

罗丹明 6G 的三维荧光和共振散射光谱

夏国朝 陶慧林

(桂林工学院材料与化学工程系 广西桂林市建干路 12 号 541004)

摘 要 研究了罗丹明 6G (R6G) 的荧光光谱、共振散射光谱和吸收光谱, 讨论了共振光散射与共振荧光的区别与联系。在罗丹明 6G 水溶液的三维荧光等高线光谱中, 瑞利散射线与荧光等高线有部分相交。共振散射峰 (544nm) 介于荧光激发峰 (530nm) 和发射峰 (552nm) 之间。由光偏振实验, 测得 R6G 共振散射光谱 544nm 处的偏振度 P 为 0.0105。上述实验结果证明, R6G 的共振散射峰主要是共振荧光。共振光散射信号随 pH 值增大而增强的机理是 R6G 酸碱平衡移动导致荧光型体的形成。由于自吸收的影响, 荧光强度、共振散射光强度与 R6G 浓度之间不是严格的线性关系。

关键词 罗丹明 6G, 三维荧光, 共振光散射, 共振荧光, 光偏振。

中图分类号: O 657. 32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2008)05-0773-06

1 引言

当紫外光照射到某些物质的时候, 这些物质会吸收紫外光, 自身发射出不同颜色 and 不同强度的可见光, 而当紫外光停止照射时, 这种自身发出的光线也随之很快地消失, 这种光线称为荧光^[1]。利用这种能够反映物质特性的荧光来对该物质进行定性和定量分析的方法称为荧光分析法; 共振光散射 (Resonance Light Scattering, RLS) 技术是 $\Delta\lambda = 0$ 的同步荧光技术^[2]。这两种技术最主要的优势是灵敏度高和选择性好^[3-5], 但荧光与共振光散射之间既有区别又有联系^[6]。本文研究了罗丹明 6G (Rhodamine 6G, 简称 R6G, 结构见图 1) 的荧光、共振光散射和吸收光谱的特性与机理。实验证明, R6G 水溶液的共振光散射主要是共振荧光, 荧光强度和共振光散射强度随浓度增大而增强, 但由于自吸收的影响, 并不是线性关系。同时溶液 pH 值的改变可以导致 R6G 水溶液的酸碱平衡移动。

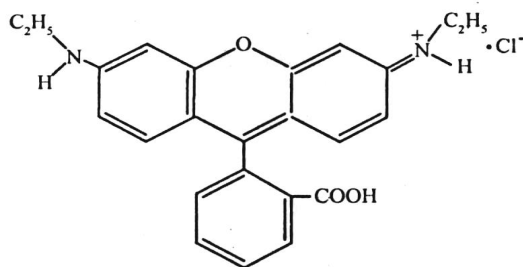


图 1 R6G 分子结构

联系人, 手机: (0) 13768748139; E-mail: taohuilin@glite.edu.cn

作者简介: 夏国朝 (1976—), 男, 湖南省株洲市人, 硕士, 主要从事药物分析方向工作。

收稿日期: 2008-01-02; 接受日期: 2008-07-23

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LS55 荧光分光光度计(美国 PE 公司), TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析公司), FA 1104 电子分析天平(江苏泰兴市电子仪器厂), pH S-3C 型精密 pH 计(上海精密磁仪器厂)。

R6G(分析纯): 以水配制成 0.5 g/L 溶液; 3 mol/L HCl 标准溶液; 1.0 mol/L 的 NaCl 溶液; 实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

在一系列 25 mL 比色管中, 分别加入 NaCl 溶液、R6G 溶液和 HCl 标准溶液, 以水稀释至刻度, 摇匀, 扫描三维荧光光谱, 三维同步荧光光谱, 以激发波长 λ_{ex} 等于发射波长 λ_{em} 扫描共振散射光谱, 扫描二维荧光光谱和吸收光谱, 进行光偏振实验。

