

Т.Д. Смирнова

МЕТОДЫ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Принятые обозначения

t_0	время жизни возбужденного состояния
K_f	константа скорости флуоресценции
N_l	числа квантов излученной энергии
N_c	числа квантов поглощенных энергии
K_{nr}^F	константы скорости безызлучательных процессов фосфоресценции
K_{isc}	константа скорости интеркомбинационной конверсии,
K_{is}	константа скорости внутренней конверсии
Φ_l	N_l/N_c квантовый выход
$\Phi_{эн}$	энергетический выход
I_t	интенсивность свечения в момент времени t ;
I_0	интенсивность свечения в момент прекращения возбуждения люминесценции,
τ	длительность люминесценции (среднее время жизни возбужденного состояния)
I	интенсивность люминесценции в присутствии тушителя.
I	интенсивность люминесценции в присутствии тушителя

Введение

Понятие люминесценции (*“luminescenz”*) впервые ввел физик и историк науки Эйльхардт Вьедеман (Eilhardt Wiedemann) в 1888 году для описания *“всех тех явлений, которые обусловлены не только повышением температуры”*. Слово *“люминесценция”* происходит от латинского *“lumen”* (“свет”).

В настоящее время люминесценцией называют свечение атомов, молекул и других частиц, возникающее в результате электронного перехода из возбужденного электронного состояния в основное. Этому явлению предшествует поглощение энергии возбуждения, которое сообщается тем или иным способом.

В зависимости от способа возбуждения частиц различают следующие виды люминесценции. *Фотолюминесценция* возникает при воздействии на люминесцентные центры световых квантов - электромагнитного излучения (УФ-, видимый свет). *Хемилюминесценция* – в результате взаимодействия с энергией химического, обычно окислительного процесса. *Биолюминесценция* – при поглощении энергии биохимической реакции. *Гетерохемилюминесценция* возникает на поверхности твердых тел за счет энергии, выделяющейся при адсорбции некоторых газов. *Рентгенолюминесценция* - в случае использования в качестве источника возбуждения рентгеновских лучей.

Способ возбуждения	Вид люминесценции
Электромагнитное излучение (УФ, видимый свет)	Фотолюминесценция
Энергия химических реакций	Хемилюминесценция
Энергия химических реакций, протекающих в живых организмах	Биолюминесценция
Рентгеновское излучение	Рентгенолюминесценция
Электрическая энергия	Электролюминесценция

В аналитической химии для анализа лекарственных препаратов, биологических жидкостей, мышечных тканей наиболее часто используют фотолюминесценцию. Остановимся подробнее на этом методе анализа.

Основные принципы и определения

Метод фотолюминесценции или молекулярной люминесценции привлекает аналитиков, прежде всего большей чувствительностью. Предел обнаружения этого метода составляет в среднем $1 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл, что, практически, на два порядка ниже, чем предел обнаружения абсорбционной спектроскопии. Кроме этого, сигнал в люминесцентном анализе зависит от интенсивности источника излучения. В тоже время,

возбуждение светом – наиболее универсальный способ возбуждения. Практически все вещества характеризуются спектрами поглощения в УФ-, видимой или ИК-области. Возбуждение светом легко регулируется, и, выбирая определенную длину волны, можно исключить процессы, связанные с поглощением энергии другими компонентами, повысить селективность определения. Высокая чувствительность, широкий диапазон определяемых концентраций (до четырех порядков), избирательность и хорошая воспроизводимость результатов всегда привлекала внимание аналитиков к этому методу и способствовала его широкому применению, дальнейшему развитию и совершенствованию.

Процессы возбуждения молекул. Фотохимия изучает все химические изменения, происходящие при действии на вещество видимого или ультрафиолетового света. Согласно классификации Каши, различают три основных типа молекулярных орбиталей: σ , π , n . На рис. 1. приведена схема расположения энергетических уровней молекулярных орбиталей и указаны возможные электронные переходы, происходящие в молекуле при поглощении ею кванта света.



Рис. 1 Типы основных электронных переходов (по классификации Каши)

Переходы $\sigma \rightarrow \sigma^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ сопровождаются переходом одного из электронов связи со связующей орбитали основного состояния молекулы на более богатую энергией разрыхляющую орбиталь. Переход $\sigma \rightarrow \sigma^*$ наблюдается при возбуждении в дальней вакуумной (менее 180 нм) УФ-области, а переход $\pi \rightarrow \pi^*$ - при возбуждении в ближней УФ- и видимой области. Это весьма интенсивные переходы с $\epsilon = 10^3$ - 10^5 . Именно наличие этих переходов обуславливают флуоресценцию молекул. Молекулы, содержащие лишь простые связи, часто не обладают флуоресцентными

свойствами или их флуоресценция наблюдается в редких случаях. Полосы поглощения, соответствующие $n \rightarrow \sigma^*$ переходу располагаются в дальней и ближней УФ-областях, а $n \rightarrow \pi^*$ - в ближней УФ- и видимой части спектра. Вероятность такого перехода мала ($\epsilon = 1.5 \cdot 10^3$), а время жизни возбужденного синглетного состояния n, π и вероятность безызлучательной дезактивации велика. Экспериментально установлено, что разница в энергиях S_1 и T_1 для состояния n, π^* в 2-4 раза меньше, чем для состояния π, π^* . Благодаря этому соединения, содержащие n -электроны слабо либо вовсе не флуоресцирующие, либо сильно фосфоресцируют. Эту взаимосвязь флуоресценции и фосфоресценции используют при выборе наиболее чувствительного люминесцентного метода анализа.

Как показывает квантовая химия, чем длиннее цепь сопряженных связей, тем меньше энергия для синглет-синглетного $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода, и дальше в длинноволновую область спектра смещены спектры поглощения и люминесценции.

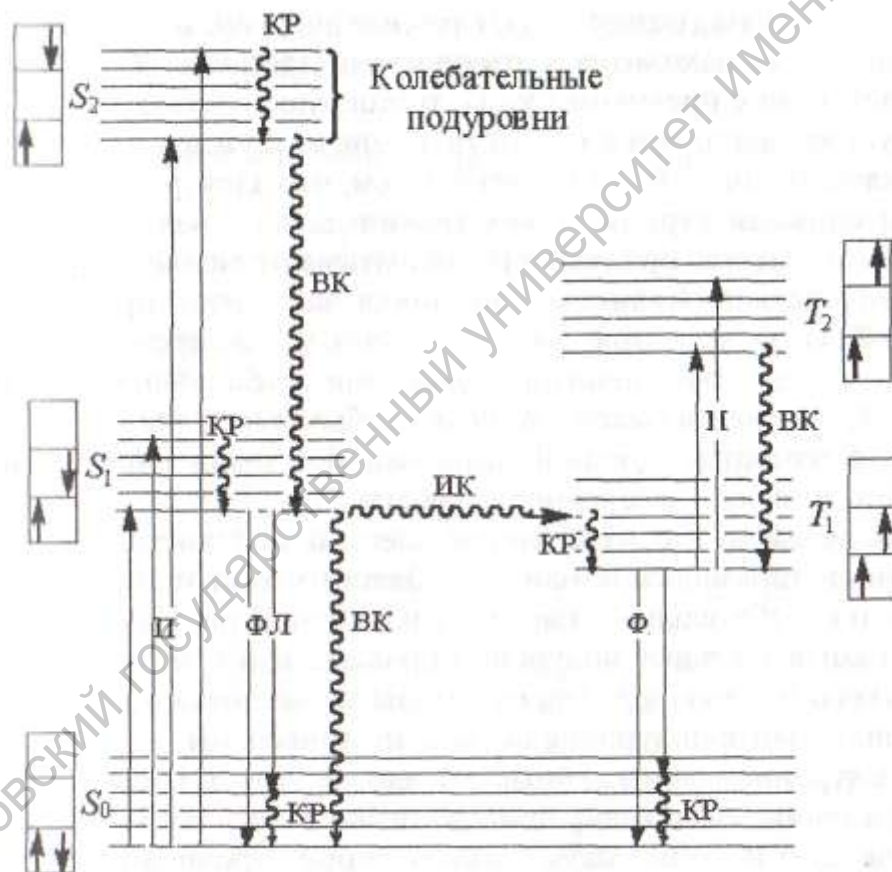


Рис. 2. Схема электронно-колебательных состояний процессов возбуждения и дезактивации сложной молекулы (схема Яблонского-Теренина-Льюиса): S_0 – основное синглетное электронное состояние; S_1 и S_2 – возбужденные синглетные электронные состояния; T_1 и T_2 – возбужденные триплетные электронные состояния; П – поглощение света; ФЛ – флуоресценция; Ф – фосфоресценция; КР – колебательная релаксация;

ВК – внутренняя конверсия; ИК – интеркомбинационная конверсия; \rightarrow – излучательные процессы; волнистая стрелка – безызлучательные процессы.

В незамещенных ароматических углеводородах, для которых характерна флуоресценция, энергия синглет-синглетного перехода $\pi \rightarrow \pi^*$ уменьшается с увеличением числа сопряженных колец.

Наиболее важным фактором, обуславливающим флуоресценцию органических соединений, является наличия жесткой и плоской структуры молекулы.

Поглощая квант света, молекула переходит из основного состояния S_0 в возбужденное S_1 (рис.2), точнее, на один из его колебательных уровней. За время $1 \cdot 10^{-12}$ с осуществляется переход электрона на нижний колебательный подуровень возбужденного состояния, который называют *колебательной релаксацией*. Возвращение молекулы из нижнего колебательного состояния S_1 в основное S_0 возможно различными способами:

1. за счет внутренней конверсии в результате потери энергии в виде теплоты при столкновении молекулы с другими частицами (рис.2, волнистая стрелка);

2. флуоресценции, испускании энергии в виде кванта света без изменения спина электрона $S_1 \rightarrow S_0$; безызлучательны переход между двумя электронными состояниями без изменения мультиплетности $S_2 \rightarrow S_1$ или $T_2 \rightarrow T_1$ называется *внутренней конверсией*.

3. фосфоресценции, излучении света в результате перехода между электронными состояниями с изменением мультиплетности $T_1 \rightarrow S_0$.

Наиболее устойчивым для большинства молекул является синглетное состояние с суммарным спином, равным нулю. В триплетном состоянии спины возбужденного электрона и оставшегося в основном состоянии, параллельны и суммарный спин равен 1. Переходы между синглетным и триплетным состояниями, например, $S_1 \rightarrow T_1$ в принципе запрещены. Такие переходы, становятся возможными в присутствии тяжелых металлов и получили название *интеркомбинационной конверсией*. Время жизни триплетного состояния молекулы составляет $10^{-3} - 10^{-2}$ с. Дезактивация молекулы, ее переход в основное состояние, происходит при взаимодействии с другими молекулами, имеющими неспаренные электроны, например, с кислородом, а также при столкновении с другими частицами. В этой связи флуоресценция наблюдается гораздо чаще фосфоресценции, особенно в растворах. Интенсивная фосфоресценция характерна для органических соединений в замороженном или в стекловидном состоянии, когда диффузия минимальна.

Спектр фосфоресценции, в соответствии с диаграммой Яблонского лежит в области более длинных длин волн, чем спектр флуоресценции.

Замедленная флуоресценция, которая происходит в результате термической активации молекул из T_1 в S_1 - состояние с последующим излучением из него, характеризуется спектром, совпадающим со спектром *быстрой* флуоресценции, но со временем жизни фосфоресценции молекулы.

Процессы возможных потерь избыточной энергии возбужденными молекулами различны и конкурируют между собой (рис.3). Вклад каждого из них определяется относительной величиной константы скорости. Предположим, что возбужденная молекула флуоресцирует с константой скорости K_f (константа скорости излучательной дезактивации $S_1 \rightarrow S_2$). Переход в основное состояние безызлучательным путем с уровня S_1 характеризуется общей константой скорости:

$$K_{nr} = K_{isc} + K_{is},$$

где K_{isc} - константа скорости интеркомбинационной конверсии, а K_{is} - константа скорости внутренней конверсии $S_1 \rightarrow S_0$. Если значения K_f больше или сопоставимы с K_{nr} , то интенсивность флуоресценции будет значительной, а процессы диссипации энергии возбуждения молекулы минимальны. Константа скорости излучательной дезактивации $T_1 \rightarrow S_0$ (процесса фосфоресценции) обозначается K^F .

$K_{nr}^F = K_{ic}^F$ - константа скорости безызлучательных процессов, внутренней конверсии $T_1 \rightarrow S_0$.



