



Дисциплина

«Методы фармакопейного анализа»

МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ
СПЕКТРОСКОПИЯ
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Лекция 12

(лектор: доцент, к.фарм.н. Тимофеева Ю.А.)

МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ)

Спектроскопия – это раздел физики, посвященный изучению спектров электромагнитного излучения, включающий в себя методы количественного и качественного анализа, основанные на взаимодействии света с живой и неживой материей.

Принцип метода

Еще в начале XIX века концентрацию окрашенных растворов научились оценивать, сравнивая на глаз интенсивность их окраски с заранее приготовленной шкалой эталонных растворов (колориметрия). Затем были изобретены приборы для количественного измерения поглощения света растворами; установлены закономерности, связывающие характеристики светопоглощения с концентрацией окрашенных веществ.

В XX веке подобным образом стали определять и концентрацию бесцветных растворов, их поглощение измеряли в УФ- или в ИК-области. В развитие молекулярно-абсорбционной спектроскопии большой вклад внесли физики П.Бугер (франция), К.Фирордт (германия), У.Кобленц (США). В зависимости от того, в какой области спектра измеряют аналитический сигнал, методы молекулярно-абсорбционной спектроскопии разделяют на две группы:

- Фотометрический анализ в УФ – и видимой области (Спектрофотометрия);
- Ик-спектроскопия.

Соответствующие методы сильно различаются по своим возможностям, но основаны они на одних и тех же теоретических закономерностях.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

К фотометрическим методам относятся:

1. **Колориметрия** – основана на визуальном сравнении интенсивности окраски анализируемого раствора с интенсивностью окраски раствора того же вещества известной концентрации (стандартный раствор).
2. **Фотоэлектроколориметрия** – основана на измерении интенсивности света в видимой части спектра; для монохроматизации света применяются светофильтры;
3. **Спектрофотометрия** – основана на применении монохроматического света как в видимой, так и ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра; для монохроматизации света применяются дифракционные решётки и призмы.

Общие закономерности пропускания света:

При пропускании монохроматического светового потока через кювету с раствором, содержащим молекулы или ионы X , интенсивность светового потока уменьшается. Это связано с рядом причин:

- часть света поглощается молекулами или ионами X ,
- другая часть – растворителем и примесями,
- третья - рассеивается и отражается стенками кюветы.

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА

Чтобы учесть потери света, связанные с растворителем и кюветой, измерения проводят относительно раствора сравнения, не содержащего X. Обычно в качестве раствора сравнения используют чистый растворитель. Если поместить и фотометрируемый раствор, и раствор сравнения в одинаковые кюветы, а затем через эти кюветы пропускать свет с одной и той же длиной волны λ и одинаковой начальной интенсивностью $I_{нач}$, то потери света на отражение и рассеяние для обеих кювет окажутся одинаковы. Тогда различие в интенсивности получаемых световых потоков (I и I_0) будет определяться лишь природой и концентрацией X.

Основные фотометрические величины:

Пропускание T % - отношение интенсивности светового потока, прошедшего через раствор к интенсивности падающего светового потока.

Поглощение или оптическая плотность D (A) – десятичный логарифм величины, обратной пропусканию.

Молярный показатель поглощения E_M – оптическая плотность раствора, концентрация которого выражена в молях, толщина слоя в сантиметрах.

Удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1CM}$ - оптическая плотность раствора, концентрация которого выражена в процентах, толщина слоя в сантиметрах.

ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ

В качестве аналитического сигнала в молекулярно-абсорбционной спектроскопии используют *оптическую плотность* (A). Это десятичный логарифм отношения интенсивности монохроматического света, прошедшего через раствор сравнения, к интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор:

$$A = \lg \frac{I_0}{I}$$

Оптическая плотность – безразмерная величина. Она не зависит от $I_{нач}$, а определяется природой и концентрацией частиц, поглощающих свет на данной длине волны, а также толщиной поглощающего слоя в кювете. Связь этих величин описывает основной закон светопоглощения, который принято называть законом Бугера – Ламберта - Бера:

В соответствии с этим законом, оптическая плотность раствора, измеренная на некоторой длине волны, прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества, поглощающего свет на этой длине волны, и толщине слоя раствора.

$$A = \varepsilon l C$$

C - концентрация поглощающих частиц, [моль/л]

l - толщина слоя [см],

ε - молярный коэффициент поглощения (коэффициент пропорциональности),

его величина зависит от природы X и длины волны, на которой измеряют оптическую плотность.

ИЗМЕРЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ

Аппаратура

Для измерения оптической плотности растворов и регистрации спектров поглощения используют спектрофотометры. Важнейшая их часть - монохроматор. Другие узлы - источник света, приемник излучения и регистрирующее устройство.

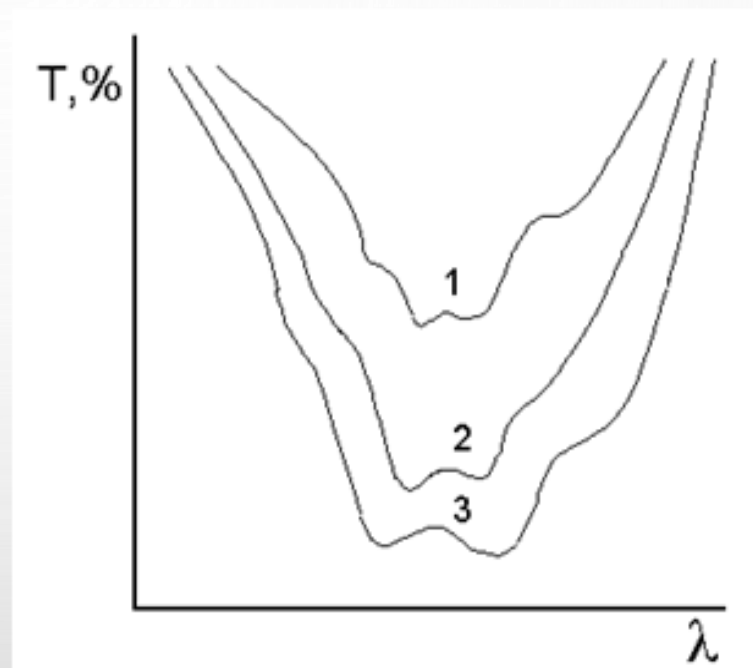
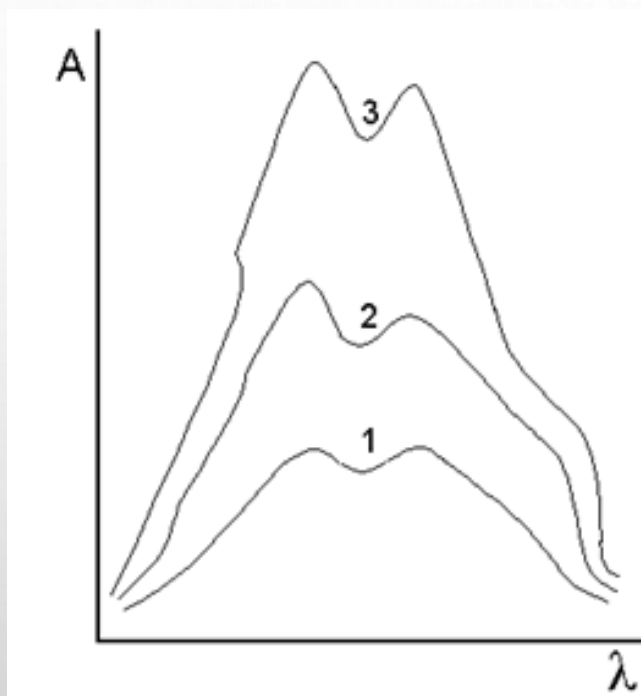


