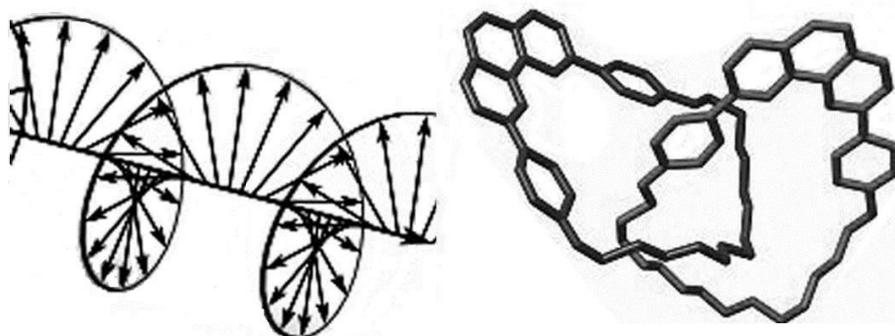


В.С. Сибирцев

**Экспериментальные методы исследования
физико-химических систем**

Часть 3. Молекулярная спектроскопия

Учебное пособие



Санкт-Петербург
2016

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

В.С. Сибирцев

**Экспериментальные методы исследования
физико–химических систем**

Часть 3. Молекулярная спектроскопия

Учебное пособие

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

Санкт–Петербург
2016

Сибирцев В.С. Экспериментальные методы исследования физико–химических систем. Часть 3. Молекулярная спектроскопия: Учебное пособие. - СПб: Университет ИТМО, 2016. - 79 с.

Данное пособие соответствует программе дисциплины Б.3.1.11 «Экспериментальные методы исследования» студентов–бакалавров, обучающихся по направлению 16.03.01. «Техническая физика» и образовательным программам «Нефтехимия и аналитическое приборостроение», «Лазерная инженерия», «Теплофизика», «Световая инженерия» и содержит основные теоретические разделы вышеупомянутой дисциплины; примеры решения типовых задач, тестовые задания, справочные данные; а также описание лабораторных работ к данным разделам; и предназначено для самостоятельной работы студентов по дисциплине Б.3.1.11.

При этом, в 1-й части данного пособия были рассмотрены основы современной теории строения вещества и физико–химических превращений, протекающих в одно- и многокомпонентных системах, включающих различные вещества и материалы. Во 2-й части данного пособия рассматриваются основные методы элементной спектроскопии.

А в настоящей 3-й части данного пособия рассматриваются основные методы молекулярной спектроскопии, применяемые в современных экспериментальных исследованиях различных физико–химических систем.

Рекомендовано к печати Ученым советом Университета ИТМО, протокол № 2 от 25.01.2016 года



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2016
© В.С. Сибирцев, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
10. Молекулярная адсорбционная спектроскопия	5
10.1. Молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ в «видимой» области спектра (ВдМАСА)	6
10.2. Устройства, используемые для ВдМАСА	17
10.3. Инфракрасный молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ (ИкМАСА)	24
11. Молекулярный эмиссионный спектрофотометрический анализ (МЭСА)	33
11.1. Методы прямого МЭСА	33
11.2. Индикаторные методы МЭСА	54
Список литературы	76

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Экспериментальные методы исследования» является важной составляющей в системе знаний, умений и навыков, которые необходимо получить студентам–бакалаврам специальности 16.03.01.

В результате её освоения студенты должны получить теоретическое и практическое представление об основных современных методах экспериментальных исследований, включая:

- основы современной теории строения вещества и физико–химических превращений, протекающих в одно- и многокомпонентных системах, включающих различные вещества и материалы (*включая представления о строении атомов, молекул и их агрегатов; об основных типах внутри- и межмолекулярных химических связей; о строении и основных свойствах молекулярных и коллоидных растворах; об основах химической термодинамики, химии равновесных систем и химической кинетики и т.п.*);
- основы количественного и качественного химического анализа;
- основные современные способы пробоподготовки, применяемые в физико–химическом анализе (*включая специфическую и неспецифическую сорбцию, фильтрацию, минерализацию, упаривание, седиментацию, сепарацию, перегонку, ректификацию, экстракцию, перекристаллизацию, хроматографическое и электрофоретическое разделение и т.п.*);
- основные оптические методы, применяемые в современных экспериментальных исследованиях (*включая атомно–адсорбционную и атомно–эмиссионную спектроскопию, молекулярную адсорбционную фотометрию в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра; люминесцентный анализ; спектроскопию внутреннего отражения и комбинационного рассеяния; рефрактометрию; турбидо- и нефелометрию; различные виды поляриметрии, микроскопии и т.п.*);
- основные электрохимические методы, применяемые в современных экспериментальных исследованиях (*включая потенциометрию, вольтамперометрию, кондуктометрию, кулонометрию, масс–спектрометрию и т.п.*);
- другие современные экспериментальные методы физико–химического анализа (*включая реометрию, радиометрию, ядерно–магнитный и парамагнитный резонанс, диэлектрическую спектроскопию, атомно–силовой, элементный рентгено–флуоресцентный и рентгено–структурный анализ; различные биохимические и биологические методы исследования и т.п.*).

При этом студенты должны научиться:

- формулировать и трактовать основные законы и понятия экспериментального физико–химического анализа;
- понимать сущность основных процессов и устройство приборов, используемых в настоящее время в экспериментальном физико–химическом анализе;
- практически осуществлять различные виды физико–химического анализа и грамотно интерпретировать получаемые при этом результаты.

10. МОЛЕКУЛЯРНАЯ АДсорбЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Как уже говорилось, если молекулы вещества, составляющего образец, предварительно разделить на атомы (*термическим или иным способом*), то адсорбционные и эмиссионные спектры этих атомов будут линейчатые, то есть представлять собой совокупность более темных по отношению к фону (*для спектров поглощения или самообращенных линий в эмиссионных спектрах*) или светлых (*в эмиссионных спектрах*) полос с разной интенсивностью (*и шириной*) при нескольких длинах волн, строго определяемых (*хотя и по-разному для адсорбционных и эмиссионных спектров*) для каждого химического элемента разностью энергий разрешенных переходов их внешних (*валентных*) электронов из основного состояния в возбужденное (*для адсорбционных спектров*) и обратно (*для эмиссионных спектров*). Такие линейчатые спектры легко анализировать. Однако с их помощью можно определить только элементный состав анализируемого образца, т.е. из атомов каких химических элементов и в каком количестве состоят молекулы вышеупомянутого образца.

Для того же, чтобы результаты анализа учитывали то, как вышеупомянутые атомы непосредственно соединены между собой в молекулах, необходимо применение молекулярных методов спектроскопии, в которых образец, не разделяя на атомы, как правило, подвергают воздействию какого-либо внешнего (*по отношению к образцу*) полихроматического, неполяризованного электромагнитного излучения.

Исключение при этом составляют случаи применения лазерной или светодиодной спектроскопии; либо использования дополнительных устройств, пропускающих только определенным образом поляризованный свет (*о чём подробнее будет рассказано в разделе 12.1*); либо применения в молекулярном спектроскопическом анализе явлений хемо-, био-, электро-, соно- и т.п. люминесценции (*о чём подробнее будет рассказано в разделе 11*).

10.1. Молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ в «видимой» области спектра (*ВдМАСА*)

В методе ВдМАСА образец без разрушения на отдельные атомы облучают, как правило, полихроматическим, неполяризованным светом из ближнего ультрафиолетового, видимого или ближнего инфракрасного областей спектра (*которые мы в дальнейшем для краткости будем называть просто «видимым» диапазоном*).

При этом, молекулы разных веществ (*либо одного и того же вещества, но в разных изомерных, аллотропных, по-разному ионизированных, связанных с другими молекулами и т.п. состояниях*), также как и атомы разных химических элементов, избирательно поглощают фотоны с разными длинами волн (*определяемыми разрешенными для данного вида молекул переходами их внешних валентных электронов из основного состояния в возбужденное*).

Но получаемые при этом молекулярные электронные адсорбционные спектры (МЭАС), в отличие от атомарных, как правило, широкополосные и мало структурированы. Происходит это потому, что вышеозначенные МЭАС

определяются совокупностью значительно большего количества электронных переходов, разрешенных в анализируемых молекулах.

А кроме того, энергия, необходимая для каждого такого перехода (E_{Π}), уже не точно определяется разностью энергий возбужденного и основного состояний электрона (E_A), как в случае вещества, находящегося в атомарном состоянии – а больше оной на некоторый диапазон величин ($E_{\Pi} = E_A + \Delta E$), определяемый тем, что часть энергии поглощенного фотона расходуется на увеличение тех или иных колебательных друг относительно друга и вращательных движений атомов и групп атомов в молекуле.

Это явление называется «расщеплением энергии электронных переходов по колебательным и вращательным подуровням» или *(в случае разделения широкополосного пика на несколько более узкополосных)* «проявлением тонкой колебательной структуры молекулярных электронных спектров» *(вращательную составляющую в этом случае не упоминают – поскольку её проявление значительно менее заметно – из-за того, что требует значительно меньших энергий)*.

Вследствие того, ВдМАСА используется, в большей мере, для определения концентрации тех или иных веществ в образце *(в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера, определяющем прямую линейную зависимость величины поглощения образцом света с заданной длиной волны λ от концентрации в этом образце вещества, наиболее интенсивно поглощающего при данной λ , и длины оптического пути света в образце)*, чем для их идентификации *(см. рис.10.1.1)*.

Однако, поскольку не все вещества обладают значительной оптической активностью или образуют оптически активные комплексы с определёнными реагентами в определённых условиях, а кроме того, максимум поглощения каждого вещества в том или ином его состоянии всё же ограничен определённым диапазоном длин волн – то ВдМАСА в ряде случаев используют также и для качественного анализа присутствия в пробе различных веществ.

При этом следует учитывать, что значительно увеличить чувствительность и избирательность ВдМАСА можно за счёт предварительного хроматографического или электрофоретического разделения анализируемой пробы, специфической сорбции с последующим экстрагированием определяемых веществ, перегонки, перекристаллизации и других методов предварительной пробоподготовки, которые будут описаны в следующих частях данного пособия.

Также электронные молекулярные спектры поглощения могут быть сужены или даже расщеплены на несколько более узких пиков при охлаждении образцов; либо в случае, когда достаточно высокомолекулярное анализируемое вещество помещается в растворитель с низкой диэлектрической проницаемостью *(пропанол, бутанол, гексан, октан, декан и т.п.)*, «изолирующий электронное взаимодействие» различных фрагментов анализируемых молекул.

Кроме того, чувствительность и избирательность молекулярного спектрального анализа может быть существенно повышена за счёт применения косвенных методов фотометрии, использующих дополнительные реагенты *(фотопреципитаторы)*, при специфическом взаимодействии которых с

анализируемыми веществами светопоглощение образца существенно увеличивается, уменьшается или сдвигается по максимуму в другую область длин волн.

Для определения неорганических веществ (или ионов) в молекулярной фотометрии чаще всего используют реакции образования или разрушения окрашенных комплексных соединений. Для фотометрического определения органических веществ (а также некоторых неорганических таких например, как сульфиды или нитриты) чаще всего используют реакции синтеза с их участием каких-либо окрашенных соединений (см. рис.10.1.2 и рис.10.1.3). Помимо этого, достаточно часто в косвенном молекулярном фотометрическом анализе применяют реакции окисления или восстановления с участием анализируемых веществ и каких либо дополнительных к ним реагентов (перманганатометрия, хроматометрия и т.п.; см. рис.10.1.4).

Также с помощью методов как прямой, так и косвенной молекулярной фотометрии нередко исследуют кинетику протекания различных химических реакций (см. рис.10.1.5). При этом, кинетические методы могут быть использованы, в том числе, и для значительного повышения чувствительности такого анализа. Так, например, определяемое вещество (или ион) может вводиться в некоторую систему в качестве катализатора. В результате чего, каждая частица определяемого вещества в ходе катализируемой ею реакции приводит к появлению в системе или удалению из неё большого количества других светопоглощающих (или светоизлучающих) частиц.

Но при этом нужно учитывать, что при разных значениях рН, а также в присутствии примесей и вспомогательных веществ, при смене растворителя и т.п. – может измениться оптическая плотность фона; а также могут образовываться (или разрушаться) либо разные количества светопоглощающих (или светоизлучающих) веществ; либо даже разные такие вещества.

Так, например, при взаимодействии ионов 3-валентного железа с сульфосалициловой кислотой (H_3Sal) (комплексобразовательная фотометрия) – ни Fe^{3+} , ни H_3Sal сами по себе в видимой области активно свет не поглощают. А вот их комплексы поглощают свет весьма активно. Но образуются при разных рН в разном виде и с максимумами поглощения при разных длинах волн. А именно:

при рН от 1,8 до 2,5 $\text{Fe}^{3+} + \text{Sal}^{3-} \rightarrow \text{FeSal}$, $\lg\beta=14,4$
(где β – константа устойчивости светопоглощающего комплекса),
цвет получающегося раствора фиолетовый;

при рН от 4,0 до 8,0 $\text{Fe}^{3+} + 2\text{Sal}^{3-} \rightarrow [\text{Fe}(\text{Sal})_2]^{3-}$, $\lg\beta=25,2$,
цвет получающегося раствора бурый;

при рН от 8,0 до 11,5 $\text{Fe}^{3+} + 3\text{Sal}^{3-} \rightarrow [\text{Fe}(\text{Sal})_3]^{6-}$, $\lg\beta=32,3$,
цвет получающегося раствора желтый.

Или при взаимодействии ионов 2-валентной меди со щелочами могут последовательно проходить следующие реакции, характерные для осадочной фотометрии: $\text{CuSO}_4 + 2\text{NaOH} = \text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow + \text{Na}_2\text{SO}_4$,
что приводит к образованию из бледно-голубого прозрачного разбавленного раствора CuSO_4 синего хлопьевидного осадка $\text{Cu}(\text{OH})_2$,



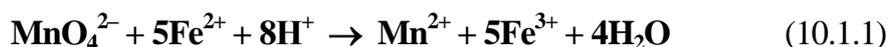
что приводит к растворению осадка $\text{Cu}(\text{OH})_2$ с образованием ярко-синего прозрачного раствора тетрагидроксокупрата(II) натрия,



что приводит к замещению в комплексном соединении меди гидроксо-групп на амино-группы с образованием гидроксида тетраамминмеди (II).

Или при взаимодействии перманганата калия (KMnO_4) с Fe^{2+} (подобно как и со множеством других органических и неорганических восстановителей) при разных pH пробы происходят следующие реакции, характерные для окислительно-восстановительной перманганатометрии:

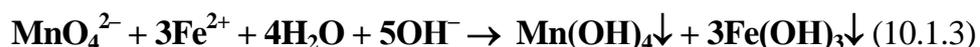
при $\text{pH} < 7$



в результате чего красный раствор KMnO_4 обесцвечивается, оставаясь прозрачным; при $\text{pH} \sim 7$



в результате чего красный раствор KMnO_4 обесцвечивается с выпадением бурых осадков MnO_2 и $\text{Fe}(\text{OH})_3$; при $\text{pH} > 7$



в результате чего зеленый раствор KMnO_4 обесцвечивается с выпадением бурых осадков $\text{Mn}(\text{OH})_4$ и $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

Для учета влияния фона во всех этих случаях применяют как методы внешнего стандарта или добавок (рассмотренные во «Введении»), так и метод разбавлений (при осуществлении которого известное количество анализируемой пробы разбавляют известным количеством воды или другого вещества, слабо поглощающего свет в анализируемом спектральном диапазоне – после чего сравнивают аналитические сигналы, полученные от неразбавленной и разбавленной проб методами прямой или косвенной фотометрии), метод опорной спектральной линии и т.п.

При этом для иллюстрации алгоритма действий при осуществлении метода опорной спектральной линии можно привести пример определения совместного присутствия в водном растворе полинуклеотидов и белков (с чувствительностью до нескольких мкг/мл по каждому) из руководства к спектрофотометру «UNICO 2804», которое предлагает измерять поглощение анализируемого раствора при 3-х длинах волн (260, 280 и 320 нм либо 230, 260 и 280 нм); после чего определять искомые концентрации как:

$$C_{\text{ДНК}} (\text{мкг/мл}) = 62,9 \times (A_{260} - A_{320}) - 36,0 \times (A_{280} - A_{320})$$

$$\text{и } C_{\text{БЕЛКА}} (\text{мкг/мл}) = 1552 \times (A_{280} - A_{320}) - 757,3 \times (A_{260} - A_{320});$$

$$\text{либо } C_{\text{ДНК}} (\text{мкг/мл}) = 49,1 \times (A_{260} - A_{320}) - 3,48 \times (A_{230} - A_{320})$$

$$\text{и } C_{\text{БЕЛКА}} (\text{мкг/мл}) = 183 \times (A_{230} - A_{320}) - 75,4 \times (A_{260} - A_{320}).$$

Здесь A – коэффициенты поглощения анализируемого раствора при соответствующих длинах волн. A_{320} нм используется в качестве опорной длины волны, при которой поглощение анализируемого раствора принимается за фоновое.

Важным дополнением к основному закону светопоглощения является также правило аддитивности – согласно которому суммарная оптическая плотность раствора равна сумме оптических плотностей всех его, не взаимодействующих друг с другом поглощающих компонентов:

$$A_{\Sigma} = l \cdot \sum \varepsilon_i C_i.$$

Это правило обычно используется в тех случаях, когда пики поглощения нескольких компонентов образца значительно перекрываются, в то время как необходимо определить концентрацию каждого из них. В таком случае измеряют оптическую плотность образца при нескольких различных концентрациях определяемых веществ (*получаемых различными разбавлениями исходной пробы или добавками в пробу различных заранее известных их концентраций*) и составляют систему линейных уравнений, решением которой и определяют концентрацию каждого из анализируемых веществ. Более подробно эта методика рассмотрена в подписи к рис.10.1.6.

Кроме того, нужно учитывать, что достаточная точность ВДМАСА может быть достигнута только в определенном диапазоне оптических плотностей. Так что, если таковая плотность у анализируемого образца слишком высока, то концентрацию оптически активного вещества в нём необходимо уменьшить путем разбавления пробы.

А если оптическая плотность образца слишком мала – нужно:

(1) либо увеличить концентрацию определяемого вещества в пробе (*например, путём экстрагирования его в другой растворитель или другими способами, которые будут описаны далее в разделе «Методы дополнительной пробоподготовки»*);

(2) либо изменить условия анализа (*температуру, рН, ионную силу раствора и т.п.*) так, чтобы оптимальным образом изменить химическую форму и другие характеристики светопоглощающих веществ в образце;

(3) либо подобрать реагент, который будет образовывать с определяемым веществом более оптически активный комплекс;

(4) либо увеличить коэффициент умножения фотодетектора (*хотя при этом, как правило, ухудшается отношение величины аналитического сигнала к фону*).

Либо применить один из нижеприведенных специальных способов, используемых при измерении слабых световых потоков:

(1) визуальная фотометрия (*в которой при выравнивании механическими или оптическими средствами яркости двух полей сравнения используется способность человеческого глаза ощущать различия в яркости*).

(2) кюветы с увеличенной длиной оптического пути, за счёт прямоугольного сечения (*а не квадратного, как в стандартном варианте*), увеличенного объема, отражающего покрытия (*позволяющего свету от внешнего источника многократно проходить через один и тот же объем образца*) и т.п.

(3) проточные кюветы (позволяющие анализировать значительно больший объем пробы, чем в случае использования обычных кювет с фиксированным объемом пробы).

(4) лидары, в которых источник и приемник излучения могут быть разнесены на многие метры или даже километры (за счёт чего также увеличивается длина оптического пути).

(5) светофильтры или монохроматоры с увеличенной шириной спектральных щелей (для аппаратного интегрирования поглощения или пропускания образца по достаточно большому диапазону длин волн, хотя при этом и может ухудшиться избирательность анализа) и т.п.

(6) накопление фонового и аналитического сигналов, за счёт множественного их считывания с одного и того же образца (что увеличивает отношение суммарного аналитического сигнала к суммарному фоновому его значению).

Также в ряде случаев, помимо стандартных жидкостных, в фотометрии используются: герметичные или проточные газовые кюветы;

+ держатели оптически прозрачных пленок и кристаллических образцов;

+ такие специальные виды кювет, как: термостатируемые (электрически или потоком внешнего теплоносителя), капиллярные и т.п.

Для иллюстрации вышесказанного ниже приведены следующие рисунки.

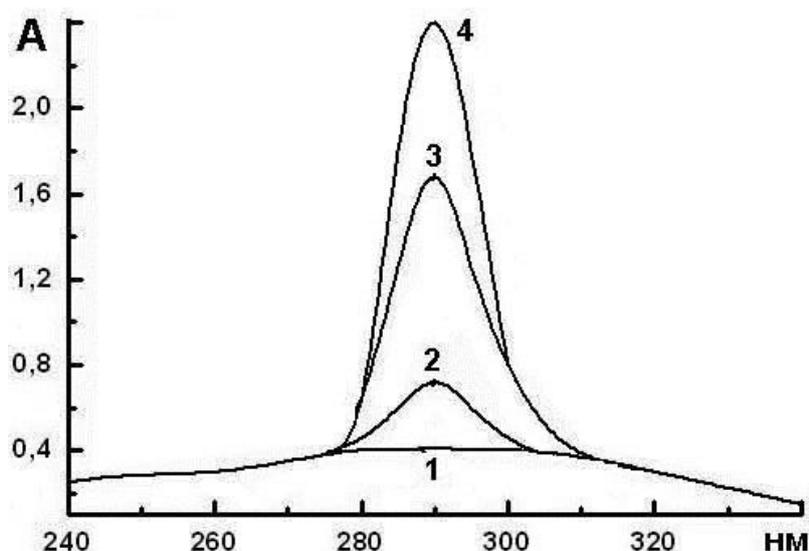


Рисунок 10.1.1 - Прямой ВдМАСА. Спектры светопоглощения в ближней ультрафиолетовой области водных растворов с концентрациями молочного белка казеина: 0.01, 0.3, 0.7 и 1 масс. % (кривые 1–4, соответственно).

При этом, по оси ординат отложены значения оптической плотности (A), полученные для исследованных растворов относительно дистиллированной воды на спектрофотометре «UNICO-2804» при установленной спектральной ширине монохроматора 1 нм и стандартной 10 мм кювете; а по оси абсцисс — длина волны поглощаемого света.

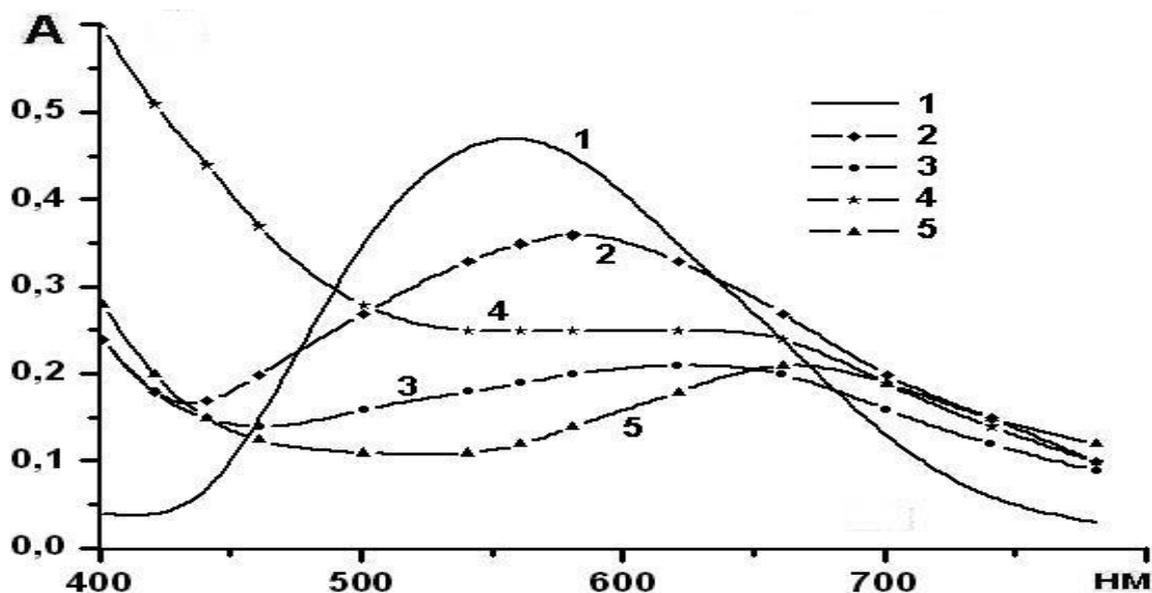


Рисунок 10.1.2 - Косвенный комплексообразовательный ВдМАСА.

Спектры светопоглощения в видимой области водных растворов с концентрациями молочного белка казеина: 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 и 0.001 масс. % (линии 1–5), – в присутствии 0.4 М NaOH и 0.005 М CuSO₄. В результате чего, в анализируемых растворах протекает специфическая биуретовая реакция, приводящая к образованию активно поглощающих свет в видимой области спектра комплексов меди с пептидными белковыми связями (притом, что сами белки в видимой области спектра свет практически не поглощают).

Обозначения по осям на рис.10.1.2 те же, что и на рис.10.1.1.

Отсюда мы видим, что осуществляя биуретовую реакцию, в водном растворе, содержащем 0.4 М NaOH и 0.005 М CuSO₄, о концентрации белка можно судить по поглощению данного раствора при 550 нм (которое пропорционально увеличивается при увеличении содержания белка в анализируемом растворе более 0,2 масс. %), в случае, если соблюдается условие: $A_{550} > A_{440}$. При этом, если $A_{550} > 4$ – пробу следует разбавить и измерить её поглощение при 550 и 440 нм снова. А если $A_{440} > A_{550}$ – можно утверждать, что концентрация белка в пробе меньше 0,2 масс.% (либо иного значения, полученного для конкретного вида белка по предварительно построенной калибровке). И если нужно получить точное значение этой концентрации – пробу следует разбавить на 10÷15%. После чего, определить увеличилось или уменьшилось её поглощение при 400 нм. И дальше оценивать концентрацию белка в пробе по соответствующей калибровке (нисходящей или восходящей для разных диапазонов концентраций белка по поглощению раствора при 400 нм).

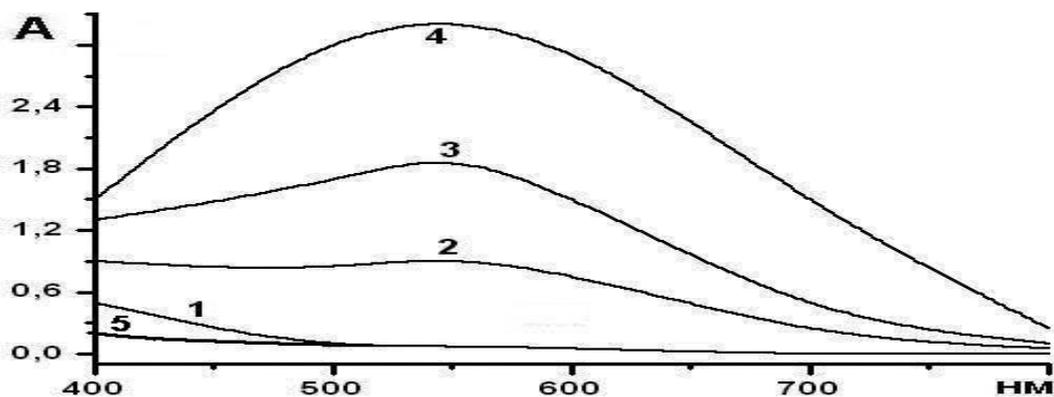


Рисунок 10.1.3 - Косвенный комплексообразовательный ВдМАСА. Спектры светопоглощения в видимой области водных растворов с концентрациями крахмала: 0,001 (линии 1 и 5), 0,02, 0,06 и 0,2 масс. % (линии 1–3) в присутствии 10^{-9} (линия 5) и 10^{-3} (линии 1–4) моль/л I_2 (используемого, в данном случае, в качестве специфического фотометрического индикатора – образующего с крахмалом, в свободном виде в водорастворенном состоянии весьма слабо поглощающим свет в видимой области спектра, активно поглощающие и рассеивающие видимый свет комплексные соединения). Обозначения по осям те же, что и на рис.10.1.1.