Рис. 3. Возможные фотофизические процессы дезактивации молекулы.

Рассмотрев в самом общем виде соотношение скоростей различных процессов в молекуле, можно сделать вывод, что форма спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света (правило Каша).

Характеристики люминесцирующих молекул. К спектральным характеристикам относятся спектр люминесценции и спектр возбуждения люминесценции.

Спектр возбуждения люминесценции – зависимость интенсивности люминесценции (флуоресценции, фосфоресценции) от длины волны возбуждающего света. *Спектр люминесценции* – зависимость интенсивности излучения (флуоресценции, фосфоресценции) от ее длины волны. Характер спектров определяется природой люминесцентного центра, энергиями его возбужденных состояний, вероятностями излучательных переходов между различными состояниями и пр. кроме этого на характер спектра оказывает сильное влияние окружающая среда.

Спектры излучения, как и поглощения, сложных молекул имеют размытую колебательную структуру и выглядят в виде широких бесструктурных полос. Это наблюдается как для спектров флуоресценции, так и для спектров фосфоресценции. Последние всегда смещены в более длинноволновую область по сравнению со спектром флуоресценции, так как фосфоресценция отвечает переходу с более низко расположенного уровня T_1 . Спектры различных молекул могут отличаться лишь положением максимума. Низкая характеристичность спектров люминесценции снижает селективность люминесцентных методов анализа.

Эффективность преобразования поглощенной энергии в энергию люминесценции характеризуется *энергетическим и квантовым выходами* люминесценции. Отношение излучаемой энергии люминесценции к энергии поглощенного света называют энергетическим выходом, а отношение числа излучаемых квантов к числу поглощенных называют квантовым выходом люминесценции.

Если $\varphi_{эн}$ – энергетический выход люминесценции, а E_l , E_c – соответственно энергия люминесценции и энергия поглощенного света, то

$$\varphi_{эн} = E_l / E_c$$

Одной из важнейших характеристик люминесцирующей молекулы является *квантовый выход* (φ) – отношение числа излученных квантов к числу поглощенных:

$$\varphi_l = N_l / N_c$$

где N_l и N_c – числа квантов излученной и поглощенных. Связь между $\varphi_{эн}$ и $\varphi_{фл}$ легко установить, если учесть, что энергия n квантов равна $E = h\nu \cdot n$:

$$\varphi_{эн} = N_l \cdot h\nu_l / N_c \cdot h\nu_c = \varphi_l \cdot \nu_l / \nu_c$$

Зависимость энергетического выхода люминесценции от длины волны возбуждающего света подчиняется закону Вавилова. Согласно этому закону *квантовый выход в растворах не зависит от длины волны возбуждающего света*. Сущность закона Вавилова состоит в том, что на каком бы уровне возбужденного состояния ни оказалась молекула при поглощении фотона (а это зависит от длины волны возбуждающего света),

вопрос о том, быть ли переходу излучательным или нет, решается только после того как молекула растратила часть энергии возбуждения в тепло и оказалась на нижнем колебательном подуровне нижнего уровня возбужденного состояния.

Чем больше квантовый выход люминесценции определяемого вещества, тем чувствительнее аналитическая реакция, основанная на измерении интенсивности люминесценции.

Энергетический выход люминесценции с увеличением длины волны возбуждающего света сначала возрастает пропорционально длине волны, а затем остается постоянным и после достижения некоторой граничной длины волны резко падает.

Определение квантового выхода флуоресценции. Квантовый выход люминесценции определяют, сравнивая, в одинаковых условиях эксперимента, интенсивности флуоресценции исследуемого вещества и стандартного, для которого значения квантового выхода известно.

При этом используют следующее соотношение:

$$\varphi_{\text{кв}} = \varphi_{\text{кв}}' (I_{\text{max}} \delta_{0.5} \lambda_{\text{ФЛ}} A') / (I_{\text{max}}' \delta_{0.5}' \lambda_{\text{ФЛ}} A),$$

где $\varphi_{\text{кв}}'$ – квантовый выход стандартного вещества (раствор флуоресцеина в 0.1 М NaOH, $\varphi_{\text{кв}} = 0.64$ или сульфата хинина в 0.1 М H₂SO₄ $\varphi_{\text{кв}} = 0.55$).

I_{max} и I_{max}' – максимальная интенсивность флуоресценции исследуемого и стандартного вещества.

$\delta_{0.5}$ и $\delta_{0.5}'$ – полуширина нормированных спектров флуоресценции исследуемого и стандартного вещества.

A' и A – оптические плотности в максимумах исследуемого и стандартного вещества.

Вероятность перехода молекулы из основного состояния S₀ в состояние S₁ при поглощении фотона равна единице и не зависит от длины волны поглощенного фотона. Излучательный переход молекулы с нижнего подуровня возбужденного состояния происходит с вероятностью η , меньшей единицы, и сопровождается высвечиванием кванта флуоресценции. Очевидно, что η и есть квантовый выход флуоресценции. Он меньше единицы, поскольку существует некоторая вероятность (1 – η) безызлучательных переходов в основное состояние непосредственно через триплетное состояние, а также других способов диссипации энергии. Высокие значения квантовых выходов люминесценции свидетельствуют о низкой безызлучательной дезактивации энергии возбуждения. При этом поглощение растворов должно быть около 0.1 единиц оптической плотности.

Спектральные закономерности молекулярной спектроскопии

Принцип Франка-Кондона заключается в том, что *часть электронной энергии при поглощении и испускании света молекулой расстрачивается на увеличение колебаний, т.е. превращается в тепло*. Согласно этому принципу электронные переходы являются настолько быстрыми процессами (10^{-15} с) по сравнению с движением ядер (10^{-12} с), что за время электронного перехода ядра не успевают изменить ни своей скорости, ни взаимного расположения. Силы, связывающие ядра, изменяются также быстро, как быстро происходит электронный переход. Прежнее положение ядер будет соответствовать изменившимся в результате электронного перехода силам взаимодействия, если молекула будет совершать достаточные колебания. При электронном возбуждении молекулы прочность связи ослабевает, а ядра в первый момент продолжают занимать близкое друг к другу положение. Такое несоответствие приводит к тому, что молекула начинает совершать сильные колебания. За короткое время жизни возбужденного состояния (10^{-9} с) избыточная колебательная энергия распределяется между молекулами и передается окружающей среде. В результате молекула переходит из неравновесного состояния в равновесное колебательное состояние соответствующее данной температуре, при котором ядра в соответствии с ослабленной связью находятся на большем расстоянии друг от друга и совершают около этого положения небольшие колебания. При испускании кванта света прочность связи мгновенно усиливается, а ядра по-прежнему занимают далекое друг от друга положение. Вновь осуществляется переход из неравновесного в равновесное состояние в результате сильных колебаний. Этот принцип означает, что наиболее вероятными переходами между различными электронными и колебательными уровнями являются те переходы во время которых значительно не меняется ни количество движения, ни положение ядер. По существу принцип отражает тот факт, что быстрое превращение электронной энергии в энергию колебания ядер затруднено.

Правило Стокса-Люммеля. В соответствии с правилом Стокса-Люммеля длина волны люминесцирующего излучения сдвинута в длинноволновую область по сравнению с длиной волны поглощенного света. Для люминесценции характерно, что часть энергии возбуждения неизбежно теряется в виде тепла, поэтому энергия квантов света, выделяющегося при люминесценции меньше, чем энергия квантов возбуждающего света. Иначе говоря, длина волны люминесцентного свечения всегда больше, чем длина волны возбуждающего света, за исключением небольшого участка спектра, где полосы возбуждения и люминесценции перекрываются (рис.4).

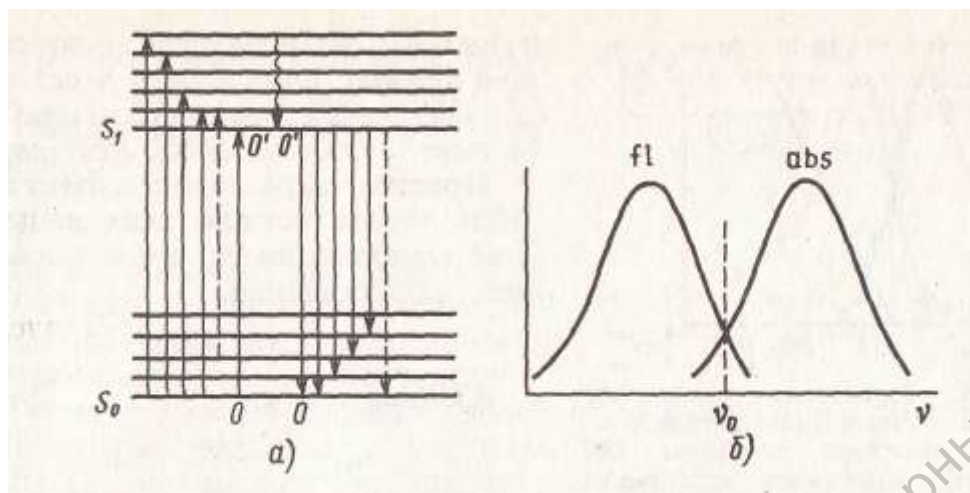


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая закон Стокса-Люммеля: а – энергетические переходы; б – спектры поглощения и флуоресценции

Правило Левшина. Согласно этому правилу нормированные (приведенные к одному максимуму) спектры поглощения и флуоресценции, изображенные в функции частот, зеркально симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров. Частота точки пересечения может быть интерпретирована как частота электронного процесса, то есть 0-0 – перехода. Правило зеркальной симметрии может быть записано в виде:

$$\nu_c + \nu_l = 2 \nu_{0-0},$$

где ν_c и ν_l – симметричные частоты в спектре поглощения и испускания. Соблюдение правила зеркальной симметрии позволяет построить спектр флуоресценции или поглощения, имея только один из них.

Зависимость люминесценции от внешних факторов. Такие факторы как температура, природа растворителя, наличие примесей оказывают весьма значительное влияние на люминесцентные свойства молекул. Спектры люминесценции очень чувствительны к химическим свойствам окружения (полярности, рН, концентрации, вязкости и др.) люминесцирующей молекулы, что широко используется в биохимических исследованиях. Люминесценция позволяет изучать изменения конформации макромолекул, а при использовании люминесцентного микроскопа изучать и локализацию люминесцирующих молекул внутри клетки.

Кинетика затухания флуоресценции. Прямым методом исследования фотохимических реакций является изучение кинетики люминесценции. При этом для возбуждения люминесценции используют

либо короткие импульсы света, либо модулированный свет. Наносекундные и пикосекундные источники света и высокочувствительные сверхбыстрые системы регистрации предоставляют исключительные с точки зрения химической кинетики возможности для исследования механизмов наиболее быстрых химических реакций. Интенсивность люминесценции (*флуоресценции и фосфоресценции*) прямо пропорциональна концентрации возбужденных молекул (соответственно в синглетном или триплетном состоянии) в данный момент времени. Поэтому, измеряя кинетику люминесценции получают непосредственно зависимость концентрации этих возбужденных молекул от времени.

При импульсном возбуждении после прекращения возбуждающего импульса получается уравнение процесса первого порядка, решение которого имеет вид экспоненты. Интенсивность флуоресценции после прекращения возбуждения спадает со временем по экспоненциальному закону:

$$I_t = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

где I_t — интенсивность свечения в момент времени t ; I_0 — интенсивность свечения в момент прекращения возбуждения люминесценции, τ — длительность люминесценции (среднее время жизни возбужденного состояния):

$$I_\tau = \frac{I_0}{e} = \frac{I_0}{2,72} \approx 0,37I_0$$

Таким образом, при экспоненциальном затухании люминесценции весь ход процесса свечения определяется величиной τ , временем, в течение которого интенсивность флуоресценции уменьшается в e раз.

Из приведенных выше уравнений видно, что число молекул в возбужденном состоянии убывает во времени по экспоненциальному закону (рис. 6) и становится равным нулю только спустя продолжительное время. Это объясняется тем, что разные молекулы осуществляют акт испускания в разные моменты времени и находятся в возбужденном состоянии различное время.