3 结果与讨论

3.1 R6G 水溶液的三维荧光光谱

在 $400\text{—}650 \text{ nm}$ 之间, 以 $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ 间隔扫描 R6G 水溶液的三维荧光光谱, 如图 2 所示。a 是投影图, a 中每条曲线表示在特定激发波长 λ_{ex} 下, 荧光强度随发射波长 λ_{em} 的变化, a 中的“驼峰”是荧光峰, “脊梁峰”是瑞利散射峰, 二者相交的部分是共振散射峰; b 是等高线图, b 中横坐标为荧光发射波长 λ_{em} , 纵坐标为激发波长 λ_{ex} , 平面上的点表示由两个波长所决定的荧光强度, 将荧光强度相等的各个点连结起来, 便构成了由一系列等强度线组成的等高线光谱图, 等高线自外向内表示荧光强度逐步增强, b 中的“指纹区”是荧光等高线, 从左下角到右上角(对角线上)有一条光谱线, 是 R6G 溶液的瑞利散射所产生的, 这条线在波长较短的部分(左下角)较强, 而在波长较长部分(右上角)较弱, 这是由于瑞利散射强度与入射光波长的 4 次方(λ^4)成反比^[7], 在瑞利散射线上的各点的 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 。

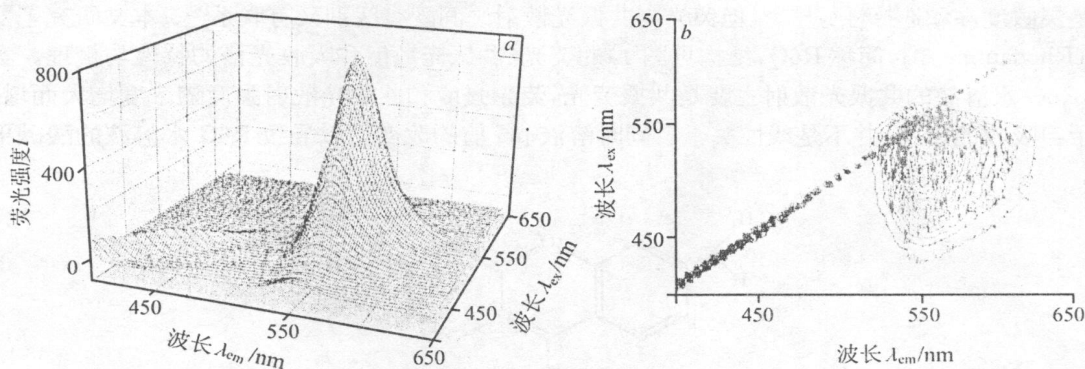


图 2 R6G 的三维荧光光谱
a——投影图; b——等高线图。

$C_{\text{R6G}} = 4.0 \mu\text{g/mL}$; $\text{pH } 0.44$; 0.1 mol/L NaCl; 狭缝 $2.6 \text{ nm}/2.6 \text{ nm}$; 电压 650 V ; $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$; 扫描速度 400 nm/m in 。

从 b 中可以找出 R6G 的三维特征荧光峰的定量信息 ($\lambda_{\text{em}} = 552 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $I = 798$), 瑞利散射线与荧光等高线在 $521\text{—}562 \text{ nm}$ 之间相交, 这表明对 R6G 水溶液而言, 在 $521\text{—}562 \text{ nm}$ 波长范围内, 当激发波长与发射波长相等时, 所得到的发射光包括瑞利散射光和共振荧光(因为 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$)。这说明, 用共振光散射技术(即 $\Delta\lambda = 0$ 的同步荧光技术)所测得的共振散射光谱包括瑞利散射和共振荧光。瑞利散射在各测量波长都存在, 而共振荧光只在一定的波长范围内存在。对 R6G 水溶液而

言, 产生共振荧光的波长范围是 521—562nm, 共振荧光最强的波长(共振荧光峰)是 544nm。一般认为, 共振荧光在气体和结晶中有可能发生, 而在溶液中, 由于溶剂的相互作用使能量损失, 所观察到的荧光波长总是大于激发光的波长, 不大可能观察到共振荧光^[8]。但图 2 表明, R 6G 溶液可以产生较强的共振荧光。