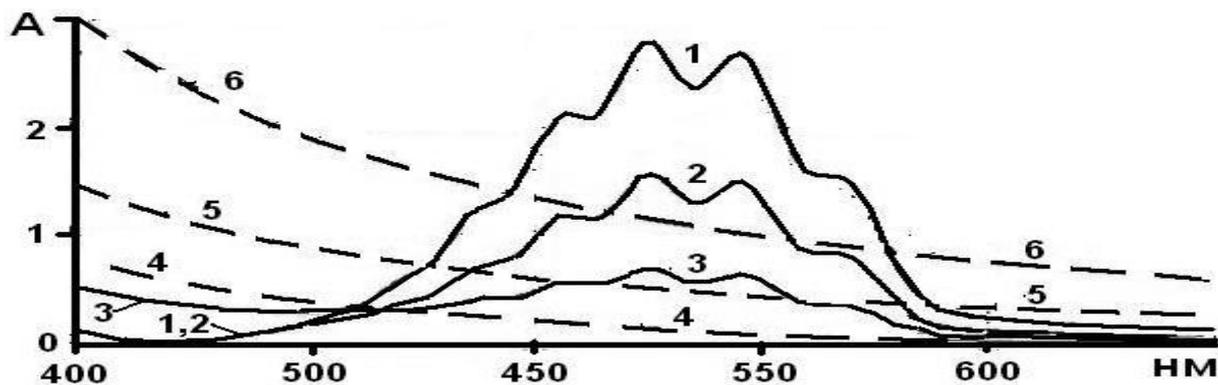


Рисунок 10.1.4 - Косвенный окислительно–восстановительный ВдМАСА. Спектры светопоглощения в видимой области водных растворов, содержащих 0,001 М $KMnO_4$ при pH 0,3 (линии 1–4), 1,15 (линия 5) и 6,5 (линия 6) и концентрациях $FeSO_4$: 0,0001 (сплошная линия 1), 0,0025 (сплошная линия 2), 0,005 (сплошная линия 3) и 0,0075 М (штриховые линии 4–6), соответственно. Отсюда видно, что светопоглощение $KMnO_4$ в видимой области спектра снижается пропорционально увеличению содержания в анализируемых растворах различных восстановителей (таких как Fe^{2+} , NO_2^- , SO_3^- , большинство органических соединений и т.п.). Причем, наиболее чувствительна перманганатометрия в сильно кислой среде. Поскольку с увеличением pH образуются другие продукты окисления $KMnO_4$ (см. вышеописанные реакции 10.1.1–10.1.3), более эффективно поглощающие и рассеивающие видимый свет. Обозначения по осям те же, что и на рисунке 10.1.1.

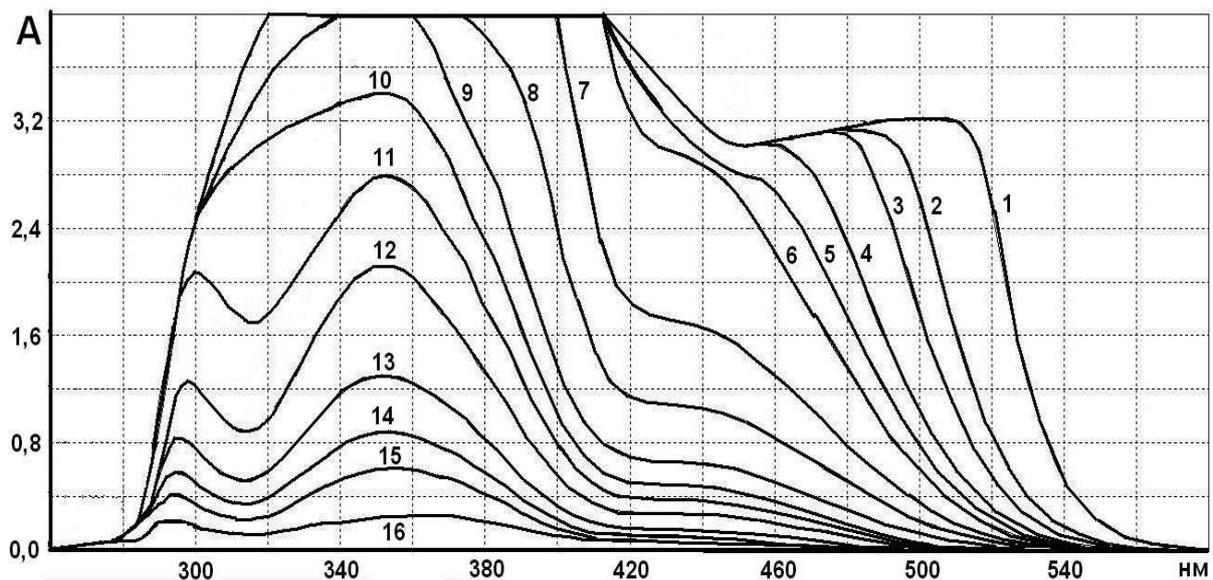


Рисунок 10.1.5 - Прямой ВдМАСА. Спектры светопоглощения нейтральных водных растворов $K_2Cr_2O_7$ с концентрациями: 1000 (1), 330 (2), 220 (3), 150 (4), 110 (5), 80 (6), 40 (7), 30 (8), 22 (9), 18 (10), 14 (11), 11 (12), 7,5 (13), 5 (14), 3 (15) и 1 (16) $\times 10^{-4}$ М. Обозначения по осям те же, что и на рис.10.1.1.

Таким образом, как мы видим, чтобы точно определять количественное содержание бихромат-ионов в водных растворах в широком диапазоне концентраций $Cr_2O_7^{2-}$, без достаточно трудоемкой процедуры подбора нужной степени разведения пробы при превышении её оптической плотностью верхнего предела чувствительности фотометра при заданной длине волны – можно осуществлять измерение оптической плотности таких растворов не при одной (как обычно), а при 3-х разных длинах волн.

При этом, при концентрациях бихромат-ионов ($C_{БИ}$) от 10^{-4} моль/л (нижний предел обнаружения на спектрофотометре «UNICO-2804» при установленных спектральной ширине монохроматора 1 нм и стандартной 10 мм кювете, при увеличении спектральной ширины монохроматора, длины оптического пути луча в кювете либо при использовании прибора с большей светосилой и чувствительностью фотодетектора этот предел обнаружения может быть увеличен) до 3×10^{-3} М (либо иного значения $C_{БИ}$ – при котором окажется превышен верхний предел чувствительности используемого фотометра при заданной длине волны; который для «UNICO-2804» в данных условиях составляет $A \sim 3,2$) величину $C_{БИ}$ следует определять по величине оптической плотности исследуемого раствора относительно дистиллированной воды при 350 нм.

При $C_{БИ}$ в диапазоне $3 \div 6 \times 10^{-3}$ М концентрацию бихромат-ионов в исследуемом растворе следует определять по величине его оптической плотности относительно дистиллированной воды при 410 нм.

А при $C_{БИ}$ от 6×10^{-3} до 0,1 М концентрацию бихромат-ионов в исследуемом растворе следует определять по величине его оптической плотности относительно дистиллированной воды при 500 нм. Причем, верхний предел обнаружения может быть увеличен за счёт уменьшения спектральной ширины монохроматора, длины

оптического пути луча в кювете, уменьшения интенсивности света на входе в анализируемый образец либо на выходе из него (например, за счёт применения ослабляющих светофильтров) и т.п.; а также за счёт разбавления самого анализируемого образца.

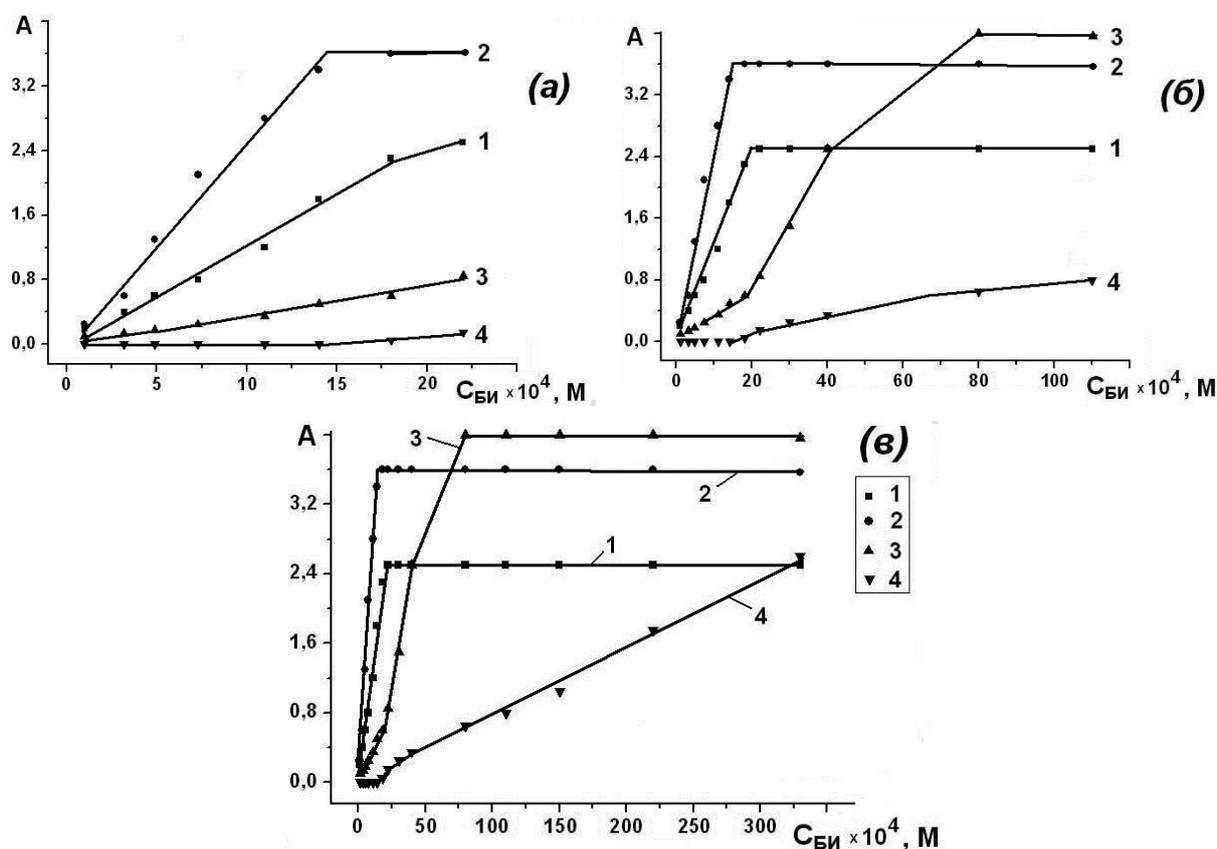


Рисунок 10.1.6 - Калибровочные зависимости A от $C_{БИ}$, полученные на основании данных, показанных на рис.10.1.5, для света с длиной волны 300 (1), 350 (2), 410 (3) и 500 (4) нм. Точками показаны экспериментально полученные данные, а линиями – аппроксимирующие их прямые.

Таким образом, при фотометрическом определении совместного содержания в водных растворах перманганат- и бихромат-ионов нужно осуществлять следующую последовательность действий. Сначала, разбавляя два отдельных раствора, содержащих, соответственно, $0,1 \text{ M MnO}_4^-$ и $0,1 \text{ M Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, строим калибровочные зависимости A при 350 и 525 нм от концентраций каждого из этих ионов. Затем, измеряем оптическую плотность анализируемого образца при 350 и 525 нм (A_{350} и A_{525} , соответственно). Далее, по калибровкам и полученной величине A_{525} определяем концентрацию в пробе перманганат-ионов и то, какой вклад они вносят в общую оптическую плотность образца при 350 нм (A_{350}^{II}). После чего, по формуле $A_{350}^{\text{B}} = A_{350} - A_{350}^{\text{II}}$ определяем вклад бихромат-ионов в общую оптическую плотность образца при 350 нм. И наконец, по калибровкам и полученной величине A_{350}^{B} определяем концентрацию в пробе бихромат-ионов.

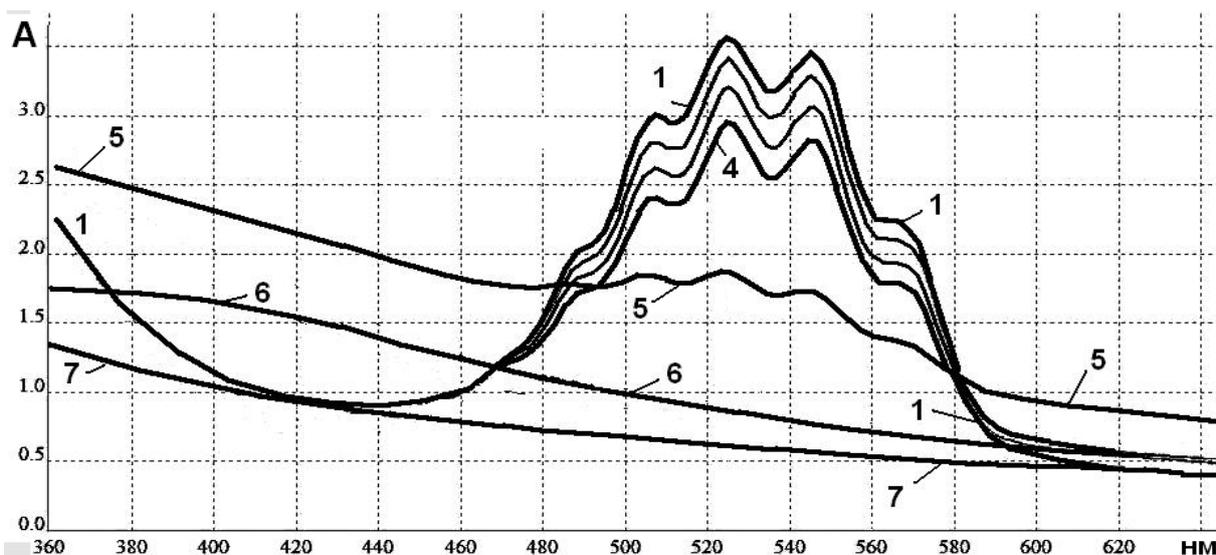


Рисунок 10.1.7 - ВДМАСА кинетики окисления перманганатом водного раствора глюкозы. Линиями 1–4 здесь показаны спектры поглощения нейтрального раствора $4,5 \times 10^{-3}$ М KMnO_4 в присутствии 0,0 (1), 0,007 (2), 0,01 (3) и 0,016 М глюкозы (4) почти сразу после добавления последней в кювету. А линиями 5–7 показаны спектры поглощения того же раствора через 15, 30 и 60 минут после добавления в кювету 0,016 М глюкозы. Обозначения по осям те же, что и на рис.10.1.1.

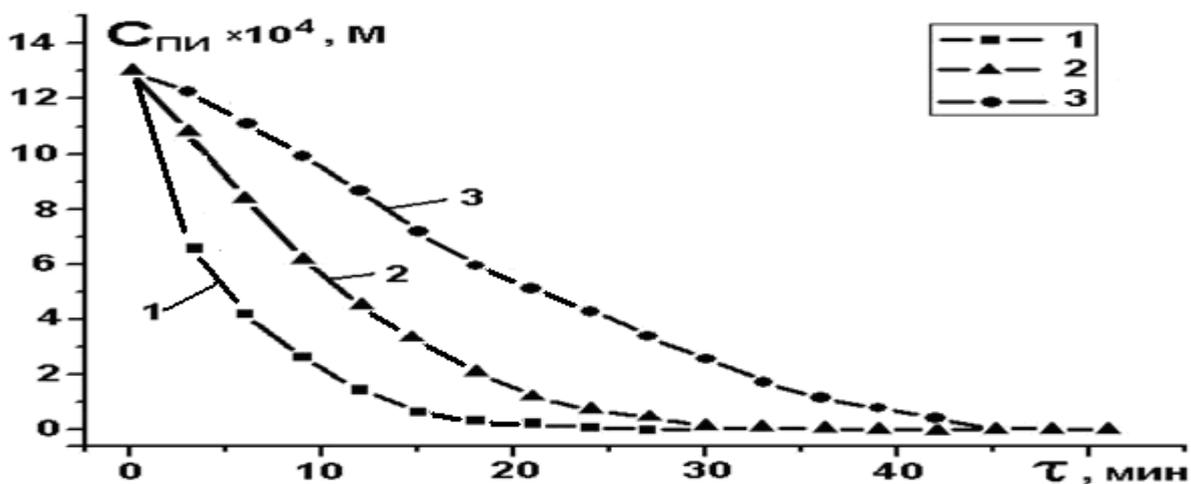


Рисунок 10.1.8 - Зависимости концентрации перманганат-ионов ($C_{\text{ПМ}}$, М) от времени протекания (τ) реакции окисления $1,3 \times 10^{-3}$ М KMnO_4 водных растворов глюкозы с исходными концентрациями последней $30, 10$ и 5×10^{-3} М (линии 1–3, соответственно, где точками показаны экспериментальные данные), в присутствии 0,1 М HNO_3 . При этом, $C_{\text{ПМ}}$ рассчитывались как $C_{\tau} = C_0 \times (A_{\tau} - A_{\text{мин}}) / (A_{\text{макс}} - A_{\text{мин}})$, где $A_{\text{макс}}$ и $A_{\text{мин}}$ – максимальное и минимальное значения оптической плотности раствора в ходе протекания исследуемой реакции. После чего, для расчета порядка (n) и константы скорости (k) реакции экспериментально полученные зависимости $C_{\text{ПМ}}$ от τ аппроксимировались

$$\text{функцией } C^{1-n} = C_0^{1-n} + (n-1) \times k \tau \text{ (см. раздел 8).}$$

10.2. Устройства, используемые для ВдМАСА

При осуществлении ВдМАСА спектры поглощения образцов регистрируют, как правило, одним из двух следующих способов, показанных на рис. 10.2.1.

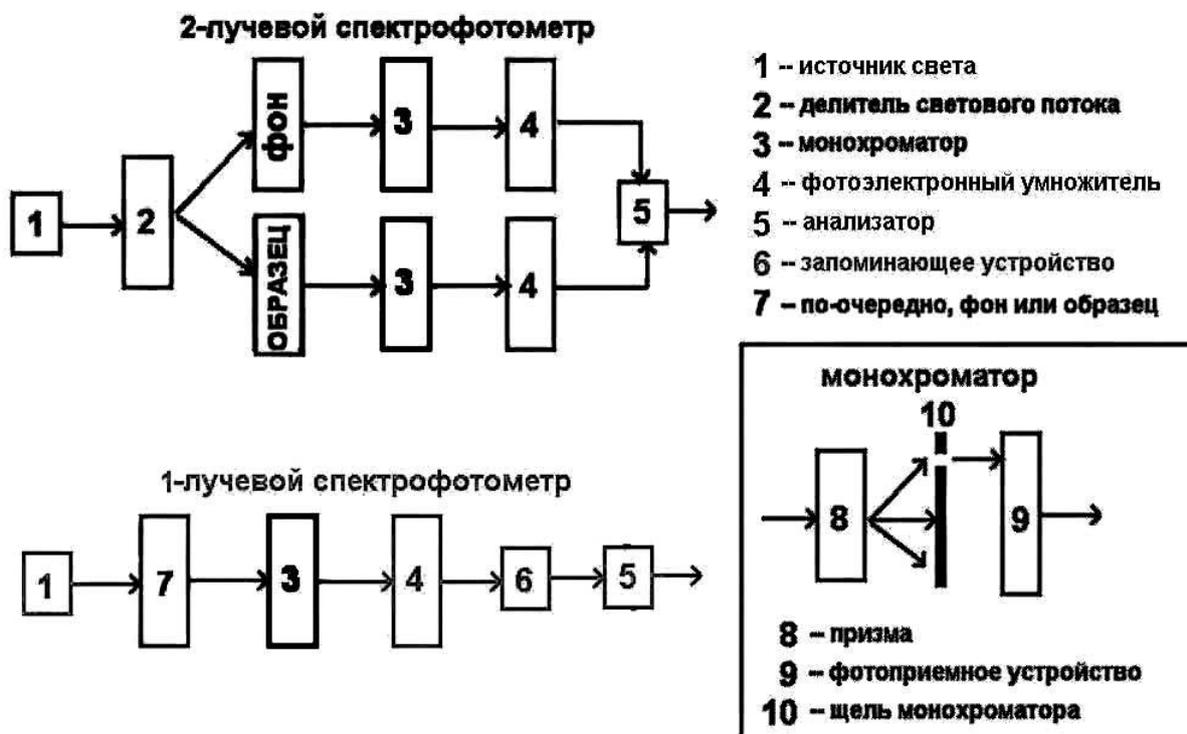


Рисунок 10.2.1 - Схема регистрации спектров поглощения

Кроме того, часто применяются также промежуточные варианты, в которых:

(1) либо аналитический и фоновый (*опорный*) сигналы поочередно проходят через один и тот же монохроматор, после чего попадают на один и тот же фотодетектор;

(2) либо в качестве «образца сравнения» используется не кювета с «фоновым раствором» (*содержащим, по возможности, все те же компоненты, что и анализируемый образец, за исключением собственно анализируемого вещества*), а кювета с «раствором сравнения» (*содержащим известное количество другого светопоглощающего вещества*) или даже просто светофильтр с заранее установленными стабильными светопоглощающими характеристиками.

При этом одно–лучевые приборы применяются, в основном, для массовых рутинных измерений. А более сложные и дорогие двух–лучевые – для более точного прецизионного анализа (*поскольку они учитывают временную нестабильность аналитических характеристик источника излучения, монохроматора, фотодетектора и регистратора, которая не может быть учтена с помощью обычной «статической» калибровки*).

Помимо этого, в зависимости от задач исследования, может меняться как ширина щелей монохроматоров, так и их расположение (*между источником света и образцом либо между образцом и фотодетектором*), а также коэффициент фотоэлектронного умножения детекторов, материал стенок кювет с

образцом*¹ и т.п. Обычно в спектрофотометрах используют монохроматоры с шириной щели от 0,5 до 30 нм. А в так называемых фотоколориметрах – сменные светофильтры, избирательно пропускающие свет в диапазоне длин волн, большем 30 нм ($\lambda \pm \Delta\lambda$, $\Delta\lambda > 15\text{нм}$) и включающем максимум поглощения: либо самого определяемого вещества; либо реагента, с помощью которого это вещество определяется, либо продукта реакции анализируемого вещества с вышеупомянутым реагентом, либо исходного вещества или продукта реакции, катализируемой определяемым веществом.

При этом использование светофильтров, хотя и снижает избирательность (селективность) анализа (*впрочем, и так, как уже говорилось, весьма невысокую для методов прямого ВдМАСА, но значительно увеличивающуюся за счёт использования специфических реагентов на определяемые вещества*), значительно удешевляет и упрощает необходимое для измерений аналитическое оборудование, а также увеличивает чувствительность ВдМАСА в области малых концентраций определяемых веществ.

Устройство монохроматоров (*призматических либо дифракционных*), применяемых в настоящее время в ВдМАСА, аналогично ранее рассмотренному для АЭСА.

Светофильтры же, используемые в ВдМАСА, подразделяются на абсорбционные и интерференционные.

При этом под абсорбционными светофильтрами подразумеваются устройства, пропускающие излучение только определенного интервала длин волн, поглощая излучение всех остальных длин волн.

По характеру своего интервала пропускания такие светофильтры делятся на: узкополосные (*с малым $\Delta\lambda$*), широкополосные и отсекающие (*с одним порогом пропускания – вместо двух, как в предыдущих случаях, т.е. пропускающие фотоны всех длин волн, больших или меньших некоторого $\lambda_{\text{п}}$, поглощая все остальные фотоны*).

А по исполнению данные светофильтры обычно представляют собой пластины, изготовленные из разных сортов цветного стекла, прозрачных пластмасс, пленок из окрашенного желатина и т.п. Особое распространение имеют стеклянные абсорбционные фильтры. Хотя в ряде случаев применяют также жидкостные фильтры, изготавливаемые в виде окрашенных растворов неорганических солей или органических красителей, помещаемых в кюветы со стеклянными или кварцевыми (*для УФ-диапазона*) стенками. Кроме того, для выделения УФ-участков спектра иногда применяют газовые абсорбционные фильтры, устроенные подобно жидкостным. А для выделения более узких спектральных участков применяют комбинации из нескольких светофильтров.

Интерференционными светофильтрами называются многослойные тонкопленочные структуры, с помощью которых можно выделять излучение не только в отсекающем или широкополосном варианте, но в диапазоне всего

*¹ в качестве которого может быть использован полистирол с достаточной оптической прозрачностью, обычное стекло (*в случае выполнения анализов в области только от 350 до 700 нм*), кварцевое стекло, стекло со вставками из чистого кварца и т.д.

нескольких нанометров (так называемые, полосовые фильтры). Принцип действия этих светофильтров основан на явлении многолучевой интерференции света и состоит в следующем. Одна часть излучения, падающего на поверхность фильтра, отражается от металлической пленки–зеркала 2 (как показано на рис. 10.2.2). А другая часть проходит через слой диэлектрика 3 и попадает на вторую металлическую пленку–зеркало 2. Здесь снова часть светового потока отражается и попадает через слой диэлектрика 3 на 1-ю пленку–зеркало, а другая часть выходит наружу. Этот процесс повторяется многократно. И если на расстоянии между двумя пленками–зеркалами умещается точно несколько полуволен ($\lambda_{\Phi}/2$), то лучи с длиной волны λ_{Φ} при совпадении их по фазе будут усиливаться; а при несовпадении, гаситься. В результате чего, из такого интерференционного светофильтра будут выходить только фотоны с длинами волн, равными $k \times \lambda_{\Phi}/2$ (где число «k», называемое порядком световых волн, равно 1, 2, 3 и т.д.). При этом, излучение 2-го и более высоких порядков, как правило, поглощается стеклянной пластиной 1, ограничивающей рассматриваемый фильтр. Так что из данного светофильтра будут выходить только фотоны с длиной волны $\lambda_{\Phi}/2$.

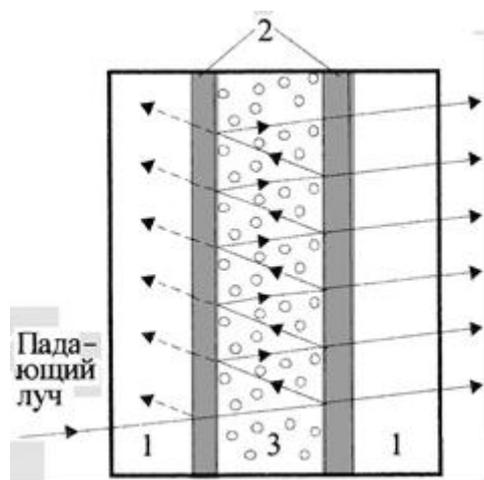


Рисунок 10.2.2 – Принцип действия светофильтров

А источники излучения, используемые в ВдМАСА, в свою очередь, могут быть следующими.

(1) Малогабаритные низковольтные лампы накаливания с баллоном, выполненным из кварца (хорошо пропускающего, в отличие от обычного стекла, УФ-излучение) и заполненным при низком давлении парами йода или брома, и вольфрамовой нитью, через которую пропускается постоянный стабилизированный ток.

(2) Газоразрядные лампы с баллоном, выполненным из кварца и заполненным при низком, высоком (от 0,1 до 0,5 атм) или сверхвысоком (до 10 атм) давлении парами водорода, дейтерия, ртути, аргона, ксенона или криптона. При этом, чем выше давление паров в баллоне, тем больше интенсивность свечения лампы. Однако при использовании в фотометрическом анализе газоразрядных ламп возникает проблема с достижением достаточно высокой стабильности их излучения.

На приведенном ниже рисунке 10.2.3 показаны спектры излучения различных вышеописанных ламп, где кривая 1 – соответствует лампе накаливания с вольфрамовой нитью; а кривые 2–4 – газоразрядным лампам, наполненным парами ксенона (2), ртути (3) и водорода (4).

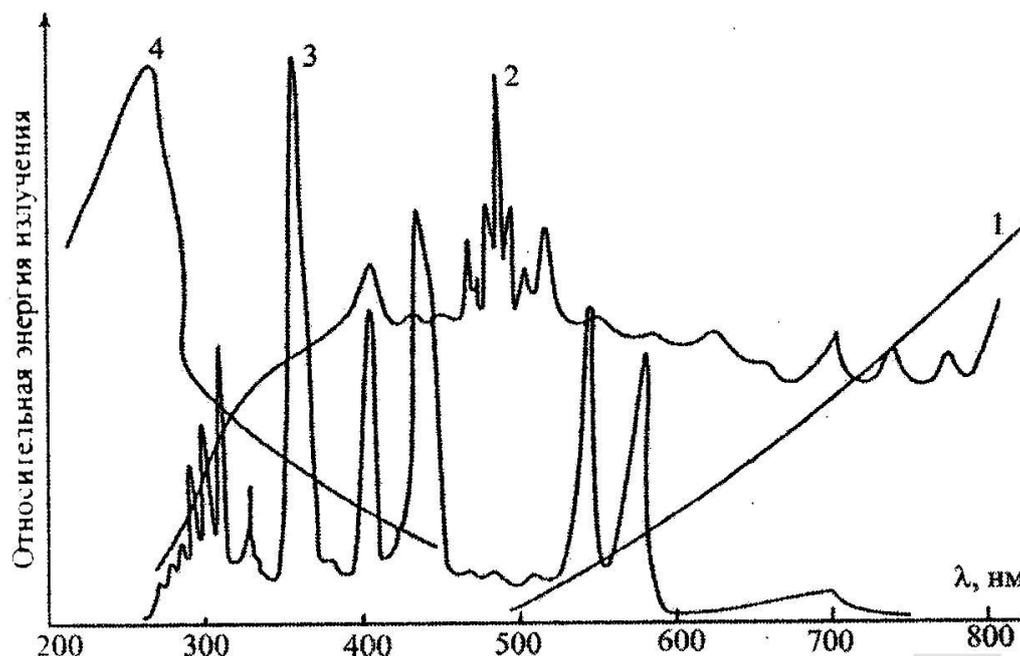


Рисунок 10.2.3 – Спектры излучения различных источников излучения

Отсюда видно, что водородные или дейтериевые лампы целесообразно применять для фотометрии или возбуждения люминесценции в УФ-области ($\lambda = 200\text{--}300$ нм), ксеноновые лампы - в области $300\text{--}700$ нм, а лампы накаливания - в ещё более длинноволновой видимой и ближней ИК областях.

