

固定波长同步荧光光谱参数的理论计算

李耀群* 黄贤智 许金钧

(厦门大学化学系, 厦门, 361005)

摘要 基于荧光激发光谱和发射光谱对波长呈高斯分布的设定, 本文推导出固定波长同步荧光光谱峰值位置、相对强度和半峰宽度等 3 个主要光谱参数的理论计算式。所提出的计算式应用于若干荧光物质光谱参数的计算, 并和实测值、文献计算值作了对照。结果表明, 和文献计算方法相比, 本法与所研究物质的实际光谱参数较为接近, 可为固定波长同步荧光光谱参数的理论计算提供一有效方法。

关键词 同步荧光光谱, 高斯分布, 光谱参数。

1 引言

同步荧光光谱特性可用谱峰峰值位置、相对强度和半峰宽等 3 个主要参数来表征。理论上探讨它们与对应的荧光激发光谱、发射光谱及扫描参数的关系, 有助于对同步荧光法特点的充分认识和对分析体系扫描参数的优化^[1]。

同步荧光光谱分析法于 70 年代提出后, 以其谱图简单、选择性高、散射光干扰少等优点而引起人们的注意, 获得广泛的应用^[2~7]。根据单色仪扫描方式的不同, 同步荧光法又可分为固定波长法、可变角法和恒能量法^[8]。目前最广为使用的是固定波长同步荧光光谱分析法, 即在扫描过程中使激发波长和发射波长两者之间始终保持固定的波长间隔($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$)。

各种同步荧光光谱的理论计算已有一些报道^[1,9,10]。Lloyd 和 Evett 曾对固定波长同步荧光光谱的峰位和强度作了理论预测, 并提出带宽的经验式^[9], Boudot 和 Andre 另外也提出一个求带宽的经验式^[11]。Lloyd 和 Evett 的工作是基于激发峰和发射峰对波长呈高斯分布的假设, 推导过程极为复杂, 且必须采用简化和近似处理。而对于带宽, 则未能推导得到满意结果^[9]。本文采用假设激发峰和发射峰对波长呈高斯分布的想法, 在推导参数过程中未做任何省略或近似处理, 从理论上还得出带宽的计算式。研究结果表明, 总的说来, 与 Lloyd 等的计算式及经验式相比较, 本文所提出的计算公式可提供更为准确的固定波长同步荧光峰参数的计算值。

2 实验部分

2.1 仪器

自制微机化多功能荧光分光计^[12]。仪器的激发和发射单色仪狭缝均为 1 mm (自然宽度)。测绘激发光谱、发射光谱及固定波长同步荧光光谱时, 扫描速度均为 120 nm/min。计算在 Apple- I 微机上进行。

2.2 试剂

本文系国家自然科学基金及国家教委博士点基金资助项目。

1-萘酚(α -萘酚)和 2-萘酚(β -萘酚)贮备液:准确称取适量 1-萘酚(化学纯,纯度 $>99\%$)和 2-萘酚(实验试剂,纯度 $>99\%$)分别用 0.1 mol/L KOH 水溶液配制成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液。避光冷藏保存。使用时用 0.1 mol/L KOH 加以稀释。

3 理 论 部 分

分子光谱由于各种变宽因素而呈带状光谱,最普遍观察到的光谱形状为高斯分布,另外还有洛仑兹分布等^[13]。

为演算方便,本文假定激发光谱 $X(\lambda_i)$ 和发射光谱 $Y(\lambda_j)$ 均为单峰,且对波长呈高斯分布(用 i 代表激发、 j 代表发射):

$$X(\lambda_i) = X_0 \exp[-(\lambda_i - \lambda_{i0})^2 / 2\sigma_i^2] \quad (1)$$

$$Y(\lambda_j) = Y_0 \exp[-(\lambda_j - \lambda_{j0})^2 / 2\sigma_j^2] \quad (2)$$

式中, λ_{i0} 、 λ_{j0} 分别为激发峰和发射峰的峰位(即最大激发波长和最大发射波长), σ 为标准偏差。

由波长为 λ_i 的激发光激发,在 λ_j 的波长位置检测到的荧光发射强度可表示为:

$$M = \alpha X(\lambda_i) Y(\lambda_j) \quad (3)$$

α 为与波长无关的项。对于固定波长同步扫描:

$$\lambda_j = \lambda_i + \Delta\lambda \quad (4)$$

则同步荧光信号强度为

$$M_s = \alpha X_0 Y_0 \exp[-(\lambda_i - \lambda_{i0})^2 / 2\sigma_i^2] \exp[-(\lambda_i + \Delta\lambda - \lambda_{j0})^2 / 2\sigma_j^2] \quad (5)$$