Время жизни возбужденных молекул можно определить графически, откладывая зависимость логарифма интенсивности от времени (рис. 5):

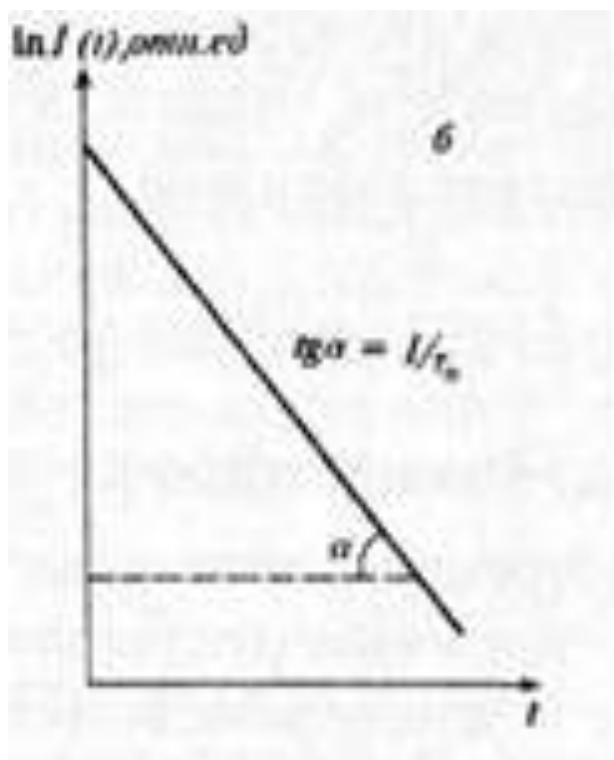


Рис.5. Зависимость $\ln I$ от времени t

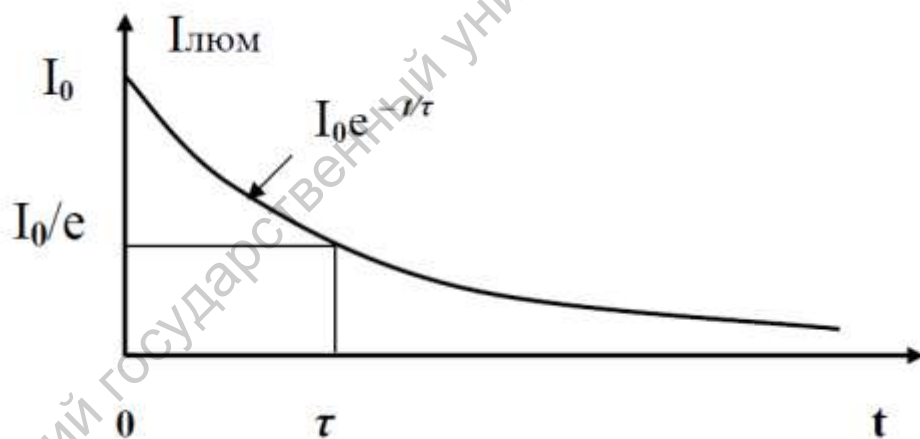


Рис.6. Затухание люминесценции во время

Каждый из описанных переходов можно формально рассматривать как химическую реакцию первого порядка, если мы обозначим молекулу как Q . Как и для любой реакции первого порядка, скорость описанных процессов пропорциональна концентрации (в данном случае – количеству частиц) исходного вещества. Так, в случае флуоресценции

$$d[Q^*]/dt = -K_f[Q^*]$$

Решая дифференциальное уравнение, получим

$$[Q^*] = [Q^*]_0 \exp(-t \cdot K_f) = [Q^*]_0 \exp(-t/t_0),$$

где $t_0 = 1/K_f$ – время жизни возбужденного состояния относительно процесса флуоресценции.

Оценить время жизни возбужденного состояния S_1 относительно любых процессов легко можно по формуле

$$t_0 = 1/(K_f + K_{IC} + K_{ISC}).$$

Эту величину легко померить: поскольку интенсивность люминесценции пропорциональна количеству частиц в возбужденном состоянии:

$$I = I_0 \exp(-t/t_0),$$

так что, измеряя изменение интенсивности люминесценции со временем и экстраполируя полученную кривую экспоненциальной зависимостью, мы легко получаем значение t_0 .

Точно также измеряя изменение интенсивности люминесценции на длине волны, соответствующей разнице ($T_1 - S_0$), мы получим время жизни возбужденного триплетного состояния.

Известно, что далеко не все органические соединения флуоресцируют. Излучение будет наблюдаться в том случае, если константа флуоресценции K_f будет как минимум соизмерима с константами конкурирующих процессов. Количественной оценкой флуоресценции является как раз ее квантовый выход, который по определению равен отношению числа излученных квантов света к числу поглощенных или, считая, что каждая молекула способна излучить один квант света квантовый выход как можно выразить как

$$\varphi_{KB} = K_f / (K_f + K_{IC} + K_{ISC}) = K_f \cdot t_0$$

Эта величина будет ненулевой в случае, если числитель и знаменатель соизмеримы, то есть

$$K_f \sim (K_f + K_{IC} + K_{ISC}) \sim (K_{IC} + K_{ISC}).$$

Точно так же, кинетическими причинами определяется и возможность фосфоресценции. Для начала необходим переход $S_1 \rightarrow T_1$, который возможен в случае, если

$$K_{ISC} \sim (K_f + K_{IC} + K_{ISC}) \sim (K_f + K_{ISC}).$$

Сама же фосфоресценция происходит, если $K_F \sim K_{ISC}$ и вызвана формально запрещенным переходом с изменением спина $T_1 \rightarrow S_0$. При наличии тяжелого атома, когда этот запрет снижается, константа этого процесса может достигать $K_F \sim 10^6 \text{ с}^{-1}$, и фосфоресценция становится более вероятной. Однако в отсутствие снятия запрета обычно константа фосфоресценции характеризуется значением лишь $K_F \sim 10^2 \text{ с}^{-1}$, то есть процесс чрезвычайно медленный, возможен и более вероятен дальнейший внутрисистемный перенос или быстрая безызлучательная дезактивация. Если же молекулу заморозить до 77К (температура жидкого азота), все колебательные процессы замедлятся или вовсе исчезнут, и фосфоресценция будет наблюдаться. Ее эффективность из тех же общих соображений равна

$$\Phi_{\text{KB F}} = K_{ISC} / (K_{IC} + K_{ISC}) \cdot K_F / (K_F + K_{ISC} + K_{IC})$$

Если эффективность образования триплетного уровня велика, то есть $K_{ISC} \gg (K_{flu} + K_{IC})$, то

$$\Phi_{\text{KB F}} = K_F / (K_F + K_{ISC} + K_{IC})$$

Тушение флуоресценции

Тушение флуоресценции обусловлено столкновением возбужденных атомов с окружающими их невозбужденными частицами. В результате столкновения энергия возбуждения переходит в кинетическую энергию сталкивающихся частиц или в энергию возбуждения партнера. Эффективность тушения зависит от частоты столкновений с возбужденным атомом и вероятности тушения при столкновениях. Тушение проявляется при больших концентрациях, когда длина свободного пробега частиц мала, а частота столкновений велика. Особенно сильно эффект тушения проявляется в конденсированных средах, в газах при высоком давлении. Частота столкновений возбужденных атомов с другими частицами возрастает с повышением температуры, следовательно, эффект тушения с ростом температуры также усиливается. Тушение флуоресценции в результате столкновений возбужденных частиц сопровождается сокращением среднего времени жизни возбужденного состояния. Природа частиц, сталкивающихся с возбужденными атомами, оказывает существенное влияние на эффективность тушения. Так, известно, что, квантовые выходы флуоресцирующих центров существенно выше в атмосфере аргона.

Температурное тушение. Повышение температуры вызывает уменьшение выходов флуоресценции и фосфоресценции. В частности, в области комнатных температур выход флуоресценции обычно

уменьшается на несколько процентов с повышением температуры на 1°C. Это связано с тем, что безызлучательная дезактивация электронно-возбужденных состояний осуществляется преимущественно при соударениях излучающих молекул, частота которых в растворе прямо пропорциональна температуре. Одновременно с уменьшением выхода люминесценции происходит уменьшение длительности свечения.

Концентрационное тушение. Эффект концентрационного тушения наблюдается при больших концентрациях люминофора. Обычно он начинает проявляться с некоторой пороговой концентрации c_0 , при этом имеет место экспоненциальная зависимость выхода люминесценции от концентрации:

$$\varphi = \varphi_0 e^{-g(c-c_0)}$$

где φ_0 — выход люминесценции при бесконечном разбавлении; g — константа. Величина пороговой концентрации c_0 и константа g специфичны для различных веществ. При $c \leq c_0$; $\varphi = \varphi_0 = \text{const}$. Эффект концентрационного тушения обратим: при разбавлении концентрированных растворов выход люминесценции вновь достигает максимального значения, указывая на отсутствие сложных физико-химических превращений молекул люминофоров.

Уменьшение выхода люминесценции с увеличением концентрации люминофора вызвано ассоциацией молекул люминофора с образованием нелюминесцирующих агрегатов различного состава (теория молекулярной ассоциации), а так же и передачей энергии от возбужденных молекул к невозбужденным (теория миграции энергии).

Теория *молекулярной ассоциации* описывает явление концентрационного тушения в растворах с высокой концентрацией компонентов. Наличие в растворах люминофоров полимерных агрегатов легко обнаруживается спектроскопическими исследованиями. Как видно из рисунка 7, изменений в спектре поглощения родамина 6Ж в смеси пропилового спирта и четыреххлористого углерода с ростом концентрации красителя, в области малых концентраций (до 10^{-6} г/мл), где ассоциация практически не наблюдается, спектр поглощения остается неизменным. При возрастании концентрации красителя интенсивность полосы поглощения мономеров при $\lambda = 535$ нм уменьшается, а интенсивность полосы поглощения димеров при $\lambda = 505$ нм, напротив, возрастает. Все спектры поглощения пересекаются в изобестической точке с $\lambda = 515$ нм, свидетельствующей о том, что исследуемые растворы представляют собой бинарную смесь мономеров и димеров. Объединение молекул люминофора

в ассоциаты вызывает уменьшение выхода люминесценции, при этом форма спектра люминесценции при этом остается неизменной.

Еще одна теория, - теория *миграции энергии* описывает эффект концентрационного тушения в относительно разбавленных растворах люминофоров. Согласно этой теории, между любыми соседними молекулами люминофора, при наличии перекрывания их спектров поглощения и люминесценции, возникает резонансное взаимодействие, приводящее к безызлучательному переносу энергии от возбужденной молекулы к невозбужденной. Чем больше область перекрывания спектров поглощения и люминесценции, тем меньше величина пороговой концентрации c_0 . Если отсутствуют такие области перекрывания, то концентрационное тушение не наблюдается в широком диапазоне концентраций люминофора. Концентрационное тушение имеет место в результате передачи энергии от возбужденных молекул на нелюминесцирующие ассоциаты молекул люминофора.

Оба явления — самоассоциация молекул люминофора и передача энергии от возбужденных молекул люминофора к невозбужденным или их ассоциатам — вносят различный вклад в суммарное концентрационное тушение люминесценции. Например, концентрационное тушение родамина 6Ж обусловлено преимущественно образованием нелюминесцирующих димеров, в то время как концентрационное тушение флуоресцеина в основном определяется передачей энергии возбуждения на нелюминесцирующие агрегаты.

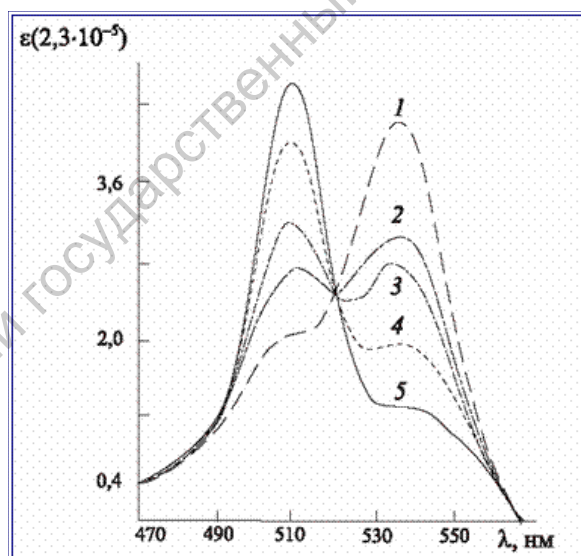


Рис. 7 Спектры поглощения растворов родамина 6Ж различной концентрации в смеси пропиловый спирт – четыреххлористый углерод: c , г/мл: 1 – $2,0 \cdot 10^{-6}$; 2 – $1,0 \cdot 10^{-5}$; 3 – $5,0 \cdot 10^{-5}$; 4 – $1,0 \cdot 10^{-4}$; 5 – $5,0 \cdot 10^{-4}$

Тушение посторонними веществами. Выход люминесценции может уменьшаться в присутствии посторонних веществ, называемых *тушителями*. К наиболее активным тушителям люминесценции относятся: тяжелые анионы и катионы Γ^- , 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 носить либо химический (статическое тушение), либо физический (динамическое тушение) характер.

