

Application News

No. A500

光吸收分析
Spectrophotometric Analysis

使用同步荧光法进行分离分析

Separation Analysis by Synchronous Fluorescence Spectroscopy

多组分样品的分离分析可以借助荧光光度计的同步荧光光谱法来实现。在激发光谱测定中，先固定荧光波长，然后扫描激发分光器的波长；在荧光光谱测定中，则先固定激发波长，然后扫描荧光分光器的波长。而在同步荧光光谱测定中，错开激发和荧光分光器的开始扫描波长，将两波长差 ($\Delta\lambda$) 保持为固定值，按照相同扫描速度同时对两侧分光器进行扫描并测定。检测器接收到的是由激发分光器波长激发而发射的与激发波长偏移 $\Delta\lambda$ 处荧光发射波长的强度，通过选择合适的 $\Delta\lambda$ 可以进行目标成分的分离。

本文向您介绍同步荧光法的原理，以及使用图 1 所示的荧光分光光度计 RF-6000 对多环芳香族化合物的混合样品进行分析的示例。



图 1 荧光分光光度计 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

同步荧光法的定义

Synchronous Fluorescence Spectroscopy

同步荧光法的原理如下所示¹⁾。将照射到荧光物质的激发光波长设为 λ' ，将 $E_M(\lambda)$ 定义为荧光的强度分布图（荧光光谱）。荧光波长 λ 的荧光光度值 $I(\lambda)$ 取决于 $E_M(\lambda)$ 。并且与 λ' 激发的荧光物质散发的光亮度 $R_{\lambda'}$ 成正比。

$$I(\lambda) = k_1 R_{\lambda'} E_M(\lambda) \quad (1)$$

此处， k_1 为系数。当荧光物质的浓度很低时，通过公式 (2) 计算 $R_{\lambda'}$ 。

$$R_{\lambda'} = k_2 \varepsilon(\lambda') c d I_0(\lambda') \varphi(\lambda') \quad (2)$$

此处， k_2 为系数； $\varepsilon(\lambda')$ 为吸光系数； c 为荧光物质的浓度； d 为光程长； $I_0(\lambda')$ 为激发光的强度； $\varphi(\lambda')$ 为荧光物质的量子产率。

$\varepsilon(\lambda') I_0(\lambda') \varphi(\lambda')$ 的乘积作为激发函数，将激发光谱作为 $E_X(\lambda')$ 时，可以通过公式 (3) 计算。

$$E_X(\lambda') = k_3 \varepsilon(\lambda') I_0(\lambda') \varphi(\lambda') \quad (3)$$

此处， k_3 为系数。

根据公式 (1)、(2)、(3)，同步荧光光谱的强度 $I_S(\lambda', \lambda)$ 可以通过公式 (4) 计算。

$$I_S(\lambda', \lambda) = K c d E_X(\lambda') E_M(\lambda) \quad (4)$$

此处， $K = k_1 k_2 k_3^{-1}$ 。

在同步荧光光谱测定中，因为激发波长与荧光波长的波长差 ($\Delta\lambda$) 固定，所以

$$\lambda - \lambda' = \Delta\lambda \quad (\text{一定}) \quad (5)$$

根据公式 (4)、(5)，

$$I_S(\lambda', \lambda) = K c d E_X(\lambda') E_M(\lambda' + \Delta\lambda) \quad (6)$$

或者

$$I_S(\lambda', \lambda) = K c d E_X(\lambda - \Delta\lambda) E_M(\lambda) \quad (7)$$