因本文要讨论的是激发光谱和发射光谱相互作用产生的同步光谱的特征,可将荧光强度表示为相对于系数 $\alpha X_0 Y_0$ 的量:

$$I_s = \exp[-(\lambda_i - \lambda_{i0})^2 / 2\sigma_i^2 - (\lambda_i + \Delta\lambda - \lambda_{j0})^2 / 2\sigma_j^2] \quad (6)$$

由 $dI_s/d\lambda_i = 0$ 可得同步荧光峰的峰值波长 λ_{iso} (用激发波长表示):

$$\lambda_{iso} = [\sigma_i^2(\lambda_{j0} - \Delta\lambda) + \sigma_j^2\lambda_{i0}] / (\sigma_i^2 + \sigma_j^2) \quad (7)$$

按定义谱带半峰宽 W 和标准偏差之间存在关系:

$$W = (8\ln 2)^{\frac{1}{2}} \sigma \quad (8)$$

所以式(7)可重写为:

$$\lambda_{iso} = [W_i^2(\lambda_{j0} - \Delta\lambda) + W_j^2\lambda_{i0}] / (W_i^2 + W_j^2) \quad (9)$$

结合式(6)、式(8)和式(9),可得峰值强度 I_{so} :

$$I_{so} = \exp[-4\ln 2(\lambda_{j0} - \lambda_{i0} - \Delta\lambda)^2 / (W_i^2 + W_j^2)] \quad (10)$$

由 I_{so} 的一半值所对应的两个波长位置 λ_h 可确定同步峰的半峰宽 W_s 。利用式(6)可得:

$$\exp[-(\lambda_h - \lambda_{i0})^2 / 2\sigma_i^2 - (\lambda_h + \Delta\lambda - \lambda_{j0})^2 / 2\sigma_j^2] = 0.5 I_{so} \quad (11)$$

式(10)代入式(11),并且以式(8)将标准偏差均改为半峰宽表示。经推导得:

$$W_s = W_i W_j / (W_i^2 + W_j^2)^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

式(9)、(10)及(12)即分别代表固定波长同步荧光峰的峰位、强度和半峰宽的理论计算式。

4 结果与讨论

4.1 带宽

比较了不同计算方法所得到的固定波长同步光谱带宽结果。文献曾报道了两个半峰宽的经验计算式:

$$\text{文献(9)} \quad W_s = 0.364(W_i + W_j) - 3.309 \quad (13)$$

$$\text{文献(11)} \quad W_s = W_i + W_j - (W_i^2 + W_j^2)^{\frac{1}{2}} \quad (14)$$

许金钩等^[14]曾给出了 9 种荧光体在以 $\Delta\lambda$ =(最大发射波长-最大激发波长)进行同步扫描所获得的同步荧光光谱半峰宽的实测值和由上述经验式(13)、(14)计算得来的数据(见文献(14)的表 1,所用仪器为日立-650-10S 型荧光分光计)。取该表中所给的激发和发射光谱半峰宽的数据代入式(12),计算结果与实测值非常吻合,比用式(13)、(14)的计算结果都好。参见表 1。计算半峰宽值的平均误差:用式(13),得 $0.4 \pm 2.8(\text{SD})\text{nm}$;由式(14),得 $-4.4 \pm 2.2(\text{SD})\text{nm}$;而用本文推导的式(12),得 $+0.03 \pm 1.6(\text{SD})\text{nm}$ 。结果表明,与文献报道的经验式相比,本文提出的带宽公式可提供更准确的固定波长同步荧光光谱的半峰宽数据。

