

Люминесцентный анализ



Люминесцентный анализ

- Люминесцентный анализ — совокупность оптических методов анализа, основанных на явлении люминесценции.
- Люминесценция — свечение вещества, возникающее при его возбуждении различными источниками энергии.

Классификация различных видов люминесцентного анализа

1. Классификация по способу (источнику) возбуждения.

1. Фотолюминесценция — свечение вещества, возникающее под воздействием излучения в УФ и в видимой области спектра.

2. Хемилюминесценция — свечение вещества за счет энергии химических реакций.

3. Рентгенолюминесценция — свечение вещества под воздействием рентгеновских лучей.

4. Катодолюминесценция — свечение вещества в газовой фазе при бомбардировке его потоком электронов (катодными лучами).

5. Термолюминесценция (кандолюминесценция) — свечение вещества вследствие его возбуждения при нагревании.

6. Другие виды люминесценции: сонолюминесценция (возбуждение ультразвуком), ионолюминесценция (возбуждение потоком ионов щелочных металлов в вакууме), атомная флуоресценция (возбуждение атомов в пламени), триболюминесценция (механическое возбуждение), радиолюминесценция (возбуждение радиоактивным излучением).

2. Классификация по длительности послесвечения.

- 1. Флуоресценция (спонтанная люминесценция)** — свечение, прекращающееся сразу после прекращения действия источника возбуждения. Длительность послесвечения составляет 10^{-6} — 10^{-9} с. Флуоресцирующие вещества называют флуорохромами.
- 2. Фосфоресценция** — свечение, продолжающееся некоторое время после прекращения действия источника возбуждения. Длительность послесвечения составляет 10^{-2} — 10^{-3} с.

Возникновение люминесценции

- Люминесценция возникает как следствие поглощения веществом квантов $h\nu_0$ электромагнитного излучения и возбуждения его молекул или атомов. Перейдя в возбужденное состояние В, молекула или атом вещества через некоторое время возвращается в основное состояние А, излучив избыточную энергию в виде квантов. При этом часть энергии излучается сначала в виде кванта теплового излучения $h\nu_T$, что приводит к определенной стабилизации молекулы на нижнем возбужденном уровне Г, затем происходит излучение кванта В- или УФ-области спектра, сопровождающееся переходом в основное состояние. В связи с этим энергия (частота) флюоресцентного излучения меньше энергии (частоты) возбуждающего излучения (за счет теплового излучения).

- Флуоресцентный анализ (флуориметрия) — анализ, основанный на использовании флуоресценции определяемого вещества, возбуждаемой энергией излучения в УФ и в видимой области спектра.
- Потеря поглощенной энергии может происходить по-разному:
 1. Возбужденная частица может одновременно излучить всю поглощенную энергию в виде светового кванта и снова вернуться в основное состояние. Произойдет резонансное излучение с той же длиной волны, которая соответствовала поглощенному кванту.
 2. Может произойти безызлучательная потеря части поглощенной энергии, например, за счет теплового обмена при столкновении с другими частицами. При этом частица перейдет из возбужденного коле-

Правило Стокса - Левшина

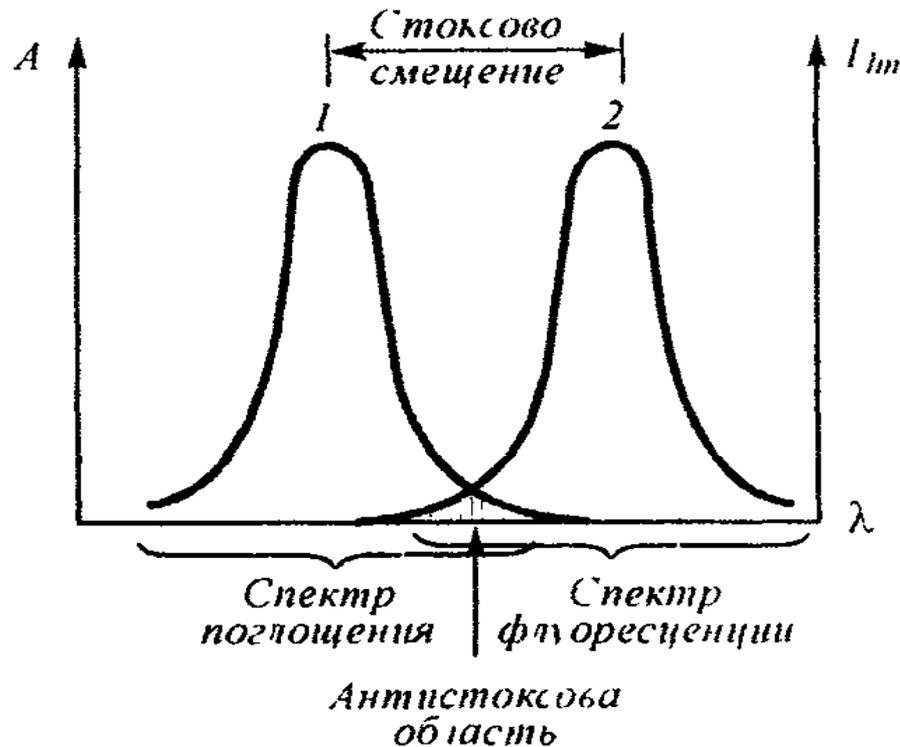
- **Частота флуоресцентного излучения меньше частоты поглощенного (возбуждающего) излучения, а длина волны флуоресцентного излучения больше длины волны поглощенного излучения.**
- Следовательно, вещества, поглощающие УФ излучение, могут люминесцировать (флуоресцировать) в видимой области спектра.
- Правило Стокса—Левшина не является совершенно абсолютным; известны отступления от него (в так называемой «антистоксовой» области).