3 2 R6G 水溶液的三维同步荧光光谱

在 350—600nm 之间, 同步波长 $\Delta\lambda$ 从 0—140nm 变化($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$), 扫描间隔 $\Delta\lambda$ 相差 5nm, 扫描 R 6G 水溶液的三维同步荧光, 如图 3 所示。c 是投影图, c 中每条曲线表示在特定同步步长 $\Delta\lambda$ 下的荧光强度, 它反映了激发波长 λ_{ex} 和发射波长 λ_{em} 同步变化对荧光强度的影响。d 是等高线图, 从 d 中可以找到三维特征同步荧光峰的信息($\Delta\lambda = 25\text{nm}$, $\lambda_{em} = 527\text{nm}$, 强度 $I = 656.6$), 最大共振散射峰的信息($\Delta\lambda = 0$, $\lambda_{em} = 544\text{nm}$, 强度 $I = 395.1$), 这些信息可以作为同步荧光法和共振散射法定量测量的信息。

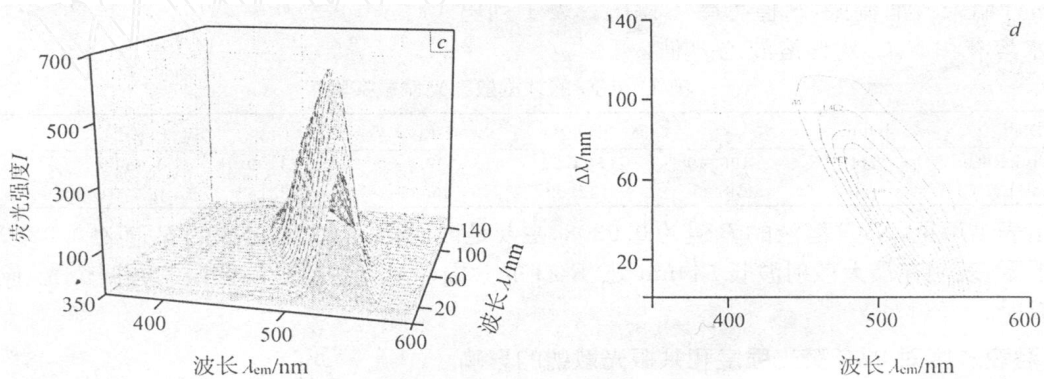


图 3 R 6G 三维同步荧光光谱

c——投影图; d——等高线图。

$C_{R6G} = 4\mu\text{g/mL}$; pH 0.92; 狭缝 2.5nm; 电压 650V; 扫描速度 400nm/m in; 扫描间隔 5nm。

3 3 R6G 水溶液的二维荧光与共振散射光谱

图 4 绘出了 R 6G 水溶液的荧光激发光谱、发射光谱和共振散射光谱。由图 4 可见, R 6G 的荧光激发峰(1)位于 530nm, 发射峰(2)位于 552nm, 共振散射峰(3)位于 544nm, 共振散射峰介于荧光激发峰和发射峰之间。由于 R 6G 的激发光谱和发射光谱有相当大的重叠, 而且重叠部位正好是共振散射峰的位置。因此, 共振散射峰包含共振荧光。联系图 2 考虑, 可知图 4 中的共振散射峰就是图 2b 中瑞利散射线与荧光等高线相交的部分, 在共振散射峰以外的波长区域, 散射光较弱, 是瑞利散射。

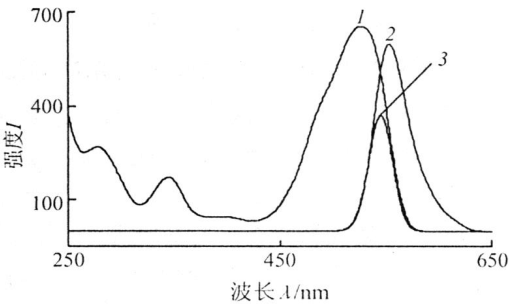


图 4 R 6G 的荧光激发光谱(1)、发射光谱(2)和共振散射光谱(3)

$C_{R6G} = 4.0\mu\text{g/mL}$, pH 0.92, 0.1mol/L NaCl,

$\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 530\text{nm}/552\text{nm}$,

狭缝 2.5nm/2.5nm; 电压 650V; 扫描速度 600nm/m in。

3 4 光偏振实验

利用光偏振实验, 可以进一步鉴别 R 6G 共振散射光谱中的荧光成分。散射光是完全偏振光, 在偏振光激发下, 荧光体所发射的荧光亦是偏振光。但是, 小分子在粘度小的水溶剂中旋转扩散很快, 因此可使荧光消偏。通过测量 R 6G 共振散射光的偏

