

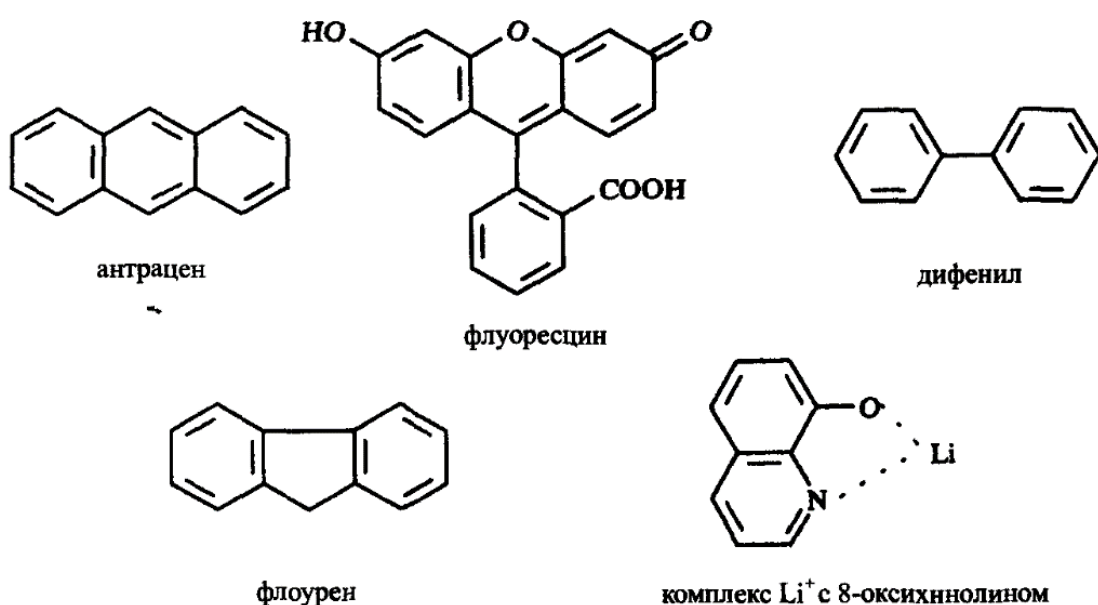
## Качественный и количественный люминесцентный анализ

Спектры люминесценции, как и абсорбционные электронные спектры, применяются для качественного и количественного анализа, в структурных исследованиях, изучении электронно-колебательных состояний молекул, физико-химических свойств растворов, газообразных, жидких и твердых образцов.

**Качественный анализ.** Число флуоресцирующих веществ весьма ограничено. Четкими, имеющими характерную структуру спектрами люминесценции обладают немногие вещества: соединения редкоземельных элементов, соли уранила, ароматические соединения, порфирины и некоторые другие. Для многих комплексов переходных металлов полоса люминесценции сдвинута в ИК-область, поэтому в обычных условиях она не проявляется.

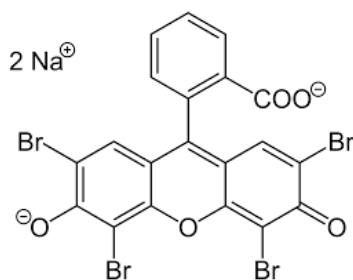
Особенно интенсивной флуоресценцией обладают конденсированные полиароматические системы: антрацен, флуоресцеин, флуорен. Часто интенсивность флуоресценции возрастает в результате комплексообразования с ионом металла, например, в случае образования комплекса лития с 8-оксихинолином (рис. 1).

ис.  
1.  
При  
мер  
ы  
флуо  
ресц  
иру  
ющи  
х веществ

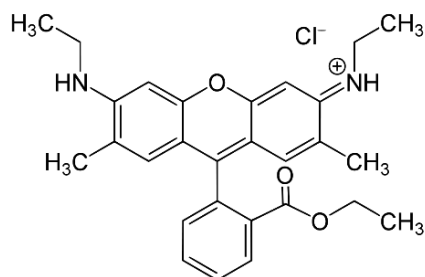


В основе качественного анализа по спектрам люминесценции лежит зависимость не только положения полосы, но и квантового выхода от структурных особенностей молекулы. Таким образом, флуоресцентный метод применим для непосредственной идентификации некоторых органических веществ.