根据以上公式，同步荧光光谱作为 λ 和 λ' 的函数计算得到。强度图也会因 $\Delta\lambda$ 的变化而发生变化。

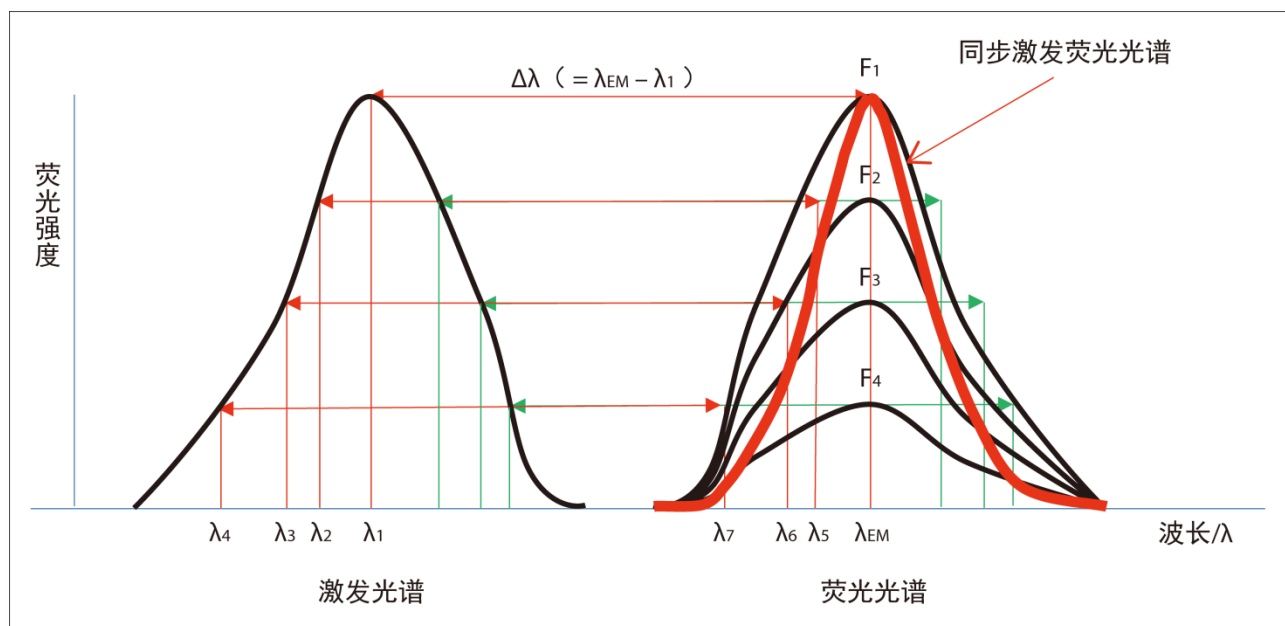


图2 同步荧光光谱的示意图
Schematic Diagram of Synchronous Fluorescence Spectra

为了从视觉上理解同步荧光法，图2显示了虚拟激发光谱和荧光光谱。

假设通过波长 λ_1 激发时，根据波长 λ_{EM} 计算得到强度 F_1 的荧光光谱。将激发波长设为 λ_2 时，可以通过波长 λ_{EM} 获得与强度 F_1 的荧光光谱相似的强度 F_2 的荧光光谱。

对于该激发光谱和荧光光谱，通过两个光谱的波长差 $\Delta\lambda (= \lambda_{EM} - \lambda_1)$ 同时扫描激发波长和荧光波长，从而测定同步荧光光谱。激发波长为 λ_4 时，波长 λ_{EM} 的荧光强度为 F_4 ，但是，因为在同步荧光光谱测定中，荧光波长为移动了 $\Delta\lambda$ 的 $\lambda_7 (= \lambda_4 + \Delta\lambda)$ ，所以强度 F_4 的荧光光谱 λ_7 的荧光强度即为同步荧光光谱的强度。同样，当激发波长为 λ_3 时，波长 λ_{EM} 强度 F_3 的荧光光谱 $\lambda_6 (= \lambda_3 + \Delta\lambda)$ 的荧光强度即为同步荧光光谱的强度。由此，如果在激发波长和荧光波长的间隔保持在 $\Delta\lambda$ 的状态下进行扫描，则可以得到如红线所示的同步荧光光谱。

如图2所示，同步荧光光谱与原荧光光谱相比，半宽度变窄，并且，将 $\Delta\lambda$ 设为激发光谱和荧光光谱的波长差时，同步荧光光谱的峰强度会达到最大。

■ 多环芳烃化合物的同步荧光光谱测定

Synchronous Fluorescence Spectra of Polycyclic Aromatic Compounds

制备芘（浓度 $2.9 \mu\text{g/mL}$ ）、苯并(a)芘（浓度 $1.6 \mu\text{g/mL}$ ）、苯并(k)荧蒹（浓度 $2.0 \mu\text{g/mL}$ ）的环己烷溶液，使用荧光分光光度计 RF-6000 进行测定。表1为测定条件；图3为测定结果。由此可知，芘、苯并(a)芘、苯并(k)荧蒹的激发波长分别为 335 nm 、 385 nm 、 308 nm 。在上述浓度下测定时，苯并(k)荧蒹的荧光强度最大，大约是荧光强度最小的芘的40倍。为了更加容易确认芘和苯并(a)芘的荧光光谱，放大了图3的荧光光谱（图4）。