Основные характеристики флюоресценции

Квантовый выход, энергетический выход, спектр флюоресценции.

Спектр флюоресценции — распределение интенсивности I_{lm} излучения флюоресценции по длинам волн или частотам:

$$I_{lm} = f(\nu) \text{ или } I_{lm} = f(\lambda)$$



Спектры флуоресценции веществ связаны с их спектрами поглощения и подчиняются определенным закономерностям.

1. Закон Стокса–Ломмеля: спектр флуоресценции всегда смещен в сторону более длинных волн по сравнению со спектром поглощения того же вещества.

2. Правило зеркальной симметрии В.Л. Левшина: спектры поглощения и флуоресценции приблизительно зеркально симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров, если они представлены в шкале частот

Расстояние между положениями максимумов в спектре поглощения и в спектре флуоресценции называют ***стоксовым смещением***.

Различные флуоресцирующие вещества характеризуются неодинаковым стоксовым смещением, поскольку имеют неодинаковые возбужденные электронно-колебательные состояния. Чем больше величина стоксова смещения, тем более надежно определение люминесцирующих веществ флуоресцентным методом.

Измерению интенсивности флуоресценции мешает возбуждающее излучение, которое можно можно устранить, если:

1. излучение флуоресценции наблюдают в направлении, перпендикулярном к направлению светового потока возбуждающего излучения;
2. отделяют спектральный участок возбуждающего излучения от спектрального участка флуоресцентного излучения с помощью светофильтров.

Энергетический выход

- Отношение энергии излучаемой люминесцирующим веществом, к энергии поглощенного света: E_{lm} E_{abs}

$$\Phi_e = E_{lm} / E_{abs}$$

Энергетический выход люминесценции характеризует эффективность преобразования поглощенной световой энергии в энергию люминесцентного излучения.

Квантовый выход

- Квантовый выход Φ люминесценции — это отношение числа излученных квантов люминесценции (флуоресценции) N_{lm} к числу квантов N_{abs} поглощенного возбуждающего излучения:

$$\Phi = N_{lm} / N_{abs}$$

- Чем больше квантовый выход флуоресценции, тем эффективнее преобразование возбуждающего света в излучение флуоресценции.
- Квантовый выход флуоресценции зависит от длины волны возбуждающего света, природы растворенного флуоресцирующего вещества и растворителя, концентрации раствора, температуры, присутствия примесей в растворе.

Закон Вавилова

- *Квантовый выход флуоресценции постоянен, если длина волны возбуждающего света (в определенных пределах) меньше длины волны флуоресценции:*

$$\varphi = \text{const, если } \lambda_{\text{abs}} < \lambda_{\text{lm}}$$

- **Следствие:** В определенной спектральной диапозоне (при $\lambda_{\text{abs}} > \lambda_{\text{lm}}$) спектр люминесценции (флуоресценции) не зависит от того, каким участком спектра возбуждается люминесценция (флуоресценция), т.е. спектр люминесценции (флуоресценции) не зависит от длины волны возбуждающего излучения.

Количественный флуоресцентный анализ

Принципы количественного флуоресцентного анализа.

1. Метод основан на использовании прямой пропорциональной зависимости между интенсивностью люминесценции (флуоресценции) I_{lm} и концентрацией c определяемого вещества в растворе:

$$I_{lm} = kc$$

2. Чем больше квантовый выход тем больше коэффициент пропорциональности k в выражении и тем выше чувствительность флуоресцентного анализа. Таким образом, флуоресцентный анализ следует проводить в таких условиях, при которых квантовый выход флуоресценции был бы постоянным и максимальным

Условия поведения флуоресцентного анализа

1. В соответствии с законом Вавилова для того, чтобы квантовый выход был постоянным, необходимо, чтобы выполнялось условие

$$\lambda_{\text{abs}} < \lambda_{\text{lm}}$$

2. Анализируемый раствор должен быть сильно разбавленным (концентрация $c < 10^{-4}$ моль/л).

Уменьшение интенсивности люминесценции при увеличении концентрации раствора называется **концентрационным тушением люминесценции (флуоресценции)**. Минимальная концентрация, при которой уже наблюдается концентрационное тушение флуоресценции, называется пороговой концентрацией.

Условия поведения флуоресцентного анализа

3. Посторонние примеси должны быть удалены. При наличии посторонних примесей может происходить как усиление, так и ослабление и даже тушение флуоресценции.