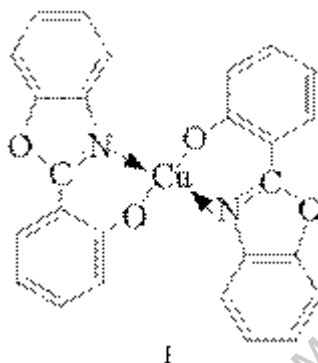
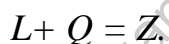


Рис.8. Комплекс Cu^{2+} с 2-(*o*-оксифенил)бензоксазолом.

Статическое тушение обусловлено образованием нелюминесцирующего продукта в результате взаимодействия люминофора с тушителем. В качестве примера можно привести тушение флуоресценции 2-(*o*-оксифенил)бензоксазола ионами Cu^{2+} , вызванное образованием бис-комплекса (рис.8), не обладающего свечением. Поскольку статическое тушение связано с образованием нелюминесцирующих комплексов Z между молекулами люминофора L и тушителя Q , процесс тушения можно описать уравнением



Если поглощение люминофора и комплекса одинаково, то можно записать:

$$\frac{\Phi}{\Phi_0} = \frac{[L] + [Z]}{[L]} = 1 + \frac{[Z]}{[L]} = 1 + \beta[Q]$$

где Φ , Φ_0 — выход люминесценции в отсутствии и в присутствии тушителя соответственно;

β — константа устойчивости нелюминесцирующего комплекса.

Когда поглощение комплекса отлично от поглощения люминофора, уравнение не соблюдается. Однако для слабо поглощающих растворов справедливо отношение

$$\frac{I}{I_0} = \frac{[L] + [Z]}{[L]} = 1 + \beta[Q]$$

где I , I_0 — интенсивность люминесценции в отсутствии и в присутствии тушителя. Выше приведенные уравнения описывают зависимость степени тушения люминесценции от концентрации тушителя.

Отличительными признаками статического тушения являются:

- уменьшение доли молекул люминофора, обладающих люминесценцией;
- изменение спектров поглощения и люминесценции люминофора в присутствии тушителя;
- неизменность выхода люминесценции раствора люминофора, содержащего тушитель, при разбавлении; наличие стехиометрии между количествами люминофора и тушителя (т.е. концентрации тушителя и люминофора должны быть одного порядка).

Существует также еще один отличительный признак статического тушения. Ввиду того, что увеличение температуры уменьшает устойчивость комплекса Z , угол наклона прямой $I/I_0 (t/t_0) - [Q]$ с ростом температуры становится более пологим.

Концентрационное тушение, связанное с образованием нелюминесцирующих димеров и более крупных агрегатов молекул люминофора, является частным случаем статического тушения.

Динамическое тушение. Когда взаимодействие люминофора и тушителя носит физический характер, тушение люминесценции осуществляется за счет передачи энергии от электронно-возбужденных молекул люминофора к частицам тушителя. Тушители такого рода делят на два типа — резонансные и нерезонансные. Для резонансных тушителей характерно перекрывание спектров поглощения со спектрами люминесценции люминофоров. Даже малые концентрации резонансных тушителей вызывают сильный тушащий эффект. Спектры поглощения нерезонансных тушителей не имеют зон перекрывания со спектрами излучения люминофоров. Ощутимый эффект тушения люминесценции нерезонансными тушителями достигается лишь при высоких концентрациях последних.

Пути дезактивации в результате физических процессов электронно-возбужденной молекулы в присутствии тушителя представлены на рис. 9.

Стрелками указаны направления электронных переходов в возбужденной молекуле, а k_1 , k_2 и k_3 являются константами скоростей соответствующих переходов.

Переход 1 сопровождается испусканием кванта люминесценции, а переходы 2 и 3 являются безызлучательными. Переход 2 обусловлен внутренними свойствами молекулы люминофора и осуществляется либо непосредственно (внутренняя конверсия, колебательная релаксация), либо через триплетное состояние (интеркомбинационная конверсия, колебательная релаксация). Переход 3 имеет место при взаимодействии возбужденных молекул люминофора с частицами тушителя.

Квантовый выход определяется соотношением скоростей излучательного и безызлучательных переходов. Ниже в виде таблицы представлена дезактивация электронно-возбужденных молекул через фотофизические процессы.

Процесс	Скорость процесса
Поглощение возбуждающего излучения $S_0 + hv_a \rightarrow S_1$	$v_0 = k_0 I_S [S_0]$
Люминесценция $S_1 \rightarrow S_0 + hv_e$	$v_1 = k_1 [S_1]$
Внутримолекулярное тушение $S_1 \rightarrow S_0 + \text{тепло}$	$v_2 = k_2 [S_1]$
Тушение частицами тушителя $S_1 + Q \rightarrow S_0 + Q$	$v_3 = k_3 [S_1] [Q]$

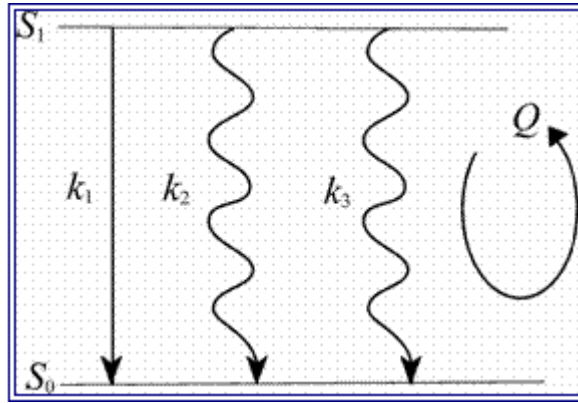


Рис. 9. Возможные пути дезактивации электронно-возбужденной молекулы в присутствии тушителя

При непрерывном облучении световым потоком система частиц (люминофор-тушитель) пребывает в стационарном состоянии. Общее число переходов из возбужденного в основное состояние в единицу времени $(\nu_1 + \nu_2 + \nu_3)$ тогда равно числу квантов света (ν_0) , поглощенных за тот же промежуток времени. Поскольку число излучательных переходов ν_1 равно числу высвеченных квантов люминесценции, то отношение ν_1 к ν_0 или к $(\nu_1 + \nu_2 + \nu_3)$ есть квантовый выход люминесценции в присутствии молекул тушителя:

$$\Phi_{K(Q)} = \frac{k_1}{k_1 + k_2 + k_3 [Q]}$$

Степень тушения люминесценции частицами тушителя выражается уравнением Штерна –Фольмера:

$$\frac{\Phi_K}{\Phi_{K(Q)}} = 1 + \left(\frac{k_3}{k_1 + k_2} \right) [Q] = 1 + K [Q]$$

Где

$$\Phi_K = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \text{ — квантовый выход люминесценции в отсутствии молекул}$$

тушителя;

$$K = \frac{k_3}{k_1 + k_2} \text{ — константа динамического тушения.}$$

Отличительными признаками динамического тушения, помимо сокращения длительности люминесценции молекул люминофора, являются также:

- неизменность спектров поглощения и люминесценции люминофора в присутствии тушителя;
- отсутствие стехиометрии между количествами люминофора и тушителя (т. е. концентрации тушителя и люминофора сильно различаются между собой).

Помимо перечисленных, укажем еще на один отличительный признак динамического тушения. Константа динамического тушения определяется скоростью, с которой молекулы люминофора и тушителя диффундируют друг к другу. Поскольку повышение температуры увеличивает диффузию молекул, то и константа динамического тушения будет возрастать с ростом температуры.

Концентрационное тушение, связанное с миграцией энергии от возбужденных молекул люминофоров к невозбужденным является частным случаем динамического тушения.

Механизмы динамического тушения. Процесс динамического тушения может характеризоваться различными механизмами. Ключевой его стадией является образование электронно-возбужденных комплексов столкновения $L^*...Q$ либо эксиплексов LQ^* . Между комплексами столкновения и эксиплексами существует определенное различие. Компоненты комплекса столкновения удалены друг от друга на расстояние $\sim 0,7$ нм и более и произвольно ориентированы друг относительно друга. Единственным требованием, обуславливающим образование комплекса столкновения, является максимальное перекрытие орбиталей компонентов комплекса. Эксиплекс является образованием, отвечающим минимуму потенциальной энергии возбужденного состояния и имеющим по этой причине определенную геометрию. В частности, в эксиплексах, содержащих ароматические компоненты, молекулы расположены таким образом, что их плоскости оказываются параллельными.

Эксиплексы существуют только в возбужденном состоянии, в основном состоянии они диссоциируют и потому их нельзя обнаружить. Люминесценция эксиплекса не имеет колебательной структуры и располагается в более длинноволновой области, чем люминесценция возбужденных молекул люминофора. Однако эксиплексы не всегда люминесцируют. Если сумма констант скоростей безызлучательных процессов, в которых участвуют эксиплексы, достаточно велика, то такие эксиплексы не люминесцируют. Люминесценцию эксимеров обычно

наблюдает при больших концентрациях люминофора, т.е. в условиях, отвечающих концентрационному тушению.

Связь интенсивности флуоресценции и концентрации

При прохождении потока света через раствор с концентрацией C часть потока поглощается, однако в флуоресценцию преобразуется лишь часть поглощенного света, выражаемая квантовым выходом флуоресценции $\varphi_{\text{фл}}$. Интенсивность флуоресценции $I_{\text{фл}}$ пропорциональна числу квантов флуоресценции:

$$I_{\text{фл}} = \varphi_{\text{фл}} \cdot I_c$$

Интенсивность поглощения света I_c является разностью между интенсивностями падающего света I_0 и прошедшего через слой длиной l (I_t):

$$I_c = I_0 - I_t$$

По закону Бугера-Ламберта-Бера

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l}$$

Следовательно,

$$I_c = I_0 - I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l} = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

$$I_{\text{фл}} = \varphi_{\text{фл}} I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

Если произведение $\varepsilon c l$ невелико и значительно меньше 0.01, то

$$I_{\text{фл}} = 2,3 I_0 \varepsilon l c \varphi_{\text{фл}}$$

Таким образом, интенсивность люминесценции пропорциональна квантовому выходу люминесценции, интенсивности возбуждающего света, коэффициенту поглощения при длине волны возбуждения и концентрации люминофора. Это уравнение является математическим основанием количественного люминесцентного анализа. Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации люминофора часто сохраняет линейный характер в пределах нескольких порядков величины концентрации.

Согласно этому уравнению для разбавленного раствора в определенных условиях эксперимента произведение $2,3 I_0 \varphi_{\text{фл}} \varepsilon l$ – постоянная величина, которую можно обозначить k , тогда

$$I_{\text{фл}} = k \cdot C$$

Линейная зависимость интенсивности излучения от концентрации часто сохраняется в пределах трех-четырёх порядков величин концентрации. Отклонения от линейности обусловлены эффектами внутреннего фильтра и реабсорбцией. Эффект внутреннего фильтра связан с поглощением части возбуждающего излучения посторонними веществами и, связанным с этим,

уменьшением количество фотонов, поглощенных самим люминофором. Это вызывает снижение интенсивности люминесценции.

Под реабсорбцией понимают поглощение квантов люминесценции как самим люминофором, так и посторонними веществами. Если реабсорбция происходит самим люминофором, то интенсивность люминесценции в коротковолновой области спектра заметно ослабляется (рис.10). В тех случаях, когда фотоны люминесценции поглощаются каким-либо посторонним веществом, характер искажений спектра люминесценции будет полностью определяться формой спектра поглощения этого вещества. Эффект реабсорбции увеличивается с возрастанием оптической плотности раствора в области регистрации люминесценции.