**Фотометр КФК-3-01
ЗОМЗ**

Спектрофотометр Lambda 25

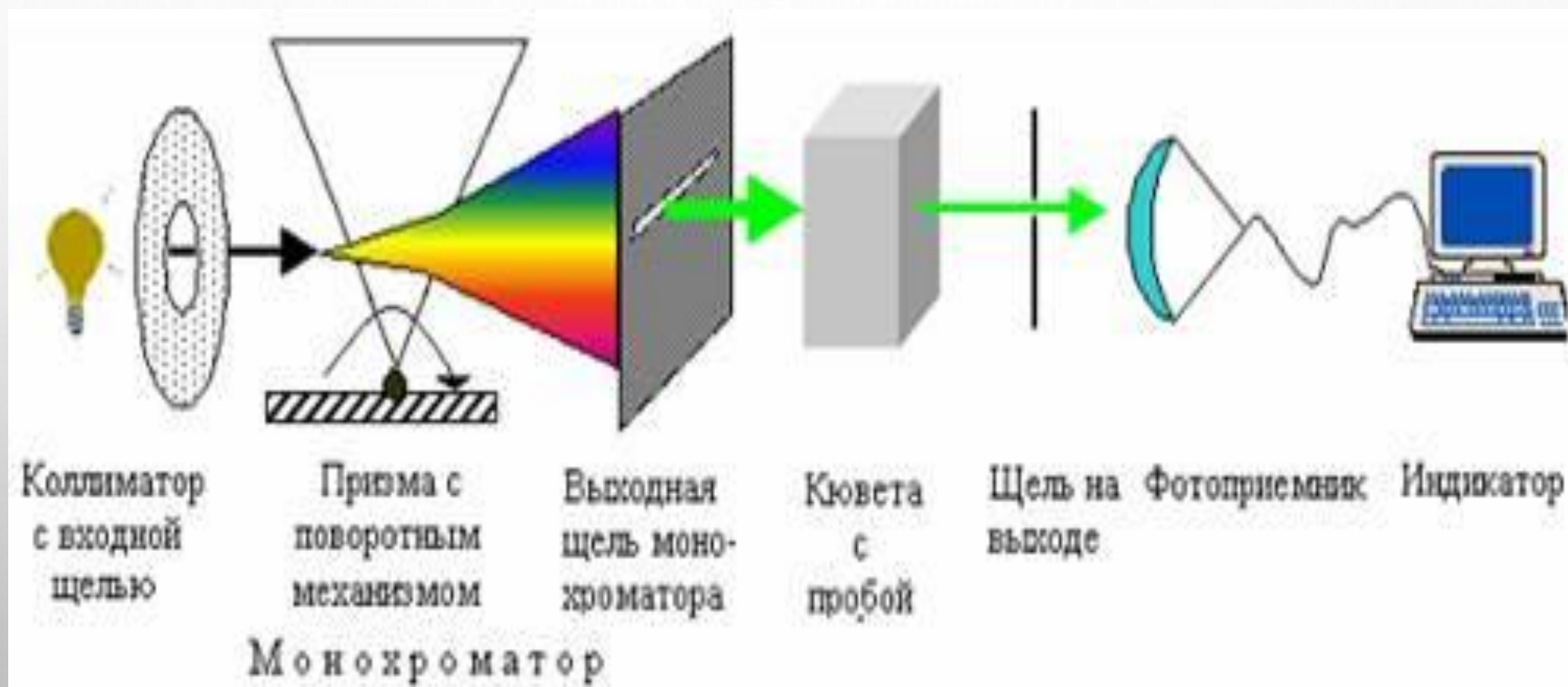


ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ



Способы представления спектров поглощения одних
и тех же растворов. ($C_1 : C_2 : C_3 = 1 : 2 : 3$)

УСТРОЙСТВО СПЕКТРОФОТОМЕТРА



МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ВЕЩЕСТВА

Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого окрашенных растворов

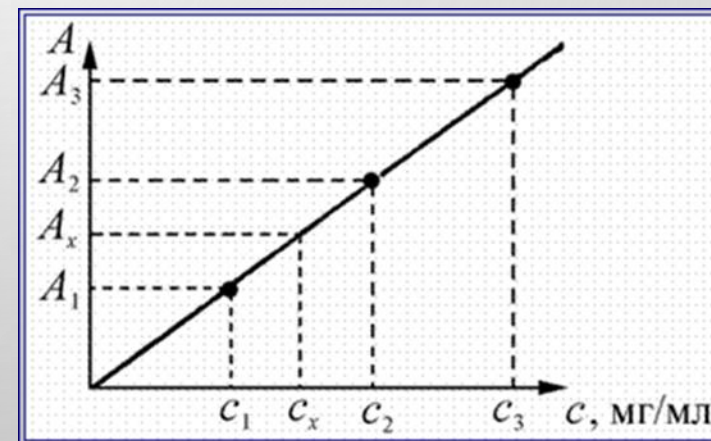
$$C_x = C_{\text{ст}} \frac{A_x}{A_{\text{ст}}} \qquad q_x = \frac{C_x V_x V_{\text{общ.}}}{V_1}$$

