{\lambda_1}^A \sim C_A$ 工作曲线查出样品中 A 组分的含量 C_A 。

2. 当 A 组分于 λ_2 的荧光强度不等于零时

设 A 和 B 组分的荧光发射光谱如图 2。由图 2 可知, 虽然 B 组分在测定波长 λ_1 和参比波长 λ_2 的荧光强度相等, 可是 A 组分在 λ_2 的荧光强度不等于零, 在 λ_2 测得的荧光强度不是 $F_{\lambda_2}^B$, 而是 $F_{\lambda_2}^{A+B}$, 故式 (2) 应改写为

$$F_{\lambda_1}^A = F_{\lambda_1}^{A+B} - F_{\lambda_2}^{A+B} + F_{\lambda_2}^A \quad (3)$$

移项得:

$$\Delta F = F_{\lambda_1}^A - F_{\lambda_2}^A = F_{\lambda_1}^{A+B} - F_{\lambda_2}^{A+B} \quad (4)$$

根据荧光强度公式:

$$F = K I_0 \phi abc \quad (5)$$

式中:

F 为测得的荧光强度;

K 为与仪器检测特性有关的常数;

I_0 为激发光强度;

ϕ 为被测物质的荧光效率;

a 为被测物质的吸光系数;

b 为液池的光程长度;

c 为被测物质的浓度。

可知, 当仪器、测量条件以及被测物质确定之后, K 、 I_0 、 ϕ 、 a 和 b 均为常数, $K I_0 ab$ 的积亦为一常数 (以 K' 表示之), 则式 (5) 可改写为:

$$F = K' C \quad (6)$$

那么 $F_{\lambda_1}^A$ 和 $F_{\lambda_2}^A$ 可写为:

$$F_{\lambda_1}^A = K_1 C_A \quad (7)$$

$$F_{\lambda_2}^A = K_2 C_A \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \Delta F^A &= F_{\lambda_1}^A - F_{\lambda_2}^A = (K_1 - K_2) C_A \\ &= k C_A \end{aligned} \quad (9)$$

可见, A 组分的 ΔF^A 正比于其浓度 C_A 。由于 $F_{\lambda_1}^{A+B}$ 和 $F_{\lambda_2}^{A+B}$ 可分别于波长 λ_1 和 λ_2 实验测得, 所以由式 (4) 可得 ΔF^A 。最后, 可由样品的 ΔF^A 值和 $\Delta F^A \sim C_A$ 工作曲线查出样品中 A 组分的含量。显然, B 组分的干扰已被消除。

(二) B 组分的测定

1. 当组分 B 的荧光强度于 λ_2 为零时

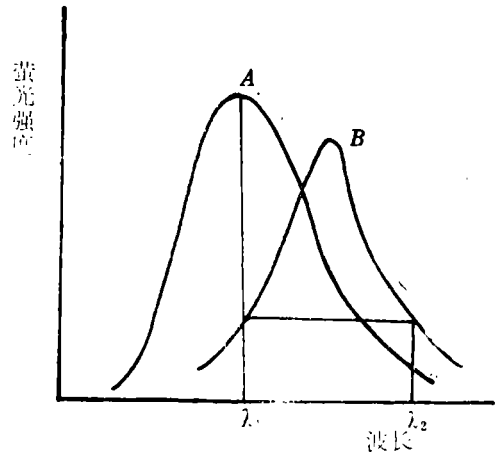


图 2 荧光物质 A 和 B 的荧光发射光谱;
 B 组分于 λ_1 和 λ_2 的荧光强度相等

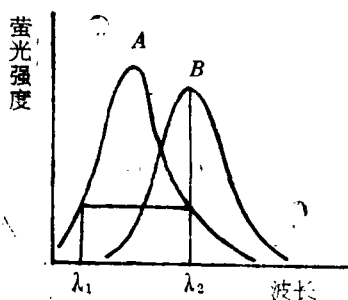


图3 荧光物质A和B的荧光发射光谱
时A组分于 λ_1 和 λ_2 的荧光强度相等

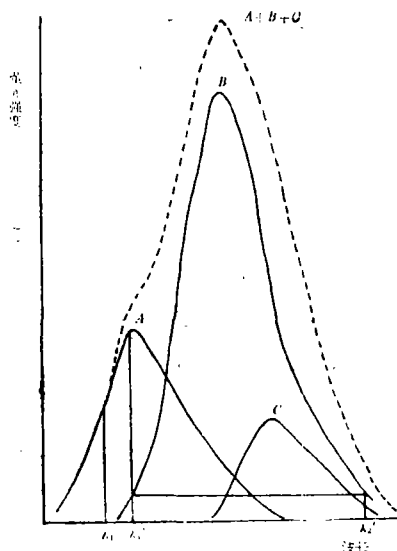


图4 荧光物质A、B和C的荧光发射光谱。曲线A、B、C和A+B+C分别代表相应组分的荧光发射光谱和混合物的荧光发射光谱

方法原理与A组分测定法1相似，可于B组分的光发射峰附近选择 λ_1 并测量其荧光强度 $F_{\lambda_1}^{A+B}$ ，而后由A组分的荧光发射光谱线找出与 λ_1 等荧光强度的 λ_2 （见图3），再由式（10）计算出 $F_{\lambda_1}^B$ ：

$$F_{\lambda_1}^B = F_{\lambda_1}^{A+B} - F_{\lambda_1}^A \quad (10)$$

式中 $F_{\lambda_1}^{A+B}$ 和 $F_{\lambda_2}^A$ 分别由实验测得。由试样的 $F_{\lambda_1}^B$ 值和 $F_{\lambda_1}^B \sim C_B$ 工作曲线查出B组分的含量。