Также кроме газоразрядных ламп непрерывного действия, выпускаются импульсные газоразрядные лампы, позволяющие получать высокоинтенсивные вспышки света длительностью от 10^{-3} до 10^{-9} секунд и используемые, в частности, для определения времени задержки люминесценции различных веществ (*что подробнее будет описано в разделе 11.1*), а также для увеличения ресурса лампы и повышения интенсивности её свечения.

Для того же, чтобы газоразрядная ртутная (*или иная*) лампа испускала излучение сплошного спектра, применяют так называемые люминесцентные лампы, выполняемые так же, как обычные газоразрядные, на внутреннюю поверхность баллона которых наносится дополнительный слой люминофора, который, поглощая линейчатое атомарное излучение паров ртути (*или иного вещества, заполняющего баллон газоразрядной лампы*), испускает собственное молекулярно-люминесцентное излучение в виде уже достаточно широкой сплошной полосы в области длин волн, определяемой составом люминофора (*изменяя который, можно соответственно изменять и спектр излучения такой лампы*).

(3) Помимо этого, в настоящее время в качестве дешевых и доступных источников излучения при фото- и люминометрии нередко используют так называемые сверхяркие светодиоды. Помимо прочего из-за обычно, достаточно узкого диапазона длин волн испускаемых ими фотонов, эти светодиоды (*так же, как и лазеры*) не требуют наличия в фотометре сложного и дорогого монохроматора (*значительно уменьшающего, к тому же, интенсивность света, поступающего в образец*) и позволяют, при необходимости, делать его весьма легким и компактным. Но если нужно проводить фотометрический анализ в разных спектральных областях, приходится, как правило (*так же, как и в случае применения светофильтров*), использовать несколько сменных светодиодов с разными длинами волн излучения.

Так, например, в случае фотометра «Эксперт-003» (*состоящего из отдельных кюветно–измерительного и регистрационного блоков, имеющих общий вес 1,5 кг и габариты 200×200×100 мм*), источником возбуждения излучения, совмещенным с монохроматором, служат сменные светодиоды с длинами волн в стандартном наборе: 375, 400, 430, 470, 505, 525, 572, 590, 605, 615, 626, 655, 850, 880 и 940 нм.

И это ещё далеко не самый компактный из существующих в настоящее время вариантов фотометров. Так, например, фотометр «AP-700» (*фирмы «Arel», Япония*), с широкополосным светодиодом, в качестве источника излучения, встроенными светофильтрами на 405, 420, 460, 510, 540, 600, 660 нм и минимальным объемом пробы 0,5 мл, имеет габариты 118×180×60 мм и вес 800 гр *см.: http://nv-lab.ru/catalog_info.php?ID=774&Full=1*).

(4) Также интенсивный сплошной спектр излучения вплоть до 200 нм даёт искровой разряд постоянного или переменного тока, осуществляемый в водной среде между угольными или металлическими электродами.

(5) И наконец, перспективным, хотя пока ещё и весьма дорогим, источником монохроматического излучения являются лазеры, твердотельные, газовые или жидкостные. Причем в последнем случае, в качестве рабочего вещества, как правило, используются растворы различных органических красителей, что позволяет в широком спектральном интервале осуществлять плавную перестройку длины волны света, излучаемого такими лазерами и, как и в случае светодиодов, обходиться в фотометрах без дополнительных монохроматоров.

При этом, источник излучения, фотодетектирующее и регистрирующе–анализирующее устройства могут быть выполнены как в виде моноблока (*анализируемый образец в который помещается, как правило, в фотометрической кювете, обычной, с увеличенной длиной светового пути, проточной или иного типа из описанных в разделе 10.1*), так и в виде отдельных модулей.

Причем, в последнем случае, облучение образца и регистрация излучения на выходе из него могут осуществляться как по лидарному принципу (*который будет подробнее описан в разделе 12.4*), так и посредством оптоволоконных зондов, подводимых к поверхности образца либо помещаемых вглубь него.

А, кроме того, могут использоваться схемы анализа, в которых вокруг одного источника светового облучения располагается несколько образцов (*либо,*

с помощью оптоволоконных кабелей, излучение от одного источника подается к нескольким образцам, расположенным относительно этого источника достаточно произвольным образом), с отдельным фотодетектором после каждого (либо подачей сигнала, получаемого после каждого образца, с помощью оптоволоконных кабелей, на один фотодетектор).

Либо вокруг одного источника излучения (оптоволоконный зонд от коего помещается внутрь образца) располагается несколько фотодетекторов (что используется, в частности, при анализе кристаллических образцов, проявляющих значительную анизотропию своих оптических и иных свойств, а также характеризующихся достаточно значительной светопрозрачностью либо светоотражающими свойствами).

Либо сигналы от нескольких фотометрических датчиков (включающих каждый, отдельный источник излучения, образец и детектор) собираются на одно регистрирующе–анализирующее устройство и т.п.

Кроме того, при осуществлении ВДМАСА в ряде случаев используют:

+ дополнительные фильтры, пропускающие только поляризованный свет (что значительно повышает избирательность методов анализа, использующих неполяризованный свет, поскольку среди веществ, избирательно поглощающих, рассеивающих либо испускающих кванты света в заданном диапазоне длин волн лишь малая часть является ещё и оптически активными, подробнее об этом см. в разделе 12.1);

+ приставки для получения спектров многократного нарушенного полного внутреннего, диффузного и зеркального отражения (о принципах действия которых будет рассказано в разделе 12.2), позволяющие анализировать мало- и непрозрачные твердые и жидкие образцы, а также суспензии, пасты и т.п.; а кроме того, создавать компактные переносные фотолюминометры для анализа приповерхностных областей больших объектов (хотя аналогичные приставки изготавливаются и в качестве отдельных модулей, вставляемых в кюветное отделение стационарных фотометров).

Впрочем, как уже говорилось, наряду со стационарными (такими, например, как описываемые в http://analit-spb.ru/equipment_item.php?id=50 или <http://bio-chim.ru/index.shtml>), весьма компактные переносные фотометры изготавливаются и без вышеупомянутых приставок.

А, кроме того, нужно учитывать, что следует с большой долей осторожности сравнивать между собой спектры отражения, получаемые при разных условиях. А уж тем более, сравнивать эти спектры со спектрами, получаемыми при «обычном» способе пропускания света через весь анализируемый образец.

Аналогично, с большой долей осторожности следует сравнивать между собой и спектры, получаемые с помощью различных типов оптоволоконных зондов, а также спектры, получаемые без применения оных зондов.

Также, если раньше для анализа образцов в ближней ультрафиолетовой ($\lambda = 200\text{--}350$ нм), видимой ($\lambda = 350\text{--}1100$ нм) и ближней инфракрасной ($\lambda = 1100\text{--}3300$ нм) областях спектра, как правило, использовались разные спектрофотометры, поскольку для каждого из вышеозначенных спектральных диапазонов требуются, как минимум, разные источники излучения, кюветы и

фотодетекторы (с максимумами интенсивности излучения, светопропускаемости и светочувствительности в разных спектральных областях). То в настоящее время, хотя для недорогих приборов, используемых для рутинных анализов, это разделение всё ещё сохраняется.

У приборов исследовательского класса, как правило, один моноблок способен выполнять непрерывное сканирование светопоглощения образцов в области длин волн от 200 до 900 нм или от 180 до 1100 нм, а в ряде случаев (как например спектрофотометры «UV 3600 Plus» или «Solid Spec 3700 DUV» фирмы Shimadzu, Япония), даже от 165 до 3300 нм, автоматически осуществляя при этом смену источников облучения образца, фотодетекторов и т.д.

Для иллюстрации вышеизложенного приведем упрощенную схему устройства однолучевого спектрофотометра «СФ-56», до сих пор реально выпускаемого в Санкт-Петербурге (см. например <http://lomo-microsystems.ru/sf56.html>) и используемого во многих лабораториях для сканирования спектров молекулярного поглощения образцов в диапазоне от 190 до 1100 нм.

В этом спектрофотометре излучение от одного из источников света (**1** или **1***, роль которых играют газоразрядная лампа, заполненная дейтерием и используемая в диапазоне от 190 до 390 нм, и лампа накаливания с вольфрамовой нитью, заполненная парами йода и используемая в диапазоне от 390 до 1100 нм) падает на зеркальный конденсор (**2**), направляющий свет на плоское поворотное зеркало (**3**), которое, в свою очередь, направляет его дальше, через фокусирующую линзу (**4**), входную щель монохроматора (**5**) и светофильтр (**6**) на поворотную вогнутую дифракционную решетку (**7**) с переменным шагом и криволинейным штрихом. Эта решетка изготавливается на сферической зеркальной поверхности, и потому, помимо диспергирующих свойств, обладает свойством фокусировать спектр. Применение же переменного шага и криволинейного штриха значительно уменьшает абберационное искажение решетки и позволяет получить высокое качество спектра во всем рабочем спектральном диапазоне.

Далее, световой пучок, отражаемый дифракционной решеткой, фокусируется в плоскости выходной щели монохроматора (**8**), расположенной над входной щелью 5. Сканирование осуществляется поворотом дифракционной решетки. При этом монохроматическое излучение различных длин волн, проходя через выходную щель 8 и конденсорную линзу (**9**), попадает на контрольный или исследуемый образец (**10**). А после прохождения образца, через фокусирующую линзу (**11**) с помощью поворотного зеркала (**12**) попадает на один из фотодетекторов (**13** или **13***), в качестве которых используются: сурьмяно–цезиевый фотоэлемент с окном из кварцевого стекла (в области спектра от 186 до 700 нм) и кислородно–цезиевый фотоэлемент (в области спектра от 600 до 1100 нм).

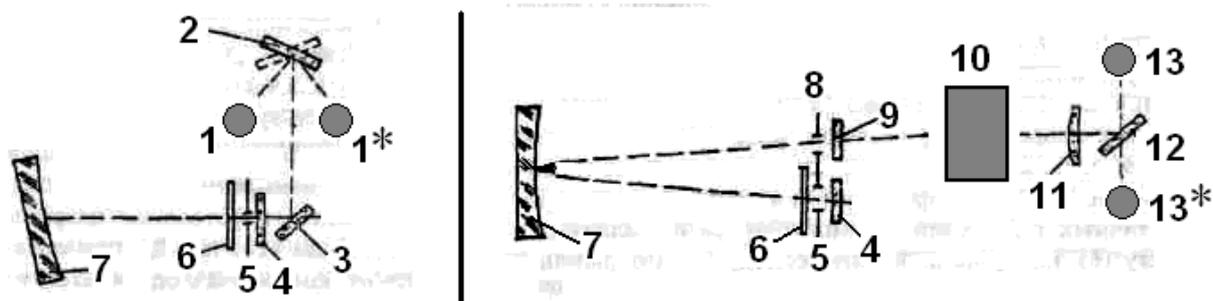


Рисунок 10.2.4 - Упрощенная оптическая схема спектрофотометра «СФ-56».

Дополнительно спектрофотометр «СФ-56» комплектуется 3-мя приставками зеркального отражения (с углами падения 6, 30 и 45 градусов), приставкой диффузного отражения (с углом падения 8 градусов), оптоволоконной приставкой (предназначенной для исследования кристаллов различной формы) и 4-мя вариантами держателей кювет.

А в спектрофотометре «СФ-2000» (также выпускаемом фирмой «ЛОМО») детектором излучения служит уже матрица полупроводниковых светочувствительных элементов (что позволяет в течение менее 1 секунды регистрировать сразу весь спектр поглощения анализируемого образца без достаточно длительной процедуры его сканирования). А кроме того «СФ-2000» комплектуется более сложной приставкой «СФО-2000», позволяющей регистрировать спектры как зеркального, так и диффузного отражения образцов при различной геометрии освещения и отражения.

10.3. Инфракрасный молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ (ИкМАСА)

Методами абсорбционной молекулярной спектроскопии в «видимой» области спектра, как уже говорилось в предыдущем разделе, удобно определять количественное содержание в образце того или иного вещества.

А методами инфракрасной спектроскопии можно исследовать уже собственно молекулярную структуру этого вещества.

И определяется это тем, что энергии поглощаемых веществом квантов среднего ИК–диапазона хватает только на изменение интенсивности колебательных и вращательных процессов атомов в молекулах. Причем основной вклад в получаемые таким образом спектры в среднем ИК диапазоне вносят колебательные переходы, имеющие большую энергию, чем вращательные (расщепление по последним определяет уширение полос в ИК–спектрах, впрочем, всё равно гораздо более узких и структурированных, чем молекулярные электронные спектры, в которых расщепление основных полос идёт не только по вращательным, но и по колебательным уровням).

При этом, хотя с увеличением температуры колебательные и вращательные процессы атомов в молекулах интенсифицируются, эти процессы имеют место даже при 0 К.

Колебания, происходящие в многоатомной молекуле, делят на два основных типа: (1) «скелетные» (в которых все атомы молекулы участвуют

примерно в одинаковой степени) (2) и «характеристические» (при которых сильные смещения испытывает лишь малый фрагмент молекулы).

Совокупность всех «скелетных колебаний» (определяемая частотами пиков поглощения в ИК-спектре, а также интенсивностью этих пиков друг относительно друга), как отпечатки пальцев, единственным уникальным образом идентифицирует не только любое вещество (вернее то, в котором атомы разных химических элементов связаны между собой ковалентными связями, так что при изменении интенсивности их колебаний изменяется и дипольный момент молекулы, определяемый мгновенным локальным распределением в ней взаимонескомпенсированных электрических зарядов), но даже его агрегатное состояние и аллотропную модификацию (поскольку межмолекулярные связи также дают пики в ИКМАСА).

В то время как, частоты «характеристических колебаний» зависят, в основном, только от наличия в ней тех или иных функциональных групп атомов, и используются для изучения строения молекул неизвестных веществ.

Хотя последнее нередко осложняется тем, что ни одна группа не является в полной мере изолированной от колебаний остальной части молекулы. А это, в свою очередь, приводит к некоторым изменениям характеристических частот и интенсивностей ИК полос поглощения, в зависимости от химического окружения в молекулах каждого конкретного вещества функциональных групп, ответственных за вышеупомянутые полосы поглощения.

В ИКМАСА (в отличие от УфМАСА и ВдМАСА) для удобства интерпретации, спектры, как правило, записывают так, чтобы по оси ординат откладывалась интенсивность пропускания (Т) или поглощения образцом ИК-света; а по оси абсцисс – волновое число этого излучения ($\nu^* = 1/\lambda$), обычно измеряемое в см^{-1} . В качестве примера, на рис. 10.3.1 приведен спектр, полученный методом ИКМАСА для тонкой пленки этанола, где полосы поглощения, соответствующие «скелетным колебаниям» атомов в анализируемых молекулах в «области отпечатков пальцев», как обычно, расположены при $\nu^* < 1500 \text{ см}^{-1}$.

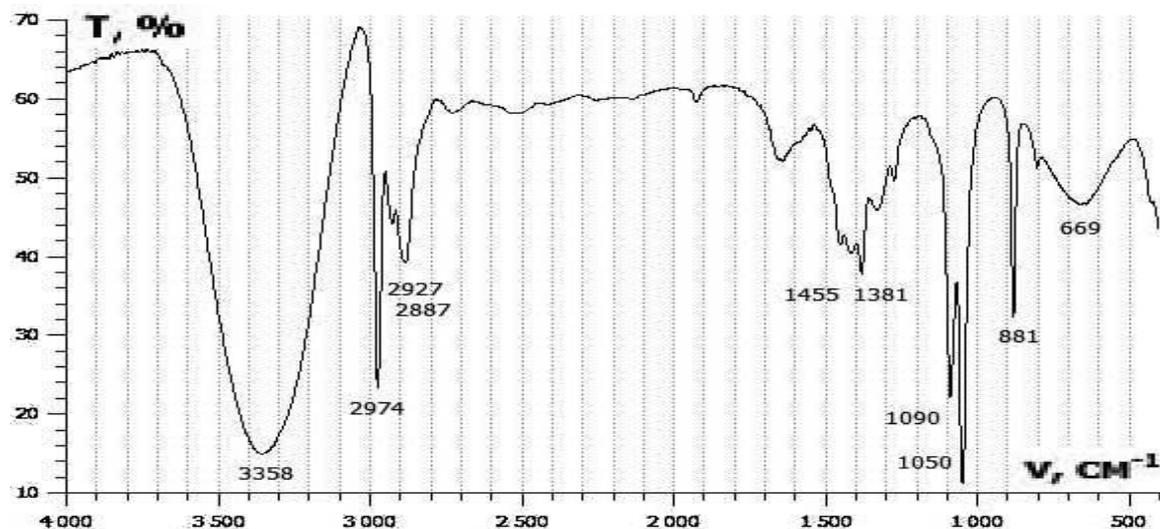


Рисунок 10.3.1 – Спектр тонкой пленки этанола

При этом, качественное и количественное определение веществ при ИкМАСА методически проводят так же, как при АЭСА и ВдМАСА. В 1-м случае, по длинам волн (*или волновым числам*) «скелетных колебаний», дающих наиболее интенсивные полосы поглощения в «области отпечатков пальцев» (*по которым, в настоящее время, накоплен уже весьма большой объем справочной литературы и компьютерных баз данных*). А во 2-м случае, по наиболее интенсивной полосе пропускания или поглощения, характерной для спектра только одного из веществ, присутствующих в исследуемом образце, интенсивность которой, в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера (*см. раздел «Введение в ФХМА» из 2-й части данного пособия*), прямо пропорциональна количеству анализируемого вещества.

Похожа, в целом, на спектрофотометры, используемые для ВдМАСА, и оптическая схема дисперсионного ИК–спектрометра. Но так как диапазон внешнего облучения образца тут другой, есть и ряд особенностей.

(1) В качестве источника ИК–излучения используют: штифт Нернста (*сплав щелочных металлов*), глобар (*стержень из карбида кремния*), нихромовую проволоку и другие подобные материалы– нагреваемые электротоком до 1500⁰С или более.

(2) Приемниками ИК–излучения служат термопары и терморезисторы.

(3) Поскольку как обычное, так и кварцевое стекло интенсивно поглощают ИК–излучение, вместо линз, для организации светового потока в ИК–спектрометрах используют вогнутые (*фокусирующие*) и выпуклые (*рассеивающие*) сферические зеркала.

(4) Материал кювет и растворители (*жидкий или твёрдый*), используемые для ИкМАСА, не должны поглощать ИК–излучение. Поэтому, кюветы здесь изготавливаются, чаще всего, из кристаллических металлических галоидов (NaCl, KBr, AgCl, CaF₂, CoBr *и т.д.*). А в качестве растворителя в жидких образцах используется не вода (*интенсивно поглощающая излучение в среднем и дальнем ИК–диапазонах*), а чаще всего, CCl₄ или CS₂ (*хотя их пары и токсичны*). Причем, показатели преломления (*n* – равен отношению скоростей распространения излучения в образце и в вакууме) растворителя и материала кюветы должны быть близки (*иначе, на границе раздела сред будет иметь место интерференция, а также, вблизи сильных полос поглощения n сможет меняться, что будет приводить к эффекту переменного фона*).

Кроме того, поскольку при ИкМАСА интенсивность излучения, как на входе, так и на выходе из образца, как правило, достаточно мала, в настоящее время активно используются ИК–Фурье–спектрометры.

В них, как показано на рис. 10.3.2, исходный поток тепловых фотонов от источника ИК–излучения **1**, проходя через коллиматор **2** (*в качестве которого, как уже говорилось, в данном случае используется не линза, а сферическое зеркало*) и анализируемый образец **3**, на систему, состоящую из наклонного полупрозрачного центрального зеркала **13** и полностью отражающих боковых зеркал **7** и **8**, делится оной на два смещенных по фазе световых потока (*за счёт того, что зеркало 8 с помощью мотора 9, управляемого компьютером 12, перемещается относительно остальных зеркал рассматриваемого спектрометра со строго заданной скоростью*). Которые, суммируясь (*что*

приводит к интерференции с усилением или ослаблением излучения в зависимости от длины его волны), через конденсор **10** (также как и **2**, в случае ИК-спектрометрии, состоящего не из линз, а из сферических зеркал) попадают затем на вход детектирующего устройства **11**. Информация с выхода коего подаётся на компьютер **12** – запоминающий и расшифровывающий общую исходную картину поглощения образцом внешнего излучения с помощью обратного Фурье-преобразования.

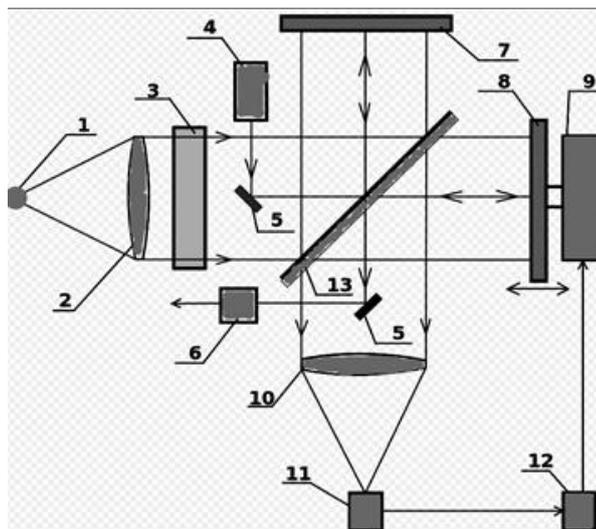


Рисунок 10.3.2 – Схема ИК-Фурье-спектрометра

Главное при этом, соблюдать механическую точность движения зеркала **8** на уровне микрометров в течение некоторого времени (например, 1-й секунды), осуществляя постоянное быстрое считывание получаемого сигнала (например, через каждую 0,001 сек). А, кроме того, в качестве «сигнала сравнения» (аналогичного используемому в 2-лучевом спектрофотометре) в данной схеме используется излучение от эталонного гелий–неонового лазера или светодиода **4**, с помощью вспомогательных зеркал **5** попадающего на эталонный фотоприемник **6**. В результате же всего этого, можно:

(1) считывать сигнал не по одной длине волны в каждый момент времени, а сразу параллельно по 1000 и более длин волн (что позволяет увеличить отношение сигнал–шум до 60 раз);

(2) выиграть в светосиле (т.к. нет щелей монохроматора), что позволяет уменьшить предел обнаружения веществ до 200 раз (а также регистрировать мало интенсивные полосы и даже эмиссию образца в ИК-области);

(3) выиграть во времени анализа (10–15 секунд, вместо 10 минут, необходимых для записи всего спектра на обычном, диспергирующем спектрометре);

(4) увеличить разрешающую способность прибора по длинам волн (при этом у Фурье-спектрометров она ещё и постоянна на всём спектральном диапазоне);

(5) автоматизировать многие операции с помощью компьютера;

(6) и наконец, накапливать сигнал от многих последовательных быстрых измерений одного образца (что позволяет увеличить отношение сигнал–шум ещё в 10 или более раз).

При этом, однако, Фурье–спектрометр – это дорогой, а также весьма сложный и деликатный в обращении прибор. Вследствие чего, использование его для рутинных массовых анализов нецелесообразно.

Кроме того, поскольку методом ИкМАСА могут исследоваться не только жидкости, но и газы, а также твёрдые образцы, для исследования последних применяют следующие специальные методы:

- (1) приготовление таблеток с КВг и другими наполнителями, не поглощающими в ИК–диапазоне;
- (2) приготовление суспензий (*взвесей*) образца в вазелиновом масле или других иммерсионных средах (*имеющих показатель преломления близкий к образцу, в противном случае, будет иметь место большое светорассеяние*);
- (3) исследование тонких слоёв образца на различных подложках;
- (4) исследования полимерных плёнок;
- (5) исследования, с использованием специальных приспособлений (*монокристаллов, волокон и т.п.*).

В качестве конкретных приёмов, используемых в настоящее время для записи ИК–спектров можно привести следующие.

В настоящее время, существует три основных приёма для записи спектров жидкостей: в ячейках с фиксированными или съёмными спейсерами (*прокладками между стекол*) либо из плёнки непосредственно между стёклами. Для количественных измерений предпочтительно использование фиксированных ячеек (*где спейсером служит амальгама, обеспечивающая постоянный оптический путь*). В разборных ячейках эту функцию выполняет прокладка из металлической фольги или тефлона. Стёкла в таких ячейках можно разбирать для очистки или изменения длины оптического пути, но обычно после каждой сборки такой кюветы оптический путь в ней немного изменяется. Согласно же третьему способу, каплю жидкости можно поместить на одно стекло и прижать её другим. При этом оптический путь регулируется прилагаемым усилием. Это удобно для количественных оценок, но неудобно для летучих веществ. Впрочем, если образец неустойчив или легко испаряется, для записи его спектра можно использовать кюветы с водяным охлаждением.

Для получения спектров твёрдых веществ их нужно измельчить в мелкий порошок и диспергировать в матрице. При этом, в качестве такой матрицы обычно используется бромид калия. В количестве 200–300 мг он смешивается с образцом (1–2 мг), растирается (*для получения качественных спектров желательно, чтобы размер частиц не превышал длины волны излучения*), вакуумируется (*для удаления воды*) и прессуется ручным гидравлическим прессом (*обычно мощностью 15 или 25 тонн*) в таблетку (*обычно, имеющую диаметр ~ 13 мм и толщину ~ 1 мм*). Кроме того, перед использованием бромид калия обычно дополнительно прогревают до 40°C (*для того, чтобы на нём не конденсировалась вода*). Также растворимые вещества можно нанести на стекло в виде раствора, после чего удалить растворитель под инфракрасной лампой.

Альтернативой вышеописанной матрицы служит вазелиновое масло. Образец в этом случае готовится растиранием в ступке с несколькими каплями такого масла. Получаемая смесь помещается в разборную кювету. После чего записывается её ИК–спектр.

А если образец представляет собой тонкий однородный материал, спектр записывают в проходящем ИК–излучении, закрепив образец в специальном держателе (*который представляет собой пластинку с прямоугольным отверстием, к коему прижимается образец, накрываемый сверху магнитной пластинкой с отверстием в центре*).

И наконец, ИК–измерения для газообразных веществ требуют гораздо более длинных оптических путей, чем обычно. Кроме того, особенностью спектроскопии газообразных образцов является проявление вращательного движения молекул; а также уширение спектральных линий (*вследствие теплового движения и соударения частиц*). Также, с данным видом спектроскопии связан ряд других проблем. Например, из-за очень большой длины оптического пути существенную роль начинает играть расходимость светового пучка, из-за чего между центральными и краевыми лучами пучка возникает дополнительная разность хода.

Помимо этого, для неразрушающего анализа малопрозрачных твердых и жидких образцов, смол, резин, паст, суспензий и т.п. в ИК–спектроскопии, также как и в вышерассмотренных методах УфМАСА и ВдМАСА, применяются различные приставки, служащие для получения спектров многократно нарушенного полного внутреннего, диффузного и зеркального отражения.

Либо, наряду со стационарными (*описываемыми, например в <http://biochim.ru/index.shtml> или http://www.analit-spb.ru/equipment_item.php?id=57*), изготавливают компактные ИК–спектрофотометры, работающие исключительно на принципе диффузного отражения и позволяющие, вследствие того, анализировать количественный и качественный химический состав не только дозируемых газообразных, жидких или твердых образцов (*включая определение содержания влаги, толщины полимерного покрытия различных образцов и т.п.*); но и поверхностей весьма крупных объектов; а также образцов, герметично закрытых светопроницаемой полимерной или стеклянной упаковкой.



Рисунок 10.3.3 – Внешний вид ИК–спектрометра «Микро-PAZIR»

В частности, подобный ИК–спектрометр «*Micro-PHAZIR*» (см.: <http://ccsservices.ru/catalog/portativnye-blik-spektrometry/> и рис. 10.3.3), имеет вес всего 1,3 кг, габариты 250×200×100 мм, спектральный диапазон от 900 до 2400 нм, дополнительные насадки для засыпания или наливания в них образцов, оптоволоконный датчик с длиной кабеля до 2 м и т.п.

Однако при этом нужно учитывать, что следует с большой долей осторожности сравнивать между собой спектры отражения, получаемые при разных условиях. А уж тем более, сравнивать эти спектры со спектрами, получаемыми при «обычном» способе пропускания света через весь анализируемый образец. Аналогично, с большой долей осторожности следует сравнивать между собой и спектры, получаемые с помощью различных типов оптоволоконных зондов, а также спектры, получаемые без применения оных зондов.