Здесь: q_x — содержание определяемого вещества, мг;
 V_x — объем окрашенного исследуемого раствора, мл;
 V_1 — объем аликвотной части исследуемого раствора, взятой для приготовления
окрашенного раствора, мл;
 $V_{\text{общ}}$ — общий объем исследуемого раствора, мл

Метод градуировочного графика

Определив оптическую плотность раствора A_x , находят ее значение на оси ординат, а затем на оси абсцисс — соответствующее ей значение концентрации C_x . Содержание вещества q_x (мг) в исследуемом растворе определяют по формуле:

$$q_x = \frac{C_x V_x V_{\text{общ}}}{V_1}$$



МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ВЕЩЕСТВА

Метод добавок

А) Расчет по методу сравнения неизвестной концентрации:

$$q_x = \frac{V_x A_x c_{\text{доб}} V_{\text{доб}} V_{\text{общ}}}{(A_{x+a} - A_x) V_1 V_{x+a}}.$$

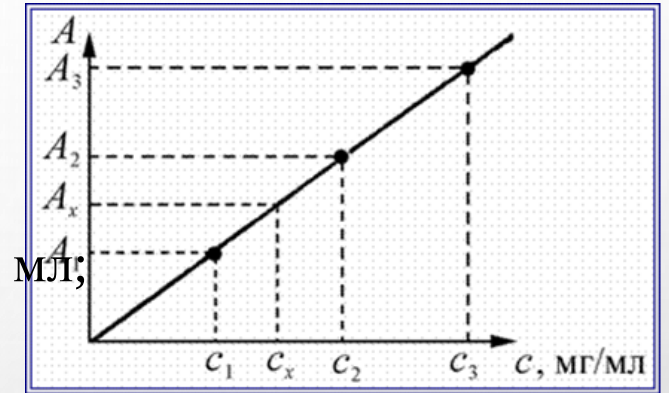
Здесь: V_x — объем окрашенного исследуемого раствора без добавки, мл;

$V_{\text{доб}}$ — объем раствора добавки, мл;

$V_{\text{общ}}$ — общий объем исследуемого раствора, мл;

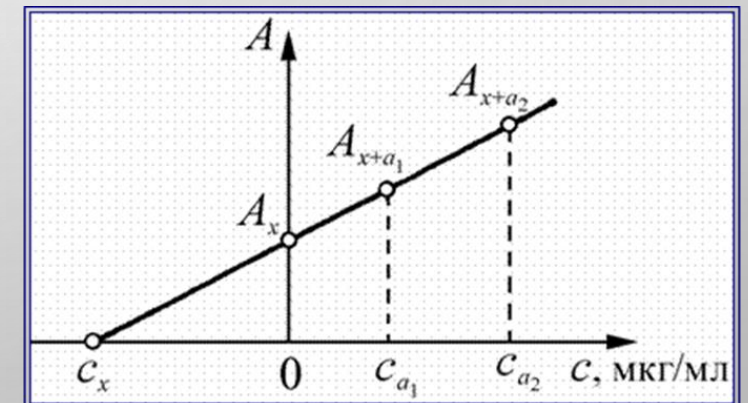
V_1 — объем аликвотной части исследуемого раствора, взятой для приготовления окрашенного раствора, мл;

V_{x+a} — объем окрашенного исследуемого раствора с добавкой, мл.