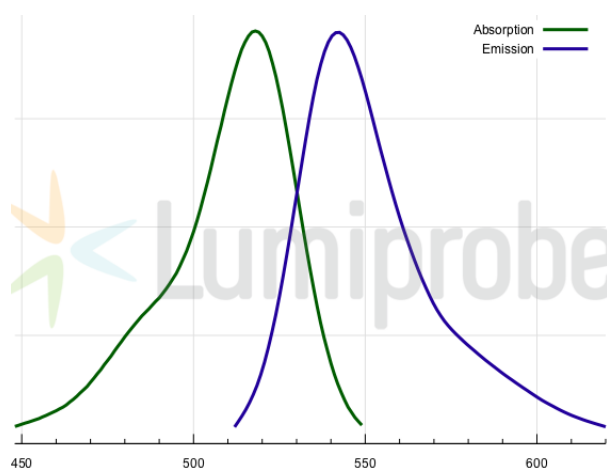
Предельные углеводороды и непредельные углеводороды с изолированными кратными связями, соответствующие им спирты, кислоты, эфиры, галогенопроизводные *не флуоресцируют в видимой и УФ областях*. В то же время, например, альдегиды и кетоны дают видимую люминесценцию. Флуоресценция бензола, нафталина и т.д. происходит в УФ-области спектра, а других ароматических полициклических соединений - частично или полностью в видимой области. Сильно флуоресцируют многие кислород- и азотсодержащие гетероциклические соединения ароматического ряда, металлоорганические соединения.



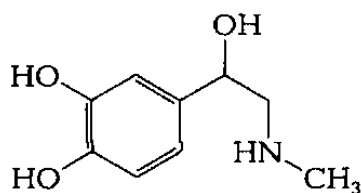
Эозин



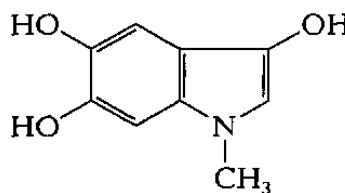
Родамин 6G



Итак, органические люминесцирующие соединения - это в основном сопряженные ароматические либо полиеновые системы. Изменяя степень сопряжения, вводя те или иные заместители, мы можем изменять энергию возбужденного состояния и длину волны люминесценции. Наибольшей способностью к люминесценции обладают симметричные молекулы с протяженной системой сопряженных связей. Экспериментально установлено, что жесткая, в частности, замкнутая планарная структура способствует интенсивной флуоресценции, тогда как структура, допускающая внутреннюю переориентацию (движение) больших фрагментов молекулы, препятствует ее появлению. Жесткой плоской структуре молекул способствует образование новых циклов или появление хелатных и внутримолекулярных водородных связей. Например, известный гормон адреналин не люминесцирует, но при окислении превращается в ярко люминесцирующий триоксидон, бициклическая молекула которого имеет жесткую систему сопряженных связей.

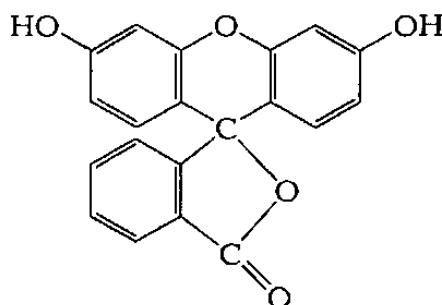


Адреналин

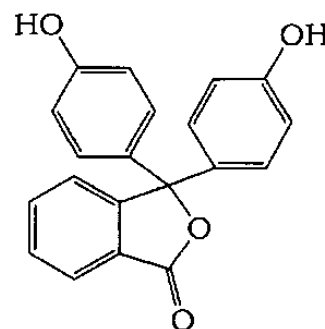


Триоксидон

Люминесцирующий флуоресцеин отличается от нелюминесцирующего фенолфталеина только тем, что кислородный мостик в молекуле флуоресцеина жестко удерживает два кольца в одной плоскости, что способствует взаимодействию  $\pi$ -систем.



Флуоресцеин



Фенолфталеин

Многие органические молекулы, не имеющие жесткой структуры, сами не люминесцируют, однако после координации в комплекс с образованием хелата получают необходимую жесткость и способность к люминесценции (комплексы ализарина с Al, Ga; 8-гидроксихинолина с Ag, Be, Sn и т.д.).