Тем более, что и современные ИК–Фурье–спектрометры, работающие по принципу пропусканию света через весь исследуемый образец (такие например, как «*Agilent Cary 630*» – см.: <http://ccsservices.ru/catalog/ik-fure-spektrometry-agilent/>), могут иметь вес порядка 3,8 кг при габаритах 160×310×130 мм и спектральном диапазоне от 150 до 2860 нм (т.е. от средней УФ– до средней ИК–областей спектра).

Кроме того, ИК–спектрометры (работающие как на просвет образцов, так и на отражение от них монохроматического инфракрасного света) в ряде случаев совмещают с микроскопом, что позволяет проводить точный пространственный анализ распределения различных веществ на поверхности или в глубине прозрачных для ИК–излучения исследуемых образцов.

Также в настоящее время, помимо ИК–спектроскопии поглощения, разработаны методы инфракрасной спектроскопии испускания (ИкМЭСА), в которой регистрируются ИК волны, излучаемые анализируемыми образцами. При этом, ИкМЭСА демонстрирует большую чувствительность, чем ИкМАСА, поскольку имеет значительно меньший уровень фонового излучения, воспринимаемого детектором. Но для проведения таких экспериментов изучаемый образец должен иметь температуру, отличную от температуры спектрометра (причем, желательно, чтобы температура образца была выше насколько возможно большей, поскольку с повышением температуры возрастает и интенсивность ИК–излучения образца). А кроме того, необходимо учитывать, что любой нагревающийся элемент спектрометра (помимо самого образца) может быть источником фонового ИК–излучения.

Типичными областями применения ИкМЭСА являются исследования атмосферы Земли и инфракрасная астрономия. Кроме того, существуют многочисленные методы регистрации ИК–спектров испускания отдельных газов, жидкостей и твёрдых тел; а также регистрации интенсивности ИК излучения различного промышленного оборудования, органов живых организмов и т.п. В результате чего, имеется возможность получать информацию не только о качественном и количественном химическом составе, но и, в частности, о разности температур различных участков исследуемого объекта. Что, в свою очередь, даёт информацию о динамике функционирования этих участков, как в случае, например, тепловой компьютерной томографии живых объектов или

регистрации энергоутечек при функционировании различного промышленного и бытового оборудования, включая тепловые и электросети (*причем, в последнем случае системы «тепловидения» сочетают с регистрацией интенсивности УФ-излучения, возникающего в результате протекания коронных электрических разрядов в местах утечек электроэнергии*) и т.п.

Помимо этого, инфракрасный спектрофотометрический анализ (*также как и УфМАСА и ВдМАСА*) в настоящее время активно применяют не только для изучения состояния статических физико-химических систем, но и для исследования динамики взаимодействия между различными компонентами этих систем; а также взаимопереходов одних форм веществ в другие, в зависимости от действия на них различных внешних факторов (*термических, химических, акустических, электрических, магнитных, механических и т.п.*). При этом, помимо обычных двумерных спектров, с развитием использования матричных детекторов и Фурье-спектрометров (*позволяющих значительно быстрее снимать сразу весь спектр поглощения или испускания образца*) появилась возможность регистрировать также трехмерные спектры (*где по 3-ей оси откладывается время от начала реакции либо какого-либо внешнего воздействия на анализируемый образец*).

И наконец, ИкМАСА (*также как и УфМАСА и ВдМАСА*) нередко совмещают с хроматографическими и электрофоретическими методами разделения различных многокомпонентных химических систем.

Однако, применение ИК-спектроскопии в настоящее время всё же достаточно ограничено тем, что, как уже говорилось:

(1) интенсивные ИК-спектры дают только молекулы веществ, в которых есть атомы разных химических элементов, связанные между собой ковалентными связями, так что при изменении интенсивности колебаний этих атомов друг относительно друга изменяется общий мгновенный дипольный момент молекулы;

(2) молекулы воды, являющейся основной составляющей большинства анализируемых систем, интенсивно поглощают электромагнитное излучение в средней и дальней ИК-областях; а кроме того, разрушают большинство материалов призм, линз и кювет, используемых в ИК-спектрофотометрии.

Для преодоления последнего ограничения приходится применять сложные методы предварительной пробоподготовки, например, экстрагируя, сорбируя или испаряя анализируемые органические вещества из их водных растворов (*подробней эти методы будут рассмотрены в следующих частях данного пособия*). В частности, в настоящее время выпускают так называемые парофазные дозаторы, в виде отдельных модулей, располагаемых отдельно от спектрометра либо помещаемых в его кюветное отделение, где производится термическое испарение анализируемых веществ из жидких или твердых образцов. После чего, полученные пары либо сразу анализируются на спектрометре, либо сорбируются дополнительными «твердофазными ловушками» (*выпускаемыми не только в стационарном, но и в переносном вариантах, в случаях, когда парофазный дозатор используется отдельно от ИК-спектрометра*), в которых анализируемые вещества могут длительно храниться в сорбированном состоянии и лишь при конкретной необходимости

их дальнейшего спектрального анализа термически десорбироваться. Причем, при такой термической десорбции могут использоваться ещё и дополнительные «криоловушки», конденсирующие только часть испаренных веществ, и таким образом, дополнительно увеличивающие селективность анализа.

Кроме того, к «неудобным» для ИКМАСА образцам в настоящее время активно применяют методы, основанные на получении для этих образцов спектров комбинационного рассеяния, которые по своим возможностям, во многом, являются обратным аналогом ИК–спектроскопии (*т.е. те системы, которые дают малоинтенсивные ИК–спектры, демонстрируют весьма интенсивные КР–спектры, и наоборот*).

11. Молекулярный эмиссионный спектрофотометрический анализ (МЭСА)

11.1. Методы прямого МЭСА

Как выше уже говорилось, после того, как световые кванты были поглощены веществом, они могут быть снова испущены оным, в результате обратного перехода электронов из возбужденного состояния в более низкоэнергетическое основное. Это составляет предмет люминесцентных методов анализа.

По способу возбуждения люминесцентные методы делят на:

- фотолюминесценцию (*возбуждаемую ультрафиолетовым или видимым светом*);
- рентгенолюминесценцию (*возбуждаемую рентгеновским излучением*);
- радиолюминесценцию (*возбуждаемую проникающими в образец нейтронами либо γ -излучением*);
- хемо- и биолюминесценцию, проявляющуюся при протекании в образце тех или иных экзотермических химических или биохимических реакций (*с добавлением в этот образец каких-либо дополнительных реагентов либо без добавления*) без каких либо дополнительных способов возбуждения рассматриваемого образца;
- термолюминесценцию (*возбуждаемую при нагревании образца, как например при АЭСА или в некоторых методах эмиссионной ИК–спектроскопии*);
- катодолюминесценцию (*возбуждаемую потоком электронов, пропускаемым через образец*);
- электролюминесценцию (*возбуждаемую внешним электромагнитным полем, накладываемым на образец*);
- сонолюминесценцию (*возбуждаемую ультразвуком*);
- триболлюминесценцию (*возбуждаемую за счёт механических сил трения, прикладываемых к образцу*) и т.п.

В зависимости от времени задержки между поглощением и вторичным излучением квантов света (τ_3) различают: флуоресценцию ($\tau_3 < 10^{-2}$ с) и фосфоресценцию ($\tau_3 > 10^{-2}$ с).

По агрегатному состоянию вещества различают люминесценцию в газах, растворах и кристаллах.

Кроме того, различают первичную люминесценцию (т.е. непосредственное свечение первично возбужденных молекул).

И вторичную люминесценцию – свечение молекул, получающих энергию в результате поглощения люминесценции первично возбужденных молекул другого вещества.

Также различают люминесценцию атомарную (как например в вышерассмотренных методах АЭСА и РФЭА) и молекулярную (МЭСА).

При этом, атомарная люминесценция, как правило, происходит при той же длине волны, что и поглощение.

А для молекулярной люминесценции чаще всего характерен стоксов сдвиг, при котором длина волны излучаемого света больше длины волны света, возбуждающего эту люминесценцию.

Объяснено последнее явление может быть следующим образом. При избирательном поглощении молекулой вещества кванта света с длиной волны, близкой к оптическому диапазону, происходит переход одного из внешних (валентных) электронов (e) с основного энергетического уровня (e с наименьшей возможной для данного e энергией) на какой либо из возбужденных уровней (энергия которого определяемая длиной волны как $E = h\nu = h\nu^* / \lambda$ – отличается от энергии основного уровня данного e на величину, соответствующую энергии поглощенного кванта – минус некоторое количество энергии, расходуемое на увеличение интенсивности колебательных и вращательных движений ядер атомов в молекуле).

Аналогичные явления происходят и при поглощении молекулами исследуемых веществ:

+ квантов других диапазонов электромагнитного излучения (например, радиационного или рентгеновского, только при этом возбуждаются электроны уже не внешних, а внутренних атомных оболочек; либо, если энергии поглощаемой γ -частицы достаточно, может происходить переход из основного в возбужденное состояние сразу нескольких электронов);

+ внешних электронов, пропускаемых через образец;

+ энергии ультразвука;

+ энергии, выделяющейся при протекании каких-либо экзотермических химических реакций;

+ тепловой энергии (т.е. энергии хаотических неупорядоченных взаимодвижений других молекул);

+ энергии внешнего электромагнитного поля, прикладываемого к образцу, и т.п.

При этом, возбужденные e -уровни различаются на «синглетные»

(S – характеризующимися малым временем нахождения на них e и антипараллельным спином в e -паре) и «триплетные» (T – или так называемые метастабильные уровни со значительно большим временем нахождения на них e и параллельным спином в e -паре).

Далее, при переходе e с S -уровня на более низкоэнергетический (чаще всего, основной) происходит быстрое (флуоресцентное) испускание кванта энергии (энергия которого определяемая длиной волны равна разности энергий

этих уровней – минус некоторое количество энергии, расходуемое на увеличение интенсивности колебательных и вращательных движений ядер атомов в молекуле).

А при переходе e с T-уровня на более низкоэнергетический происходит существенно более медленное (фосфоресцентное) испускание кванта энергии с длиной волны большей длины волны света, излучаемого при флуоресценции тех же молекул (см. рис.11.1.1) – поскольку при этом имеет место дополнительная безызлучательная диссипация (или иначе, рассеяние) энергии; в результате, которой энергия расходуется на увеличение интенсивности колебаний и вращения атомов в молекуле друг относительно друга.

При этом, возможный механизм колебательной диссипации энергии электронных переходов состоит в следующем. В молекуле в 1-ю очередь возбуждаются валентные электронные связи. При этом электроны «мгновенно» (по сравнению с ядром атома) переходят на более «дальние» орбиты. После чего, положительно заряженные ядра атомов начинают с большей силой отталкиваться друг от друга (т.к. между ними в меньшей степени присутствуют стабилизирующие отрицательно заряженные электроны). Затем, просуществовав некоторое время в возбужденном состоянии, электроны также быстро, как и до того, переходят обратно, в основное своё состояние. А гораздо более массивные ядра атомов по инерции (которая прямо пропорциональна массе) продолжают интенсивно колебаться друг относительно друга. Таким образом, часть энергии расходуется на увеличение колебаний атомов в молекуле. Что приводит к тому, что энергия испускаемых квантов света всегда меньше энергии поглощенных квантов.

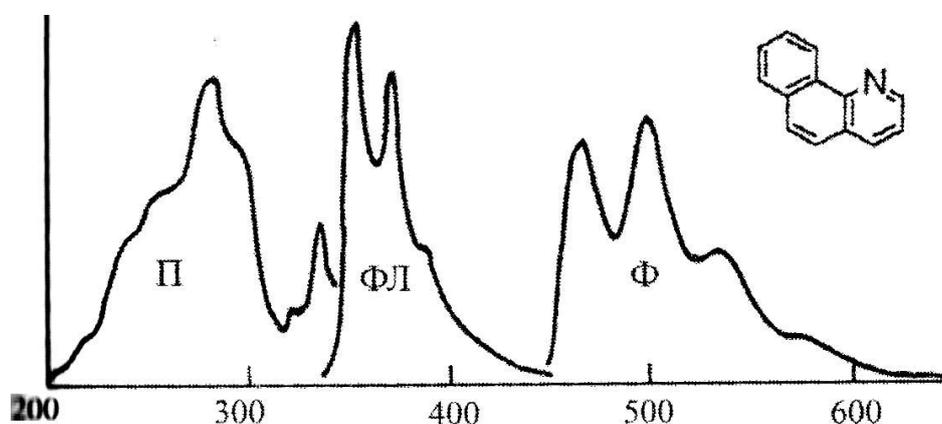


Рисунок 11.1.1 - Спектры поглощения (П), флуоресценции (ФЛ) и фосфоресценции (Ф) бензхинолина в этаноле. При этом, по оси ординат отложена интенсивность поглощения (П) либо люминесценции, а по оси абсцисс – длина волны поглощаемого (П) или излучаемого. Кроме того, спектры П и ФЛ получены при комнатной температуре, а спектр Ф – при охлаждении раствора.

Гораздо реже молекулярная люминесценция происходит с антистоксовым сдвигом, при котором длина волны излучаемого света меньше длины волны света, возбуждающего эту люминесценцию.

Механизм этого явления состоит в следующем. После перехода e с основного S_0 - на возбужденный S_1 -уровень (осуществляемого также, как и в случае ранее рассмотренной «стоксовой» люминесценции), происходит дальнейший переход того же e с нестабильного S_1 -уровня на метастабильный T_1 -уровень с той же энергией. Находясь на последнем достаточно долгое время, e может успеть поглотить ещё один квант энергии. Что приводит к переходу данного e на ещё более высокоэнергетический S_2 - или T_2 -уровень. При переходе с которых на основной S_0 -уровень данного электрона происходит испускание кванта света с энергией, большей, чем у каждого из квантов, поглощенных перед тем молекулой, в отдельности (но меньшей, чем у всей суммы поглощенных ею квантов: $h\nu_{III} < h\nu_{II} < h\nu_{III} + h\nu_{II}$). Вследствие чего, квантовый выход люминесценции (определяемый отношением общего числа вторично излучаемых веществом квантов света, к числу их, поглощенному непосредственно перед этим тем же количеством вещества) при любом её виде меньше или равен единице. А энергетический выход люминесценции (определяемый отношением общего числа излучаемой веществом энергии, к энергии, поглощенной непосредственно перед этим тем же количеством вещества), ещё меньше квантового.

Похожий механизм имеет и так называемая «вынужденная медленная флуоресценция», которая наблюдается у некоторых веществ при низких температурах или в очень вязких средах. И приводит к излучению с той же длиной волны, что и при флуоресценции. Но со временем задержки испускания относительно возбуждения, в таком же, как при фосфоресценции.

При этом, поглотив квант света, e сначала переходит в метастабильное возбужденное состояние – в котором может находиться достаточно долго. После чего, в результате соударения молекул, e сообщается дополнительная энергия – достаточная для перехода его на следующий, уже нестабильный энергетический уровень. С которого и происходит переход рассматриваемого e обратно на основной уровень с испусканием кванта света.

И наконец, реже всего при молекулярном состоянии вещества (но при том, являясь наиболее обычной в атомарном его состоянии) имеет место так называемая «резонансная люминесценция», при которой длина волны излучаемого света совпадает с длиной волны света, возбуждающего эту люминесценцию (т.е. колебательно–вращательная диссипация энергии при электронных переходах полностью отсутствует).

Вследствие вышесказанного (т.е. из-за наличия колебательно–вращательной диссипации энергии при электронных переходах в молекулах), спектры атомарной люминесценции (также как и атомарные электронные спектры поглощения) – линейчатые. А спектры молекулярной люминесценции (также как и молекулярные электронные спектры поглощения), чаще всего, весьма широкополосные.

Поэтому, главная область применения МЭСА (также как и вышерассмотренных методов ВдМАСА), количественные определения веществ с пределом обнаружения до 10^{-9} моль/л (т.е. гораздо меньшим, чем при осуществлении ВдМАСА, из-за того, в частности, что фоновый сигнал при регистрации люминесценции, принципиально, гораздо меньше по величине, чем при регистрации поглощения света образцом; а отношение полезного сигнала к фону, наоборот, существенно больше).

Однако при этом следует учитывать, что при осуществлении количественного МЭСА, интенсивность люминесценции (I) с увеличением концентрации люминофора в образце (C) сначала экспоненциально увеличивается лишь при малых C . Затем, в некотором диапазоне концентраций люминофора I изменяется мало. А при ещё большем увеличении C интенсивность люминесценции образца, и вовсе, начинает значительно уменьшаться, как показано на схеме (см. рис. 11.1.2).

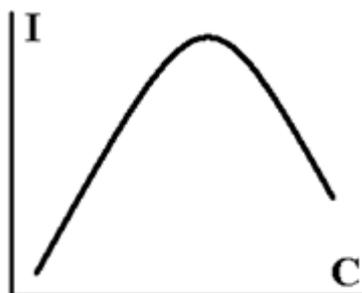


Рисунок 11.1.2 - График зависимости интенсивности спектральной линии от содержания в пробе химического элемента

Если попробовать описать это математически, то для фотолюминесценции (являющейся наиболее широко используемым в настоящее время методом МЭСА) можно получить следующее выражение:

$$I_L = I_{II} \cdot \varphi \cdot k ;$$

$$I_y = I_{II} \cdot 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot C} ; \quad I_{II} = I_{II} - I_y ; \quad \varphi = N_L / N_{II} \Rightarrow$$

$$I_{II} = I_{II} \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot C}) \Rightarrow I_L = k \cdot \varphi \cdot I_{II} \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot C}) ,$$

где I_{II} и I_y — интенсивность света от внешнего источника возбуждения до и после образца; I_{II} и I_L — интенсивность света, поглощенного образцом и люминесцентно излучаемого им; N_{II} и N_L — общее число квантов света, поглощенных образцом и люминесцентно излучённых им; φ — квантовый выход люминесценции; k — приборный фактор (определяющий, какая часть люминесценции регистрируется; при этом всегда $k \ll 1$ — т.к., в частности, излучается свет образцом во все стороны, а регистрируем мы его, как правило, только в одной области пространства); l — длина оптического пути; ε — концентрационный коэффициент поглощения.

Однако даже эта достаточно сложная формула описывает только возрастающую ветвь зависимости интенсивности люминесценции от концентрации. После чего начинается тушение люминесценции, которое также может протекать по нескольким механизмам.

(1) Концентрационное тушение, при котором невозбуждённые молекулы люминофора поглощают кванты света, испускаемые его возбуждёнными молекулами.

(2) Тушение свечения люминофора молекулами других веществ (растворителя или примесей), присутствующих в образце.

Этот вид тушения, в свою очередь, подразделяется на:

(2.1) статическое тушение, при котором другие вещества, взаимодействуя с невозбужденными молекулами люминофора, образуют продукты либо не люминесцирующие совсем, либо люминесцирующие при другой длине волны;

(2.2) и динамическое тушение, при котором тоже самое происходит при взаимодействии других веществ с уже возбужденными молекулами люминофора.

(3) Безызлучательно поглощение молекулами растворителя или нелюминесцирующих примесей, присутствующих в анализируемом образце, квантов света, способных возбуждать свечение люминофора, концентрацию которого в образце требуется определить; либо энергию силовых полей или частиц, используемую для иных способов возбуждения свечения этого люминофора (*электрическую, термическую и т.п.*).

(4) И наконец, температурное тушение, которое обусловлено, во-первых, значительным увеличением колебательной энергии молекулы при повышении температуры (*из-за чего облегчается безызлучательная перестройка электронной конфигурации возбужденной молекулы люминофора*). А, кроме того, при увеличении температуры может увеличиваться и скорость реакций люминофора, приводящих к тушению его свечения.

Таким образом, при больших концентрациях люминофора в образце регистрация его свечения проблематична (*ведь даже там, где нет тушения, dI/dC уменьшается с увеличением концентрации*). А вот при малых концентрациях мы имеем линейную зависимость: $I_{\text{люм}} \sim k \cdot C$. Вследствие чего, при люминесцентном анализе стремятся максимально разбавлять пробу.

Однако, у спектров фотолюминесценции, в отличие от спектров поглощения, есть не одна, а три степени свободы – по характеристическим диапазонам длин волн максимумов возбуждения и испускания; а также по времени задержки испускания относительно возбуждения.

Кроме того, общее количество веществ, способных к активной люминесценции, гораздо меньше, чем веществ, активно поглощающих видимый и УФ свет (*что уменьшает универсальность МЭСА, по отношению к УфМАСА и ВдМАСА, но зато, увеличивает селективность этого метода анализа*).

Также методы люминесцентного анализа различаются по способам возбуждения эмиссии образцов (*поскольку, как уже говорилось существует не только фото-, но и хемо-, электро- и другие виды люминесценции*).

Помимо этого, для увеличения селективности молекулярного фотолюминесцентного анализа в ряде случаев регистрируют:

Синхронные спектры, получаемые сканированием с одновременным синхронным изменением длин волн возбуждения и эмиссии, с сохранением постоянного сдвига ($\Delta\lambda_{\text{ф}}$) между ними. При этом, $\Delta\lambda_{\text{ф}}$ обычно устанавливают равным разности длин волн максимумов возбуждения и эмиссии, наблюдаемых для исследуемого образца на классических спектрах люминесцентного возбуждения и эмиссии. Но для лучшей селекции пиков отдельных компонентов в сложных смесях $\Delta\lambda_{\text{ф}}$ при записи синхронных спектров может выбираться и иным.

Асинхронные спектры, получаемые аналогично синхронным, но с разными скоростями сканирования по возбуждению и эмиссии (являющимися, однако, постоянными величинами, как по каналу возбуждения люминесценции, так и по каналу её эмиссии). То есть $\Delta\lambda_{\Phi}$ в этом случае (как и в случае регистрации классических спектров люминесценции) является величиной переменной по длине волны. Но регистрация эмиссии образца при этом производится всё же не при фиксированной длине волны возбуждения ($\lambda_{\text{В}}$), как при классическом способе, а при $\lambda_{\text{В}}$, изменяющейся в процессе сканирования.

Производные спектры разных порядков от классических, синхронных или асинхронных спектров люминесценции.

Синхронные и асинхронные спектры позволяют уменьшить количество пиков, наблюдаемых на классических спектрах люминесценции образца (как показано на рис.11.1.3); либо значительно сузить оные. Кроме того, при подобном способе регистрации спектров люминесценции в весьма значительной степени уменьшается фоновое излучение (проявляющееся за счёт рэлеевского и комбинационного рассеяния света молекулами растворителя, механизмы которого будут рассмотрены нами ниже). Однако, для проявления такого эффекта необходимо, чтобы уже на «классическом» спектре люминесцентного возбуждения или испускания образца наблюдалась «тонкая колебательная структура» (расщепление одного широкополосного пика на несколько).

Производная спектроскопия также позволяет сузить наблюдаемые спектральные полосы и увеличить их контрастность. Причем, происходит это в тем большей степени, чем больший порядок дифференцирования исходного спектра используется (см. рис.11.1.4).

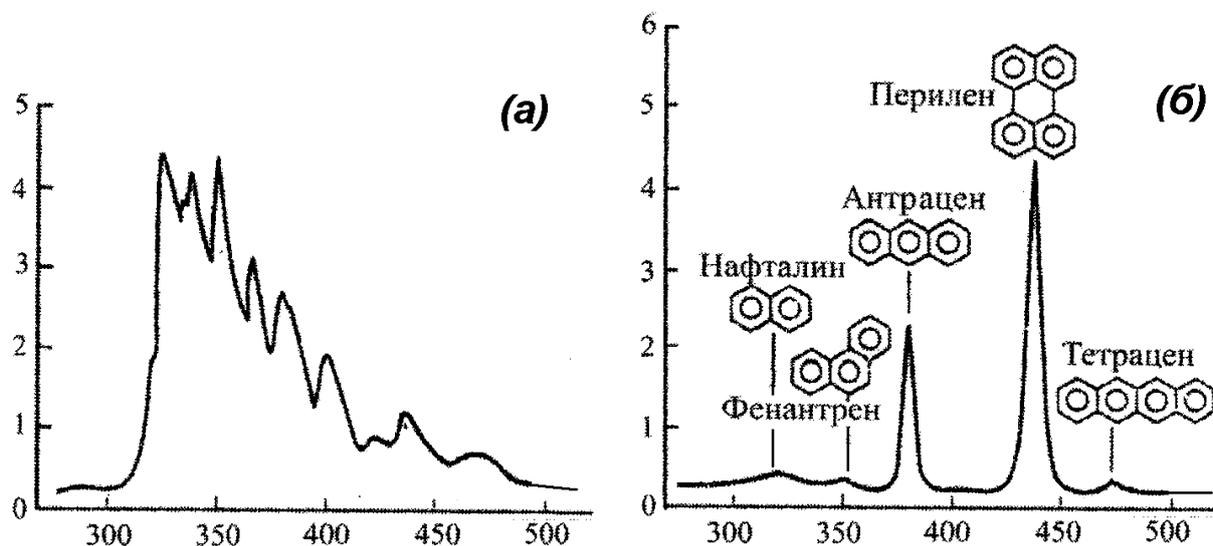


Рисунок 11.1.3 - Классический (а) и синхронный (б) спектры флуоресцентной эмиссии смеси нафталина, фенантрена, антрацена, перилена и тетрацена.

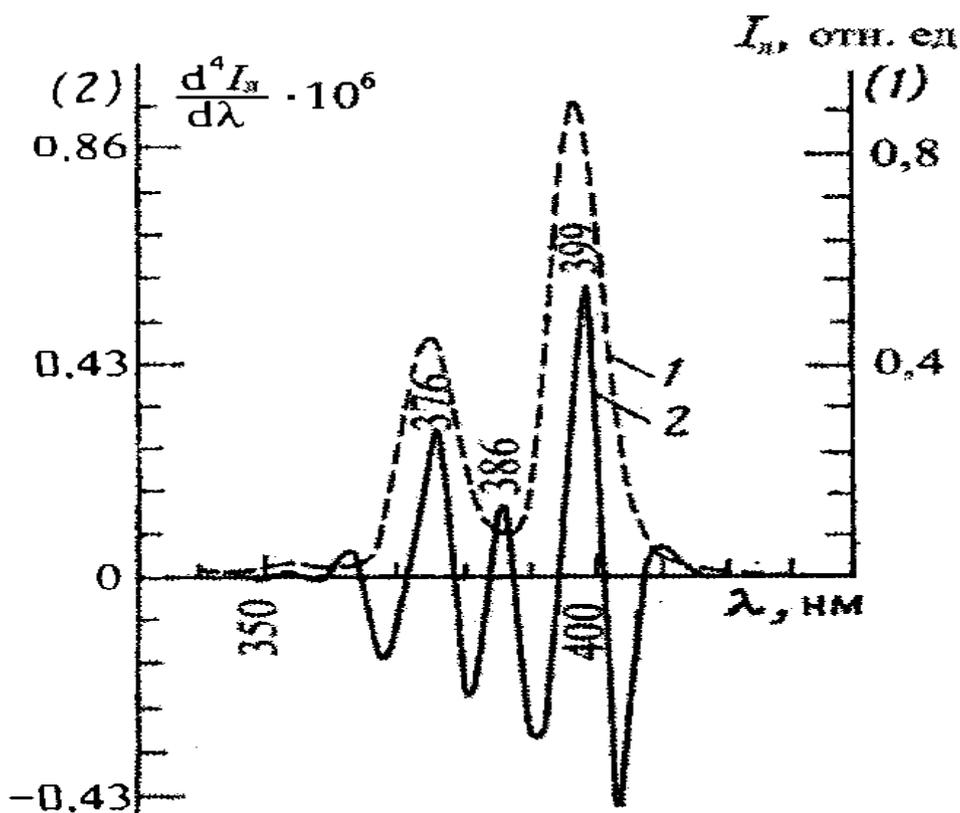


Рисунок 11.1.4 - Синхронный спектр флуоресцентной эмиссии смеси антрацена ($1,0 \times 10^{-7}$ М), 9,10-диметилантрацена ($2,0 \times 10^{-8}$ М) и 1,2-бензантрацена ($1,5 \times 10^{-7}$ М), измеренный при $\Delta\lambda = 5$ нм (пунктирная кривая 1). И спектр производной 4-го порядка от спектра 1 (сплошная кривая 2).

Также для увеличения селективности МЭСА в ряде случаев осуществляют регистрацию спектров люминесценции при пониженных температурах. Причем, подчас вплоть до 77К (*температуры кипения азота*). Для чего обычно используют так называемые стеклюющиеся растворы (*такие например, как смесь 1:1 воды с глицерином, смесь 1:1 изопентана и метилциклогексана, чистый этанол или в смеси с изопропанолом и т.п.*), имеющие аморфную (*или иначе, стеклообразную структуру*) даже при весьма низких температурах (*поскольку при кристаллизации образцов, как правило, проявляется анизотропия их оптических свойств + могут значительно увеличиваться мешающие МЭСА светоотражение, светорассеяние и тушение люминесценции*).