2. 当B组分的荧光强度不为零时

方法原理与A组分测定2相似，这样可于 λ_1 和 λ_2 测得 $F_{\lambda_1}^{A+B}$ 和 $F_{\lambda_2}^{A+B}$ ，然后由式（11）求得 ΔF^B ：

$$\Delta F^B = F_{\lambda_1}^B - F_{\lambda_2}^B = F_{\lambda_1}^{A+B} - F_{\lambda_2}^{A+B} \quad (11)$$

（因为 $F_{\lambda_1}^A = F_{\lambda_2}^A$ ）

最后由 ΔF^B 和 $\Delta F^B \sim C_B$ 工作曲线查出B组分的含量。

二、多波法测定三组分荧光混合物

假设：（1）被测定的溶液中有A、B和C三种荧光物质共存，它们的荧光强度有良好的加和性；（2）A、B和C组分及A+B+C组分有图4所示的发射光谱。那么A、B和C组分的测定可按下述的方法进行。

（一）A组分的测定

1. 选择 λ_1 为测定波长

由图4可知，于 λ_1 处B和C组分均无荧光，它们对A组分的测定不干扰。

2. 选择 λ_1' 为测定波长， λ_2' 为参比波长

由图 4 可知, λ_1' 位于 A 组分的荧光峰波长, 方法灵敏度较高, 但于 λ_1' 测得的荧光强度为 A 组分和 B 组分于 λ_1' 的荧光强度之和, 需找合适的 λ_2' 并测量其荧光强度 ($F_{\lambda_1', B} = F_{\lambda_2', B}$) 才能扣除 B 组分的干扰。此外还得注意到 C 组分在 λ_2' 的荧光强度为零, 否则由于 C 组分的存在可能使 A 组分的测定结果略有偏低。

(二) B 组分的测定

根据 A、B 和 C 组分的荧光发射光谱, 可选择 B 组分的荧光峰为测定波长 λ_1 (见图 5)。由图 5 看出, 在 λ_1 处 A 和 C 组分对 B 组分测定干扰较小, 但在此波长下测得的荧光强度仍是三者之和, 即

$$F_{\lambda_1}^{A+B+C} = F_{\lambda_1}^A + F_{\lambda_1}^B + F_{\lambda_1}^C \quad (12)$$

为消除 A 和 C 组分对 B 组分测定的干扰, 可于 A 和 C 组分的荧光发射光谱的 λ_1 波长位置, 找出相应的等荧光强度波长 λ_2 和 λ_3 作为参比波长, 此时:

$$F_{\lambda_1}^A = F_{\lambda_2}^A; \quad F_{\lambda_1}^C = F_{\lambda_3}^C$$

若 B 组分于 λ_3 的荧光强度为零, $F_{\lambda_1}^B$ 可由式 (12) 求得, 然后由 $F_{\lambda_1}^B \sim C_B$ 工作曲线查出 B 组分的含量。

若 B 组分于 λ_3 的荧光强度不为零, 可改用式 (13) 求得 ΔF^B

$$\Delta F^B = F_{\lambda_1}^B - F_{\lambda_2}^B = F_{\lambda_1}^{A+B+C} - F_{\lambda_2}^A - F_{\lambda_3}^{B+C} \quad (13)$$

然后由 $\Delta F^B \sim C_B$ 工作曲线查出 B 组分的含量。

(三) C 组分的测定

和 B 组分的测定相似, 可选择 C 组分的荧光发射峰为测定波长 λ_1 。由图 6 可知, 于 λ_1 测得的荧光强度为 A、B 和 C 三者之和。为消除 A 和 B 组分对 C 组分测定的干扰, 可于 B 和 A 组分的荧光发射光谱上找出各自与 λ_1 等荧光强度的波长 λ_2 和 λ_3 , 即:

$$F_{\lambda_1}^B = F_{\lambda_2}^B; \quad F_{\lambda_1}^A = F_{\lambda_3}^A$$

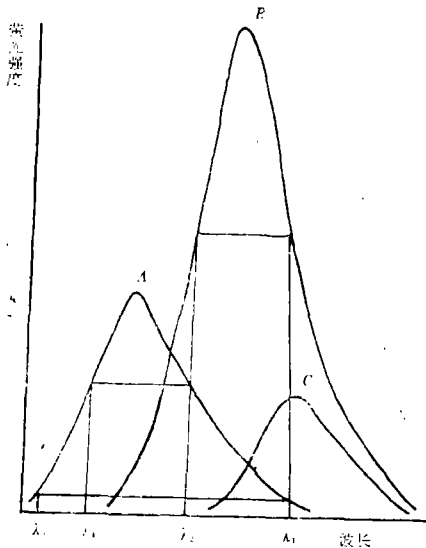


图 5 B 组分测定时, λ_1, λ_2 和 λ_3 的选择

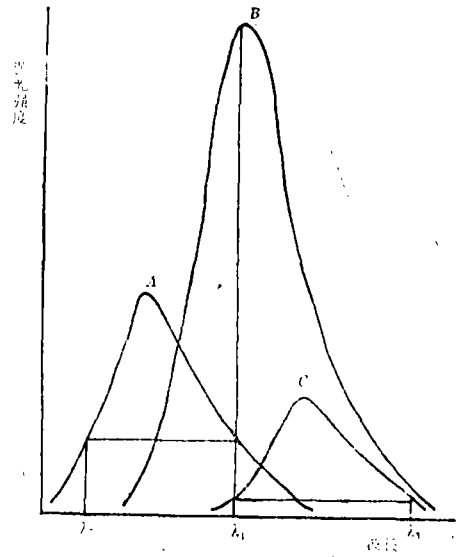


图 6 C 组分测定时, $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ 和 λ_4 的选择

由图 6 可看出, λ_2 测得的荧光强度并非仅是 B 组分的荧光强度, 而是 B 和 A 组分

的荧光强度之和即:

$$F_{\lambda_2}^{A+B} = F_{\lambda_2}^A + F_{\lambda_2}^B$$

但 $F_{\lambda_2}^A = F_{\lambda_4}^A$ (等荧光强度波长), $F_{\lambda_4}^A$ 可由实验测得, 所以于波长 λ_1 测得的荧光强度可写为:

$$\begin{aligned} F_{\lambda_1}^{A+B+C} &= F_{\lambda_1}^A + F_{\lambda_1}^B + F_{\lambda_1}^C \\ &= F_{\lambda_3}^A + (F_{\lambda_2}^{A+B} - F_{\lambda_4}^A) + F_{\lambda_1}^C \end{aligned}$$

移项得:

$$F_{\lambda_1}^C = F_{\lambda_1}^{A+B+C} - F_{\lambda_3}^A - F_{\lambda_2}^{A+B} + F_{\lambda_4}^A \quad (14)$$

式中 $F_{\lambda_1}^{A+B+C}$ 、 $F_{\lambda_3}^A$ 、 $F_{\lambda_2}^{A+B}$ 和 $F_{\lambda_4}^A$ 可分别于波长 λ_1 、 λ_3 、 λ_2 和 λ_4 实验测得, 所以 $F_{\lambda_1}^C$ 可由式 (14) 计算出。最后由 $F_{\lambda_1}^C \sim C_C$ 工作曲线查出 C 组分的含量。

结 果 与 讨 论

综上所述, 只要根据有关荧光物质的发射光谱, 选择适宜的测定波长 λ_1 和参比波长 λ_2 (λ_3 或 λ_4), 就有可能通过多波长荧光法简便地同时测定两组分或三组分荧光物质。

根据荧光分析的一般规律, 可预料, 多波长荧光法有其局限性: (1) 采用不同的荧光分光光度计时, 由于其单色器和光电倍增管的光谱特性不尽相同, 所选用的测定波长 λ_1 和参比波长 λ_2 、 λ_3 或 λ_4 必然不尽相, 其具体波长应由实验确定, 不能彼此乱套用; (2) 被测物质的浓度不宜过大, 否则可出现荧光自吸现象; (3) 各种组分浓度不可相差太大, 否则测定的误差较大。

(1985 年 3 月 21 日收稿)

参 考 文 献

1. Lloyd, J.B., Nature (Phys Sci) 231, 64-65 (1981).
2. Lloyd, J.B.F., Analyst, 105, 97(1980).
3. 黄贤智、谢平、黄莺莺, 第三届全国分析年会文集, 中国化学会, 1983 年, 大连。P432-433.
4. 许金钧, 光学与光谱技术, (3), 12 (1983).
5. 厦门大学化学系分析教研室, 分析化学, 3, 224(1982).
6. 黄贤智、许金钧光学与光谱技术, 2, 37(1982).

(接 24 页)

语言程序的转换已不成问题。公式变曲线程序与 5DX 对曲线的处理功能相结合, 开辟了一个新天地。

尚待解决的问题是: ①扩大内存。用户可用内存仅 15K, 须使用间接寻址方法借用内存区, 或使用复盖、矢量操作等技术压缩字典内容。②解决方便的调用方法, 寻求一个先经编译随时可用 PROG 调用的程序的编译方法。

(6) 测控

RS-232 通道可以对非红外操作进行监控或数据处理。尚未开展有关的接口, A/D 转换及控制软件的研究与开发。

此外, 尚有 1200S 与 TMON 之间数据转换软件的开发待解决。

软件开发需多方面知识, 要付出艰辛的劳动, 需各单位广泛协作。希望 FTIR 用户协会及有关方面给予组织、支持与赞助。

(软件程序及原理见《5DX FT-IR 软件及操作手册》1—5 册)。

(1985 年 6 月 6 日收稿)