Способность к флуоресценции сильно зависит от наличия и вида заместителей. Так, для ароматических соединений введение в молекулу галогенов и COOH группы снижает интенсивность флуоресценции, а -CN, -NH<sub>2</sub>, -OH – увеличивает. Вещества, различающиеся по «жесткости» структуры, но имеющие сходные спектры поглощения, могут различаться по интенсивности флуоресценции. Так, можно различать пространственные *цис*- и *транс*-изомеры, и конформации, например, 1,4-дифенилбутадиена и т.п.

Положение, форма полосы и интенсивность флуоресценции для соединений, способных к ионизации и диссоциации в какой-то мере, могут зависеть от pH. Это относится, например, к нафтолсульфоновым кислотам,  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтиламинам. Так, в нейтральном или щелочном растворе флуоресценция нафтиламинов наблюдается в видимой области, а в кислом растворе - только в УФ области.

В случае неорганических «примесных» *фосфоров* они вместе с основным веществом составляют обычно единую фосфоресцирующую систему, тогда как фосфоресценция органических соединений - свойство, присущее самим молекулам. Таким образом, выводы о структуре на основании спектров флуоресценции носят общий характер, но вместе с другими данными иногда могут облегчить решение тех или иных структурных задач.

**Количественный анализ.** Главная область применения молекулярного флуоресцентного анализа – высокочувствительное количественное определение микроконцентраций ( $10^{-9}$  -  $10^{-7}$  моль/л) аналитов в растворе. При фотовозбуждении легко регулировать длину волны возбуждающего излучения, его интенсивность и поляризацию. При анализе

многокомпонентной смеси возможно возбудить электронный переход, сопровождающийся люминесценцией только у одного из компонентов смеси. Таким образом, становится возможным *проводить избирательный (селективный) анализ смеси веществ.*

Люминесцентный анализ основывается на зависимости интенсивности фотолюминесценции от концентрации люминесцирующего вещества в растворе. Эта зависимость сложнее, чем в абсорбционном анализе. Интенсивность люминесценции пропорциональна квантовому выходу люминесценции, мощности возбуждающего излучения, коэффициенту поглощения и концентрации люминофора:

$$I = 2,303 \varphi_k I_0 \varepsilon l c$$

Поскольку интенсивность свечения прямо пропорциональна интенсивности возбуждающего излучения, то, увеличивая последнюю, можно добиваться очень большой чувствительности спектрофлуориметрических измерений. Надежно регистрируется, например, свечение растворов с концентрацией флуоресцирующего вещества порядка  $10^{-10}$  моль/л, что превышает чувствительность метода абсорбционной спектрофотометрии.

В то же время область линейности градуировочной зависимости в люминесцентном методе невелика. С ростом концентрации (особенно при  $C > 10^{-4}$ ) градуировочный график заметно отклоняется вниз. Отклонения от линейности вызваны рядом причин: явлением концентрационного тушения, эффектом внутреннего фильтра и эффектом самопоглощения (реабсорбции).

***Тушение люминесценции.*** Определения концентрации могут быть затруднены влиянием внешних и внутренних факторов. *Выход люминесценции зависит от концентрации люминофора в растворе, температуры, присутствия посторонних веществ.* Уменьшение выхода люминесценции под влиянием этих факторов называют *тушением люминесценции.*

В практике люминесцентного анализа прежде всего следует учитывать влияние концентрации люминофора, так как при больших концентрациях наблюдается эффект *концентрационного тушения*. Указанный эффект начинает проявляться с некоторой «пороговой» концентрации  $c_0$ . Эффект концентрационного тушения *обратим*: при разбавлении концентрированных растворов выход люминесценции вновь достигает максимального значения.

Уменьшение выхода люминесценции с увеличением концентрации люминофора вызвано, с одной стороны, ассоциацией молекул люминофора с образованием не люминесцирующих агрегатов различного состава (механизм молекулярной ассоциации), а с другой – миграцией энергии от возбужденных молекул к невозбужденным.

*Температурное тушение.* Повышение температуры вызывает уменьшение выходов флуоресценции и фосфоресценции. Это связано с тем, что безызлучательная дезактивация электронно-возбужденных состояний осуществляется преимущественно при соударениях излучающих молекул, а частота таких соударений в растворах прямо пропорциональна температуре. Охлаждение, наоборот, увеличивает выходы флуоресценции и фосфоресценции.