При этом, могут увеличиваться общий квантовый и энергетический выходы люминесценции (*а значит, и интенсивность аналитического сигнала по отношению к фону*)

- + проявляться фосфоресценция анализируемых образцов (*причем, даже в тех случаях, когда люминесценция вообще не была характерна для тех же образцов при более высоких температурах*), что увеличивает избирательность анализа (*в частности, за счёт больших, чем при флуоресценции, времени задержки и сдвига длин волн максимумов испускания относительно возбуждения; а также меньшего фонового свечения*)

- + более четко проявляться тонкая колебательная структура спектров возбуждения и испускания люминесценции (что увеличивает характеристичность этих спектров).

Кроме того, эффекты, аналогичные наблюдаемые при сильном охлаждении растворов, могут проявляться при сорбции исследуемых веществ на поверхности различных носителей (*твёрдых или жидких, органических или неорганических, таких например, как SiO_2 , Al_2O_3 , бумага и т.п.*) либо абсорбции потенциальных люминофоров вглубь различных полимерных матриц, мицелл (*дисперсных частиц коллоидных систем*), биологических мембран и т.п.

Помимо прочего, это явление в настоящее время активно используют, в частности, для чрезвычайно высокочувствительного (до 10^{-12}г) определения содержания в образцах различных неорганических ионов в кристаллофосфорах. Которые получают совместным прокаливанием при $700\text{--}1500^\circ\text{C}$ анализируемого образца + основы фосфора (в качестве которой используют такие термостойкие соединения, как CaO , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, CaSO_4 , NaF , ZnS и т.п.) + плавня (*бесцветные легкоплавкие соли Li , Na , K и т.п., которые добавляют в исходную смесь для того, чтобы облегчить внедрение определяемого иона в кристаллическую решетку основы фосфора*).

Кристаллофосфоры для определения органических соединений получают более мягким способом. Но они отличаются и меньшей чувствительностью определения. При этом поглощает энергию, необходимую для возбуждения люминесценции, как правило, кристаллическая решетка основы фосфора, а испускают кванты света в окружающую среду уже молекулы анализируемого вещества. И потому, спектры возбуждения люминесценции образца в составе кристаллофосфора и вне его, как правило, совершенно не похожи. А вот спектры испускания, наоборот, характеристически близки.

Помимо этого, электронные молекулярные спектры люминесценции могут быть изменены по интенсивности, сдвинуты по шкале длин волн, сужены или даже расщеплены на несколько более узких пиков, в случае, когда достаточно высокомолекулярное анализируемое вещество вместо полярного растворителя (*такого например, как вода*) помещается в растворитель с более низкой диэлектрической проницаемостью (*пропанол, бутанол, гексан, октан, декан и т.п.*), «изолирующей электронное взаимодействие» различных фрагментов анализируемых молекул; изменяющий интенсивность тушения люминесценции (*меньшую, в частности, в более вязких средах*) или процессов взаимодействия молекул люминофора с молекулами растворителя (*за счет, например, образования межмолекулярных водородных связей*) и т.п. Это иллюстрируют, в частности, рис.11.1.5 и рис.11.1.6.

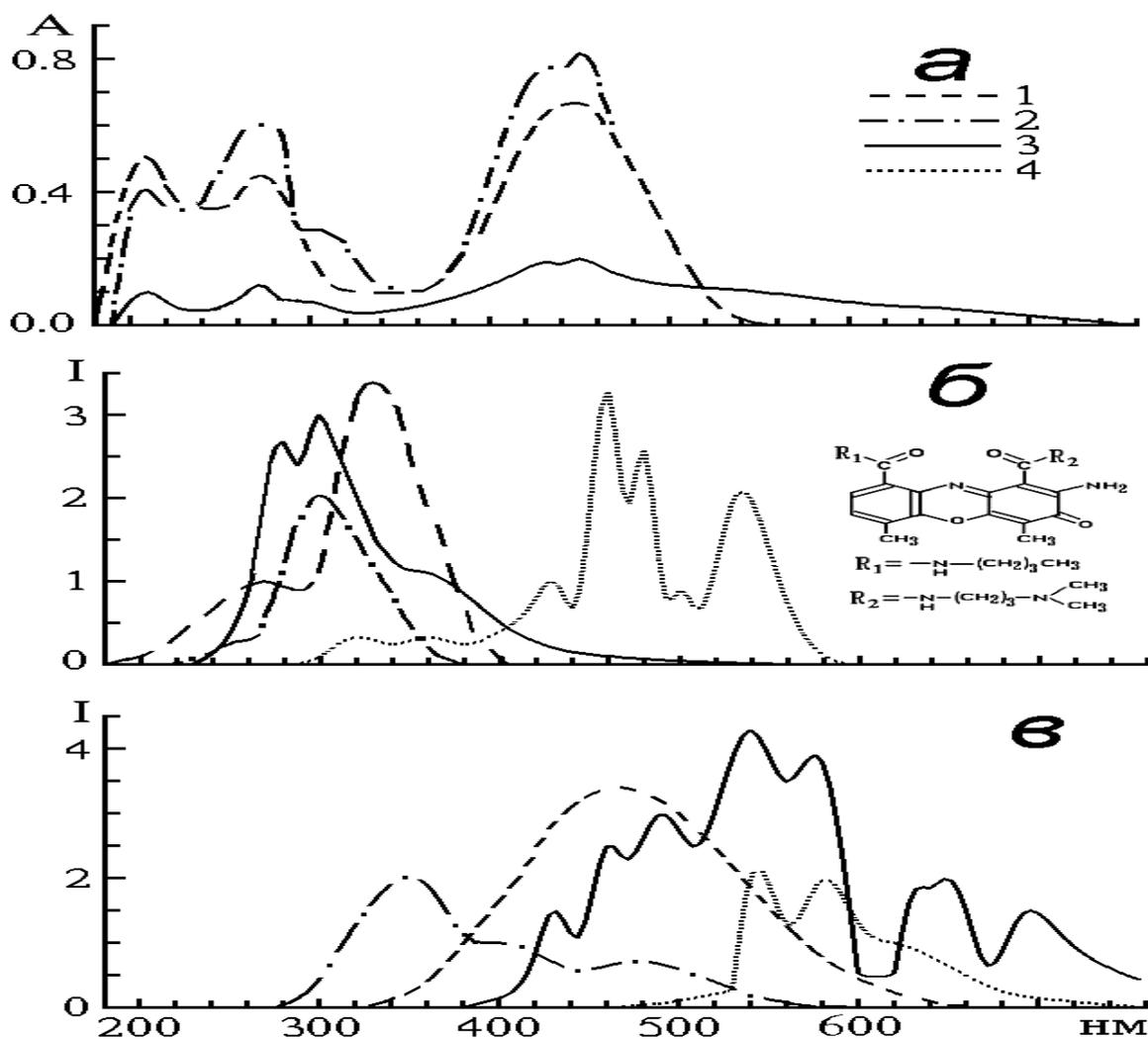


Рисунок 11.1.5 - Спектры поглощения (*а*), флуоресцентного возбуждения (*б*) и эмиссии (*в*) 2-амино-4,6-диметил-3Н-3-оксофеноксазина (*структурная формула показана на рисунке*) с концентрацией $7,5 \times 10^{-5}$ моль/л – в воде (*кривая 1*); 2-пропаноле (*кривая 2*) и октане (*кривые 3 и 4*); снятые при длинах волн флуоресцентного возбуждения и эмиссии: 330 и 470 нм (*1*), 300 и 350 нм (*2*), 300 и 490 нм (*3*) и 460 и 580 нм (*4*), соответственно. При этом, кривые 4 показаны на рисунке в масштабе, уменьшенном по интенсивности в 15 раз (*для соответствия масштабу кривых 1–3*).

Также немалое влияние на характер спектров люминесценции анализируемых систем могут оказывать: (1) общий уровень их ионной силы; (2) рН, вязкость и другие параметры среды; (3) способность молекул растворителя или нелюминесцирующих примесей активно поглощать кванты света, способные возбуждать фотолюминесценцию, либо энергию силовых полей или частиц, используемую для иных способов возбуждения люминесценции (*электрическую, термическую и т.п.*); (4) способность молекул растворителя или нелюминесцирующих примесей активно тушить (*по какому либо из вышеперассмотренных механизмов*) люминесценцию молекул анализируемых веществ; и т.п. (*см. рис.11.1.6*).

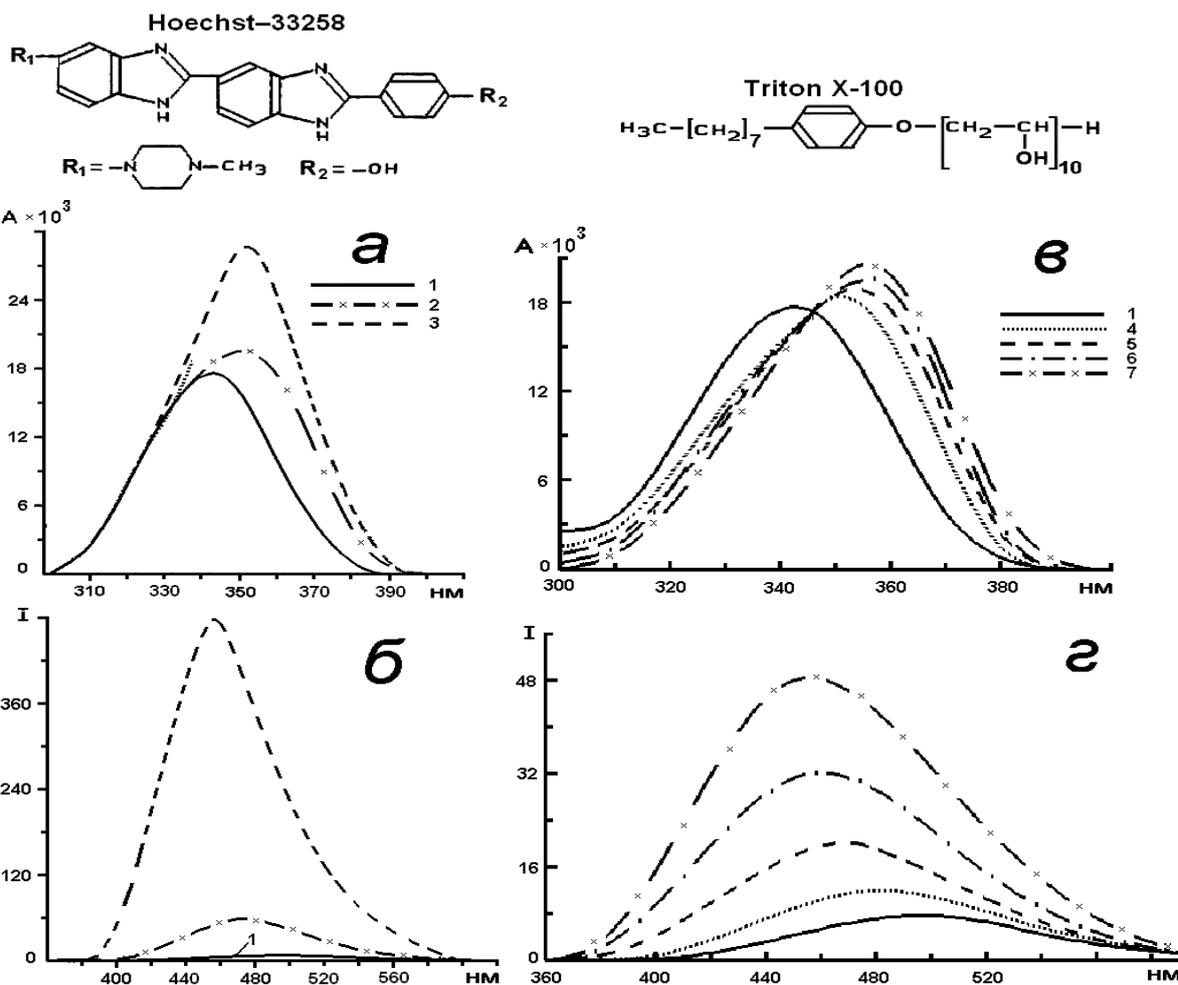


Рисунок 11.1.6 - Спектры поглощения (а, в) и флуоресцентной эмиссии (при длине волны возбуждения, соответствующей максимуму поглощения люминофора в каждом конкретном случае) (б, д) люминофора Hoechst-33258 с концентрацией $6,5 \times 10^{-7}$ моль/л в воде (кривые 1), 50% водном растворе сахарозы (увеличивающей вязкость раствора) (кривые 2), 2-пропанолe (с малой жидкостной проницаемостью среды) (кривые 3); а также в воде с добавлением Triton X-100 в соотношениях 3,5, 10, 20 и 50 моль/моль по отношению к Hoechst-33258 (кривые 4-7, соответственно).

В результате всего вышесказанного, методы МЭСА в большей мере, чем УфМАСА и ВдМАСА годятся и для качественного анализа веществ (причем, в ряде случаев, с использованием указанных выше специальных приемов, удаётся получить различные люминесцентные характеристики даже для комплексов, образуемых за счёт слабых межмолекулярных ван-дер-ваальсовых взаимодействий, о природе которых было рассказано в 1-й части данного пособия).

При этом, в наиболее сложном случае (когда требуется исследовать характер спектров молекулярной фотолуминесценции образцов с неизвестным заранее составом веществ либо с веществами, спектральные свойства которых ещё не изучены) рекомендуется следующая последовательность

действий. Сначала следует снять спектр молекулярного поглощения образца в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

Затем, возбуждая люминесценцию образца непрерывно (либо с наименьшим временем задержки регистрации испускания), отдельно при длине волны, соответствующей каждому из зарегистрированных максимумов поглощения (достаточно далеко отстоящих друг от друга по шкале длин волн), следует снять набор спектров люминесцентной эмиссии образца.

Потом, при каждом из зарегистрированных максимумов эмиссии (достаточно далеко отстоящих друг от друга по шкале длин волн) следует снять соответствующий ему спектр возбуждения (поскольку, в частности, в случае присутствия в анализируемом образце веществ или их форм с разными способностями к поглощению и люминесценции, спектры поглощения и возбуждения люминесценции для такого образца могут не совпадать).

И наконец, для каждого из зарегистрированных максимумов возбуждения (достаточно далеко отстоящих друг от друга по шкале длин волн) следует снять соответствующий ему спектр люминесцентной эмиссии, меняя при этом время задержки между возбуждением и испусканием, чтобы выявить как флуоресценцию, так и возможную фосфоресценцию образца.

В настоящее время, среди разных типов люминометров наиболее распространены фотолюминометры, которые, в свою очередь, подразделяются на атомарные (используемые для АЭСА) и молекулярные.

Кроме того, достаточно распространены хемолюминометры (характеризующиеся наибольшей дешевизной, компактностью и простотой исполнения); рентгеновские флуориметры (используемые в рассмотренном выше методе РФЭА); сцинтиляционные датчики (применяемые при радиометрии и аналогичные по своему устройству датчикам, применяемым при РФЭА и уже рассмотренным здесь ранее) и т.п.

Также достаточно активно применяются в настоящее время Оже-спектроскопия и другие методы электронной спектроскопии и микроскопии, которые будут рассмотрены ниже.

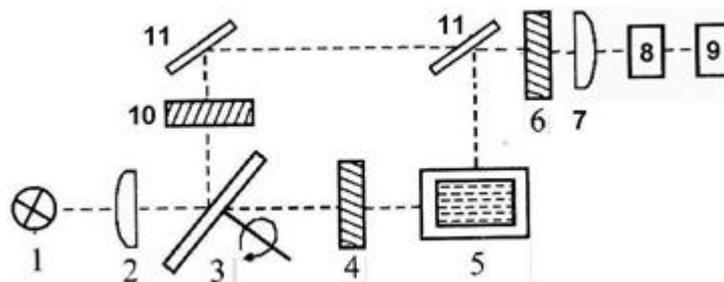


Рисунок 11.1.7 - Схема устройства фотолюминометра

При этом приборы, используемые в настоящее время для молекулярной фотолюминиметрии по своему устройству и исполнению, в основном, аналогичны абсорбционным фотометрам, рассмотренным ранее в разделе 10.2. В качестве примера, на рис. 11.1.7 приведена одна из возможных схем устройства фотолюминометра, где свет от источника излучения 1 через

коллиматор 2 попадает на модулятор 3. Последний представляет собой зеркальный диск с прорезью, который при включении прибора вращается с заданной скоростью. И если при этом на пути светового пучка оказывается прорезь модулятора 3, то свет через монохроматор в канале возбуждения 4 попадает в кювету с образцом 5; после чего люминесцентное излучение образца через монохроматор в канале эмиссии 6 и фокусирующий конденсор 7 попадает на вход фотодетектора 8; а с выхода последнего сигнал идет уже на регистрирующее устройство 9. А если на пути светового пучка, идущего от источника 1, оказывается сплошная часть модулятора 3, то свет, отразившись от неё, вместо образца 5 проходит через ослабляющий светофильтр 10; и далее, системой зеркал 11 через монохроматор 6 также направляется на фотодетектор 8. В результате, на последний попеременно попадает то излучение люминесценции образца 5 (I_D), то часть возбуждающего света (I_O). И устройство 9 в качестве аналитического сигнала вычисляет $A = \lg(I_D/I_O)$.

Исключение составляет необходимость использования в этих приборах:

+ двух монохроматоров или оптических фильтров (той же конструкции, какая рассматривалась ранее в разделах 9.2 и 10.2), располагаемых как до, так и после образца (в каналах возбуждения и эмиссии) даже при однолучевом варианте исполнения прибора.

+ источника светового облучения образца с повышенной интенсивностью или монохроматичностью (последнее повышает интенсивность излучения таких источников в заданном спектральном диапазоне, но уменьшает универсальность прибора, требуя перенастройки или смены источника светового облучения образца при необходимости изменения аналитической длины волны возбуждения), для чего применяются газоразрядные лампы сверхвысокого давления, импульсные лампы, наборы сверх ярких светодиодов с разными длинами волн излучения, лазеры с перестраиваемой частотой и т.п. (подробней см. раздел 9.3), а кроме того, в случае осуществления МЭСА, по сравнению с ВдМАСА возрастают и требования к стабильности используемого источника излучения и однородности его спектра испускания (или, по крайней мере, сглаживания «линейчатости» спектра; см. рис. 10.2.3).

+ Фотодетектора той же конструкции, какая рассматривалась ранее в разделе 9.2, но с увеличенной чувствительностью к слабым внешним световым потокам при пониженной величине фонового (темнового) сигнала.

+ А также взаимоперпендикулярного расположения друг относительно друга источника светового возбуждения образца и детектора эмиссионного излучения. Последнее используется для того, чтобы отсечь возбуждающий свет от внешнего источника (недопоглощенный образцом и имеющий направленность, строго заданную оптической системой прибора) от эмиссионного света (излучаемого самим образцом одинаково во всех направлениях). Хотя в случаях, например, лидарного исполнения прибора (которое будет описано в разделе 12.4), необходимости анализа крупных объектов (не помещающихся в кюветное отделение люминометра), также как и в ряде других случаев приходится регистрировать люминесценцию либо в направлении обратном возбуждающему световому потоку; либо даже в том же направлении, что и возбуждающий световой поток (осуществляя разделение возбуждающего и эмиссионного излучения только по различию их длин волн, а также по времени задержки

люминесценции, если регистрирующий её прибор используется в режиме фосфориметра).

Кроме того, в качестве опорного сигнала (по отношению к которому определяется интенсивность люминесценции фонового, анализируемого и стандартных образцов, что позволяет снизить требования к стабильности источников и детекторов излучения, применяемых в фотоМЭСА) в промежуточных между одно- и двух-лучевыми вариантами фотолюминометров может использоваться:

(1) либо часть возбуждающего светового излучения (см. рис. 11.1.7);

(2) либо излучение какого-либо отдельного стандартного устройства или образца, входящего в состав прибора;

(3) либо излучение (ненаправленное, также как и эмиссионное излучение, но имеющее отличные от последнего длины волн и нулевое время задержки), получающееся в результате рэлеевского или комбинационного рассеяния возбуждающего образец светового потока молекулами растворителя, составляющими основу анализируемого образца.

Плюс, для регистрации фотофосфоресценции используют:

- либо механические прерыватели (подобные модулятору 3, показанному на вышеприведенной схеме фотолюминометра), поочерёдно (через задаваемые оператором промежутки времени, определяемые, например, скоростью вращения модулятора) перекрывающие каналы возбуждения и эмиссии образца, в результате чего, регистрируется только длительное свечение образца в те моменты, когда возбуждающий его свет перекрыт;

- либо источник света, работающий в импульсном режиме, причем, чем короче эти импульсы, тем точнее набором кратного их количества можно определить τ_3 (время задержки люминесцентной эмиссии относительно времени её возбуждения), характерное для анализируемого вещества в образце.

Однако при этом следует учитывать, что

- если при использовании для возбуждения люминесценции источника с непрерывным свечением, в режиме «флуориметра» (с минимальным τ_3) регистрируются совместно как спектр флуоресценции, так и спектр фосфоресценции образца (1-й из которых можно убрать, задав с помощью механического прерывателя большее τ_3 . После чего время задержки фосфоресценции анализируемого образца τ_3^* можно достаточно легко подобрать, приняв за оное то максимальное приборное τ_3 , при котором у рассматриваемого образца перестаёт регистрироваться также и фосфоресценция);

- то при использовании для возбуждения люминесценции источника с импульсным свечением, в режиме «флуориметра» регистрируется, как правило, только спектр флуоресценции образца, а спектр фосфоресценции образца проявляется только при одном, конкретном приборном $\tau_3 = \tau_3^*$ (т.е. определить τ_3^* , не зная его заранее, в этом случае существенно сложнее).

Помимо этого, поскольку интенсивность излучения источника света, линейная дисперсия призмённых монохроматоров и чувствительность фотодетекторов зависят от длины волны света, при проведении точных прецизионных люминесцентных измерений, также как и в случае молекулярной абсорбционной

фотометрии, для получения истинных (*а не искаженных, вследствие конкретной реализации используемого оборудования*) спектров образцов приходится проводить дополнительную их корректировку. Для чего,

(1) снимаемые на конкретном приборе в стандартных условиях (*по температуре, растворителю, ширине спектральных щелей монохроматоров и т.д.*) спектры образцов с известным количеством тех или иных веществ, сравниваются с истинными спектрами, уже имеющимися для этих веществ в базе данных;

(2) либо на место анализируемого образца ставится иной стандартный источник люминесценции с уже установленными истинными спектральными характеристиками (*а в методах молекулярной абсорбционной фотометрии роль такого источника выполняют обычно стандартные светофильтры*).

И наконец, при фотолюминесцентных исследованиях (*также, как и при ранее рассмотренных фото-абсорбционных, см. раздел 10.2*), используют расширяющие их возможности:

+ оптоволоконные зонды (*позволяющие анализировать образцы сверхбольшого либо сверхмалого объема, сложнопрофильные и т.п., но при этом, поскольку такой зонд обладает собственными светопоглощающими свойствами, следует с большой долей осторожности сравнивать между собой спектры, получаемые с помощью различных типов таких зондов, а также спектры, получаемые без применения оных зондов*);

+ дополнительные фильтры, пропускающие только поляризованный свет, причем по-разному в каналах возбуждения и эмиссии (*что значительно повышает избирательность методов анализа, использующих неполяризованный свет, поскольку среди веществ, избирательно поглощающих, рассеивающих либо испускающих кванты света в заданном диапазоне длин волн лишь малая часть является ещё и оптически активными, подробнее об этом см. в разделе 12.1*);

+ приспособления для получения различных спектров отражения (*о принципах действия которых будет рассказано в разделе 12.2*), позволяющие анализировать твердые и жидкие образцы с малой оптической прозрачностью либо значительной способностью к тушению флуоресценции; а также создавать компактные переносные фотолюминометры для анализа приповерхностных областей больших объектов (*хотя аналогичные приспособления изготавливаются и в качестве отдельных модулей, вставляемых в кюветное отделение стационарных фотолюминометров*), однако, как и в случае применения оптоволоконных зондов, следует с большой долей осторожности сравнивать между собой спектры отражения, получаемые при разных условиях; а уж тем более, сравнивать эти спектры со спектрами, получаемыми при «обычном» способе пропускания возбуждающего света через весь анализируемый образец.

Впрочем, наряду со стационарными (*описываемыми, например, в <http://bio-chim.ru/index.shtml>, http://analit-spb.ru/equipment_item.php?id=64, <http://nytek.ru/catalog/spectrofluorometers/?yclid=665638450286300279> или <http://czl.ru/catalog/optical-instruments/fluorometry/>*), весьма компактные переносные фотолюминометры изготавливаются и без приспособлений для регистрации спектров отражения.

Так, например, анализатор «Флюорат-02» (*см. <http://apl54.ru/katalog/>*)

pribory-dlya-lyuminestsentnogo-analiza/26-analizator-zhidkosti-flyuorat-02-2m); имея вес 6,5 кг; габариты 305×320×110 мм; импульсную газоразрядную ксеноновую лампу, в качестве источника возбуждения; и вставные (*сменные*) стеклянные светофильтры, в качестве монохроматоров, способен работать в режимах флуориметра, фосфориметра, фотометра, нефелометра и турбидиметра, определяя, в частности, не менее 5×10^{-6} г/л фенола в воде.

А флуориметр «Qubit 3.0» (см. http://helicon.ru/catalog/detail.php?iblock_id=4§ion_id=22&element_id=12401); имея вес 740 гр; габариты 136×250×55мм и два светодиода (с максимумами излучения в районе 470 и 635 нм), в качестве источника возбуждения, совмещенного с монохроматорами, с использованием специфических флуорофоров, способен определять содержание в водных растворах ДНК от 10^{-5} г/л и белков от 10^{-2} г/л в пробах объемом от 1 мкл, затрачивая от 1 минуты на одно измерение.

В случае же хемилюминометров, один из наиболее компактных вариантов, реализованный в виде анализатора «System Sure Plus», имеющего вес 260 гр, габариты 178×25×76 мм и определяющего в водных растворах не менее 10^{-11} моль/л АТФ в течение не более 1 минуты при объеме пробы от 0,1 мл (*по интенсивности специфической биолюминесцентной реакции, протекающей с участием этого вещества – см. http://testo.spb.ru/product/ljuminometr-systemsure-plus/*) включает в себя: микрокювету с образцом

- + отражающе–фокусирующую сферу вокруг микрокюветы,
- + полупроводниковый светочувствительный элемент (ПСЭ),
- + регистратор выходного сигнала ПСЭ.

Кроме того, фотометры (*работающие как на просвет образцов, так и на отражение света от оных*) и фотолюминометры в ряде случаев совмещают с микроскопом, что позволяет проводить точный пространственный анализ распределения различных веществ на поверхности или в глубине оптически прозрачных исследуемых образцов.

Также современные флуориметры, помимо собственно люминометрических измерений, как правило, используются и для регистрации светопоглощения образцов (*причем, не только в прямом, но и в отраженном свете, с помощью оптоволоконных зондов*) в видимом, а также ближнем УФ и ИК диапазонах спектра (ВдМАСА). Плюс, как уже говорилось, такие приборы могут быть использованы для поляриметрических, а также турбидо- и нефелометрических измерений (*о чём подробнее см. в разделах 12.1 и 12.3*). Плюс, при достаточной интенсивности источника излучения и чувствительности фотодетектора современные спектрофлуориметры могут быть использованы также для регистрации рэлеевского и комбинационного светорассеяния образцов (*о чём подробнее см. в разделе 12.5*).