在同步荧光法中，为了使芘的峰强度变为最大，将芘的荧光光谱中最大峰强度的波长（ 382 nm ）和芘的激发波长（ 335 nm ）之差（ 47 nm ）作为为激发和荧光分光器的波长差。图5为根据该波长差测定得到的芘、苯并(a)芘、苯并(k)荧蒹的同步荧光光谱；表2为测定条件。由此可知，苯并(k)荧蒹和芘的最大峰强度比大约减少到8倍，芘的峰强度相对提高，并且高度分离了芘的峰。

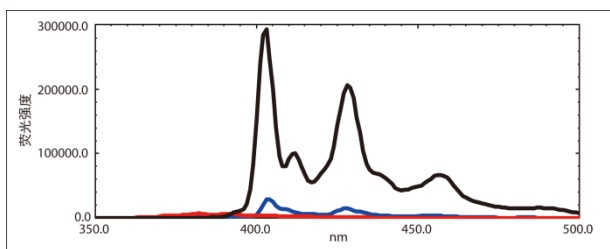


图3 芘 (红色)、苯并(a)芘 (蓝色)、苯并(k)荧蒽 (黑色) 的荧光光谱
Fig. 3 Fluorescence Spectra of Pyrene (Red), Benzo[a]pyrene (Blue) and Benzo[k]fluoranthene (Black)

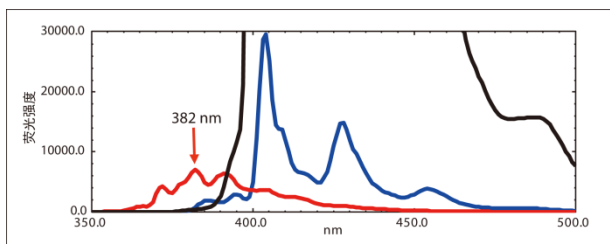


图4 图3的荧光光谱放大图
Expanded Fluorescence Spectra from Fig. 3

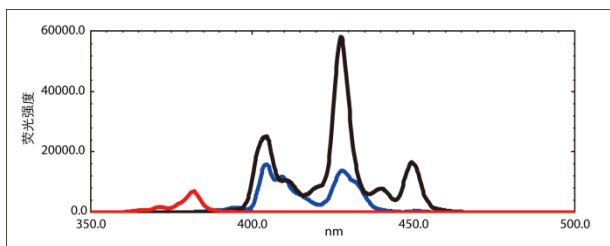


图5 芘 (红色)、苯并(a)芘 (蓝色)、苯并(k)荧蒽 (黑色) 的同步荧光光谱
Synchronous Fluorescence Spectra of Pyrene (Red), Benzo[a]pyrene (Blue) and Benzo[k]fluoranthene (Black)

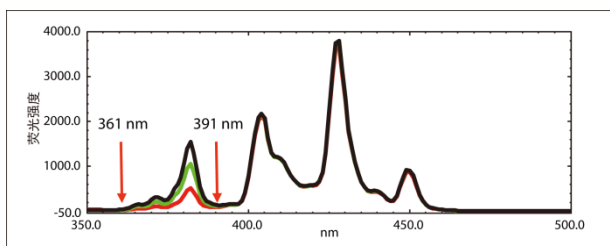


图6 使芘的浓度发生变化的同步荧光光谱
芘的浓度 红色: 0.145 $\mu\text{g/mL}$; 绿色: 0.29 $\mu\text{g/mL}$; 黑色: 0.435 $\mu\text{g/mL}$
Synchronous Fluorescence Spectra of Pyrene Measured at Three Concentrations Red: 0.145 $\mu\text{g/mL}$, Green: 0.29 $\mu\text{g/mL}$, Black: 0.435 $\mu\text{g/mL}$

表1 测定条件
Analytical Conditions

仪器	: 荧光光谱仪 RF-6000
光谱类型	: 荧光光谱
数据间隔	: 1.0 nm
扫描速度	: 600 nm/min
带宽	: Ex 3 nm, Em 3 nm
灵敏度	: 低