Б) Определение графическим способом неизвестной концентрации.

$$q_x = \frac{c_x V_x V_{\text{общ}}}{V_1}.$$





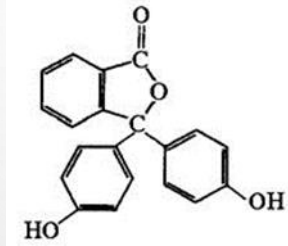
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Явление люминесценции известно с давних времен, но физики стали изучать его лишь во второй половине XIX века. В 1864 г. Дж. Стокс (англия) установил связь интенсивности свечения с концентрацией флуоресцирующих веществ в растворе и предложил использовать такую связь в аналитических целях, подчеркнув высокую чувствительность нового метода. В настоящее время в качестве аналитического сигнала используют интенсивность вторичного излучения на некоторой длине волны.

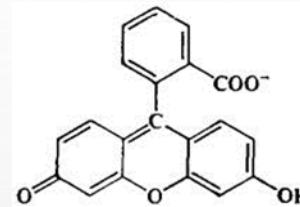
По спектрам люминесценции опознают особо опасные органические вещества в объектах окружающей среды (на уровне 10^{-6} % и ниже). В частности, так находят содержание полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), многие из которых являются канцерогенами. Эти вещества определяют в природных и сточных водах, воздухе, почвах, продуктах питания. Тот же метод используют для обнаружения других токсикантов (диоксины, нитрозамины, пестициды), а также многих биологически активных веществ (витамины, гормоны, антибиотики). Люминесцентные детекторы применяют в хроматографическом анализе, измеряя интенсивность свечения веществ, по очереди выходящих из хроматографической колонки. Люминесцентный анализ применяют в криминалистической экспертизе и для диагностики заболеваний.

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Люминесцировать могут далеко не все молекулы, поглощающие свет. Большая часть органических веществ, способных люминесцировать, – это ароматические соединения, имеющие жесткую структуру молекулы.



Фенолфталеин



флуоресцеин

Так, фенолфталеин и флуоресцеин имеют сходное строение молекул (см. структуры). Но у фенолфталеина все три бензольных кольца могут свободно колебаться друг относительно друга, и это соединение не люминесцирует. У флуоресцеина же возможность внутримолекулярных колебаний гораздо меньше (кислородный мостик жестко фиксирует два бензольных кольца), и это соединение интенсивно светится в видимой области при облучении его раствора УФ-светом.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

В определенных условиях часть поглощенной веществом энергии может выделяться в виде вторичного излучения. Это явление называют люминесценцией.

Люминесцентный анализ - это исследование свечения атомов, молекул и других частиц, которые возникают в результате электронного перехода при возвращении из возбужденного состояния в основное.

Кванты вторичного излучения, испускаемого люминесцирующими атомами, молекулами или ионами, имеют меньшую энергию, чем кванты, которые те же частицы поглощали при своем возбуждении. Виды люминесценции классифицируют по способу возбуждения. Наиболее известны:

- Катодолюминесценция (свечение под действием потока электронов, например, свечение экрана кинескопа или жидкокристаллического экрана, свечение ламп дневного света).
- Хемилюминесценция (свечение за счет химической реакции, например, у светлячков).
- Фотолюминесценция. В этом случае проба светится за счет облучения невидимым УФ-светом от внешнего источника. Именно этот вид люминесценции обычно применяют в химическом анализе.

Виды люминесценции классифицируют и по времени жизни возбужденного состояния. В анализе преимущественно используют:

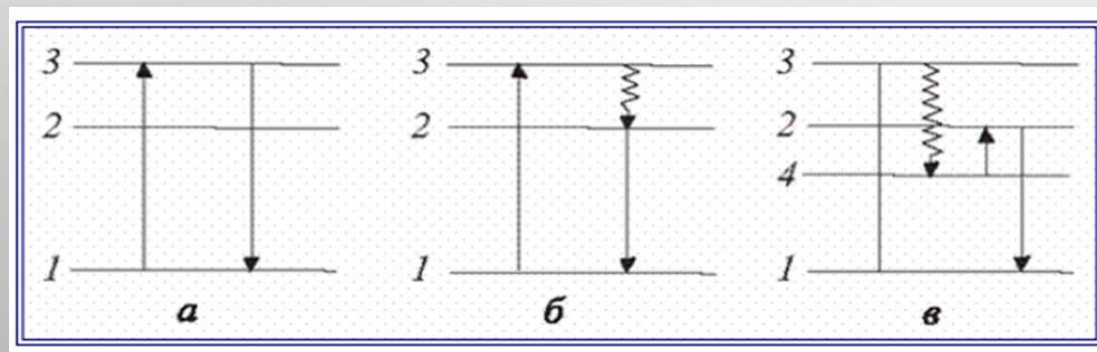
- флуоресценцию – в этом случае возбужденное состояние молекулы неустойчиво, и вторичное излучение пробы в УФ- или видимой области спектра прекращается сразу после удаления источника возбуждения;
- фосфоресценцию (иногда используют) – в этом случае свечение вещества продолжается в течение нескольких секунд, минут или даже часов после прекращения возбуждения.