表 1 同步荧光峰半峰宽的计算值与实测值的比较

序号	化合物	λ_i (nm)	λ_j (nm)	W_i (nm)	W_j (nm)	$W_s(\text{nm})^a$			
						实验值	文献(13)	文献(14)	本文(12)
1	Phenol	272	298	18.4	32.0	18.0	15.0	13.5	16.0
2	<i>P</i> -dihydroxybenzene	295	328	25.4	33.0	22.0	(-3) ^b 18.0	(-4.5) 16.8	(-2.0) 20.1
3	<i>m</i> -dihydroxybenzene	280	310	18.4	37.0	13.0	(-4) 16.9	(-5.2) 14.1	(-1.9) 16.5
4	4,4'-dihydroxydiphenyl (0.01 mol/L HCL)	272	354	42.4	46.0	31.0	(+3.9) 28.9	(+1.1) 25.8	(+3.5) 31.2
5	4-hydroxydiphenyl (0.01 mol/L HCL)	268	335	40.0	48.4	30.0	(-2.1) 28.9	(-5.2) 25.6	(+0.2) 30.8
6	2,2'-dihydroxydiphenyl (0.01 mol/L HCL)	280	395	26.4	63.0	25.0	(-1.1) 29.2	(-4.4) 21.1	(+0.8) 24.3
7	4,4'-dihydroxydiphenyl (OH ⁻ /CTMAB)	308	405	47.6	70.0	39.5	(+4.2) 39.5	(-3.9) 33.0	(-0.7) 39.4
8	4-hydroxydiphenyl (OH ⁻ /CTMAB)	306	390	46.0	58.0	36.0	(0) 34.6	(-6.5) 30.0	(-0.1) 36.0
9	2,2'-dihydroxydiphenyl (OH ⁻ /CTMAB)	322	398	40.0	56.0	32.0	(-1.40) 31.6	(-6) 27.2	(0) 32.5
							(-0.4)	(-4.8)	(+0.5)

a. 基于实验测量,式(13)(文献),式(14)(文献)和式(12)(本文)的半峰宽值;

b. 括号内数据为计算值与实测值之间的差值。

4.2 峰值强度和位置

图 1 和图 2 分别示出了 1-萘酚和 2-萘酚在不同 $\Delta\lambda$ 值下的同步荧光光谱峰值波长及强度的计算值与实验值比较结果。1-萘酚和 2-萘酚的荧光激发光谱均不只有一个峰,本文只取两者的主峰进行考察。1-萘酚的激发峰和发射峰的峰位分别为 332 和 458 nm,半峰宽分别为 45 和 99 nm;2-萘酚激发峰和发射峰的峰位分别为 347 和 413 nm,半峰宽分别为 36.6 和 68.8 nm。将上述参变量代入式(9)和(10),求出 $\Delta\lambda=66,100,125,160$ 及 180 nm 所对应的同步荧光光谱的峰值波长和强度。图 1 和图 2 均列出了用 Lloyd 和 Evett^[9]的计算公式得到的结果,以资比较。

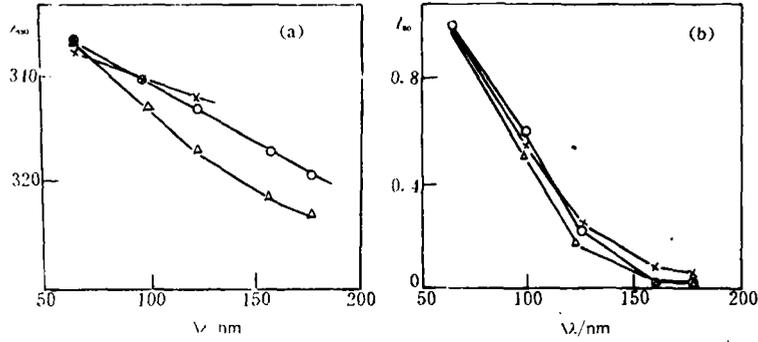


图 1 1-萘酚同步荧光峰峰值波长(a)和强度(b)的计算值与实测值的比较
×: 实测值; O: 本文所提公式的计算值; Δ: 文献[9]公式的计算值.

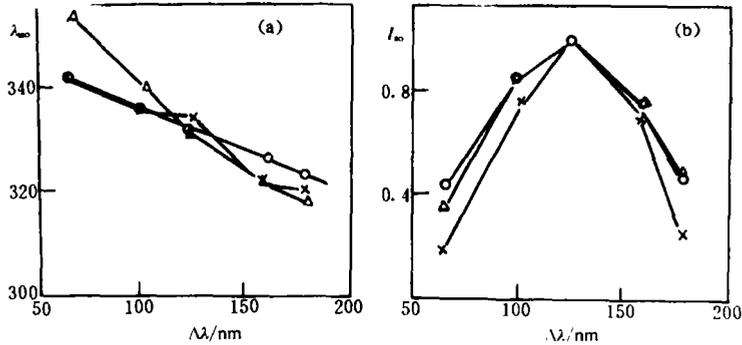


图 2 2-萘酚同步荧光峰峰值波长(a)和强度(b)的计算值与实测值的比较
(图标示同图 1)