*Тушение посторонними веществами.* Выход люминесценции может уменьшаться в присутствии посторонних веществ, называемых тушителями. К наиболее активным тушителям люминесценции относятся:

тяжелые анионы и катионы ( $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cs^+$ ,  $Cu^{2+}$  и др.);  
парамагнитные ионы и молекулы ( $Mn^{2+}$ ,  $O_2$  и др.);  
молекулы растворителя.

Взаимодействие тушителя с люминофором по своей природе может иметь либо химический (статическое тушение), либо физический (динамическое тушение) характер. Статическое тушение обусловлено образованием нелюминесцирующего продукта взаимодействия люминофора с тушителем. В качестве примера можно привести тушение флуоресценции 2-(о-оксифенил)-бензоксазола ионами  $Cu^{2+}$ , вызванное образованием

нефлуоресцирующего комплекса. Поэтому растворы для исследования спектров флуоресценции готовят с использованием растворителей особо высокой «флуоресцентной» чистоты, т.е. очищенных с помощью специальных методов от микропримесей, которые сами могут флуоресцировать.

Измерение флуоресценции обладает, по сравнению с измерением поглощения, гораздо более высокой чувствительностью обнаружения, что можно объяснить следующим образом. Чувствительность измерения поглощения ограничена способностью измерительного устройства различать два больших, но порой мало отличающихся друг от друга сигнала  $I$  и  $I_0$ . При измерении же флуоресценции определяется интенсивность светового сигнала относительно нуля, т.е. темноты. Поэтому при люминесцентном анализе с использованием лазеров достижимы пределы обнаружения  $10^{-7}$  -  $10^{-10}$  М.

В связи с высокой чувствительностью химический люминесцентный анализ широко используется в промышленности, включая химическую и нефтехимическую, в биологии, медицине, археологии и геологии. Так называемый люминесцентный анализ обнаружения или сортовой анализ позволяет обнаруживать невидимые при обычном освещении различия в исследуемых объектах. Он используется для установления сортности и качества стекол, семян, сельскохозяйственной продукции, для определения минералов в породах, поверхностных и сквозных дефектов, выявления подделок, в криминалистике.

Явление фосфоресценции используется при установлении механизмов химических превращений как органических, так и неорганических соединений, для изучения метастабильных, возбужденных триплетных фосфоресцентных состояний молекул, парамагнетизма, возникающего при облучении и т.д.

*Использование в медицине.* Люминесцентные зонды и метки. Флуоресцентная ангиография – контрастирование сосудов флуоресцеином.

Люминесцентный метод применяется также для определения концентраций бактерий и бактериальных взвесей. Для этого люминофор вводят в пробу, в которой имеются бактерии. Краситель оказывается связанным с клетками бактерий. При облучении УФ-излучением кюветы с окрашенными бактериями краситель начинает светиться. Интенсивность излучения пропорциональна концентрации бактерий. Регистрируя его с помощью фотопреобразователя, можно установить наличие определенных бактерий и определить их концентрацию. При этом перед началом измерений по раствору с известной концентрацией бактерий и по растворителю исследуемого вещества устанавливается градуировочная характеристика.