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Люминесценция – один из самых чувствительных методов анализа – применяется для определения следовых количеств элементов. В отличие от спектрофотометрии, где измеряют разность двух сигналов (I_0 и I), в люминесценции измеряют сам сигнал, и предел обнаружения зависит от интенсивности источника и чувствительности детектора. Метод люминесценции позволяет определять $10...10^{-4}$ мкг·см³ вещества.

При резонансной люминесценции квант излучения, испускаемый частицей, равен поглощенному кванту. Резонансная люминесценция характерна преимущественно для атомов, а также для простейших молекул, находящихся в газообразном состоянии при низких давлениях. При этом выделяют особый вид резонансной люминесценции — атомную флуоресценцию, т. е. свечение атомов в газовой фазе, возбуждаемое световыми квантами.

Возбужденная частица при взаимодействии с окружающими частицами может передать последним часть энергии в виде тепла и перейти на уровень 2.



а) Резонансная б) Спонтанная в) Вынужденная
Виды люминесценции
по механизму элементарных процессов

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

При резонансной и спонтанной люминесценции вероятность возвращения частиц из возбужденного состояния в основное определяется внутренними свойствами частиц и не зависит от температуры. Люминесценция, возникающая при переходе частицы с возбужденного уровня 2 на основной уровень, называется спонтанной. Уровень испускания 2 лежит ниже уровня 3 и поэтому излучаемый квант оказывается меньше поглощенного. Спонтанная люминесценция характерна для паров и растворов сложных молекул

В ряде случаев возбужденная частица, прежде чем перейти на излучательный уровень 2, оказывается на промежуточном метастабильном уровне 4, непосредственный переход с которого на основной уровень является запрещенным. Для перехода на излучательный уровень 2 частице необходимо сообщить дополнительную энергию в виде тепла или света.

Вынужденная люминесценция характерна для сложных органических молекул, находящихся при низкой температуре или помещенных в вязкие или стеклообразные среды (желатина, полимерные пленки, сахарные леденцы).

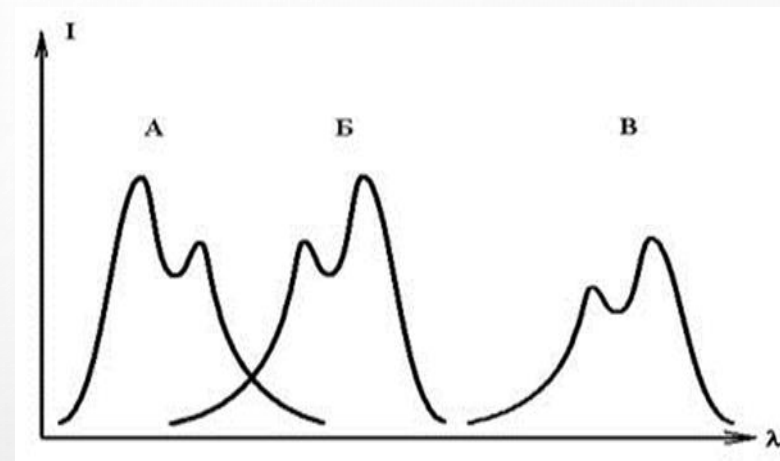
Избирательность люминесцентного анализа можно повысить, варьируя экспериментальные условия (длину волны возбуждения и регистрации сигнала, время наблюдения в фосфоресцентных методах, химические параметры, например pH раствора, температуру и т.д.).