振度,可以鉴别其是否为共振荧光光偏振。实验方法如下:将激发偏振器 E_x 的取向置为 0° ,发射偏振器 E_m 的取向分别置为 0° 和 90° ,所观测到的发射强度分别用 I 和 I' 表示;将激发偏振器 E_x 的取向置为 90° ,发射偏振器 E_m 的取向分别置为 0° 和 90° ,所观测到的发射强度分别用 i 和 i' 表示。如此扫描R6G水溶液的共振散射偏振光谱,如图5所示。

测定图5中544nm处发射光强度,按下式计算荧光偏振 P :

$$P = (I - GI') / (I + GI')$$

式中: $G = i' / i$;理论上,散射光的 P 值等于1, P 值小于1为部分偏振或消偏振, P 值为零不偏振。表1列出了R6G水溶液和NaCl对照溶液的 P 值。

表1 R6G的共振散射光偏振实验

物质	λ (nm)	i	i'	I	I'	G	P
4 μ g/mL R6G	544	496.49	524.74	697.33	773.09	1.0609	0.0220
0.1mol/L NaCl	450	59.20	22.09	36.35	378.16	0.3731	0.9308

由表1可见,NaCl溶液的 P 值为0.9308,主要是散射光。R6G水溶液的 P 值为0.0220,小于1但大于零,表明在最大散射波长544nm处,R6G的共振散射光主要是消偏振的共振荧光,同时也有瑞利散射。

3.5 溶液酸度对R6G荧光强度和共振光散射的影响

固定R6G溶液浓度,改变 H^+ 浓度,测量共振光散射和荧光强度,如图6。比较图6中两条曲线的变化趋势,R6G荧光强度与共振光散射强度随 H^+ 浓度升高而同时减小,可见二者变化的机理是相关联的。

3.6 酸碱度对R6G水溶液吸收光谱的影响

固定R6G浓度,改变溶液酸碱度,绘制R6G水溶液的吸收光谱,如图7所示。 a 是在碱性溶液中的吸收光谱,随着 OH^- 浓度的增加,最大吸收波长从526nm紫移至512nm。 b 是在酸性溶液中的吸收光谱,随着 H^+ 浓度的增加,最大吸收波长从526nm红移至532nm。综合 a 、 b 两图可知,随着pH值的减小(从左到右),R6G水溶液的吸收度先增加后减小,而且 a 图在470nm处形成一等色点。这些光谱特征表明溶液的酸碱度影响了R6G羧基质子的离解平衡:



平衡形体 HL^+ 的最大吸收波长为526nm。在酸性条件下(1),R6G苯环上羧基和胺基质子化,R6G分子主要以 H_2L^{2+} 形式存在。在碱性条件下(2),羧酸质子离解,R6G分子主要以羧酸盐形式存在。

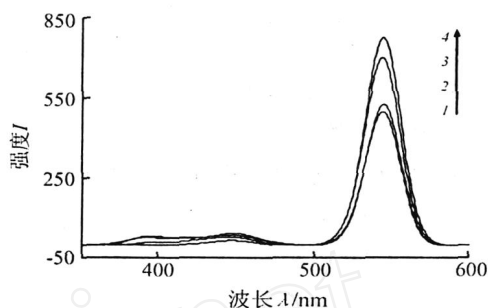


图5 R6G的共振散射偏振光谱

$C_{R6G} = 4.0 \mu\text{g/mL}$; pH 9.2; 0.1mol/L NaCl;
狭缝4nm/4nm; 电压650V; 扫描速度600nm/m in.
1—— i ; 2—— i' ; 3—— I ; 4—— I' 。

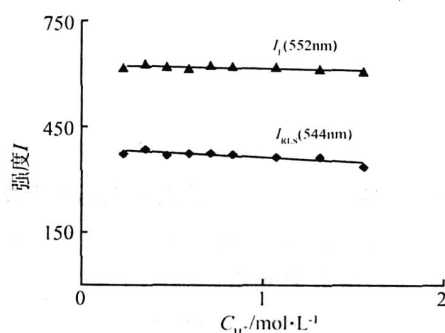


图6 荧光强度和共振光散射强度与酸度的关系

$C_{R6G} = 4.0 \mu\text{g/mL}$, 0.1mol/L NaCl;
 $\lambda_{ex} = 530\text{nm}$; 狭缝2.5nm/2.5nm;
电压650V; 扫描速度600nm/m in.