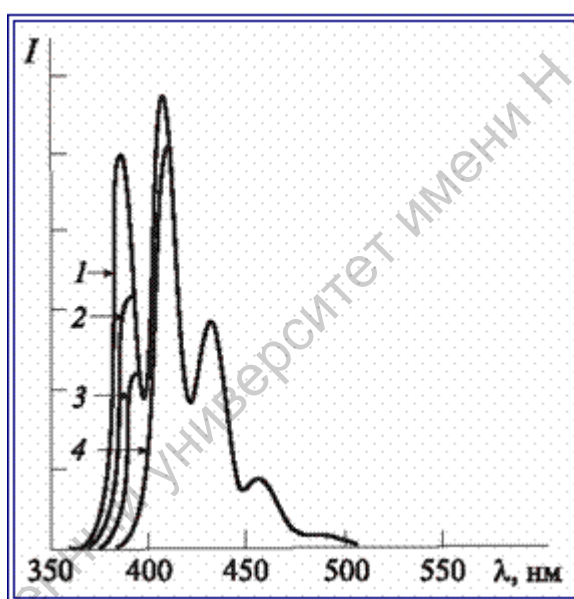


Рис. 10. Изменение спектра флуоресценции раствора антрацена в бензоле, вызванное реабсорбцией коротковолновой полосы при высоких концентрациях (концентрация антрацена возрастает в порядке 1–2–3–4)

Отклонения от линейности вызваны рядом причин:

- невыполнением соотношения $klc \ll 0,05$; явлением концентрационного тушения, ограничивающим верхний диапазон линейности концентраций;
- эффектами внутреннего фильтра — экранирующим эффектом и эффектом реабсорбции.

Первый связан с поглощением части возбуждающего излучения посторонними веществами, вследствие чего уменьшается количество фотонов, поглощенных самим люминофором. Это вызывает снижение интенсивности люминесценции последнего.

Современные фотоумножители позволяют зарегистрировать чрезвычайно низкие интенсивности света, а использование высокоинтенсивный возбуждающий свет позволяет определять крайне низкие концентрации. Из уравнения

$$I_{\text{фл}} = \varphi_{\text{фл}} I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

видно, что спектрофлуориметрия является *более чувствительным* методом, чем спектрофотометрия. В фотометрии фактором, определяющим минимально обнаруживаемую концентрацию, является минимально измеряемая разность между I_t и I_0 : Для достижения высокой чувствительности возникает необходимость в измерении с высокой точностью I . Точность измерения величины $\lg(I_0/I_t)$ не превышает 0.001. Для молекул средних размеров ε редко превышает 10^5 . Подставляя эти значения в уравнение Бугера-Ламберта-Бера, получаем, $C_{\text{мин}} > 10^{-8} \text{М}$.

Чувствительность спектрофлуориметра лимитируется лишь максимальной интенсивностью возбуждающего света, а не точностью, с которой можно измерить интенсивность света (рис.11). В идеальных условиях предельная измеримая концентрация имеет порядок 10^{-12}М .

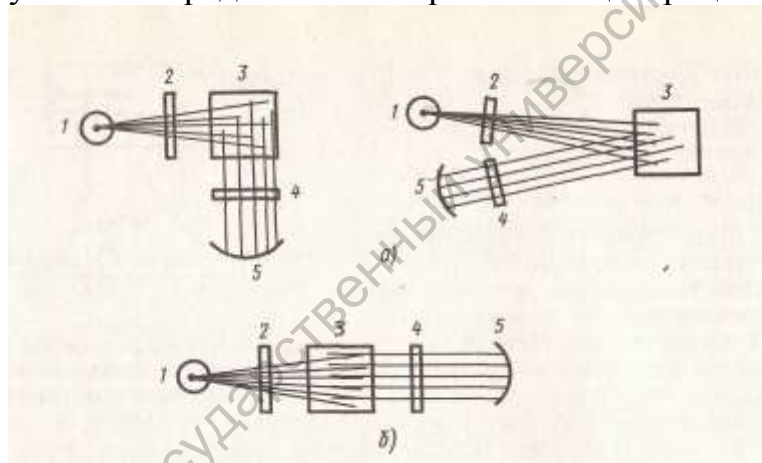


Рис. 11. Способы наблюдения люминесценции: а- способ перпендикулярных пучков; б- фронтальный способ; 1 - источник; 2-первичный светофильтр; 3- кювета с пробой; 4- вторичный светофильтр; 5-детектор

Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав изучаемой смеси. По причинам, изложенным выше, необходимо использовать растворы с низкой оптической плотностью, в противном случае требуется учитывать эффекты экранировки и реабсорбции.

Как и в случае абсорбционной спектрофотометрии, для идентификации флуоресцирующего вещества наибольшее значение имеют положение максимума, наличие и характер тонкой структуры спектров, полуширина полос флуоресценции.

Важная особенность флуоресценции смеси нескольких соединений состоит в том, что спектр смеси изменяется при изменении длины волны возбуждения, поскольку при разных длинах волн могут преимущественно возбуждаться разные соединения.

По цвету свечения и особенно по спектрам люминесценции можно установить присутствие того или иного вещества в пробе. Установить присутствие вещества в пробе по цвету ее свечения или спектру люминесценции – задача непростая. Сложность этой задачи обусловлена тем, что многие вещества обладают одинаковым свечением, а спектры их люминесценции состоят из широких, размытых полос. В этом случае нельзя рассчитывать на успешную идентификацию веществ. Лишь немногие вещества обладают достаточно четкими и характерными спектрами люминесценции, позволяющими надежно установить их присутствие в пробе. К ним относятся соединения урана (VI), лантанидов, бензопирены, порфирины и др. При наличии в пробе нескольких люминофоров обычно проводят процедуру их разделения, используя чаще всего методы экстракции и хроматографии. Селективно возбуждая спектры люминесценции отдельных компонентов, в некоторых случаях удается провести качественный анализ многокомпонентных проб, минуя процедуру предварительного разделения компонентов. На основании изучения спектров люминесценции можно сделать некоторые выводы относительно химической структуры исследуемого вещества, а также проследить за изменением, претерпеваемым веществом во времени. Для обнаружения веществ, не обладающих собственной люминесценцией, используют реакции, приводящие к образованию люминофоров (люминесцентные реакции). Иногда наличие искомого вещества в пробе удается установить по частичному или полному тушению люминесценции вспомогательного люминофора, введенного в пробу.

Приборы для регистрации люминесценции

Для регистрации спектров люминесценции и измерения частот (длин волн) и интенсивностей их монохроматических составляющих применяют люминесцентные спектральные приборы. В этих приборах возбуждение люминесценции осуществляется квантами электромагнитного излучения. Каждый такой прибор обеспечивает выполнение следующих функций: возбуждение люминесценции исследуемого образца; разложение излучения люминесценции на монохроматические составляющие и их

выделение; измерение интенсивности монохроматических потоков. Приборы для измерения молекулярной флуоресценции можно разделить на флуориметры (флуорометры) и спектрофлуориметры.

У флуориметров селекция монохроматических лучистых потоков осуществляется с помощью простейших анализаторов излучения— светофильтров. Использование светофильтров обеспечивает высокий уровень возбуждающего излучения и эффективную регистрацию флуоресценции. При флуориметрических измерениях существенное значение имеет выбор светофильтров. Первичный светофильтр должен пропускать поглощаемое образцом излучение и не пропускать излучение флуоресценции. Вторичный светофильтр должен пропускать излучение флуоресценции, но возбуждающее излучение должно им полностью поглощаться. Подбирая такую пару светофильтров, следует добиваться их хорошей скрещенности: сложенные вместе, они вообще не должны пропускать электромагнитное излучение. Источниками возбуждения у флуориметров являются ртутные лампы низкого давления.

В спектрофлуориметрах селекция монохроматических лучистых потоков осуществляется монохроматорами, а источником возбуждающего излучения служит ксеноновая дуговая лампа высокого давления, испускающая сплошной спектр в УФ-, видимой и ближней ИК-области. Спектрофлуориметры позволяют регистрировать как спектры флуоресценции, так и спектры ее возбуждения. Для получения спектра возбуждения вторичный монохроматор излучения настраивают на частоту (длину волны), соответствующую максимуму флуоресценции, а первичным меняют частоту (длину волны) возбуждающего излучения. Для получения спектров флуоресценции первичный монохроматор излучения настраивают на частоту (длину волны), соответствующую максимуму возбуждения, а вторичным меняют частоту (длину волны) флуоресценции. Существуют модели спектрофлуориметров, у которых первичным анализатором излучения является светофильтр. Такие приборы могут регистрировать лишь спектры флуоресценции.

Кюветы, применяемые при измерении спектров флуоресценции жидких образцов (растворов) представляют собой прямоугольные или треугольные в сечении стаканы или обычные пробирки, изготовленные из оптического кварца. При измерении спектров флуоресценции жидких образцов используют кюветы в виде капилляров или тонких трубок с внутренним диаметром 1–2 мм. Твердые порошкообразные образцы помещают в специальные насыпные кюветы.

В люминесцентных спектральных приборах детекторами излучения, испускаемого оптически возбужденными атомами и молекулами, чаще всего служат фотоумножители, реже — фотоэлементы и фотодиоды.

Флуориметр со светофильтрами. Одно из достоинств метода регистрации люминесценции заключается в том, что для решения многих биологических задач не требуется использование сложных и дорогих приборов. Если не требуется проведения точных спектральных измерений или применения техники исследования быстро протекающих процессов, а требуется измерить интенсивность флуоресценции при возбуждении и регистрации в относительно широкой области спектра, то можно использовать простейший флуориметр со светофильтрами. При измерении люминесценции существенным является выбор светофильтров, необходимых для разделения света, возбуждающего люминесценцию, и света люминесценции. Светофильтр для возбуждения люминесценции должен пропускать свет только в области поглощения исследуемого вещества и не должен пропускать свет в области, в которой образец люминесцирует. Светофильтр для люминесценции должен пропускать люминесценцию, но возбуждающий свет должен полностью им поглощаться. Подбирая такую пару светофильтров, следует добиваться их хорошей *скрещенности*: сложенные вместе эти два светофильтра совсем не должны пропускать свет (рис. 12).

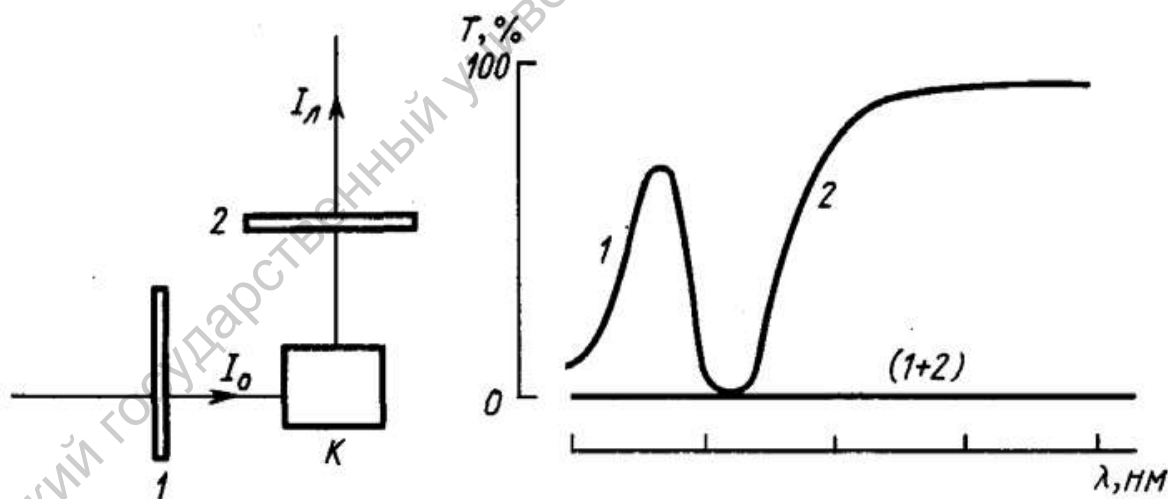


Рис.12. Использование скрещенных светофильтров для измерения люминесценции: K – кювета с образцом; 1 и 2 – светофильтры; $(1 + 2)$ спектр пропускания скрещенных фильтров. Слева: схема прохождения света; справа: спектры пропускания светофильтров.

При перестановке скрещенных светофильтров фототок фотоэлемента или фотоумножителя, обусловленный люминесценцией, должен исчезать. В флуориметре иногда устанавливают одну поляроидную пленку на пути возбуждающего света перед кюветой и две сменные поляроидные пленки после кюветы, которые позволяют расширить возможности эксперимента и

измерить величины *поляризации люминесценции*. Можно изучать *кинетику* процесса, пользуясь проточными кюветами или добавляя растворы в кювету, снабженную мешалкой.