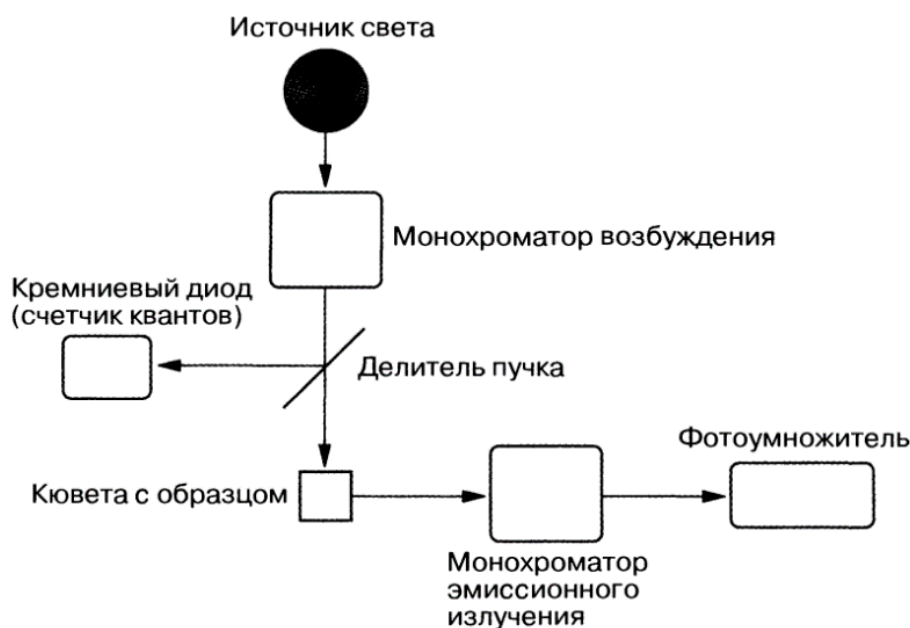
Тушение люминесценции органических красителей кислородом воздуха используется при построении люминесцентных преобразователей давления, температуры, концентрации кислорода. Так, возбужденный светом соответствующей длины волны, люминофор может излучать свет или терять энергию и светиться слабее за счет передачи ее молекулам кислорода (тушение люминесценции). Доля теряемой энергии пропорциональна концентрации кислорода и его подвижности. Квантовый выход люминесценции обратно пропорционален парциальному давлению кислорода. Поэтому, если концентрация кислорода в воздухе постоянна, то явление тушения может быть использовано для измерения давления воздуха. Для практического использования этого явления применяют тонкие полимерные пленки, проницаемые для кислорода, в состав которых введены молекулы люминофора. Оценивая уровень люминесценции, можно получить информацию о давлении, концентрации кислорода или температуре окружающей среды. Известны также люминофоры, люминесценция которых есть функция от температуры окружающей среды.

**Техника люминесцентной спектроскопии.** Принцип флуориметрии заключается в том, что вещество возбуждается источником света, после чего интенсивность флуоресцентной эмиссии измеряется как функция длины волны возбуждения и эмиссионного излучения. В отличие от



абсорбционной спектроскопии, при измерении флуоресценции всегда рассматриваются две длины - длина волны возбуждения и длина волны эмиссионного излучения. Наиболее распространенным источником излучения для флуориметров считается *ксеноновая лампа*, дающая непрерывный спектр. Для измерения флуоресценции в простых флуориметрах в качестве источников могут служить *ртутная, водородная лампы*, в настоящее время широко применяются *лазеры*.

Как и любой спектрометр, флуориметр состоит из следующих основных узлов: источника света с выбираемой длиной волны, носителя пробы и приемника излучения. Сканирующие флуориметры выполнены в виде однолучевого устройства. Рассеиваемый во все направления пространства флуоресцентный свет детектируется под углом  $90^\circ$  к падающему световому лучу с максимально большим пространственным (телесным) углом (рис. 2).



**Рис. 2.** Блок-схема сканирующего флуориметра

Расстояние между кюветой и детектором должно быть как можно меньше. За счет изменений ширины щели на обоих монохроматорах могут варьироваться спектральные участки пропускания относительно ширины полос спектра. Большая спектральная ширина полосы обеспечивает высокую чувствительность обнаружения для эмиссионного излучения. При малой

спектральной ширине полосы лучше разрешается эмиссионный спектр. Удастся распознать специфичную для вещества тонкую структуру, причем особенно отчетливо - в случае полициклических углеводородов и их производных.

Спектры *фосфоресценции* обычно исследуют для твердых растворов веществ, при низких температурах или в очень вязких жидкостях, что позволяет предотвратить электронную дезактивацию молекул, хотя иногда фосфоресценция наблюдается даже у паров, например, диацетила. Поэтому для регистрации спектров *фосфоресценции* необходимы еще два дополнительных устройства. Одно из них – механический или электронный *прерыватель*, позволяющий облучать пробу очень короткими импульсами и тем самым отделить длительное *фосфоресцентное* свечение от кратковременного флуоресцентного. Кроме того, поскольку фосфоресценция обычно наблюдается лишь при очень низких температурах для регистрации спектров фосфоресценции применяют *специальные криостаты* с различными хладагентами (жидкий азот, сухой лед в ацетоне или спирте и т. д.). В качестве твердых растворов для наблюдения фосфоресценции используют застывающие при комнатной температуре расплавы, например с борной кислотой, а вязкой жидкостью для получения раствора может служить глицерин.