В качестве примера такого прибора можно привести спектрофлуориметр «СМ 2203» (см. например http://solar-lab.ru/?page_id=137), общая оптическая схема которого показана на рис. 11.1.8. Этот прибор имеет вес 19 кг; габариты 500×400×230 мм; время выхода на рабочий режим после включения не более 5 минут; время непрерывной работы не менее 8 часов; ширину спектральных щелей монохроматоров, изменяющуюся в диапазоне от 1 до 15 нм; кюветное отделение с магнитной мешалкой, электрически термостатируемое в диапазоне от 20 до

50⁰С и т.д. При этом, «СМ 2203» позволяет регистрировать спектры флуоресценции, фосфоресценции (*со временем задержки относительно возбуждения от 0,02 до 10 с*), а также спектры рэлеевского и рамановского (*комбинационного*) рассеяния твердых, жидких и газообразных образцов в диапазоне от 220 до 820 нм и спектры поглощения в диапазоне от 220 до 1100 нм. А оптическая схема этого прибора включает в себя ксеноновую лампу (1) с частотой импульсов 0,02 секунды и интегральным параболическим отражателем, свет от которой сферическим фокусирующим зеркалом (2) направляется в монохроматор возбуждения (I) (*двойной, со сложением дисперсий*), состоящий из 2-х также сферических зеркальных коллиматорных объективов (3 и 7), 2-х идентичных дифракционных решеток (5 и 8), 3-х спектральных щелей (4, 5 и 9) изменяемой ширины и светофильтра (10), используемого для устранения излучения высших порядков дифракции. Далее, свет спектрального интервала, выделенного с помощью изменения ширины спектральных щелей монохроматора и угла поворота его дифракционных решеток, фокусируется тороидальным зеркалом 11 через светоделительную плоскопараллельную пластинку 12 (*отводящую часть излучения на фотодиод 13, типа «ФДУК-2УТ», используемого для контроля временной нестабильности источника излучения и соответствующей коррекции спектров, получаемых на «СМ 2203»*) и (*при необходимости*) поляризационный фильтр 14 (*используемого при осуществлении поляризационных измерений для выделения света, поляризованного в различных плоскостях*) попадает в кювету с образцом (15), с 2-х других сторон от которой расположены зеркальные отражатели 16 и 17, увеличивающие выходной сигнал люминесценции в 2,5–3 раза. Затем, либо при осуществлении ВдМАСА, зеркало 17 убирается, и вместо него, непоглощенный образцом свет направляется на фотодиод 29 (*аналогичный вышеупомянутому фотодиоду 13*). Либо при осуществлении МЭСА или КР-спектроскопии, люминесцентное или рассеянное излучение от кюветы 15 через поляризационный фильтр 18 (*аналогичный вышеупомянутому фильтру 14 и также используемый лишь при необходимости осуществления поляризационных измерений*) тороидальным зеркалом 19 (*аналогичным зеркалу 11*) направляется в монохроматор эмиссии (II) (*аналогичный монохроматору I*). После выхода из которого свет выделенного спектрального интервала попадает на вход фотоприемного устройства 28, в качестве которого в данном случае используется ФЭУ типа «R 928», и преобразуется оным в усиленный электрический сигнал, попадающий далее через плату управления «СМ 2203» (*включающую в себя драйверы управления монохроматорами возбуждения и эмиссии, а также термостатированием кюветы и магнитной мешалкой + коммутатор сигналов от фотоприемных устройств 13, 28 и 29 + аналого–цифровой преобразователь + микропроцессор*) на компьютер, через который осуществляется управление работой данного прибора и регистрация спектров, получаемых с его помощью.

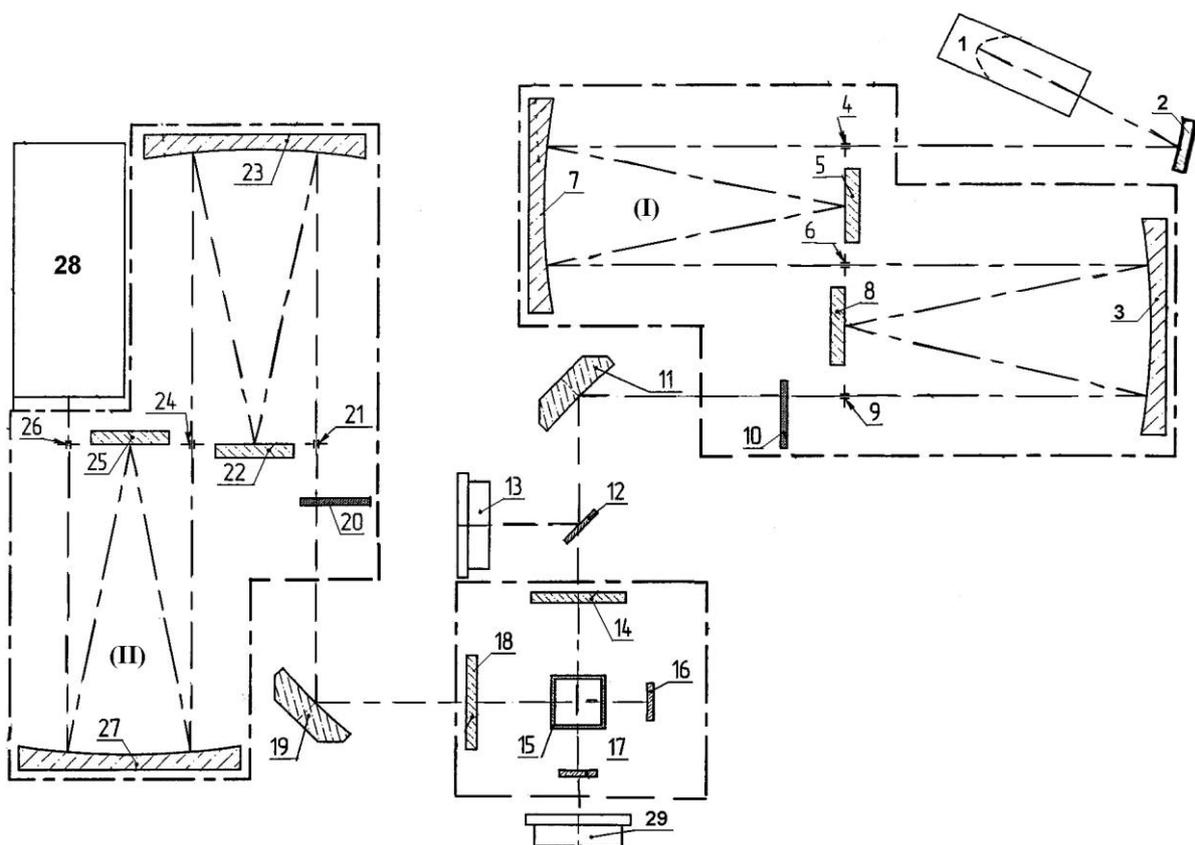


Рис. 11.1.8. Оптическая схема спектрофлуориметра «СМ 2203».

Помимо этого, МЭСА (также как и ранее рассмотренные методы ВдМАСА) в настоящее время активно применяют не только для изучения статического состояния различных физико–химических систем, но и для исследования динамики взаимодействия между различными компонентами этих систем; а также взаимопереходов в них одних форм веществ в другие, в зависимости от действия различных внешних факторов (термических, химических, акустических, электрических, магнитных, механических и т.п.).

Причем, помимо обычных двумерных спектров, в этих случаях, с развитием использования матричных фотодетекторов и Фурье–спектрометров (позволяющих значительно быстрее снимать сразу весь спектр поглощения или испускания образца) появилась возможность регистрировать также трехмерные спектры. В которых по осям Y и Z откладываются длина волны испускания либо возбуждения (Y) и интенсивность люминесценции (Z), а по оси X откладывается время от начала реакции (или какого-либо внешнего воздействия на анализируемый образец); концентрация анализируемого вещества (изменяющаяся, например, в ходе его титрования) и т.п. Либо по оси Z по-прежнему откладывается наблюдаемая интенсивность люминесценции образца. А по осям X и Y – длины волн возбуждения и испускания этой люминесценции.

В качестве примера прибора, способного регистрировать 3-мерные кинетические спектры люминесценции, можно привести спектрофлуориметр «RF 6000», выпускаемый фирмой «Shimadzu» (Япония) – см. например <http://analit-spb.ru/oborudovanie/po-tipu-oborudovaniya/atomnaya-spektroskopiya/spektrofluorimetri/spektrofluorimetr-rf-6000/>

Кроме того, молекулярный люминесцентный анализ (*также как и другие фотометрические методы*) для увеличения селективности нередко совмещают с хроматографическими и электрофоретическими методами предварительного разделения различных многокомпонентных химических систем; а также с другими специальными методами предварительной пробоподготовки (*такими как экстракция, сорбция, фильтрация, перекристаллизация, перегонка и т.п., подробнее о которых будет рассказано в следующих частях данного пособия*).

И наконец, при измерении слабых световых потоков (*которые, в частности, при фотоМЭСА в разы слабее, чем при УфМАСА и ВдМАСА, из-за необходимости использования в фотолуцинометрах двух монохроматоров, вместо одного; значительно меньшей интенсивности излучаемого света по отношению к поглощаемому тем же веществом, вследствие безизлучательной диссипации энергии; ненаправленного характера люминесценции, из-за чего детектором улавливается, как правило лишь малая её часть; и т.д.*) в ряде случаев применяются также:

(1) Визуальная люцинометрия, в которой в качестве детектора используется человеческий глаз (*что особенно эффективно при люминесцентном анализе клеточных культур и микроорганизмов либо других крупных надклеточных агрегатов*).

(2) Кюветы увеличенного объема и со специальным покрытием, отражающим возбуждающий свет (*для увеличения длины его оптического пути за счет многократного прохождения через один и тот же объем образца*); фокусирующим эмиссионное излучение (*испускаемое образцом во всех направлениях*) на фоторегистрирующее устройство с возможно более широкой площади поверхности кюветы и т.п. Что особенно эффективно при регистрации фосфоресценции или люминесценции, возбуждаемой иными способами, нежели внешнее световое или рентгеновское облучение (*поскольку в этих случаях возбуждающее излучение не является фоновым при регистрации эмиссионного*).

(3) Проточные кюветы, при пропускании через которые объема пробы, значительно большего, чем в случае использования обычных кювет с фиксированным объемом пробы, можно не только суммировать интенсивность люминесценции всего этого объема, но и общее количество люминесцентных импульсов, амплитуда которых превышает заданное фоновое значение, за заданный промежуток времени.

(4) Фотолуцинометры, работающие по лидарному принципу (*что так же, как будет описано в разделе 12.4, существенно увеличивает длину оптического пути и объем анализируемой пробы*) с разделением фотодетектором возбуждающего и излучаемого образцом света по длинам волн и времени задержки люминесценции.

(5) Источники света с повышенной интенсивностью или монохроматичностью излучения.

(6) Светофильтры или монохроматоры с увеличенной шириной спектральных щелей (*для уменьшения доли света, отсекаемого этими устройствами; а также для осуществления возможности аппаратного интегрирования возбуждения образца и его люминесценции по достаточно большому диапазону длин волн*).

Кроме того, как уже говорилось выше, увеличить интенсивность и избирательность аналитического сигнала, а также уменьшить фоновое свечение образца можно:

(1) за счёт выбора соответствующего растворителя (*причем, не только с оптимальными величинами диэлектрической проницаемости, поляризуемости и вязкости, но и с минимальным светопоглощением и светорассеянием в области длин волн возбуждения и эмиссии анализируемых веществ, а также минимальным содержанием активных примесей, способных значительно исказить результаты анализа*);

(2) адсорбировав анализируемую смесь на специальном носителе;

(3) осуществляя регистрацию люминесценции при пониженной температуре в термостабилизированной (*электрически или за счёт внешнего жидкого теплоносителя*) кювете;

(4) используя для регистрации эмиссии длины волн, насколько возможно более отличающиеся от длины волны максимального возбуждения образца;

(5) регистрируя люминесценцию с возможно большим временем задержки испускания относительно возбуждения.

Также, в ряде случаев, для регистрации слабых аналитических сигналов используется метод накопления, при осуществлении которого интенсивность люминесценции образца при одних и тех же заданных параметрах регистрируют не один, а N раз. И после суммирования полученных значений, в то время как полезный сигнал возрастает в N раз, шум (*в том случае, если он является случайной величиной, и потому, при суммировании то складывается, то вычитается*) увеличивается только в $N^{0,5}$ раз.

Помимо этого, все растворы, используемые для анализов (*особенно, органические*), желательно хранить при пониженной температуре и в концентрированном виде. Плюс, учитывать возможность адсорбции реактивов на стенках посуды, используемой для их хранения. Плюс, учитывать возможность фотолиза (*разложения люминесцирующих форм анализируемых веществ под действием света*), который, обычно, проявляется в тем большей мере, чем более коротковолновому, интенсивному и длительному облучению подвергается анализируемый образец. Плюс, обеспечивать постоянство температуры анализируемого образца, рН среды и других условий, при которых проводится эксперимент.

11.2. Индикаторные методы МЭСА

И наконец, также как и в случае УфМАСА и ВдМАСА, при осуществлении МЭСА для увеличения чувствительности и селективности весьма часто применяются не только прямые, но и косвенные методы, использующие дополнительные реагенты, при специфическом взаимодействии которых с анализируемыми веществами люминесценция образца существенно увеличивается, уменьшается, сдвигается по максимуму в другую область длин волн, изменяет время задержки между возбуждением и испусканием и т.п. При этом, косвенные методы МЭСА (*активно применяемые в настоящее время не только не только в фото-, но и в хемо-*,

а также в ряде других методов МЭСА) подразделяются на:

(1) Кинетические каталитические методы, при осуществлении, которых определяемое вещество вводят, в качестве катализатора, в систему, содержащую специфические к определяемому веществу дополнительные реагенты. В результате чего, наличие даже одной частицы определяемого вещества способствует образованию (или наоборот, разложению) большого количества других частиц или их комплексов, способных к какому либо из типов люминесценции.

(2) Обратные индикаторные методы, в которых определяемое вещество, взаимодействуя с невозбужденными (*статическое тушение*), либо возбужденными (*динамическое тушение*) молекулами индикатора тушит люминесценцию последнего, либо изменяет иные её характеристики (*длину волны максимума испускания или возбуждения, время задержки между испусканием и возбуждением и т.п.*).

(3) Прямые индикаторные методы, в которых определяемое вещество, взаимодействуя с молекулами индикатора, увеличивает интенсивность люминесценции последнего либо изменяет иные её характеристики ($\lambda_{И}$, $\lambda_{В}$, $\tau_{З}$).

(4) Так называемый, сортовой анализ (или иначе, *качественные индикаторные методы*), при осуществлении которого изменение интенсивности или иных характеристик люминесценции индикатора ($\lambda_{И}$, $\lambda_{В}$, $\tau_{З}$) является лишь указанием на качество (*сорт*) анализируемого образца. Этой группой методов пользуются для быстрой сортировки веществ, без выявления причин появления индикаторного сигнала. Не уступая, в частности, по чувствительности радиоактивному, данный метод является гораздо более доступным, дешевым и безопасным. С его помощью судят о степени чистоты реактивов или материалов. Отличают друг от друга различные сорта резин, каучуков, полимеров, стекол, алмазов, углей и т.п. Осуществляют различную медицинскую диагностику. Определяют качество и безопасность различной пищевой и продукции и т.д.

(5) И косвенные индикаторные методы. В которых изменение интенсивности или иных характеристик люминесценции индикатора является лишь качественным признаком завершения реакции или присутствия в ней анализируемого вещества. А непосредственно количественно определение проводят затем каким-либо иным методом.

При этом, самыми распространёнными среди последних являются методы люминесцентного титрования. Которые имеют следующие преимущества по сравнению с «классической титриметрией».

(1) Чувствительность люминесцентных индикаторов к гораздо меньшим концентрациям определяемых веществ, чем в случае обычных абсорбционно-фотометрических индикаторов (*до 10^{-3} мкг/мл или, в ряде случаев, ещё меньше*).

(2) Возможность проводить анализ в мутных и сильно окрашенных средах (*чем широко пользуются, в частности, при оценке рН вин, овощных соков, эфирных масел и т.п.*).

(3) Для люминесцентного титрования требуется пренебрежимо малое количество индикатора, что снижает «индикаторную ошибку» титрования.

(4) Люминесцентные индикаторы восполняют пробелы в наборе обычных «цветных» (*абсорбционно-фотометрических*) индикаторов.

Фотолюминесцентными индикаторами (ФЛИ) называются соединения, которые способны увеличивать или уменьшать интенсивность своей фотолюминесценции в видимой области спектра либо изменять длину волны максимума испускания (или, что существенно реже, возбуждения или длительность задержки между испусканием и возбуждением) в результате:

- (1) комплексообразования с ионами металлов (*металло ФЛИ*);
- (2) взаимодействия с H^+ или OH^- ионами (*кислотно–основные ФЛИ*);
- (3) взаимодействия с различными окислителями или восстановителями, присутствующими в анализируемом образце (*окислительно–восстановительные или редокс ФЛИ*);
- (4) сорбции на твердых дисперсных частицах осадков, образующихся (или растворяющихся) в процессе титрования, или десорбции с оных (*адсорбционные ФЛИ*).

В то время как хемилюминесцентные индикаторы способны изменять интенсивность, длину волны максимума испускания либо иные характеристики своей люминесценции в отсутствие иных источников возбуждения, кроме протекания в анализируемых системах каких-либо экзотермических химических реакций.

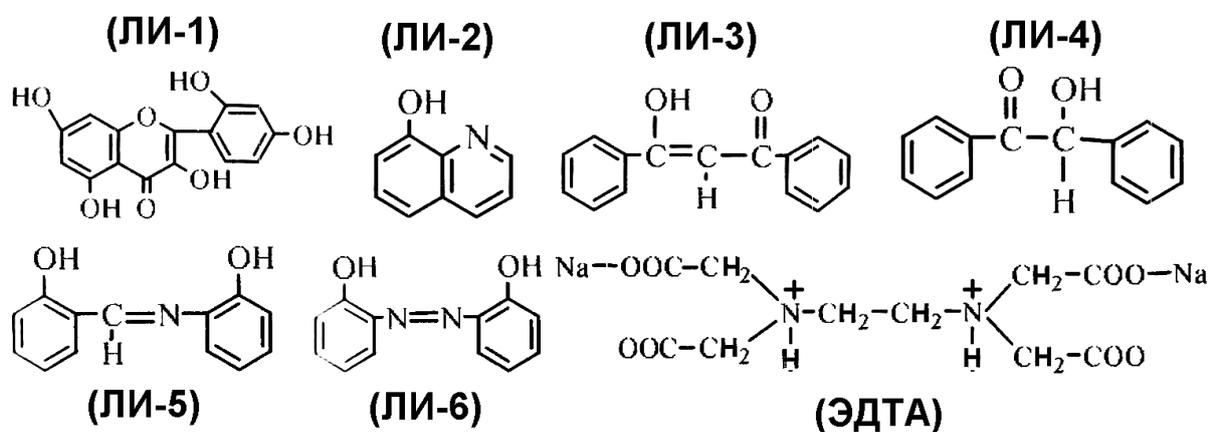
При этом, ЛИ являются, как правило, сложными органическими соединениями, имеющими в своём составе фрагменты с развитой системой сопряженных, кратных, ковалентных π -электронных связей (*поскольку даже внешние валентные σ -электроны способны возбуждаться лишь при длинах волн меньше 180 нм*). Причем, чем длиннее цепь такого сопряжения, тем в более длинноволновую область смещаются спектры поглощения и люминесценции таких соединений (*батохромный и батофлорный сдвиги*) и тем более интенсивными, как правило, они становятся. А нарушение сопряжения (*вследствие взаимовращения фрагментов молекулы, неплоского её строения, пространственных затруднений и т.п.*) приводит к смещению спектров поглощения и люминесценции таких соединений в более коротковолновую сторону (*гипсохромный и гипсофлорный сдвиги*); а также, как правило, к уменьшению их интенсивности.

В связи с этим, одной из предпосылок активной люминесценции является наличие в молекуле ЛИ конденсированных ароматических циклов. Причем, введение в такую структуру даже одного заместителя, способного эффективно взаимодействовать с основной системой сопряженных π -электронных связей ЛИ, как правило, вызывает достаточно значительные батохромный и батофлорный сдвиги в спектрах поглощения и люминесценции таких соединений. А несколько электронодонорных или электроноакцепторных таких заместителей, как правило, усиливают влияние друг друга.

Кроме того, на проявление активных люминесцентных свойств часто влияет наличие гетероатома (*отличного от углерода или водорода*), связанного с основной системой сопряженных π -электронных связей ЛИ. При этом, если такие соединения слабо флуоресцируют, то как правило, они сильно фосфоресцируют; и наоборот.

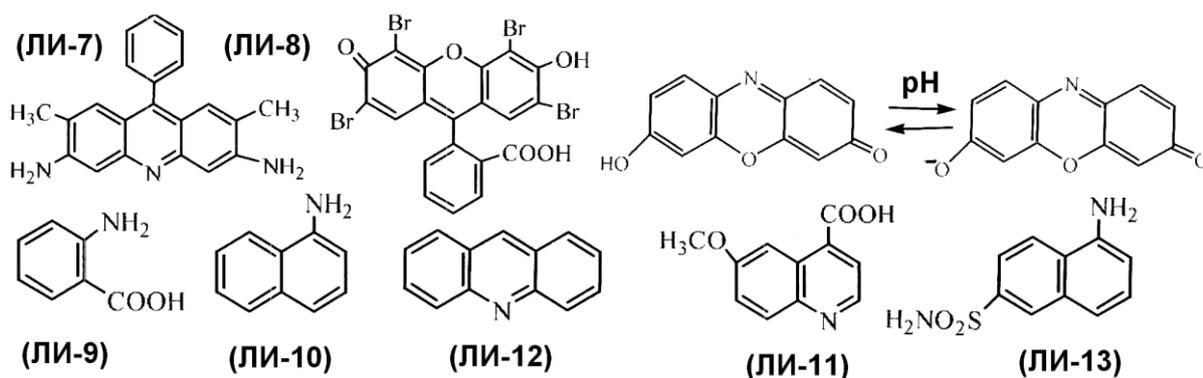
Из металлов ФЛИ наибольшее применение в настоящее время имеют: кальцеин (иначе, флуорексон, широко используется для определения присутствия *Ca* и *Mg* в разнообразных биологических материалах; а также ионов *Co*, *Cu*, *Fe*, *Mn*, *Hg* и других металлов, представляет собой сложную смесь разных хелатобразующих реагентов, таких например, как флуоресцеин и другие), морин (ЛИ-1) (также широко применяется для определения ионов различных металлов; другие реагенты этого класса: флавонол, 3-оксифлавонол, кварцетин, нарингенин), 8-оксихинолин (ЛИ-2) (образует флуоресцирующие хелатные комплексы с более чем 25-ю металлами), дибензоилметан (ЛИ-3) (также как и бензоилацетон, используется в качестве люминесцентного реагента на переходные и редкоземельные металлы), бензоин (ЛИ-4) (используется для количественного определения *B*, *Ge*, *Si*, *Sb*, *Zn*, *Cu*, *Ag*, *Co*, *Ni* и некоторых других металлов), салицилиден-0-амино-фенол (ЛИ-5) (Относится к так называемым «основаниям Шиффа»). Другие реагенты этого класса: *N*-салицилиден-2-амино-3-оксифлуорен, бис(салицилиден)этилендиамин, *N,N'*-бис(салицилиден)-2,3-диаминобензофуран. Все эти индикаторы широко используются для определения *Al*, *Ga*, *Mg* и других химических элементов), *o,o'*-диоксиазобензол (ЛИ-6) (область применения у этого и других азосоединений та же, что и у соединения ЛИ-5). Структурные формулы этих соединений приведены на схеме.

В процессе титрования происходит разрушение комплекса определяемого иона Me^{n+} с индикатором и образование более прочного комплекса Me^{n+} с титрантом, в качестве которого обычно используется ЭДТА (комплексон III, трилон Б) или F^- . При этом, люминесцировать индикатор может либо в виде комплекса с Me^{n+} , либо в свободном виде.



Чувствительность кислотно-основных ФЛИ к изменению рН, как правило, определяется переходами между их молекулярной и ионизированными формами (см. схему), что может сопровождаться смещением длины волны испускания, возбуждения или поглощения данного индикатора. В настоящее время известно более 200 кислотно-основных ЛИ. Это производные бензола, нафталина, акридина, кумарина, флуоресцеина и др. Наиболее распространены из них сейчас: бензофлавин (ЛИ-7) (диапазон рН перехода от 0,3 до 0,7; при этом флуоресценция ЛИ-7 меняет свой цвет с желтого на синий); эозин (ЛИ-8) (иначе,

2,4,5,7-тетрабром-флуоресцеин; диапазон рН перехода от 0 до 3; после чего у ЛИ-8 появляется зелёная флуоресценция); антралиловая кислота (ЛИ-9) (в диапазоне рН от 1,5 до 14 происходит постепенное увеличение, а затем уменьшение интенсивности и сдвиг длины волны максимума флуоресценции ЛИ-9 в синей области спектра); α -нафтиламин (ЛИ-10) (в диапазоне рН от 3,4 до 4,8 у ЛИ-10 проявляется флуоресценция в синей области спектра); хининовая кислота (ЛИ-11) (в диапазоне рН от 4 до 5 флуоресценция ЛИ-11 меняет свой цвет с желтого на синий); акридин (ЛИ-12) (в диапазоне рН от 5,2 до 6,6 флуоресценция ЛИ-12 меняет свой цвет с зеленого на фиолетовый); 1-нафтил-амино-6-сульфамид (ЛИ-13) (в диапазоне рН от 1,9 до 3,9 у ЛИ-13 появляется зелёная флуоресценция; а в диапазоне рН от 9,6 до 13 – постепенно исчезает).



У окислительно–восстановительных ФЛИ активно флуоресцировать могут либо окисленная, либо восстановленная формы, либо и та, и другая.

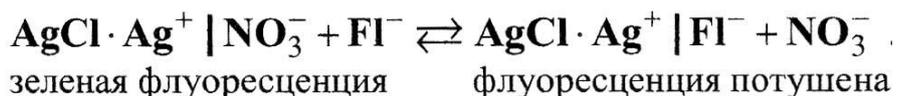
Так, например, комплексы Ru^{2+} с 2,2-дипиридиллом, 1,10-фенантролином и некоторыми их метилпроизводными флуоресцируют оранжево–красным цветом; а комплексы Ru^{3+} с теми же соединениями – нет.

Также в качестве окислительно–восстановительных ЛИ используют: трипафлавин, $\alpha(\beta)$ -нафтофлавон, риванол, флуоресцеин, родамин С, кармин и т.п. А в качестве титрантов, при этом: растворы йода, брома, перманганатов, солей Zr^{4+} .

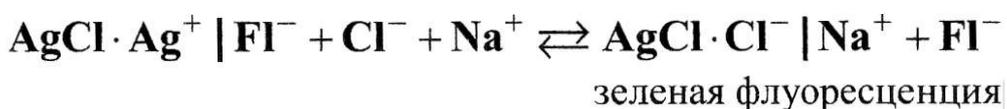
Адсорбционные ФЛИ применяют в различных методах осадительного титрования. При этом, в качестве индикаторов используют люминофоры, являющиеся слабыми органическими кислотами или основаниями. При определенных значениях рН они могут существовать в анионной или катионной формах, обладающих разными флуоресцентными способностями. Поэтому процесс титрования сопровождается различным изменением флуоресценции для анионных и катионных адсорбционных ЛИ.

Принцип действия адсорбционных ЛИ можно проследить на примере титрования $AgNO_3$ раствором $NaCl$ в присутствии флуоресцеина (HF1) (см. таблицу), являющегося слабой кислотой. До начала титрования анализируемый раствор проявляет интенсивную флуоресценцию свободного флуоресцеина, которая по мере титрования постепенно исчезает, а после достижения точки эквивалентности (ТЭ) вновь проявляется.

Это объясняется следующим образом. До достижения ТЭ на поверхности образующегося осадка AgCl из раствора в 1-ю очередь адсорбируются родственные этому осадку ионы Ag⁺. В результате чего, поверхность частиц осадка заряжается положительно. И в качестве 2-ой составляющей двойного электрического слоя (ДЭС) на их поверхности начинают адсорбироваться из раствора уже присутствующие, там отрицательно заряженные ионы NO₃⁻ и F⁻ (*анионная форма флуоресцеина*). Причем, более крупные ионы (*в данном случае, F⁻*) в большей мере склонны к адсорбции, и потому, способны вытеснять с поверхности осадка AgCl меньшие по размеру ионы NO₃⁻:



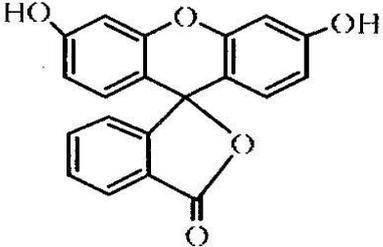
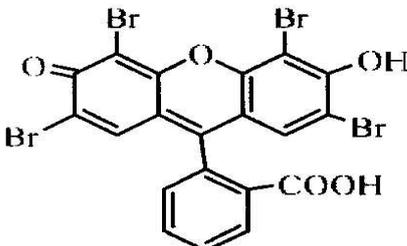
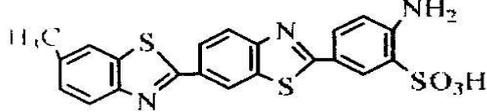
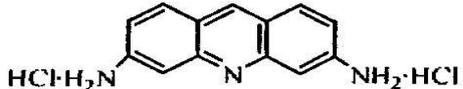
После достижения точки эквивалентности, внутренняя «обкладка» ДЭС на поверхности частиц AgCl становится отрицательно заряженной, т.к. теперь в растворе в избытке находятся ионы Cl⁻. В результате чего, и на внешней «обкладке» ДЭС на поверхности частиц AgCl отрицательно заряженные ионы F⁻ заменяются на положительно заряженные Na⁺. И при переходе F⁻ из сорбированного в растворенное состояние снова начинает проявляться активная флуоресценция этих ионов:



При обратном же порядке титрования (*к NaCl прибавляют AgNO₃*) будет наблюдаться следующая картина. Титруемый раствор демонстрирует активное свечение флуоресцеина до достижения ТЭ, и отсутствие оной после ТЭ (*поскольку в растворе при этом появляются избыточные ионы Ag⁺, сорбируемые осадком AgCl и притягивающие к себе после этого ионы F⁻, переводя их тем самым из активно флуоресцирующего отрицательно заряженного растворенного состояния 1 в слабо флуоресцирующее электронейтральное сорбированное состояние 2*).