Спектрофлуориметры предназначены для регистрации спектров люминесценции или спектров возбуждения люминесценции. Спектрофлуориметр состоит из двух монохроматоров; один – для выделения монохроматического возбуждающего света, другой – для измерения спектра люминесценции (рис.13). Коммерческие приборы, как правило, снабжены кварцевыми кюветами толщиной 1 см, угол между направлениями возбуждения и люминесценции равен 90° . В качестве источника возбуждающего света в приборе чаще всего используется ксеноновая лампа. Прибор снабжен монохроматорами для выделения отдельной длины волны как возбуждающего, так и испускаемого света. Оба монохроматора снабжены моторами, что обеспечивает автоматическое сканирование по длинам волн. Флуоресценция попадает на фотоумножители и затем количественно измеряется с помощью соответствующих электронных устройств. Выходной сигнал обычно представляется графически на мониторе компьютера или встроенном дисплее (рис.13,14).

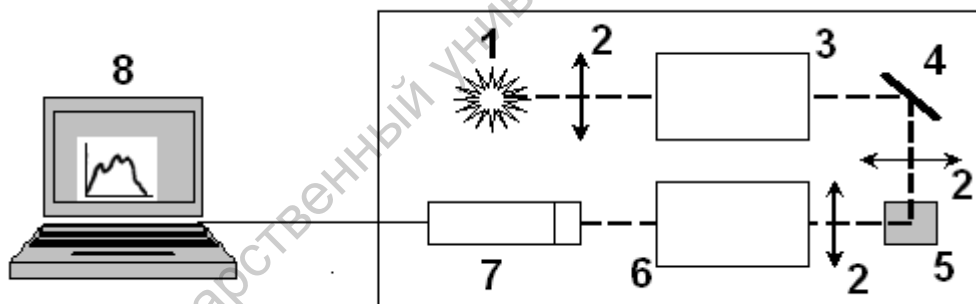


Рис. 13. Блок-схема спектрофлуориметра. 1 – источник возбуждения (лампа), 2 – линзы, 3 и 6 – монохроматор возбуждения, 4 – поворотное зеркало, 5 – кювета с образцом, 6 - монохроматор испускания, 7 – ФЭУ; 8 – система вывода данных.



Рис. 14. Современный спектрофлуориметр LS-55

Такое расположение направления возбуждающего пучка и измеряемого света люминесценции позволяет собирать значительную часть люминесценции и исключить люминесценцию самой кюветы. Такая конструкция предполагает измерение образцов с малой оптической плотностью, которые минимально рассеивают свет.

В образцах с высокой оптической плотностью светится только тонкий слой раствора, примыкающий к передней стенке кюветы, и описанный прибор измеряет лишь малую часть света люминесценции. Чтобы избежать этого, в случае образцов с высокой оптической плотностью нужно использовать тонкие кюветы, а измерение флуоресценции проводить с той стороны кюветы, на которую падает возбуждающее излучение.

При измерении растворов с малой оптической плотностью такая схема измерения спереди не дает преимущества по сравнению с измерением сбоку, поскольку флуоресценция кюветы регистрируется вместе с флуоресценцией раствора и, следовательно, возрастают требования к материалу кювет. При этом увеличение оптической плотности образца не сопровождается снижением интенсивности измеряемой люминесценции (рис. 15).

При измерениях низкой люминесценции возрастают требования к светосиле спектральных приборов, чувствительности приемника света, отсутствию рассеянного света в монохроматоре. Особое внимание следует обращать на возможную люминесценцию кюветы, растворителя и примесей к реактивам.

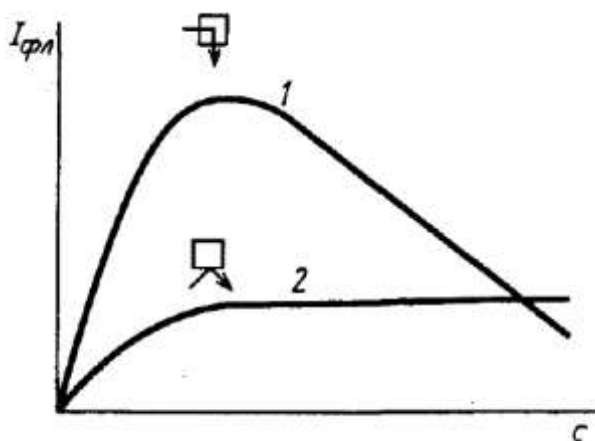


Рис. 15. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации вещества при регистрации с боковой (1) и с передней (2) стенки кювет.

Люминесцентное определение неорганических и органических соединений

Флуориметрия — метод люминесцентного анализа, основанный на измерении спектров флуоресценции. Пределы обнаружения веществ флуориметрическим методом составляют 10^{-9} – 10^{-4} %. Вещества-люминофоры определяют флуориметрическим методом по их собственной флуоресценции. Если определяемые вещества не являются люминофорами, то для их флуориметрического определения используют люминесцентные реакции. Последние должны сопровождаться возникновением или ослаблением флуоресценции. Как и каждая реакция, применяемая в анализе, люминесцентная реакция должна протекать быстро, количественно, быть воспроизводимой и, по возможности, избирательной. При флуориметрическом определении ионов металлов чаще всего используют реакции комплексообразования с органическими реагентами. В идеальном случае применяемые для анализа реагенты не должны флуоресцировать, а образующиеся комплексы, напротив, должны обладать интенсивной флуоресценцией. Молекулы таких реагентов обычно имеют нежесткую структуру и содержат функциональные группировки

К числу таких реагентов, в частности, принадлежит салицилаль-2-аминофенол. Сам он не флуоресцирует, в то же время его хелат с ионом Al^{3+} обладает интенсивной зеленой флуоресценцией. Превращение нефлуоресцирующего органического реагента во флуоресцирующий комплекс объясняют двояко. С одной стороны, это может быть связано с изменением природы синглетного возбужденного состояния S_1 при комплексообразовании. У нефлуоресцирующих веществ состояние S_1 возникает в результате $n-\pi^*$ -перехода, а у флуоресцирующих — при $\pi-\pi^*$ -

переходе. С другой стороны, это может быть следствием приобретения молекулой органического реагента определенной жесткости при комплексообразовании. У нежестких молекул часто наблюдается процесс внутренней конверсии $S_1 \rightarrow S_0$, вызывающий релаксацию энергии электронного возбуждения. У жестких молекул, напротив, вероятность безызлучательных процессов (внутренняя конверсия, колебательная релаксация) мала, а вероятность флуоресценции велика. При флуориметрическом определении органических веществ обычно прибегают к реакциям синтеза органолюминофоров. Для определения анионов часто используют косвенный флуориметрический метод, основанный на тушении люминесценции. Примером такого метода может служить определение иодид-ионов по тушению флуоресценции флуоресцеина.

Общая схема флуориметрического определения включает следующие стадии:

растворение пробы и отделение, в случае необходимости, мешающих компонентов;

проведение люминесцентной реакции (если определяемый компонент является люминофором, то необходимость в проведении реакции отпадает);

измерение флуоресценции раствора, полученного в результате проведения люминесцентной реакции (или раствора пробы, если данная реакция не проводилась);

расчет результата анализа и его метрологическая оценка.

На чувствительность флуориметрических определений существенное влияние оказывает присутствие посторонних веществ. Посторонние вещества могут снижать выход люминесценции либо уменьшать интенсивность свечения люминофора за счет эффекта внутреннего фильтра, понижая тем самым чувствительность определений. Правильный выбор длины волны возбуждающего света позволяет значительно снизить эффект внутреннего фильтра и тем самым увеличить чувствительность флуориметрических определений.

Чтобы достичь максимальной чувствительности, из двух реагентов выбирают тот, который приводит к образованию люминофора, характеризующегося минимальным перекрытием спектров поглощения и излучения. Вероятно, и область линейности градуировочного графика с более чувствительным реагентом будет заметно шире.

Метод флуориметрии применяется для определения Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , U^{3+} , Tl^{3+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} в водных растворах по их собственной флуоресценции. Низкотемпературную флуоресценцию галогенидных комплексов Bi^{3+} , Sb^{3+} , As^{3+} , Se^{4+} , Te^{4+} используют для высокочувствительного и селективного определения этих элементов. Непереходные элементы, а также лантаноиды определяют по флуоресценции их комплексов с 8-оксихинолином, β -дикетонами, основаниями Шиффа, азосоединениями, оксифлавонами, родаминовыми красителями и др. органическими реагентами. Разработаны методы определения порфиринов, витаминов, антибиотиков и других органических веществ по их собственной флуоресценции.

При *анализе смесей* люминофоров обычно проводят процедуру их разделения, используя чаще всего методы экстракции и хроматографии. Однако существует ряд способов, позволяющих избежать этой процедуры.

К их числу относятся способы селективного возбуждения спектров флуоресценции отдельных компонентов путем выбора длины волны возбуждения или использования подходящего сенсibilизатора. Например, используя акридиновый оранжевый в качестве сенсibilизатора замедленной флуоресценции антрацена, определяют содержание антрацена в смеси антрацен – 1,2-бензантрацен – пирен.

Другим способом, позволяющим проводить анализ смесей люминофоров без разделения, является способ *матричной изоляции*. Этот способ предполагает внедрение анализируемого образца в твердую матрицу, которую выбирают с таким расчетом, чтобы она по возможности минимально взаимодействовала с анализируемым образцом. Чаще всего в качестве матриц используют парафиновые углеводороды и азот. Процесс внедрения анализируемого образца в матрицу сводится к кристаллизации его растворов в парафиновых углеводородах при температуре кипения жидкого азота (77 К) или кристаллизации смеси его паров с азотом при температуре кипения жидкого гелия (4,2 К). Молекулы анализируемого образца жестко фиксированы в матрице и не могут свободно вращаться, они практически не взаимодействуют друг с другом и с молекулами матрицы. Все это устраняет причины, вызывающие уширение спектральных полос. В результате спектры флуоресценции многих органических веществ, внедренных в твердую матрицу, значительно упрощаются. Вместо широких диффузных полос появляются узкие линии шириной до 2–10 см^{-1} . Эффект превращения диффузного спектра в квазилинейчатый носит название *эффекта Шпольского*. Благодаря своей специфичности квазилинейчатые спектры нашли широкое применение в анализе. С их помощью удалось разработать высокоселективные и высокочувствительные способы определения многих органических

веществ, в том числе и нефтей. Применение квазилинейчатых спектров позволило повысить чувствительность определения некоторых веществ на два порядка по сравнению с обычным люминесцентным методом и достичь пределов обнаружения 10^{-9} – 10^{-8} %.

Удовлетворительные результаты анализа смесей люминофоров удается получить, используя метод *синхронной* флуориметрии. Суть этого метода заключается в следующем. Если при регистрации спектра флуоресценции смеси люминофоров синхронно с изменением длины волны флуоресценции λ_F менять длину волны возбуждения флуоресценции λ_S , поддерживая постоянной небольшую разность между ними, то можно получить спектр, состоящий из отдельных пиков — синхронный спектр флуоресценции. Пики появляются в той области длин волн, где спектры возбуждения и флуоресценции перекрываются. Интенсивность пика пропорциональна как интенсивности в спектре флуоресценции при длине волны ее регистрации λ_F , так и интенсивности в спектре возбуждения при длине волны λ_S . Оптимальное соотношение между шириной регистрируемого пика и его интенсивностью достигается в том случае, когда величина соответствует разности между максимумами флуоресценции и возбуждения. Интенсивность пика в синхронном спектре флуоресценции пропорциональна концентрации соответствующего компонента. Применяя при анализе смесей люминофоров метод синхронной флуориметрии, удается добиться хорошего разрешения сигналов отдельных компонентов. Метод синхронной флуориметрии позволяет получить хорошие результаты лишь в тех случаях, когда полосы в спектрах имеют отчетливо выраженную колебательную структуру.

Люминесцентные реакции комплексообразования в водных растворах. Эта группа методов относится к непрямым (косвенным) методам. В отличие от прямых люминесцентных методов здесь используется люминесценция комплексных соединений с органическими реагентами. Таким образом, эти методы применимы для веществ, самостоятельно не люминесцирующих.

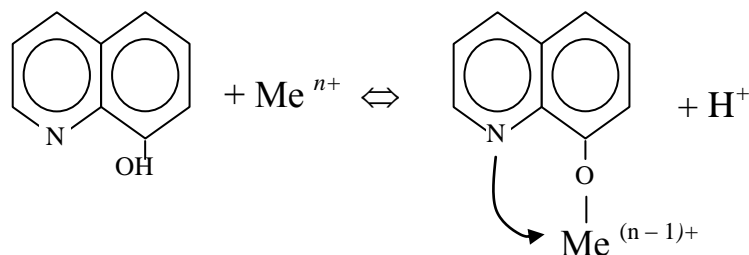
Использование органических реагентов для флуоресцентного определения неорганических ионов основано на трех типах реакций:

- -возникновение люминесценции в присутствии определяемого катиона при использовании нелюминесцирующего реагента;
- -изменение спектра люминесценции реагента в присутствии определяемого катиона;
- -гашение люминесценции реагента в присутствии определяемого катиона.