表2 测定条件
Analytical Conditions

仪器	: 荧光光谱仪 RF-6000
光谱类型	: 同步荧光光谱
数据间隔	: 1.0 nm
扫描速度	: 200 nm/min
带宽	: Ex 3 nm, Em 3 nm
灵敏度	: 低
激发和荧光的波长差	: 47 nm

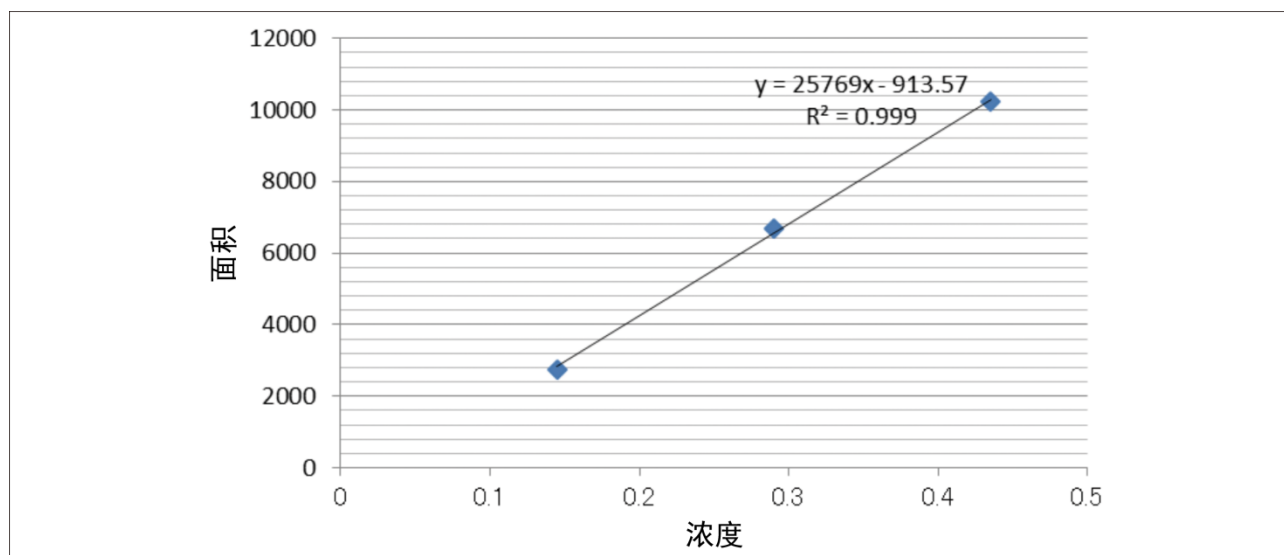


图7 芘的峰面积和浓度的关系
Relationship Between Peak Area and Concentration for Pyrene

取三支带刻度试管，分别加入 1 mL、2 mL 和 3 mL 的芘的环己烷溶液。然后三支试管再分别加入 1 mL 苯并(a)芘和 1 mL 苯并(k)荧蒹的环己烷溶液，最后用环己烷将其定容为 20 mL。溶液中各成分浓度见表 3。

表3 溶液中的各成分浓度
Concentration of Each Component in the Solution

	各成分浓度值		
	芘 (μg/mL)	苯并(a)芘 (μg/mL)	苯并(k)荧蒹 (μg/mL)
1#	0.145	0.08	0.1
2#	0.29	0.08	0.1
3#	0.435	0.08	0.1

与图 5 相同，将激发和荧光分光器的波长差设定为 47 nm 后，测定上述溶液的同步荧光光谱。图 6 为测定结果。测定条件与表 2 相同。

在图 6 的波长 361 nm 和 391 nm 之间划上基线，计算基线上方的峰面积。图 7 为峰面积与芘的浓度关系。由图可知，线性良好，可以进行分离定量。

■ 总结

Conclusion

综上所述，使用 RF-6000 的同步荧光光谱测定功能可以进行混合物的分离。因为同步荧光法通过选择适当的波长差分离混合物，所以可以在各种领域发挥作用。

参考文献 1) T. Vo-Dinh, Anal. Chem. 50 (1978) 396.



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2016 年 1 月