因同步荧光峰的强度的理论计算值以 0-1 的比值表示,故实测值也必须以比值表示。对于 2-萘酚,取 $\Delta\lambda=66\text{ nm}$ (最大发射波长和最大激发波长之差)所测得的同步荧光峰峰值强度信号定为 1,其余的同步荧光峰峰值强度与此最大强度的比值表示。类似地,对于 1-萘酚以 $\Delta\lambda=125\text{ nm}$ (最大发射波长与最大激发波长之差)所测得的同步荧光峰峰值强度信号定为 1。

4.2.1 1-萘酚的同步荧光峰峰值波长位置 当 $\Delta\lambda < 125\text{ nm}$,由本文提出的计算式所得到的计算值与实测值相当一致,而 Lloyd 等^[9]的计算值则误差颇大;而当 $\Delta\lambda > 125\text{ nm}$,Lloyd 等的计算值则相对更为吻合些(图 1-a)。

表 2 同步荧光峰峰位和强度的计算误差比较

化合物	1-萘酚		2-萘酚		
	标准偏差	平均值误差	标准偏差	平均值误差	
λ_{iso}	本文方程	2.5	+1.0	2.3	+0.63
	文献方程	5.8	+2.5	5.9	-4.4
I_{∞}	本文方程	0.11	+0.13	0.036	-0.020
	文献方程	0.096	+0.099	0.025	-0.041

a. 计算值误差的标准偏差; b. 计算值的平均误差。

4.2.2 2-萘酚的同步荧光峰峰值波长位置 本文的计算值比 Lloyd 等的计算值更靠近实测值(图 2-a)。当 $\Delta\lambda > 160\text{ nm}$ 时,2-萘酚的这个同步峰变得很弱,不易读出峰值位置,故图上未注出实测值。

4.2.3 1-萘酚的同步荧光峰峰值强度 两种计算结果与实测值比较都存在一定的误差(图 1-

b),但 Lloyd 等的计算结果相对更接近实测值。

4.2.4 2-萘酚的同步荧光峰峰值强度 两种计算结果与实测值都较好吻合(图 2-b)。

由表 2 可进一步看出同步荧光峰峰位和强度的两种计算值与实测值的误差情况。

4 参 考 文 献

- 1 Inman E L, Files L A, Winefordner J D. *Anal. Chem.*, **1986**, 58:2156
- 2 Soutor I. *Anal. Proc.*, **1983**, 20:19
- 3 Vo-Dinh T, Abbott D W. *Environm. Int.*, **1984**, 10:299
- 4 Sanchez F G, Rubio A L R. *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 228:293
- 5 李耀群,黄贤智,许金钩,陈国珍. *分析化学*, **1991**, 19:538
- 6 Files L A, Winefordner J D. *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35:471
- 7 Li Y Q, Huang X Z, Xu J G, Chen G Z. *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 256:285
- 8 Rubio S, Gomez-Hens A, Valcarcel M. *Talanta*, **1986**, 33:633
- 9 Lloyd J B F, Evett I W. *Anal. Chem.*, **1977**, 49:1710
- 10 Cabaniss S E. *Anal. Chem.*, **1991**, 63:1323
- 11 Boudot Ph, Andre J C. *Anal. Lett.*, **1982**, 15:471
- 12 李耀群,黄贤智. *厦门大学学报*, **1990**, 29:529
- 13 Butler W L, Hopkins D W. *Photochem. Photobiol.*, **1970**, 12:439
- 14 许金钩,徐瑞通. *高等学校化学学报*, **1990**, 11:350

(收稿日期:1992年7月15日;修回日期:1992年12月11日)

Theoretical Calculation for the Spectral Parameters of Constant-wavelength Synchronous Fluorescence Spectra

Li Yaoqun*, Huang Xianzhi, Xu Jingou

(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract On the assumption that the fluorescence excitation and emission spectra can be represented by Gaussian distributions versus wavelength, the theoretical equations were derived for the calculation of peak location, intensity and half-width in constant-wavelength synchronous fluorescence spectra. The proposed equations were applied to the calculation of the spectral parameters for some compounds and the calculated data were compared with the experimental data and the calculation based on the literature equations, which indicated that the proposed method could provide an effective alternative for the calculation of the spectral parameters in constant-wavelength synchronous fluorescence spectra.

Keywords Synchronous fluorescence spectra, Gaussian distribution, Spectral parameter.

(Received July 15, 1992; Revised December 11, 1992)