Все эти реакции обладают очень высокой чувствительностью.

Одними из наиболее распространённых органических реагентов являются 8-оксихинолин и морин. Реакции с катионами основаны на

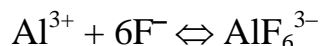
образовании внутрикомплексных соединений. Например, с 8-оксихинолином реакция протекает по схеме:



Стрелкой на схеме показано смещение электронного облака к катиону металла вследствие нескомпенсированности его положительного заряда; в результате происходит образование очень прочных комплексов.

8-оксихинолин дает реакцию 1-го типа, т.е. сам реагент не люминесцирует и люминесценция возникает только в присутствии определенных катионов (Al^{3+} , Be^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Sc^{3+} , V^{3+}), как правило, двух- – четырехзарядных. Этот реагент позволяет определять ионы с высокой избирательностью вследствие высоких значений константы устойчивости $K_{\text{уст}}$ образующихся комплексов. Цвет эмиссии – желто-зелёный при облучении УФ-светом.

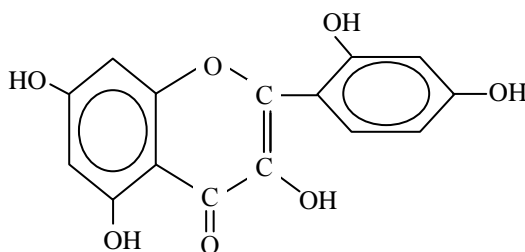
Эти методы позволяют определить и анионы. Например, известна реакция образования анионного комплекса с высоким значением константы устойчивости:



В раствор, содержащий фтор-ион F^- , добавляют известное количество Al^{3+} (с избытком); избыточные ионы Al^{3+} определяют с помощью 8-оксихинолина, который связывает оставшиеся свободные ионы Al^{3+} (значение константы устойчивости фторидного комплекса выше, чем $K_{\text{уст}}$ органического комплекса). Таким образом, косвенно определяют количество фтор-ионов в растворе.

Другой реагент – морин – имеет следующую структурную формулу:

МОРИН



С
дает прочные

катионом морин
комплексы:



Для тория: $\text{Th}[\text{RO}_2(\text{OH})_3]_2$ – константа устойчивости $K_{\text{уст}}=10^{10}$, т.е. морин позволяет проводить люминесцентное определение тория с высокой избирательностью и чувствительностью.

Таблица 1.

Характеристика комплексообразования морина с
с некоторыми ионами

Элемент	Условия реакции	Чувствительность, мкг·мл ⁻¹
Al ³⁺	pH = (3–4)	5·10 ⁻⁴
Be ²⁺	0,035M HCl	10 ⁻³
Zr ⁴⁺	2M HCl	10 ⁻³
Th ⁴⁺	pH=(2,5–5)	4·10 ⁻⁴
F ⁻	pH=5 +избыток Al	10 ⁻³

Собственная люминесценция биомолекул. При облучении различных клеток некоторых животных, растений и микроорганизмов коротковолновым ультрафиолетовым излучением ($\lambda=250-280\text{nm}$), можно зарегистрировать их флуоресценцию, которая объясняется тем, что многие ткани организма содержат витамины, белки и др. вещества, способные флуоресцировать под действием света. Такая флуоресценция биомолекул называется *собственной*. Собственная флуоресценция *живых* тканей определяется, главным образом, свечением белков. Спектры собственной флуоресценции многих клеток имеют сходную форму, но различную интенсивность (рис.16). Разные компоненты одной и той же клетки флуоресцируют неодинаково. Наиболее яркая ультрафиолетовая флуоресценция характерна сократительному аппарату клетки, митохондриям и ядрышкам. В состав клеток животного происхождения входят веществ, люминесцирующих в ультрафиолетовой и в видимой области спектра. По положению спектров люминесценции биомолекул в шкале длин волн их можно разделить на следующие группы: нуклеиновые кислоты, белки, коферменты, продукты окисления и витамины [Е.А.Черницкий, Е.И.Слобожанина. Спектральный люминесцентный анализ в медицине. Минск, Наука и техника, 1989 г.]. Спектры поглощения *нуклеиновых кислот* определяются входящими в их состав пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Люминесценция нуклеиновых кислот в водных растворах очень слаба: квантовый выход люминесценции ДНК, например, составляет около 10^{-4} , а положение максимума флуоресценции 330 – 335 нм. Из аминокислот способны люминесцировать только три ароматических аминокислоты: *триптофан, тирозин и фенилаланин*, максимумы флуоресценции которых в водных растворах приходятся на 348, 303 и 282 нм, а квантовые выходы равны 0,2; 0,21 и 0,04 соответственно. Собственная люминесценция белков лежит в УФ области

спектра и полностью определяется люминесценцией этих трех аминокислот, при этом основной вклад в люминесценцию белков принадлежит триптофану, а в его отсутствие – тирозину, и только в отсутствие их обоих проявляется слабая люминесценция фенилаланина. В клетках человека и животных содержится много белков, в состав которых входят триптофан, тирозин и фенилаланин. Это актин, миозин, ферменты типа дегидрогеназ, фосфатаз, оксидаз, некоторые гормоны, ферменты пищеварительной системы, альбумины и глобулины плазмы крови, и другие вещества. Собственная ультрафиолетовая флуоресценция всех этих белков определяется, главным образом, триптофаном³, что и определяет схожесть спектров люминесценции многих белков и клеток.

В видимой области спектра люминесцируют различные продукты окисления белков и липидов (синяя область спектра с максимумом около 405 нм). Флуоресценция живых тканей в **синей** и **желто-зеленой** областях связана с наличием в клетках восстановленной формы пиридиннуклеотидов (НАД·Н и НАДФ·Н) и окисленной формы флавопротеинов (ФП).

Такие вещества участвуют в процессах окисления жирных кислот и клеточное дыхание. Поэтому практически любые сдвиги в клеточном метаболизме отражаются и на динамике флуоресценции НАД·Н и ФП, что может быть выявлено при люминесцентном анализе живых тканей. Очень важным свойством люминесценции триптофана является смещение максимума его флуоресценции при изменении полярности и жесткости его микроокружения, что позволило разработать **флуоресцентный метод анализа структурного состояния** триптофансодержащих белков как в растворе, так и в составе клетки.

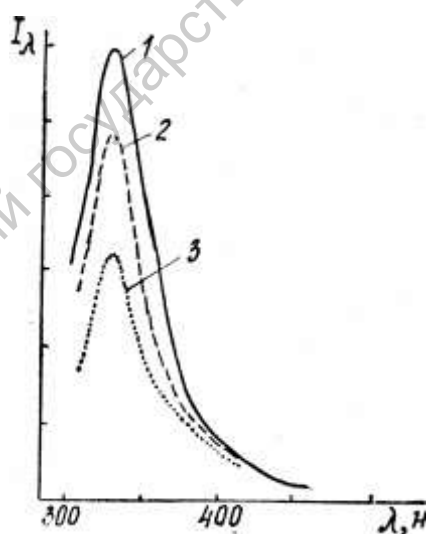


Рис. 16. Спектры ультрафиолетовой флуоресценции мышечных волокон (1), нейронов (2), эритроцитов (3).

Методы определения содержания веществ в люминесцентном анализе. Определение содержания вещества в пробе люминесцентным методом основано на сравнении интенсивности люминесценции пробы и стандартных образцов. Последние должны отвечать ряду требований:

- содержание определяемого вещества в стандартном образце должно быть точно известно;
- химический состав матрицы (основы) стандартного образца должен быть идентичен (или подобен в практически достижимой мере) матрице пробы;
- стандартный образец и проба должны обладать близкими физическими свойствами.

В практике люминесцентного анализа используют как жидкие, так и твердые стандартные образцы. Жидкие стандартные образцы готовят растворением определяемого вещества в подходящем растворителе. При этом в раствор добавляют в необходимых количествах вещества, составляющие основу пробы. Применение люминесценции кристаллофосфоров для определения неорганических веществ связано с использованием твердых стандартных образцов. Как правило, процедура их приготовления трудоемка, требует тщательности и особых мер предосторожности и обычно проводится на специальной аппаратуре.

Для расчета содержания вещества в пробе по результатам люминесцентных измерений чаще всего используют метод градуировочного графика, сравнения и стандартных добавок.

Метод градуировочного графика. В этом методе измеряют интенсивность люминесценции серии стандартных образцов (обычно не менее пяти), охватывающих весь диапазон ожидаемых содержаний определяемого вещества в пробе, и строят график зависимости интенсивности люминесценции от массовой доли определяемого вещества. В идеальном случае градуировочный график должен быть линейным и проходить через начало координат. На практике он оказывается линейным лишь в узком диапазоне содержаний определяемого вещества и редко выходит из начала координат.

Метод добавок. Наиболее простой способ приготовления стандартных образцов, соответствующих пробе по составу матрицы, заключается в использовании метода добавок. Его целесообразно использовать в тех случаях, когда состав матрицы пробы неизвестен или меняется от пробы к пробе. Сущность метода заключается в следующем. Берут три одинаковых образца пробы. Ко второму и третьему образцам добавляют точное количество определяемого вещества. Размеры добавок подбираются с таким расчетом, чтобы содержание определяемого вещества во всех трех образцах пробы после указанной процедуры отвечало соотношению $C_x:(C_x+\Delta c_1):(C_x+\Delta c_2)=1:2:3$, где Δc_1 и Δc_2 – изменение

содержания определяемого вещества, вызванное процедурой добавки. После измерения интенсивности люминесценции всех трех образцов строят график в координатах « $lgI - \Delta c$ ». Содержание определяемого вещества в пробе C_x находят путем экстраполяции графика на значение $lgI = 0$.

Фосфориметрия — метод люминесцентного анализа, основанный на измерении спектров фосфоресценции. Пределы обнаружения веществ фосфориметрическим методом при фотовозбуждении достигают 10^{-7} – 10^{-4} %.

Фосфоресценция органических молекул обусловлена дезактивацией возбужденных триплетных состояний. Время жизни триплетных состояний столь велико (до 100с), что для наблюдения фосфоресценции необходимо зафиксировать молекулу в триплетном состоянии в жесткую матрицу, т.е. иммобилизовать. Иммобилизация уменьшает вероятность безызлучательной дезактивации триплетных молекул посредством соударений и внутренней конверсии. Использование фосфоресценции для определения органических веществ обычно связано с повышением вязкости растворителя при охлаждении растворов анализируемых образцов до температуры их кристаллизации.

Для получения спектров фосфоресценции применяют органические растворители, кристаллизующиеся при низких температурах. Эти растворители должны отвечать следующим требованиям:

- быть химически инертными;
- не поглощать возбуждающий свет и свет фосфоресценции;
- быть хорошими растворителями для проб;
- быть устойчивыми к воздействию мощных световых потоков.

Чаще всего в качестве растворителей используют смеси: этиловый спирт – диметилформамид в соотношениях от 2:1 до 4:1; этиловый спирт – изопентан – диэтиловый эфир в соотношении 1:2:2 или 2:5:5. Указанные растворители кристаллизуются в стеклообразную массу при температуре кипения жидкого азота 77 К. Перед применением из растворителей удаляют водяные пары и воздух. Это позволяет избавиться от кислорода, являющегося сильным тушителем фосфоресценции. Кроме того, в результате указанной процедуры растворители кристаллизуются в однородную массу, лишенную трещин и не обладающую заметным светорассеянием.

Диапазон линейности градуировочного графика в методе фосфориметрии значительно шире, чем в методе флуориметрии. Это обусловлено тремя основными причинами.

1. При 77 К (условия наблюдения фосфоресценции) вероятность безызлучательной дезактивации электронно-возбужденных состояний при столкновениях существенно ниже, чем при комнатной температуре (условия наблюдения флуоресценции).
2. Реабсорбция фосфоресценции, как правило, невелика, т.к. спектр фосфоресценции более удален от спектра поглощения, чем спектр флуоресценции.
3. Для измерения фосфоресценции обычно берут весьма малые количества образца, что позволяет обеспечить равномерное возбуждение его фосфоресценции даже при высокой концентрации люминофора.