Люминесценцию широко применяют для определения органических веществ (например, витамины, лекарства, наркотики). В неорганическом анализе люминесцентный анализ используют в основном для определения редкоземельных элементов, а также малых количеств примесей в полупроводниковых материалах.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ЛЮМИНИСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Для проведения количественного анализа необходимы следующие условия:

1. Анализируемый раствор должен быть сильно разбавленным ($c < 10^{-4}$ моль/л).
2. Посторонние примеси должны быть удалены, так как они могут увеличивать или уменьшать флуоресценцию.
3. Температура во время проведения флуориметрических исследований должна поддерживаться постоянной.
4. Если определяемое вещество не обладает собственной флуоресценцией, проводят люминесцентную реакцию. **(Люминесцентная реакция** — это такая химическая реакция, протекание, которой сопровождается либо возникновением, либо исчезновением люминесценции, либо изменением её цвета)



Спектры поглощения (А), флуоресценции (Б)
И фосфоресценции (В) одного
соединения

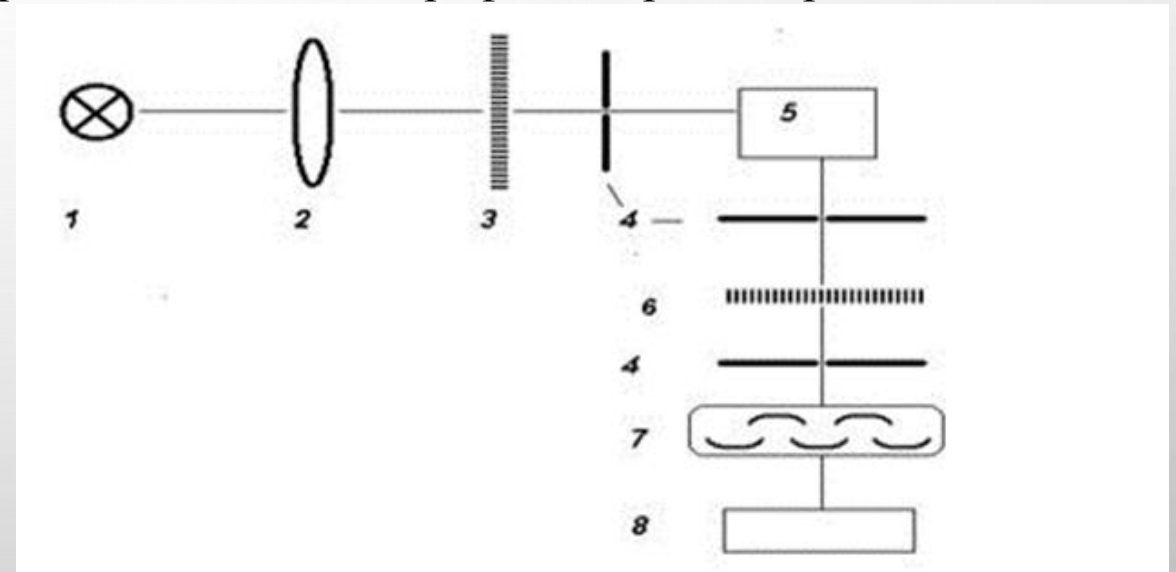
Аппаратура для люминесцентного анализа

Для идентификации индивидуальных соединений и для выбора оптимальных условий измерения их аналитического сигнала надо изучать спектры возбуждения и спектры испускания люминесценции. С этой целью используют различные спектрофлуориметры.

Принципиальная схема спектрофлуориметра

Это более сложные и дорогие приборы, чем спектрофотометры. Принципиальная схема спектрофлуориметра включает:

- 1 – источник возбуждающего света,
- 2 – фокусирующую линзу,
- 3 – первичный монохроматор,
- 4 – входные и выходные щели,
- 5 – кюветное отделение,
- 6 – вторичный монохроматор,
- 7 – приемник люминесцентного излучения,
- 8 – регистрирующее устройство.



В качестве источников возбуждения чаще всего используют мощные УФ-лампы (ртутные, ксеноновые и др.), а также лазеры.



**ВОЗНИКШИЕ ВОПРОСЫ ПО МАТЕРИАЛАМ
ЛЕКЦИИ**

ПРОСЬБА НАПРАВЛЯТЬ НА ПОЧТУ

timofeeva@volgmed.ru

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!