Подобным образом ведут себя все адсорбционные ЛИ, у которых способностью люминесцировать обладают анионы. В то время как, у адсорбционных ЛИ основного характера, у которых активно флуоресцируют катионы, при титровании наблюдается обратная картина. В нижеприведенной таблице приведены наиболее широкоиспользуемые в настоящее время адсорбционные ЛИ.

Адсорбционные флуоресцентные индикаторы

Название и формула индикатора	Определяемый ион	Титрант	Цвет флуоресценции	
			до ТЭ	после ТЭ
<p>Флуоресцеин</p> 	Ag^+ Pb^{2+} Cl^- , Br^- , I^-	Cl^- , Br^- , I^- CO_3^{2-} , PO_4^{3-} Ag^+	Нет Нет Зеленый	Зеленый Зеленый Нет
<p>Эозин*</p> 	Ag^+ Pb^{2+} Br^- , I^- , CN^-	Cl^- , I^- PO_4^{3-} Ag^+	Нет Нет Зеленый	Зеленый Зеленый Нет
<p>Примулин</p> 	Ag^+ Cl^- , Br^- , I^- Pb^{2+}	Cl^- , Br^- , I^- Ag^+ PO_4^{3-}	Нет Светло-синий Нет	Светло-синий Нет Светло-синий
<p>Трипфлавин: смесь акрифлавина и профлавина</p> <p>Акрифлавин:</p>  <p>Профлавин:</p> 	Cl^- , Br^- Ag^+	Ag^+ Cl^- , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	Нет Желто-зеленый	Желто-зеленый Нет

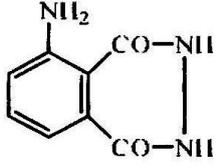
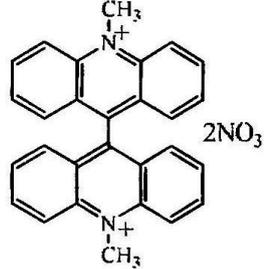
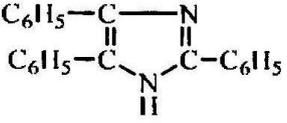
А методы хемилюминесценции по типу реакций, энергия которых используется для возбуждения люминесценции молекул, делят на: электрохемилюминесценцию (*возбуждаемую реакциями, инициируемыми, в свою очередь, электрическим полем*); биоллюминесценцию (*возбуждаемую энергией биохимических реакций*); адсорболоминесценцию (*возникающую, например, на поверхности твердых тел за счёт энергии, выделяющейся при адсорбции там некоторых газов*); кандоллюминесценцию (*возбуждаемую за счёт энергии химических реакций, протекающих с рекомбинацией атомов*); редоксоллюминесценцию (*возбуждаемую за счёт энергии окислительно-восстановительных реакций*) и т.д.

Причем, поскольку количественные определения в хемилюминесцентном анализе (ХЛА) основаны, как правило, на зависимости между скоростью того или иного экзотермического химического процесса, протекающего в анализируемой системе, (*индикаторная реакция*) и изменением каких-либо спектральных характеристик хемилюминесцентного индикатора (ХЛИ), присутствующего в той же системе. А скорость химических реакций зависит не только от концентрации реагирующих веществ, но и от концентрации катализатора (*или ингибитора*) этой реакции, рН среды, температуры и т.д. (*что подробнее было описано ранее в разделе 8*). То с помощью методов ХЛА возможно определение весьма широкого круга химических соединений, а также параметров окружающей среды (*таких как влажность, температура, рН и т.п.*).

При этом, можно выделить следующие основные группы анализируемых соединений.

- (1). ХЛИ (*см. таблицу*), т.е. вещества, способные сами излучать свет при окислении или ином виде химического возбуждения.
- (2). Вещества, неспособные сами излучать свет, но способные активно окислять ХЛИ (*O₂, пероксиды, гипохлориды, гипобромиды, персульфаты, перманганаты, хроматы и т.п.*).
- (3). Катализаторы индикаторных реакций (*такие как Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺ и т.п.*).
- (4). Ингибиторы индикаторных реакций (*например, ароматические соединения, содержащие фенольные и аминогруппы, которые способны ингибировать различные радикальные процессы*).
- (5). Вещества, способные изменять рН среды.
- (6). Вещества, дезактивирующие возбужденное состояние ХЛИ (*KI и т.п.*).
- (7). Примеси, взвеси и т.п., способные поглощать излучение ХЛИ.

Хемилюминесцентные индикаторы

Индикатор	Определяемое вещество	Титрант
 <p style="text-align: center;">Люминол (гидразид 3-амино-фталевой кислоты)</p>	H^+ $Cu^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}$ $AsO_3^{3-}, SbO_3^{3-},$ $SO_3^{2-}, S^{2-}, S_2O_3^{2-},$ CN^-, CNS^- ClO^-, BrO^- $AsO_3^{3-}, SbO_3^{3-}, N_2H_4^+$	OH^- ($pH_{кит} = 8-8,5$) ЭДТА BrO^- AsO_3^{3-} ClO^-
 <p style="text-align: center;">Люцигенин (N,N'-диметил-9,9-диакридиний нитрат)</p>	H^+ Cr^{3+}, AsO_3^{3-} $ClO^-, BrO^-,$ $Fe(CN)_6^{3-}$ $AsO_3^{3-}, SbO_3^{3-},$ $CN^-, CNS^-,$ $S^{2-}, S_2O_3^{2-}$ $Cu^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}$ I^-	OH^- ($pH_{кит} = 9-10$) H_2O_2 NH_2NH_2 BrO^- ЭДТА Ag^+
 <p style="text-align: center;">Лофин(2,4,5-три-фенилимидазол)</p>	H^+ (OH^-)	OH^- (H^+) $(pH_{кит} = 8,9-9,4)$
<p style="text-align: center;">($Si_6H_6O_3$)_n Силоксен</p>	Pb^{2+} $Ti^{3+}, Pb^{2+}, Mn^{2+},$ I^-, AsO_3^{3-}, Fe^{2+} $Fe^{2+}, I^-, Sn^{2+},$ $Mo^{4+}, Ti^{3+}, AsO_3^{3-}$ V^{3+}, H_2O_2	CrO_4^{2-} Ce^{+4} $Cr_2O_7^{2-}$ MnO_4^-

Кроме того, круг веществ, определяемых методами ХЛА, может быть существенно расширен за счёт соединений, которые в результате несложных химических реакций можно превратить в окислители ХЛИ; либо катализаторы или ингибиторы индикаторных реакций, либо кислоты, основания или соли, способные изменять рН среды; либо осадки, способные поглощать излучение ХЛИ и т.п. При этом достигается увеличение чувствительности определения таких соединений в 10–100 раз.

Так, например, I^- , Br^- и NO_2^- окисляют до I_2 , Br_2 и NO_2 . IO_3^- и BrO_3^- восстанавливают до I_2 и Br_2 . α -аминокислоты, являющиеся ингибиторами

индикаторных реакций, переводят в комплексные соединения с медью (являющиеся уже катализаторами индикаторных реакций).

Определения с помощью методов ХЛА, как правило, требуют несложной аппаратуры (см. схему) и отличаются высокой чувствительностью (присущей всем люминесцентным методам анализа и составляющей, в данном случае, от 10^{-4} до 10^{-10} г/мл при объеме пробы в пределах 2–5 мл) и экспрессностью. При количественных определениях методами ХЛА регистрируют: (1) или интенсивность свечения ХЛИ через определенное время после начала индикаторной реакции; (2) или максимальное значение интенсивности свечения ХЛИ; (3) или суммарное количество света, излученного в ходе протекания индикаторной реакции.

Во всех этих случаях, чаще всего используют метод градуировочного графика (см. раздел «Введение в ФХМА» из 2-й части данного пособия). При этом, селективность методов ХЛА, как правило, исходно не очень высока (т.к. многие вещества способны влиять на скорость индикаторных реакций). Но варьирование условий определения или применение различных маскирующих агентов (связывающих в той или иной форме примеси, мешающие определению целевых веществ) позволяет устранить этот недостаток. Тем более, что поскольку свечение ХЛИ возникает лишь при определенном значении рН или окислительно–восстановительного потенциала среды, а также часто лишь в присутствии катализатора, одни и те же ХЛИ можно применять и в кислотно–основных, и в окислительно–восстановительных, и в комплексонометрических, и в осадительных титрованиях.

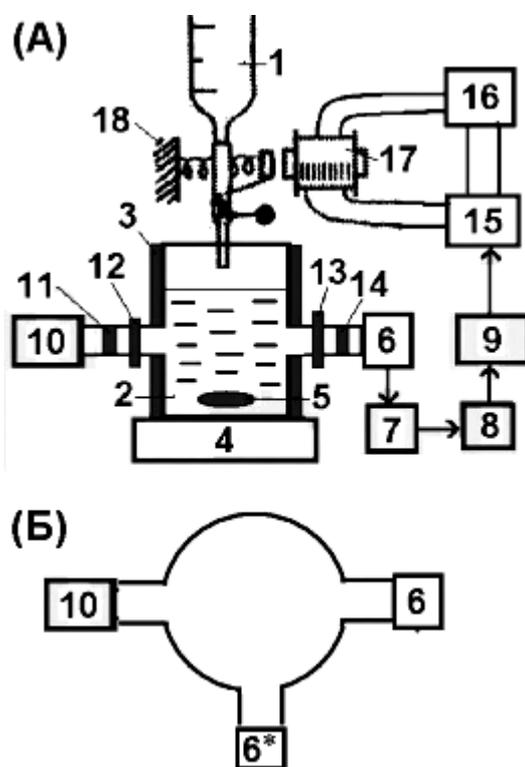


Рисунок 11.2.1 - Принципиальная схема универсальной установки

На рис. 11.2.1 показана принципиальная схема универсальной установки, которая может быть использована для титрования жидких растворов с помощью фото–абсорбционных (*цветных*), фото–люминесцентных либо хемо–люминесцентных индикаторов (**А** – *вид сбоку*; **Б** – *вид сверху*).

Основными компонентами этой установки (*необходимыми и достаточными в случае использования хемолюминесцентных индикаторов*) являются: мерная бюретка (**1**), позволяющая дозированно подавать раствор с заранее известной концентрацией титранта в стакан (**2**) с титруемым раствором (*содержащим анализируемую пробу + индикатор + при необходимости, дополнительные реагенты, необходимые для проведения титрования*), окруженный светозащитным кожухом (**3**) и поставленный на магнитную мешалку (**4**), якорь (**5**) которой уже находится в стакане; а также фотодетектор (**6**) или (**6***) (*в качестве которого, в простейшем случае, может быть использован глаз наблюдателя*).

В случае, если в качестве фотодетектора **6** или **6*** используется ФЭУ либо полупроводниковый светочувствительный элемент (ПСЭ) (*аналогичные описанным в разделе 9.2*), выходной сигнал с этого устройства через дополнительный усилитель (**7**) подаётся на регистрирующее устройство (**8**) (*в качестве которого может быть использован цифровой миллиамперметр*), и далее, при необходимости, на запоминающе–анализирующее устройство (**9**) (*в качестве которого может быть использован компьютер*).

В случае использования данного устройства, в качестве нефелометра, измеряющего уровень света, рассеиваемого различными дисперсными системами (*принцип действия которого более подробно будет описан в разделе 12.3*), устройство может включать в себя только стакан **2** (*или фотометрическую кювету, все грани которой оптически прозрачны*) + источник излучения **10** (*в качестве которого может быть использован светодиод, излучающий в ближней ИК–области*) + фотодетектор **6*** (*имеющий повышенную чувствительность к слабым световым потокам при пониженной величине фонового сигнала и располагаемый перпендикулярно направлению света от источника 10*) + устройства **7** и **8**.

В случае использования с описываемым устройством фото–абсорбционных индикаторов. Если в качестве фотодетектора **6** используется глаз наблюдателя, светозащитный кожух **3** убирают. В противном случае, к установке добавляют источник света (**10**) + коллиматор (**11**) (*линза, преобразующая разнонаправленный свет в параллельный*) + съёмный светофильтр (**12**). При этом, фотодетектор **6** располагают на одной линии с источником излучения **10**. А если в качестве последнего используется набор светодиодов, то коллиматор **11** и светофильтр **12** убирают.

И наконец, в случае, использования с описываемым устройством фотолюминесцентных индикаторов. Фотодетектор **6*** располагают перпендикулярно направлению возбуждающего люминесценцию света, поступающего в стакан **2** от источника **10**. А также располагают перед оным, дополнительно, съёмный светофильтр (**13**) (*необходимый для отсеечения рассеянного образцом возбуждающего света; а также регистрации изменения цвета люминесценции в ходе титрования*) и конденсор (**14**) (*линза, фокусирующая свет на фотодетекторе 6**).

Также данная установка может быть дополнительно автоматизирована. В этом случае, запоминающе–анализирующее устройство 9, сделав вывод о достижении ТЭ (на основании сравнения сигналов, получаемых с выхода фотодетектора 6 до начала титрования и в ходе титрования), подаёт управляющий сигнал на реле (15). В результате чего, последнее замыкается и подаёт ток от источника питания (16) на обмотку электромагнита (17) – который, в свою очередь, закрывает магнитный кран (18) титровальной бюретки 1.

При кислотно–основном хемилюминесцентном титровании к анализируемому раствору сильной или слабой кислоты (или щелочи) добавляют ХЛИ + окислитель (обычно, H_2O_2) + иногда катализатор. После чего в темноте титруют раствором щелочи (или кислоты) до появления (или исчезновения) хемилюминесцентного свечения.

Если ХЛИ применяют в окислительно–восстановительном титровании, то ХЛИ добавляют к раствору восстановителя (например, AsO_3^{3-}). После чего, в темноте титруют раствором окислителя (например, H_2O_2). При этом люминол и люцигенин пригодны для подобных определений в щелочной среде. А нерастворимый в воде силорксен, для растворов с $pH < 3,5$ либо растворов, содержащих сильный окислитель (с потенциалом выше 1,17 В).

При комплексонометрическом ХЛ определении катионов тяжелых металлов (таких как Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} и т.п.), являющихся катализаторами хемилюминесцентных реакций, к анализируемому раствору добавляют NH_4OH и ХЛИ. После чего, титруют в темноте раствором ЭДТА до прекращения свечения.

А при осадительном ХЛ титровании, например Γ ионов, к анализируемому раствору добавляют $NH_4OH + H_2O_2 +$ люцигенин. После чего, титруют в темноте раствором $AgNO_3$. При этом, до начала титрования ХЛИ (люцигенин) проявляет активное свечение. Затем, по мере титрования интенсивность этого свечения уменьшается (поскольку катионы люцигенина адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности образующегося осадка AgI). После же достижения ТЭ при небольшом избытке титранта знак заряда поверхности AgI меняется на положительный. Вследствие чего, катионы люцигенина десорбируются оттуда. И в анализируемом растворе вновь появляется свечение.

Кроме того, в последнее время появился новый класс люминесцентных методов, использующих гетерогенную (абсорб- или кандо-) люминесценцию на поверхности кристаллофоров. При этом, основа кристаллофора выступает в качестве приёмника энергии, выделяющейся при абсорбции или рекомбинации газов на его поверхности. А ионы, активизирующие этот кристаллофор, в качестве трансформатора этой энергии в световую.

Так например, в системе « $O_2 + ZnS$, активированный Tu^{3+} » наблюдается голубое свечение Tu^{3+} при 477 нм. И так как наблюдаемое таким образом свечение характерно только для газовых смесей определенного состава и лишь для определенных примесей в кристаллофоре, подобные методы отличаются высокой селективностью при анализе, как различных компонентов газовых смесей, так и примесей в фосфорах; а также большой чувствительностью.

Также, успехи в исследовании явлений биолюминесценции привели к созданию целого ряда весьма чувствительных методов анализа, включая экспресс–методы контроля микробных загрязнений в различных пищевых

продуктах (по интенсивности свечения фермента люциферазы, пропорциональной количеству АТФ, пропорциональному, в свою очередь, количеству живых клеток микроорганизмов, присутствующих в анализируемом образце) + различные методы иммуно-ферментного анализа + методы целевого подбора антибиотиков, экспресс-диагностики инфаркта миокарда и т.п.

Помимо этого, в настоящее время активно развиваются различные методы люминесцентного зондирования. При осуществлении которых в исследуемый живой организм или иной объект вводят специальные реагенты, достаточно активно способные к био-, хемо-, фото- или иным видам люминесценции. После чего, по характеру люминесценции этих реагентов (увеличение или уменьшение интенсивности эмиссии, изменение длины волны, времени задержки излучения, характера его поляризации и т.д.) судят о динамике их распределения в исследуемом объекте и характере взаимодействия с оным (для чего, например, активно люминесцирующий «зонд» ковалентно или иным способом прочно «сшиваются» с каким-либо биологически активным соединением, которое, в свою очередь, уже взаимодействует интересующим нас образом с исследуемым объектом).

Для иллюстрации вышесказанного, приведём несколько наиболее, на наш взгляд, показательных примеров применения косвенных методов МЭСА.

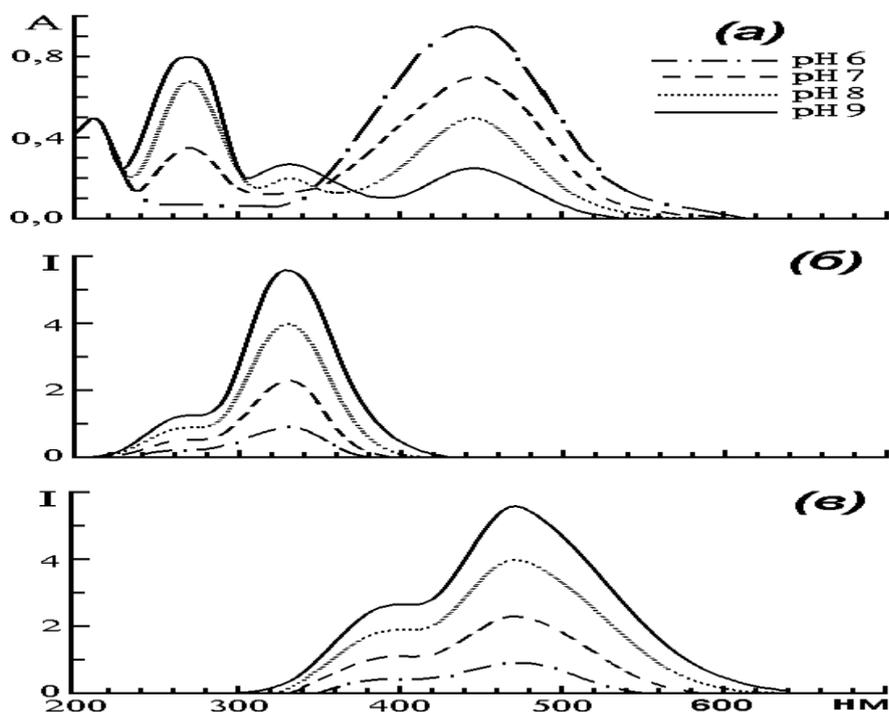


Рисунок 11.2.2 - Спектры поглощения (а), а также флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) 2-амино-4,6-диметил-3Н-3-оксофеноксазина, структурная формула которого показана на рис.11.2.3, в его водных растворах с концентрацией $7,6 \times 10^{-5}$ моль/л и различными значениями рН. Здесь по оси абсцисс обозначена длина волны, а по оси ординат, коэффициенты поглощения (А) либо флуоресценции (I) анализируемого раствора. Сходным образом изменялись спектральные свойства данного соединения и в присутствии ДНК.

Такое спектральное поведение рассматриваемого соединения, очевидно, имеет место вследствие того, что оно способно присутствовать в водных растворах, как минимум, в двух различных равновесных мономерных формах (S1 и S2), структурные формулы которых показаны на рис. 11.2.3. При этом S1-форма, преобладающая при щелочных значениях pH и поглощающая свет в диапазоне длин волн от 250 до 350 нм, способна к сравнительно интенсивной флуоресценции. В то время как S2-форма (характеризующаяся наличием большего, по сравнению с S1-формой, количества внутримолекулярных водородных связей, приводящих к изменению локализации электронной плотности феноксазиновой хромофорной системы; преобладающая при кислотных значениях pH и поглощающая свет в диапазоне преимущественно от 400 до 500 нм) такой способностью не обладает. Увеличение же квантового выхода флуоресценции рассматриваемого оксофеноксазина в присутствии ДНК можно объяснить тем, что хотя феноксазиновая хромофорная система этого соединения сама по себе способна к достаточно активной флуоресценции, в полярном растворителе (таком, например, как вода) эта способность ингибируется (за счет того, что заместители изменяют локализацию электронной плотности вышеупомянутой хромофорной системы). При специфическом же взаимодействии с полинуклеотидом вышеописанное влияние заместителей на хромофорную систему лиганда в значительной мере ослабляется, и в результате, наблюдаемый общий квантовый выход флуоресценции последнего становится ближе по величине к квантовому выходу его хромофорной системы в отсутствие каких-либо заместителей.

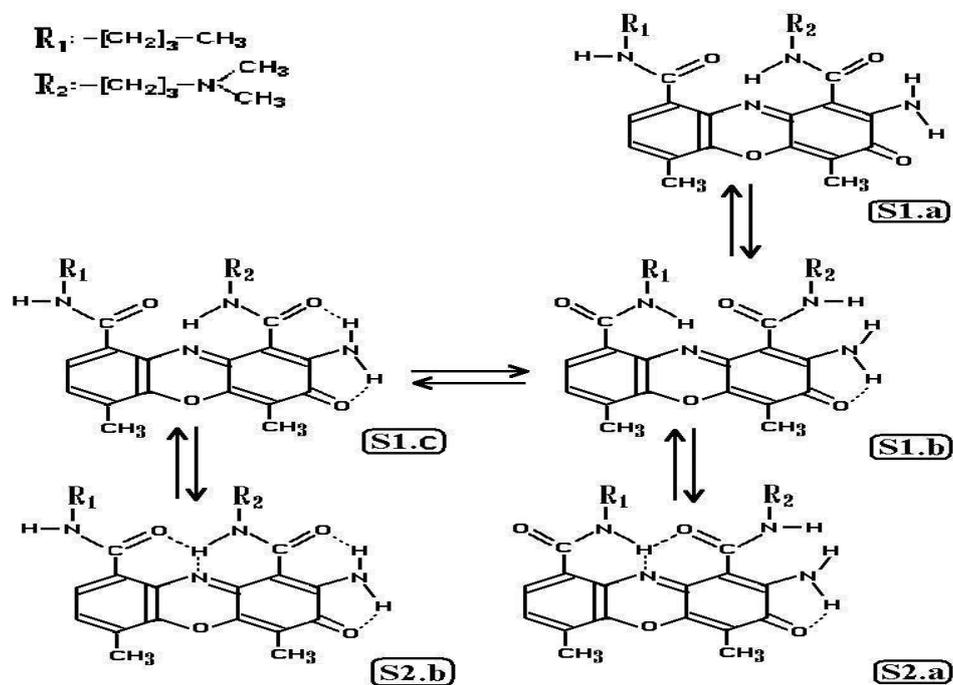


Рисунок 11.2.3 - Вероятные структуры равновесных форм, в которых оксофеноксазин, спектры которого показаны на рис. 11.2.2, находится в водных средах с различными pH, и схема взаимопереходов между ними. Пунктиром обозначены возможные внутримолекулярные водородные связи.

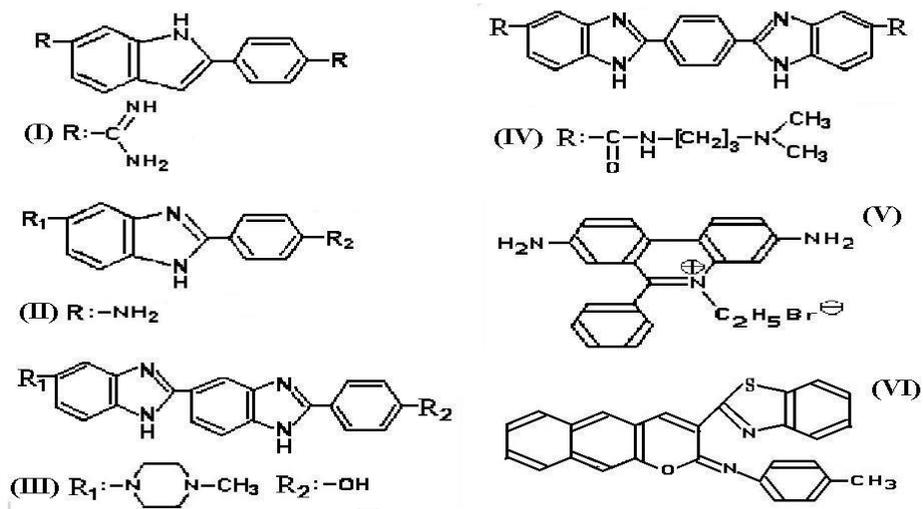


Рисунок 11.2.4 - Структурные формулы различных ДНК-специфичных флуорофоров. Цифрами обозначены: (I) DAPI, (II) Hoechst-33258, (V) этидий бромид.

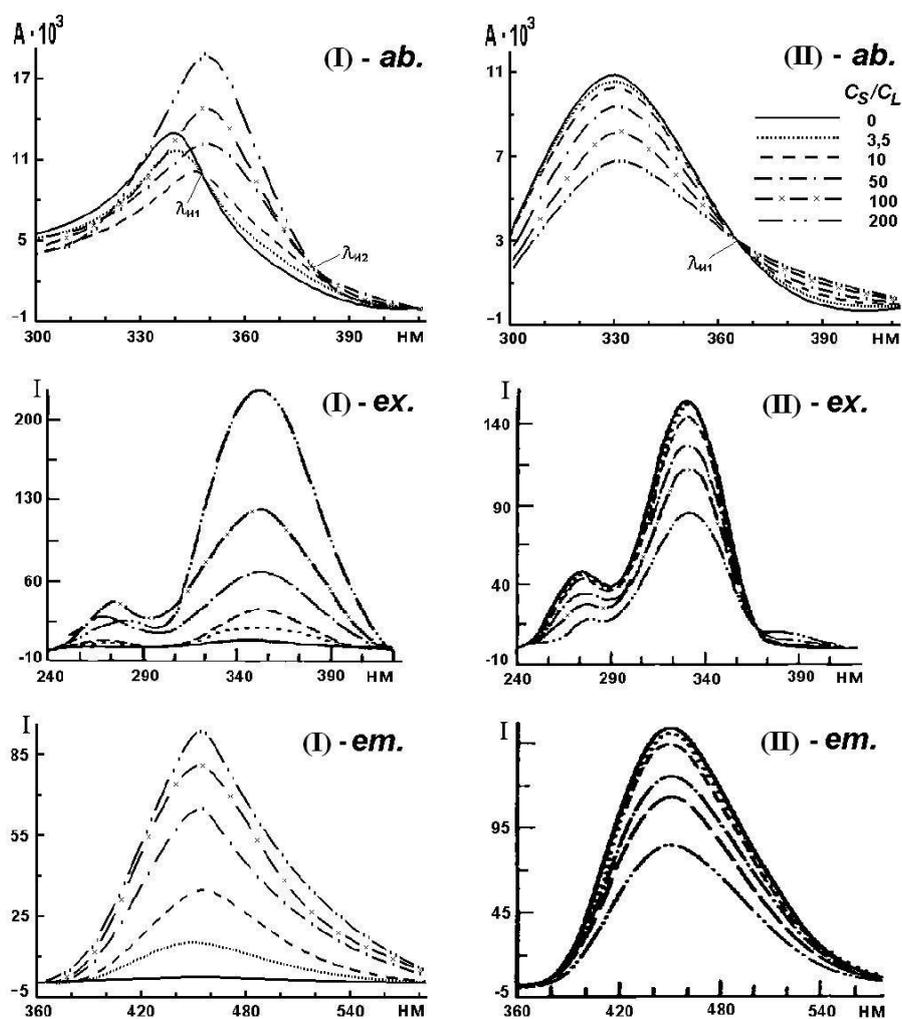


Рисунок 11.2.5 - Спектры поглощения (*ab*), а также флуоресцентного возбуждения (*ex*) и эмиссии (*em*) флуорофоров (I) и (II)

Спектры поглощения (*ab*), а также флуоресцентного возбуждения (*ex*) и эмиссии (*em*) флуорофоров (I) и (II) (см. рис. 11.2.4) в их водных растворах с концентрациями $6,4 \cdot 10^{-7}$ моль/л и рН=7,2 в присутствии различных количеств ДНК тимуса теленка.

Условные обозначения: C_S/C_L – отношения молярных концентраций ДНК/лиганд, соответствующие указанному типу кривых; λ_{H1} – изобестические точки. По оси абсцисс обозначена длина волны, а по оси ординат – коэффициенты поглощения (*A*) либо флуоресценции (*I*) анализируемого раствора.