В некоторых случаях метод фосфориметрии оказывается более чувствительным, чем метод флуориметрии. Применяя более мощные световые потоки возбуждения и специальные приборы, позволяющие регистрировать фосфоресценцию в отсутствие рассеянного возбуждающего излучения и флуоресценции, удастся значительно усилить сигнал фосфоресценции и, таким образом, повысить чувствительность определений.

Иммобилизации органических молекул, связанная с применением весьма низких температур и требующая специальным образом очищенных растворителей, сложна. Поэтому наряду с ним применяют более простые способы иммобилизации. Фосфоресценцию органических молекул при комнатной температуре удастся наблюдать у проб, адсорбированных на фильтровальной бумаге или других твердых поверхностях — субстратах (подложках). Этот способ иммобилизации доступен для большинства аналитических лабораторий, но его недостатком является значительная величина фонового сигнала, создаваемого подложкой.

Иммобилизация органических молекул при комнатной температуре может быть достигнута с помощью поверхностно-активных веществ, например лаурилсульфата натрия. Солубилизация органических веществ в мицеллу ПАВ способствует защите от столкновений и воздействия каких-либо химических тушителей, повышает «жесткость» фосфоресцирующего центра, в некоторых случаях молекула приобретает способность фосфоресцировать.

Однако следует иметь в виду, что чувствительность определения с использованием поверхностно-активных веществ на один-два порядка ниже, чем при низких температурах.

Другие способы иммобилизации, связанные с введением веществ в стеклообразные (сахарные леденцы, застывающие при комнатной температуре, расплавы борной кислоты) или вязкие (желатина, глицерин) среды, пока не нашли широкого применения в аналитической практике.

Метод фосфориметрии используется для определения полиароматических углеводородов, витаминов, антибиотиков и других органических веществ.

При анализе **смесей** люминофоров используют метод фосфориметрии с временным разрешением. Этот метод применим при условии, что средние времена жизни их возбужденных триплетных состояний довольно сильно различаются между собой. Сущность метода удобнее рассмотреть на примере двухкомпонентной смеси. Кинетика затухания фосфоресценции двух люминофоров описывается суммой двух экспонент. Если результаты измерения затухания фосфоресценции этой смеси представить в виде графика $\lg I - t$, то на полученной кривой можно выделить два линейных участка. Один участок отвечает быстро убывающей экспоненте (I_1), а правый — медленно убывающей экспоненте (I_2). Экстраполируя правый линейный участок кривой на нулевое время, находят величину $\lg I_{0,2}$. Экстраполяция левого участка позволяет найти значение $\lg(I_{0,1} + I_{0,2})$. По найденным значениям $I_{0,1}$ и $I_{0,2}$, используя градуировочные графики, нетрудно найти концентрации компонентов смеси.

Флуоресцентная микроскопия. Поскольку большинство макромолекул представлены в клетках относительно небольшим числом копий, одна или две молекулы красителя, связанные с макромолекулой, могут оставаться незамеченными. Альтернативный подход к проблеме чувствительности состоит в использовании флуоресценции.

Флуоресцирующие красители поглощают свет одной длины волны и излучают свет другой длины волны, более длинной. Если такое вещество облучить светом, длина волны которого совпадает с длиной волны света, поглощаемого красителем, и затем для анализа использовать фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей свету, излучаемому красителем, флуоресцирующую молекулу можно выявить по свечению на темном поле. Высокая интенсивность излучаемого света является характерной особенностью таких молекул.

Применение флуоресцирующих красителей для окраски клеток предполагает использование специального флуоресцентного микроскопа.

Такой микроскоп похож на обычный световой микроскоп, но здесь свет от осветителя, излучаемый мощным источником, проходит через два набора фильтров - один для задержания света перед образцом и другой для фильтрации света, полученного от образца (рис.13).

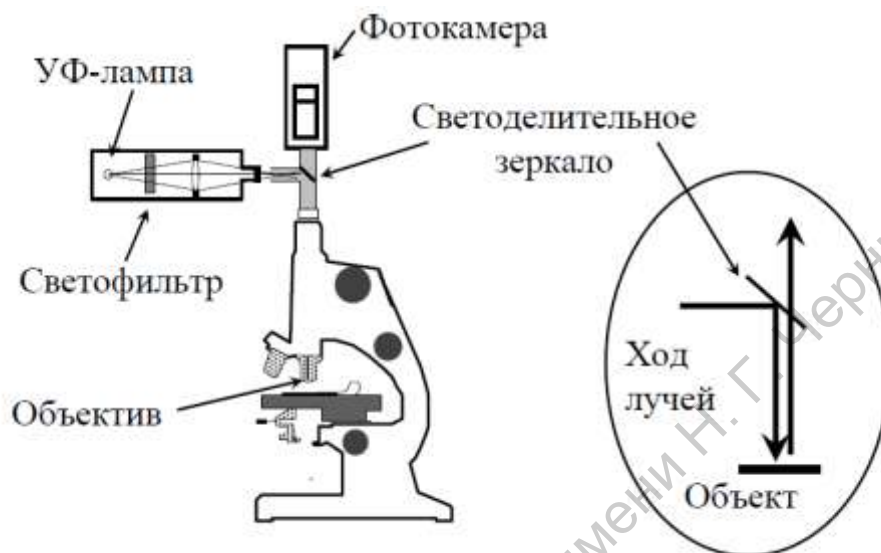


Рис. 13. Флуоресцентный микроскоп

Флуоресцентная микроскопия часто используется для выявления специфических белков или других молекул, которые становятся флуоресцирующими после ковалентного связывания с флуоресцирующими красителями. Например, флуоресцирующие красители могут быть связаны с молекулами антител, что сразу же превращает их в высокоспецифические и удобные красящие реагенты, селективно связывающиеся со специфическими макромолекулами на поверхности живой либо внутри фиксированной клетки. Для этой цели обычно используют два красителя – флуоресцеин, который дает интенсивную желто-зеленую флуоресценцию после возбуждения светло-голубым светом, и родамин, обуславливающий темно-красную флуоресценцию после возбуждения желто-зеленым светом.

Люминесцентный анализ в криминологии и судебной медицине.

Люминесцентный анализ нашел интересное применение в лабораториях **криминологии и судебной медицины**, как тонкое средство экспертизы, позволяющее обнаружить всякого рода подделки, фальсификации и скрытые следы преступлений. При установлении подлинности документов оказывает большую пользу свойство бумаги и тканей различно светиться под действием ультрафиолетового света. Если взять из разных мест десятки образцов белой бумаги и материй, то редко находятся среди них два образца, идентичных по свечению. Под действием черного света интенсивно светятся характерным темно-бурым свечением замытые на материи пятна крови, совершенно невидимые при обычном освещении. Широко применяется также фотографирование в ультрафиолетовых лучах

для обнаружения выцветших, стертых и вытравленных надписей. Люминесцентный метод приходит на помощь экспертам при определении поддельных бриллиантов и при определении подлинности картин.

В судебно-медицинской практике люминесцентный анализ применяется при макроскопическом исследовании кожных покровов, внутренних органов и судебно-медицинских вещественных доказательств, а также при макроскопическом излучении волос, срезов органов и тканей и следов человеческих выделений. Осмотр кожных покровов под ультрафиолетовыми лучами, дополняя осмотр в видимом свете, позволяет более отчетливо выявлять признаки, имеющие судебно-медицинское значение.



Исследование картин в ультрафиолетовых лучах.

Так, на беловато-сероватом фоне свечения кожи ясно обнаруживаются мало заметные при дневном свете татуировки, ссадины, рубцы, а также посторонние флуоресцирующие вещества.

Небезынтересно применение в криминалистике метода метки вещей и хранилищ порошками с целью выявления хищений. Значительное разнообразие веществ, способных флуоресцировать ярким светом, позволяет найти порошки, которые, будучи нанесены на предметы, остаются незаметными. Между тем под ультрафиолетовыми лучами они легко определяются и на вещах, и на руках человека, с ними соприкасавшегося.

Экспериментальная часть

Флуориметрическое определение алюминия с морином. В основе определения лежит реакция образования комплекса алюминия с морином. В водно-спиртовой среде (40-60% по объему спирта) при pH 3-6 при УФ-облучении мориновый комплекс алюминия дает зеленую флуоресценцию, спектр которой характеризуется $\lambda=510-530$ нм.

Цель работы: изучить спектр люминесценции моринового комплекса алюминия и провести определение алюминия в пробе.

Посуда: пробирки, емкостью 25 мл, пипетки на 10 мл, пипетки на 2

мл, пипетки на 1 мл, кювета толщиной светового пути 1 см.

Реактивы: стандартный раствор соли алюминия 10 мкг/мл Al^{3+} ; 0,01% -ный раствор морина в этаноле; этанол; ацетатный буферный раствор pH 4.0.

Порядок выполнения работы.

1. Ознакомьтесь с установкой для флуориметрического определения.
2. Изучите зависимость интенсивности флуоресценции комплексного соединения от длины волны возбуждения, варьируя ее в диапазоне 300-500 нм. Т.е. получите спектр возбуждения комплекса алюминия с морином. Определите длину волны возбуждения, при которой наблюдается наибольшая интенсивность флуоресценции комплекса.
3. Постройте градуировочный график для флуориметрического определения алюминия в оптимальных условиях: при длине волны возбуждения, соответствующей максимальной флуоресценции комплекса алюминия с морином.
4. Проведите определение алюминия в предложенной пробе.

Изучение спектра флуоресценции моринового комплекса алюминия. В одну пробирку последовательно вносят 2 мл стандартного раствора алюминия, 2 мл спирта, 1 мл буферного раствора, 1 мл раствора морина. В другую – все растворы, кроме соли алюминия. Общий объем довести до 10 мл водой. Приготовленные растворы тщательно перемешать и через 10 мин в кювету перенести, предварительно ополоснув ее исследуемым раствором, поместить в кюветную камеру. Через 10 мин в интервале длин волн 460-600 нм измерить интенсивность флуоресценции в относительных единицах. Затем изучить интенсивность эмиссии холостого раствора от длины волны. Длина волны, при которой наблюдается максимальное свечение комплекса, принимается за рабочую.

Построение градуировочного графика. В пробирки вносят последовательно 1, 2, 3, 4, 5 мл стандартного раствора соли алюминия, 2 мл спирта, 2 мл буферного раствора, 1 мл морина. Общий объем доводят водой до 10 мл, растворы перемешивают и через 10 мин измеряют интенсивность при выбранной длине волны. Строят график в координатах $I_{отн}-C$, мкг/10 мл

Определение концентрации алюминия. К полученному у преподавателя раствору пробы прилить 2 мл спирта, 2 мл буферного раствора, 1 мл морина. Общий объем доводят водой до 10 мл, измерить интенсивность свечения, определить концентрацию алюминия в предложенной пробе.

Контрольные вопросы для допуска к выполнению лабораторной работы:

1. Устройство спектрофлуориметра и принцип его работы.
2. Методика проведения лабораторной работы.

3. Порядок приготовления стандартных и анализируемых растворов, используемых в работе.

4. Техника безопасности при проведении лабораторной работы.

5. Порядок представления результатов анализа.

Составление отчета

Предоставляемый для отчета материал

1: Спектры возбуждения комплекса алюминия с морином

2: Спектры люминесценции комплекса алюминия с морином в оптимальных условиях возбуждения

3: Зависимость максимальной интенсивности люминесценции комплекса алюминия с морином от концентрации алюминия.

4. Выводы

Используемая литература:

1. Основы аналитической химии / под ред. Ю.А. Золотова. – Кн. 1–2. – М.: Химия, 2004.
2. Гришаева Т.И. Методы люминесцентного анализа: Учебное пособие для вузов. СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2003. 226 с. +илл.
3. Лещенко В.Г. Введение в спектральный и люминесцентный анализ. Учебно–методическое пособие. Мн.: БГМУ, 2002.– 37 с.
4. Кудряшева Н.С., Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н. Физико - химические основы биолюминесцентного анализа. Учеб.пособие. Краснояр. гос.ун-т. - Красноярск, 2002. - 154 с.

СОДЕРЖАНИЕ	стр
Введение	3
Основные принципы и определения	3
Тушение флуоресценции	15
Связь интенсивности люминесценции и концентрации люминофора	23
Приборы для измерения люминесценции	26
Люминесцентное определение неорганических и органических соединений	31
Экспериментальная часть	43
Используемая литература	45
Содержание	46