4. Температура во время проведения флуориметрических измерений должна поддерживаться постоянной. При повышении температуры наблюдается температурное тушение флуоресценции.

5. В тех случаях, когда определяемое вещество не обладает собственной флуоресценцией, проводят люминесцентную реакцию.

Люминесцентная реакция

- **Люминесцентная реакция** — такая химическая реакция, протекание которой сопровождается либо возникновением, либо исчезновением люминесценции, либо изменением ее цвета. При проведении люминесцентной реакции большую роль играют кислотность раствора, присутствие маскирующих реагентов, природа растворителя.
- Собственной люминесценцией обладают немногие неорганические вещества (например, соединения урана и редкоземельных элементов) и многие органические соединения.
- Большинство люминесцентных реакций предложено с целью определения катионов металлов.

Методы определения концентрации

- **Метод градуировочного графика.** Метод градуировочного графика можно использовать и тогда, когда наблюдается отступление от прямой пропорциональной зависимости между интенсивностью флуоресценции и концентрацией раствора.
- **Метод одного стандарта.** Если выполняется закон Вавилова, то готовят стандартный раствор с точно известной концентрацией c_s определяемого вещества, близкой к концентрации c_x того же определяемого вещества в анализируемом растворе. В одинаковых условиях измеряют интенсивность флуоресценции стандартного I_s , и анализируемого I_x , растворов.

$$\begin{aligned} I_s &= kc_s, \\ I_x &= kc_x, \end{aligned}$$

$$\frac{I_s}{I_x} = \frac{c_s}{c_x},$$

$$c_x = \frac{I_x}{I_s} c_s.$$

Достоинства флуоресцентного анализа

- Предел обнаружения определяемых веществ — весьма низкий: до $\sim 10^{-8}\%$. Метод позволяет определять малые концентрации — до 10^{-12} — 10^{-15} г/л.
- Аппаратурное оформление метода сравнительно несложно.
- Погрешности флуориметрического анализа обычно составляют около 2—5%, хотя в отдельных случаях могут достигать 10%.

Применение флуоресцентного анализа

- Метод широко применяется в фармакопейном анализе, например, при контроле качества фолиевой кислоты, этакридина лактата, хинина гидрохлорида, натрия парааминосалицилата, хлортетрациклина гидрохлорида, резерпина, тиамина хлорида и бромиды, рибофлавина и др.
- Предложены методики флуориметрического определения многих катионов металлов после перевода их в хелатные комплексные соединения люминесцентными реакциями с различными органическими соединениями, например, с 8-оксихинолином, 2,2'-дигидроксиазобензолом, дибензоилметаном .

Экстракционно-флуориметрический анализ

- Разновидность флуоресцентного анализа, когда определяемое флуоресцирующее вещество экстрагируется из водного раствора в жидкую органическую фазу с последующим измерением интенсивности флуоресценции определяемого вещества в экстракте.
- Метод обычно применяется тогда, когда необходимо отделить определяемое вещество от мешающих примесей, а также тогда, когда продукт люминесцентной реакции (если такая реакция проводится) малорастворим в воде, но растворяется в органическом растворителе, который можно использовать в качестве экстрагента.

Практика метода

- Для проведения флуоресцентного анализа используют различные, сравнительно простые по устройству, фотоэлектрофлуориметры.
- В качестве источника возбуждения УФ излучения часто применяют ртутную кварцевую лампу. Первичные светофильтры служат для выделения спектрального диапазона с длиной волны возбуждающего излучения, а вторичные — для выделения участка спектра с длиной волны излучения флуоресценции. В качестве приемника излучения применяют фотоэлементы и фотоумножители.

Практика метода

- Все измерения необходимо проводить быстро во избежание разогревания испытуемого раствора, что может привести к ослаблению и тушению флуоресценции.
- Способы измерения интенсивности флуоресценции: в направлении, перпендикулярном по отношению к направлению возбуждающего излучения, фронтальное измерение (направления возбуждающего светового потока и излучения флуоресценции находятся под острым углом) и регистрация в линию (направление измеряемого излучения флуоресценции совпадает с направлением возбуждающего светового потока).

Флюоресцентные индикаторы

- Органические соединения, которые при возбуждении лучами соответствующей длины волны изменяют флуоресценцию в точке эквивалентности или вблизи ее. Эти индикаторы применяются чаще всего в методах кислотно-основного титрования. Кислотно-основные флуоресцентные индикаторы обладают разной флуоресценцией в ионизированной и в нейтральной формах и характеризуются определенным интервалом изменения рН перехода (изменения) цвета флуоресценции.

Хемилюминесцентные индикаторы

- Возникновение, изменение цвета или исчезновение флуоресценции таких индикаторов вызывается протеканием соответствующей химической реакции при достижении определенного значения рН раствора. К хемилюминесцентным индикаторам относятся, например, такие органические соединения, как (в скобках указан интервал изменения рН раствора, в котором возникает свечение флуоресценции данного индикатора): N,N'-диметилбиакриден (рН = 9), лофин (8,9—9,4), люминол (8,0—8,5), люцигенин (9,0—10,0).