综合图 6 和图 7 可以推知, R 6G 的荧光光谱、共振散射光谱和吸收光谱随 pH 的改变均与 R 6G 的酸碱平衡移动有关, 都是由于各型体平衡浓度的变化。

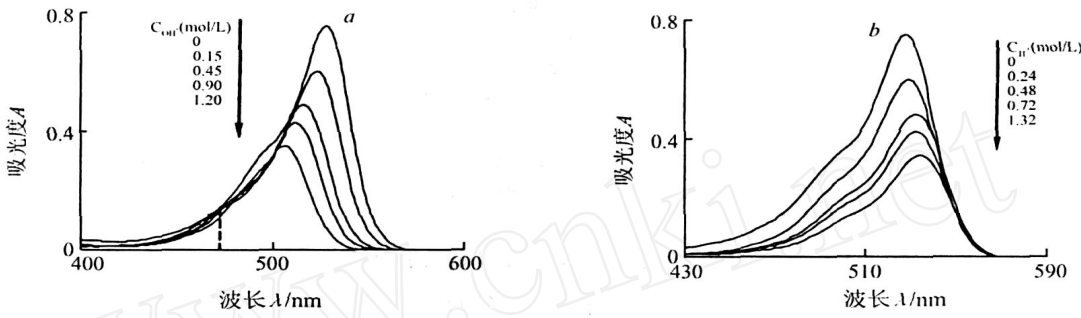


图 7 R 6G 在不同 pH 溶液中的吸收光谱
a——碱性溶液; b 酸性溶液。

$C_{R6G} = 4.0 \mu\text{g/mL}$; 0.1 mol/L NaCl ; 扫描间隔 2 nm , 中速; 以水作空白。

3.7 荧光强度、同步荧光强度和共振散射强度与 R 6G 浓度的关系

根据 2.1 和 2.2 确定的最佳测定波长, 绘出该波长处荧光强度、同步荧光强度和共振散射强度与 R 6G 浓度之间的关系, 如图 8。从图 8 可见, 荧光强度、同步荧光强度和共振散射强度与 R 6G 浓度之间不是严格的线性关系, 但三者的强度随溶液浓度的变化趋势很相似, 即浓度越大, 荧光强度、同步荧光强度和共振散射强度的变化越平缓, 这说明影响三者强度偏离线性的因素是相同的。其原因是 R 6G 的荧光峰、共振散射峰均与吸收峰有一定程度的重叠(图 4), R 6G 的发光性质受到其自吸收的影响。浓度越大, 发射光被自吸收越严重, 荧光强度、同步荧光强度和共振散射强度随浓度的改变就越小。

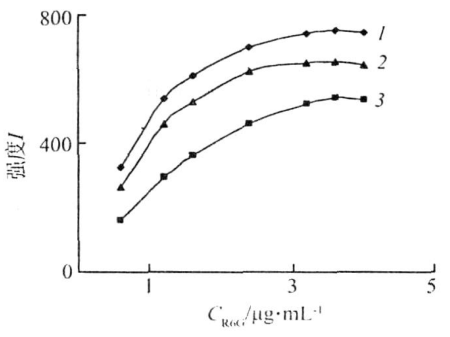


图 8 荧光强度和共振散射强度与 R 6G 浓度的关系

1——荧光, $\lambda_{em} 552 \text{ nm}$; 2——同步荧光, $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$, $\lambda_{em} 527 \text{ nm}$; 3——共振散射, $\lambda_{em} 544 \text{ nm}$; pH 3.8, 0.1 mol/L NaCl ; 电压 650 V ; 狭缝 $3 \text{ nm}/3 \text{ nm}$; 扫描速度 600 nm/m in 。

4 结论

由以上实验结果和理论分析, 可以得出如下结论: (1) R 6G 的共振光散射主要是共振荧光; (2) R 6G 共振光散射增强的机理是由于溶液 pH 的改变导致荧光型体的形成; (3) 由于 R 6G 自身吸光的影响, 荧光强度和共振光散射与浓度之间不是严格的线性关系; (4) 用不同的平面去切图 2-a 三维荧光光谱曲面, 可以得到不同的二维光谱图(平面和曲面的交线)。用垂直 λ_{em} 轴的平面去切三维荧光光谱曲面, 可以得到一系列荧光激发光谱; 用垂直 λ_{ex} 轴的平面去切, 可以得到一系列荧光发射光谱; 用沿瑞利散射峰的对角面去切($\Delta\lambda = 0$), 可以得到共振散射光谱; 用平行于瑞利散射峰对角面的平面去切(平行间隔为 $\Delta\lambda$), 可以得到一系列同步步长为 $\Delta\lambda$ 的同步荧光光谱; 用垂直荧光强度 I 轴的平面去切, 就可以得到三维荧光等高线图。由此可见, 三维荧光、三维同步荧光和共振散射之间有密切联系, 影响三者的因素有相同之处。

参考文献

- [1] 夏锦尧 实用荧光分析法[M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 1992
- [2] 魏永巨, 刘翠格, 赵晶等 曙红 Y 的共振光散射与共振荧光[J]. 化学通报, 2005, (8): 628—632
- [3] 刘志宏, 蔡汝秀 三维荧光光谱技术分析应用进展[J]. 分析科学学报, 2000, 6(16): 516—523
- [4] 汪尔康 分析化学新进展[M]. 北京: 科学出版社, 2002 280—288
- [5] 柴逸峰, 吴玉田, 李翔 药物分析(II)[J]. 分析试验室, 2004, 23(7): 72—92
- [6] 唐晓玲, 刘忠芳, 刘绍璞等 苯海拉明与赤藓红相互作用的吸收、荧光和共振瑞利散射光谱及其应用[J]. 中国科学, B 辑: 化学, 2007, 31(1): 68—75
- [7] 魏永巨, 康志敏, 刘翠格等 罗丹明 B 的共振散射光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12): 659—1662
- [8] 陈国珍, 黄贤智, 许金钩等 荧光分析法[M]. 第 2 版 北京: 科学出版社, 1990 8

Spectrophotometric Studies on Three-Fluorescence and Resonance Scattering of Rhodamine 6G

XIA Guo-Chao TAO Hui-Lin

(Dept. of Material and Chemical Engi., Guilin Institute of Tech., Guilin, Guangxi 541004, P. R. China)

Abstract Fluorescence, resonance light scattering (RLS) and absorption spectra of Rhodamine 6G (R6G) have been studied to discuss the difference and relationship between RLS and resonance fluorescence. In three-dimensional fluorescence contour spectra of R6G aqueous solutions, Rayleigh scattering line intersects with fluorescence contour. The RLS peak (544nm) of R6G lies just between fluorescence excitation peak (530 nm) and emission peak (552nm). In light polarization experiment, the polarization of RLS at 544nm was measured to be $P = 0.0105$. All the above experimental fact reveals that the RLS peak of R6G mainly consists of resonance fluorescence. The mechanism of RLS enhancement with the pH increase is because of the formation of fluorescence species in acid-base equilibrium of R6G solutions. Since light scattering is affected by light absorption, relationship between fluorescence intensity, RLS intensity and R6G concentration is not strictly linear.

Key words Rhodamine 6G, Three-Dimensional Fluorescence, Resonance Light Scattering, Resonance Fluorescence, Light Polarization

2009 年《光谱实验室》征订启事

《光谱实验室》2009 年订价与 2007、2008 年相同:

双月刊, 16 开, 每册 256 页, 单月 25 日出版, 每份年订价为 240 元(1-6 期); 零售价为: 第 1 期 70 元/本, 其余 40 元/本。

欲订阅的读者请到当地邮电局(所)办理订阅手续, 邮发代号为 82-863。错过时间者, 可直接通过邮局汇款向本编辑部联络处订阅。

地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 刘建林, 邮编: 100095, 电话: (010) 62452937。

《光谱实验室》编辑部

2008 年 9 月 25 日