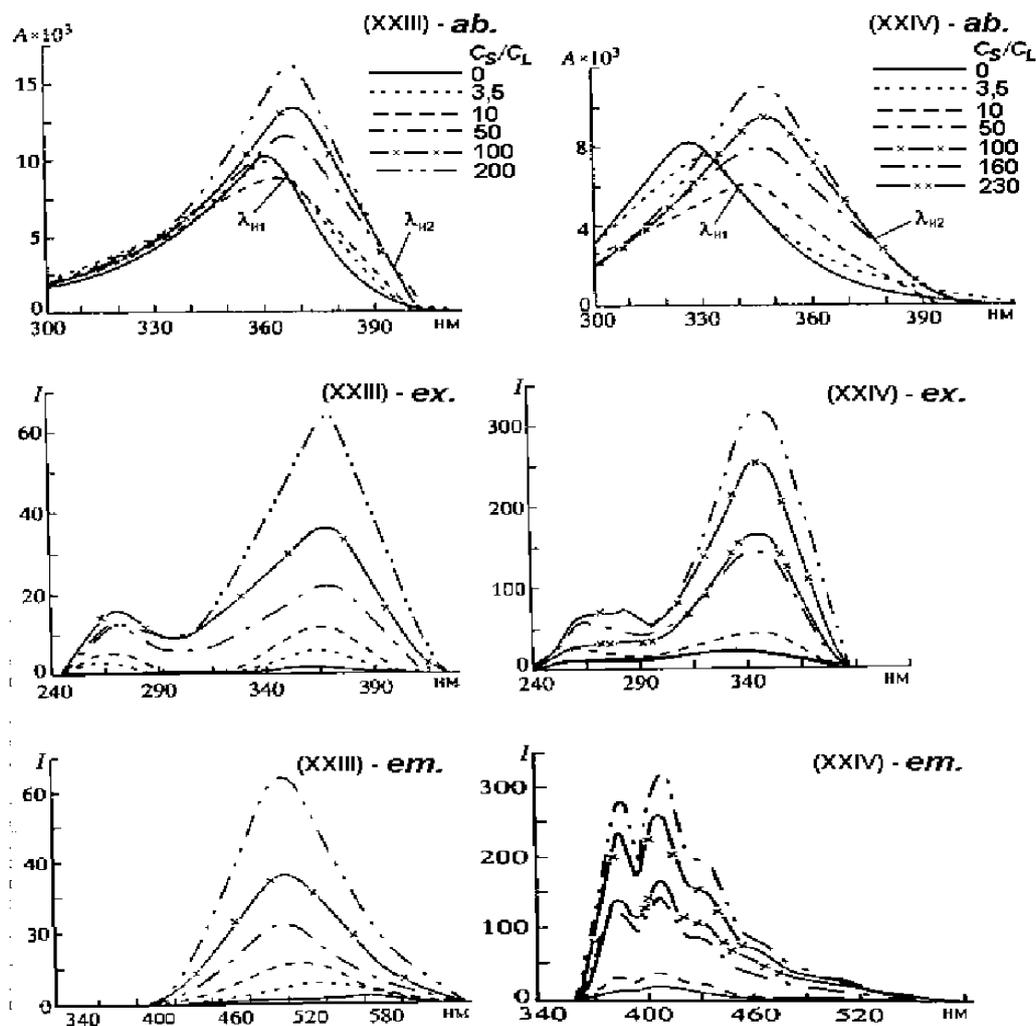


Рисунок 11.2.6 - Спектры поглощения (*ab*), а также флуоресцентного возбуждения (*ex*) и эмиссии (*em*) флуорофоров (III) и (IV) в их водных растворах с концентрациями $6,4 \cdot 10^{-7}$ моль/л и рН=7,2 в присутствии различных количеств ДНК тимуса теленка. Условные обозначения те же, что на рис. 11.2.5.

При этом, у соединения I (DAPI), как и у феноксазина, показанного на рис. 11.2.3, в несвязанном состоянии в полярном растворителе электроноакцепторные амидиновые заместители (R) ингибируют свечение хромофорного фенилиндольного фрагмента. Но при специфическом

взаимодействии с ДНК (*или в неполярном растворителе*) влияние этих R-групп на электронную систему фенилиндольного «ядра» молекулы флуорофора ослабляется, в результате чего, вышеупомянутое «ядро» восстанавливает свои люминесцентные свойства.

У соединения II, наоборот, электронодонорные аминогруппы в несвязанном состоянии молекулы флуорофора в полярном растворителе увеличивают квантовый выход флуоресценции фенилбензимидазольного «ядра». В то время как при специфическом взаимодействии с ДНК (*или в неполярном растворителе*) влияние этих амино-групп на электронную систему хромофорного «ядра» молекулы флуорофора ослабляется, в результате чего, ослабляются и люминесцентные свойства вышеупомянутого «ядра».

У бисбензимидазола III (Hoechst-33258) и фенильный, и оба бензимидазольных фрагмента, способных к активной флуоресценции, имеют возможность для активной вращательной подвижности. Вследствие чего, это соединение, несмотря на очевидно электронодонорный характер своих «терминальных» групп по отношению к связанной с ними центральной хромофорной системе, в несвязанном состоянии люминесцирует весьма слабо.

И лишь при специфическом взаимодействии с ДНК (*либо например при добавлении в раствор сахарозы, увеличивающей вязкость среды*) данный флуорофор «восстанавливает» свои люминесцентные свойства, вследствие того, что все фрагменты его молекулы оказываются достаточно жестко «закреплены» в одной плоскости друг относительно и таким образом могут входить в общее электронное сопряжение.

У соединения IV длинные, полярные, разветвленные R-группы, взаимодействуя с молекулами полярного же растворителя, стабилизируют общую плоскостную структуру молекулы флуорофора даже в несвязанном её состоянии. Но при этом, одновременно, уменьшают свечение фенилбисбензимидазольного «ядра» за счет электроноакцепторного взаимодействия с ним, которое ослабляется лишь при специфическом взаимодействии соединения IV с ДНК (*в результате чего, фенилбисбензимидазольное «ядро» соединения IV «восстанавливает» свои люминесцентные свойства*).

Рис. 11.2.7 иллюстрирует возможность анализа структуры такой сложной полимерной молекулы, как например ДНК, с помощью сразу двух флуорофоров с различным характером специфичности по отношению к анализируемому веществу и согласованными спектральными свойствами. При этом, флуорофор V (ЕБ) является интеркалятором, прослаивающимся с увеличением своей флуоресценции между двумя парами оснований двойной спирали полинуклеотида, с некоторым предпочтением к его гуанин–цитозин (GC) богатым участкам, но в основном специфичным к пространственной структуре молекулы ДНК. Тогда как флуорофор III (Хт) увеличивает интенсивность своей флуоресценции (*см. рис. 11.2.6*), присоединяясь к молекуле ДНК «снаружи» и предпочтительно специфично к участкам двойной спирали полинуклеотида, содержащим три последовательно расположенных аденино–тиминовых (АТ) и одну GC пары оснований. Кроме того, поскольку в связанном с ДНК состоянии в видимой области спектра длины волн максимумов возбуждения флуоресценции

и эмиссии для **Хт** составляют 350 и 455 нм, а для **ЕБ** – 520 и 605 нм, соответственно; то между молекулами этих красителей при совместной сорбции их на полинуклеотиде может происходить флуоресцентный резонансный перенос энергии. А именно, явление, когда при возбуждении флуоресценции молекул донора энергии (в данном случае, **Хт**) светиться начинают не только они, но и молекулы акцептора энергии (в данном случае, **ЕБ**), область длин волн возбуждения флуоресценции которого в значительной мере пересекается с областью длин волн флуоресцентной эмиссии донора (см. рис. 11.2.7). Причем эффективность такого переноса энергии (**E**) будет зависеть от расстояния (**f**) между молекулами донора и акцептора энергии, сорбированными на ДНК, как: $E = f_0^l / (f_0^l + f^l)$, где $f_0 = \text{const}$ – Форстеровский критический радиус, а $l = 2, 4$ или 6 (в зависимости от вида диполь–дипольного взаимодействия между молекулами донора и акцептора энергии). Хотя следует отметить, что явление, когда при возбуждении флуоресценции донора светиться начинает не только он, но и акцептор, может наблюдаться и на расстояниях между ними больших длины волны излучения донора. Однако механизм переноса энергии в этом случае иной (акцептор реадсорбирует фотон, уже испущенный донором, тогда как в 1-м случае первично возбужденный донор энергии вступает в слабое диполь–дипольное взаимодействие с акцептором энергии, находящимся от донора на расстоянии, меньшем длины волны его излучения, вследствие чего возникает дополнительная вероятность перехода донора в электронно-колебательное состояние с меньшей энергией при одновременном переходе акцептора в состояние с большей энергией) и зависимость **E** от **f** отличается от вышеприведенного выражения. Таким образом, очевидно, что при совместном использовании **Хт** и **ЕБ** можно оценивать не только общее количество, но и пространственную структуру ДНК в пробе.

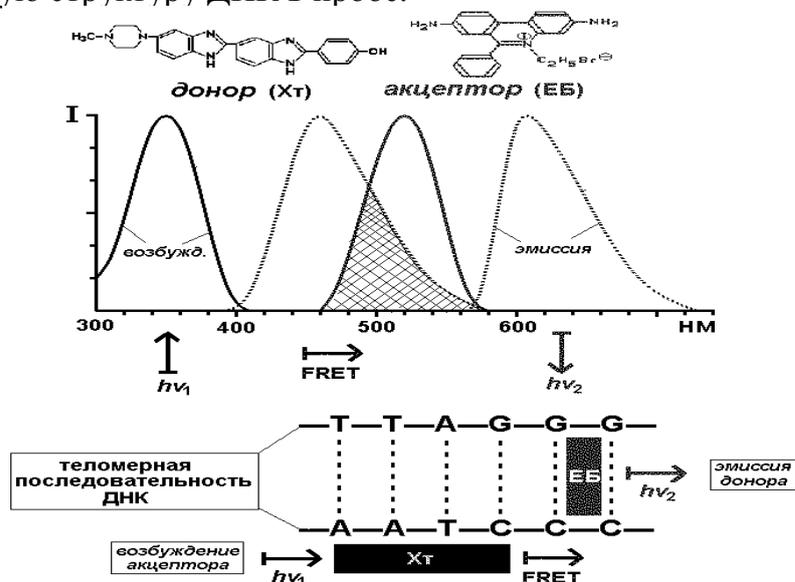


Рисунок 11.2.7 - Схема флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между молекулами флуорофоров III (**Хт**, Hoechst–33258) и V (**ЕБ**, этидий бромид). Условные обозначения: **I** – интенсивность флуоресценции; $h\nu_1$ и $h\nu_2$ – кванты света, поглощаемый **Хт** и испускаемый **ЕБ**, соответственно; **A, T, G, C** – разные нуклеотиды ДНК (аденин, тимин, гуанин и цитозин, соответственно).

И наконец, рис. 11.2.8 и 11.2.9 иллюстрируют возможность наличия в молекуле даже одного флуорофора сразу нескольких независимых люминесцирующих фрагментов. При этом, как было показано нами, в частности, в статье «Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В. // Биохимия. -2007. -Т.72, №8. -С.1107–1116» специфически связывается с ДНК флуорофор VI, преимущественно, интеркалируя между комплементарными цепями полинуклеотида за счет своего бенз- α -хроменного фрагмента. При этом для связанного флуорофора VI по сравнению со свободным, во-первых, уменьшается общий положительный заряд тиазольного цикла; а во-вторых, происходит разобщение электронных систем бензтиазольного, 4-метилфенилиминного и бенз- α -хроменного фрагментов молекулы рассматриваемого флуорофора, уменьшающее электроноакцепторное влияние первых двух из вышеупомянутых групп на последнюю. В результате чего, происходит увеличение свечения как бензтиазольного, так и бенз- α -хроменного фрагментов молекулы флуорофора VI при связывании последнего с ДНК с одновременным флуоресцентным резонансным переносом энергии между этими фрагментами.

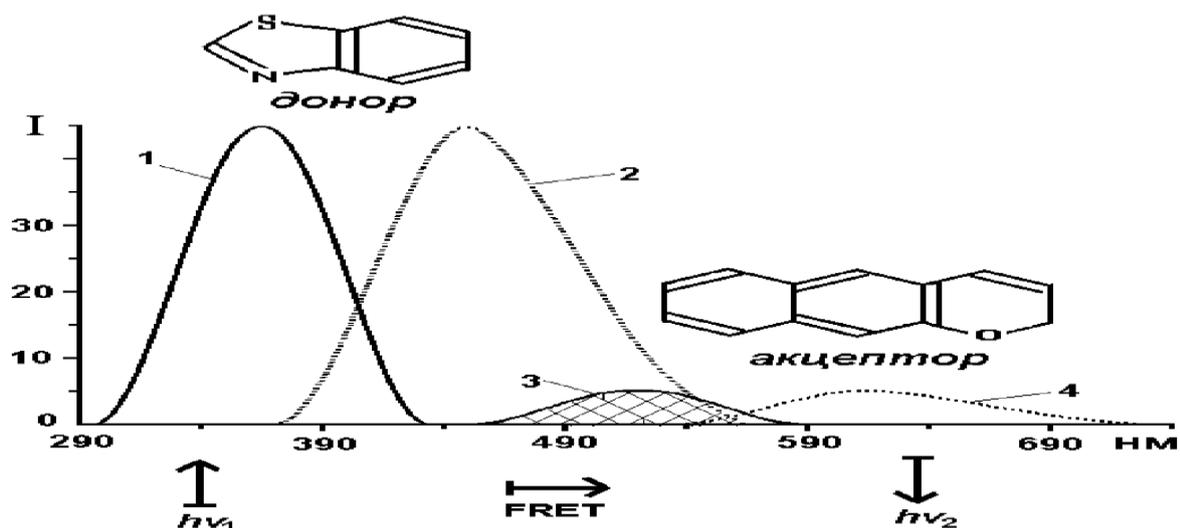


Рис. 11.2.9. Схема флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между бензтиазолиловым (*донор*) и бенз- α -хроменовым (*акцептор*) фрагментами молекулы флуорофора VI (см. рис. 11.2.4) при соотношении молярных концентраций ДНК и флуорофора $C_S/C_L=50$. Здесь кривыми 1 и 2 обозначены спектры возбуждения флуоресценции и эмиссии «донорного» фрагмента; кривыми 3 и 4 – спектры возбуждения флуоресценции и эмиссии «акцепторного» фрагмента; « $h\nu_1$ » и « $h\nu_2$ » – кванты света, поглощаемый «донорным» и испускаемый «акцепторным» фрагментами молекулы флуорофора VI, соответственно.

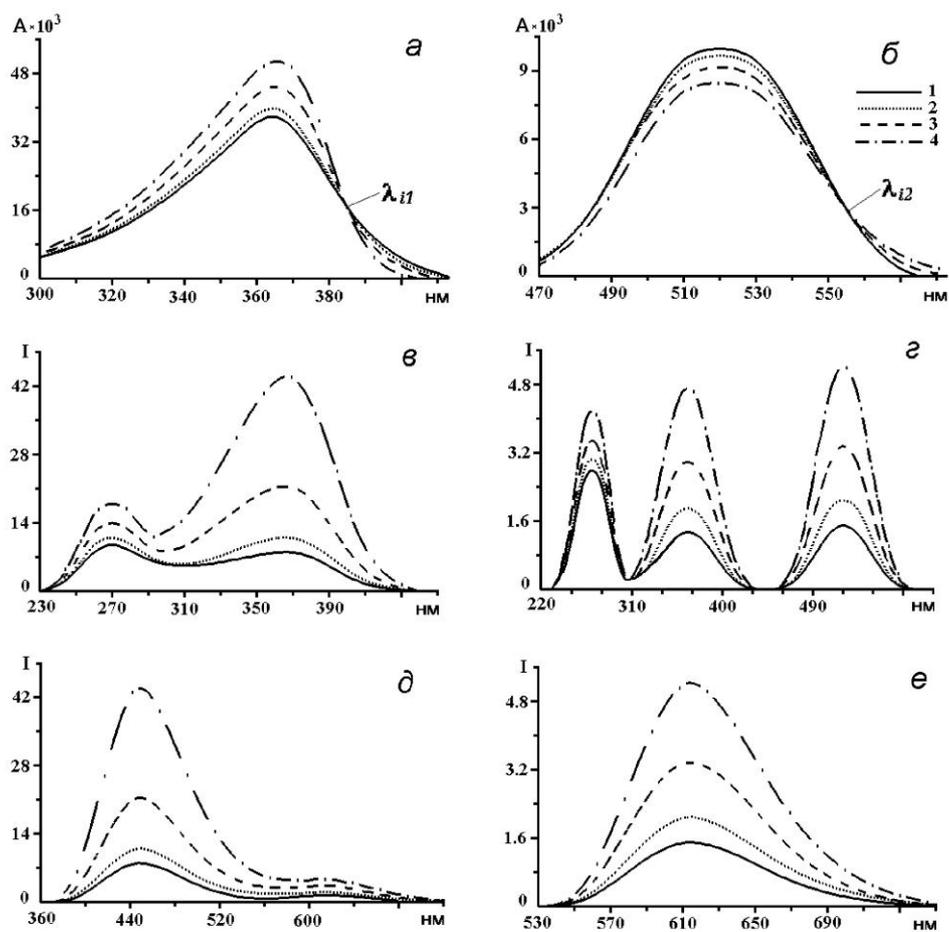


Рис. 11.2.8. Спектры поглощения (*a, б*), а также флуоресцентного возбуждения (*в, з*) и эмиссии (*д, е*) в водных растворах с концентрацией флуорофора VI (см. рис. 11.2.4) $2,8 \times 10^{-5}$ моль/л в присутствии различных количеств ДНК, снятые при длинах волн эмиссии: 450 (*в*) и 615 (*з*) нм и длинах волн возбуждения флуоресценции: 365 (*д*) и 520 (*е*) нм, соответственно. Здесь кривым 1–4 соответствуют отношения молярных концентраций ДНК и красителя (C_S/C_L): 0, 1, 10 и 50; а λ_{i1} и λ_{i2} указывают положение изобестических точек, зарегистрированных в спектрах поглощения флуорофора VI.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Аналитическая химия. / под ред. Ю.А.Золотова. -М.: Академия, 2010. -528с.
2. Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. / под ред. Л.Н.Москвина. -М.: Академия, 2008. -878с.
3. Аналитическая химия. Физические и физико–химические методы анализа. / под ред. О.М.Петрухина. -М.: Химия, 2001. -496с.
4. Бахшиев Н.Г. Введение в молекулярную спектроскопию. -Л.: Изд-во ЛГУ, 1987. -236с.
5. Беккер Ю. Спектроскопия. / Пер. с нем. -М.: Техносфера, 2009. -528с.
6. Бенуэлл К. Основы молекулярной спектроскопии. / Пер. с англ. -М.: Мир, 1985. -384с.
7. Васильев В.П. Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. -М.: Высшая школа, 1989. -823с.
8. Васильева В.И., Стоянова О.Ф., Шкутина И.В., Карпов С.И. Спектральные методы анализа. Практическое руководство. -СПб.: Лань, 2014. -413с.
9. Ландсберг Г.С. Оптика -М.: Физматлит, 2003. -848с.
10. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. -М.: Изд-во МГУ, 1994. -319с.
11. Лесс, В.Р. Практическое руководство для лабораторий: специальные методы. -СПб.: Профессия, 2011. -472с.
13. Мак-Махон Дж. Аналитические приборы. Руководство по лабораторным, портативным и миниатюрным приборам. -СПб.: Профессия, 2013. -338с.
14. Пентин Ю.А., Курамшина Г.М. Основы молекулярной спектро-скопии. -М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. -398с.
15. Пилипенко А.Т., Пятницкий И.В. Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. -М.: Химия, 1990. -815с.
16. Рабек Я. Экспериментальные методы в фотохимии и фотофизике. Т.1 и Т.2. -М.: Мир, 1985. -1150с.
17. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. -М.: Мир, 1989. -608с.

Дополнительная

1. Аналитическая лазерная спектроскопия. / под ред. Н.Оменетто. -М.: Мир, 1982. -606с.
2. Биоломинесценция. Хемилюминесценция / под ред. Н.Н.Угаровой. -М.: Изд-во МГУ, 1991. -87с.
3. Введение в фотохимию органических соединений. / под ред. Г.О.Беккера и А.В.Ельцова. -Л.: Химия, 1976. -384с.
4. Индикаторы. Т.2. / под ред. Э.Бишопа. -М.: Мир, 1976. -616с.
5. Методы исследования быстрых реакций. / под ред. Г.Хеммиса. -М.: Мир, 1977. -403с.
6. Неорганические люминофоры. -Л.: Химия, 1975. -191с.

7. Основы аналитической химии. Т.1 и Т.2. / под ред. Ю.А.Золотова. -М.: Высшая школа, 2000. -1012с.
8. Прикладная инфракрасная спектроскопия. / Под ред. Д.Кендалла, пер. с англ. -М., 1970.
9. Спектральный анализ чистых веществ. / под ред. Х.И.Зильберштейна. - СПб.: Химия, 1994. -336с.
10. Спектроскопические методы определения следов элементов. / под ред. Д.Вайнфорднера. -М.: Мир, 1979. -494с.
11. Физические и физико–химические методы анализа. / под ред. Л.Н.Москвина. -СПб.: Из-д-во СПбГУ, 2002. -142с.
12. Алексеева Т.А., Теплицкая Т.А. Спектрофлуориметрические методы анализа ароматических углеводородов в природных и техногенных средах. -М.: Гидрометеиздат, 1981. -215с.
13. Антонов В.С., Беков Г.И. и др. Лазерная аналитическая спектроскопия. - М.: Наука, 1986. -318с.
14. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. - М.: Мир, 1987. -462с.
15. Барашков Н.Н. Люминесцентный анализ на службе здоровья. -М.: Наука, 1985. -95с.
16. Барашков Н.Н., Гундер О.А. Флуоресцирующие полимеры. -М.: Химия, 1987. -223с.
17. Барлтруп Дж., Койл Дж. Возбужденные состояния в органической химии. -М.: Мир, 1978. -446с.
18. Баффингтон Р., Уилсон М. Детекторы для хроматографии. -М.: Мир, 1993. -79с.
19. Борн М., Вольф Э. Основы оптики / Пер. с англ. -М., 1973.
20. Бражников В.В. Детекторы для хроматографии. -М.: Машиностроение, 1992. -320с.
21. Булгаков Р.Г., Казаков В.П., Толстиков Г.А. Хемилюминесценция металлоорганических соединений. -М.: Наука, 1989. -220с.
22. Гительзон И.И., Левин Л.А. и др. Биолюминесценция в океане. -СПб.: Гидрометеиздат, 1992. -282с.
23. Головина А.П., Левшин Л.В. Химический люминесцентный анализ неорганических веществ. -М.: Химия, 1978. -245с.
24. Гришаева Т.И. Методы люминесцентного анализа. -СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2003. -226с.
25. Демтредер В. Лазерная спектроскопия: Основные принципы и техника эксперимента. -М.: Наука, 1985. -607с.
26. Дмитриев М.Т., Казнина Н.И., Пинигина И.А. Санитарно–химический анализ загрязняющих веществ в окружающей среде. М.: Химия, 1989. 368 с.
27. Другов Ю.С., Муравьев А.Г., Родин А.А. Экспресс–анализ экологических проб: практическое руководство. -М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. -425с.
28. Другов, Ю.С., Родин А.А. Анализ загрязненной воды: практическое руководство. -М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. -684с.

29. Другов, Ю.С., Родин А.А. Мониторинг органических загрязнений природной среды: 500 методик, практическое руководство. -М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. -897с.
30. Дубровкин И.М., Беликов В.Г. Производная спектрометрия. - Ростов на Дону: Изд-во Ростовского университета, 1988. -143с.
31. Дьяков А.О., Новаковская Э.Г., Новочихин А.В., Халонин А.С. Физико–химические методы анализа. Спектральные методы анализа. Учебное пособие. - СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. -163с.
32. Егоров В.В., Воробьева Н.И., Сильвестрова И.Г.. Неорганическая и аналитическая химия. Аналитическая химия. -СПб.: Лань, 2014. -143с
33. Ишанин Г.Г., Панков Э.Д. и др. Источники и приемники излучения. - СПб.: Политехника, 1991. -240с.
34. Кизель В.А. Практическая молекулярная спектроскопия. -М.: Изд-во МФТИ, 1998. -254с.
35. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. -М.: Химия, 1984. -336с.
36. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. -М.: Мир, 1986. -496с.
37. Лебедева В.В. Техника оптической спектроскопии. -М.: Изд-во МГУ, 1986. -352с.
38. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Люминесценция и её измерения. -М.: Изд-во МГУ, 1989. -277с.
39. Лотник С.В., Казаков В.П. Низкотемпературная хемилюминесценция. - М.: Наука, 1987. -176с.
40. Мак-Глинн С., Адзуми Т., Киносита М. Молекулярная спектроскопия триплетного состояния. -М.: Мир, 1978. -448с.
41. Немодрук А.А., Безрогова Е.В. Фотохимические реакции в аналитической химии. -М.: Химия, 1972. -74с.
42. Нурмухаметов Р.Н. Поглощение и люминесценция ароматических соединений. -М.: Химия, 1971. -216с.
43. Персонов Р.И. Селективная спектроскопия сложных молекул в растворах и её применение. -Троицк. 1981. -66с.
44. Сайдов Г.В., Свердлов О.В. Практическое руководство по молекулярной спектроскопии. -СПб.: Изд-во СПбГУ, 1995. -236с.
45. Сакодынский К.И., Бражников В.В. и др. Аналитическая хроматография. -М.: Химия, 1993. -464с.
46. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия: основы, техника, аналитическое применение. / Пер. с англ. -М.: Мир, 1982. -328с.
47. Стенхольм С. Основы лазерной спектроскопии. -М.: Мир, 1987. -312с.
48. Там Э., Бердж Р. и др. Сверхчувствительная лазерная спектроскопия. -М.: Мир, 1986. -519с.
49. Теплицкая Т.А., Алексеева Т.А., Вальдман М.М. Атлас квазилинейчатых спектров люминесценции. -М.: Изд-во МГУ, 1978. -174с.
50. Турро Н. Молекулярная фотохимия. -М.: Мир , 1967. -328с.
51. Умланд Ф., Янсен Ф., Тириг Д., Вюнш Т. Комплексные соединения в аналитической химии. -М.: Мир, 1975. -531с.

52. Чернова Р.К., Петрова И.К., Кудрявцева Л.М. Органические реагенты в флуориметрическом анализе неорганических ионов. - Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1982. -140с.

Электронные ресурсы:
e-library.ru + e.lanbook.com + nglib.ru + xumuk.ru

Миссия университета – генерация передовых знаний, внедрение инновационных разработок и подготовка элитных кадров, способных действовать в условиях быстро меняющегося мира и обеспечивать опережающее развитие науки, технологий и других областей для содействия решению актуальных задач.

КАФЕДРА ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ТОПЛИВНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА

Кафедра химии входила в состав первых 14 кафедр ЛИТМО, сформированных в 1930 году. В 1930–1960 годах кафедра работала в рамках факультета Точной механики; в период деятельности Инженерно-физического факультета (ИФФ) с 1946 года по 1954 год кафедра входила в состав ИФФ. С 1933 года – кафедрой возглавлял известный специалист в области оптического стекла профессор В.Г. Воано, позже – известный русский ученый-химик профессор С.А. Щукарев. С 1954 по 1972 год кафедрой возглавлял доцент Г.С. Кошурников.

С момента второго рождения инженерно-физического факультета в 1976 г. кафедра химии вошла в его состав. В это время на кафедре стали развиваться, в основном, три научно-технологических направления: создание новых композиционных оптических материалов; разработка химических сенсоров; технология оптического волокна.

В последующие годы сотрудники кафедры, прежде всего, профессора Новиков А.Ф. и Успенская М.В., существенно переработали методику преподавания курса химии, адаптировав ее к активно внедрявшейся тогда в Университете системе дистанционного обучения. В результате, преподавание курса химии в Университете ИТМО вышло на новый более высокий уровень.

В дальнейшем на кафедре под руководством профессора М.В. Успенской активно развивалось научно-техническое направление в области химии и физики сорбирующих полимерных материалов и нанокompозитов. В частности, на основе акриловых супервлагоабсорбентов разработан ряд новых материалов многофункционального назначения: сенсоры, жидкие линзы, раневые повязки, искусственные почвы для сельского хозяйства, огнестойкие конструкционные элементы и др.

В связи с этим в 2011 году данная кафедра (исторически – кафедра химии) позиционировала себя как отдельное структурное подразделение Национального исследовательского университета ИТМО в качестве кафедры “Информационных технологий топливно-энергетического комплекса”.

С переходом отечественных предприятий на международные стандарты продукции, повышением требований к охране окружающей среды и внедрением сложных аналитических автоматизированных систем контроля качества и мониторинга, с 2008 года в рамках направления «Техническая физика» кафедра проводит подготовку магистров и бакалавров по профилю «Физико-технические аспекты аналитического приборостроения».

Подготовка включает в себя следующие разделы:

- Компьютерные комплексы для автоматизированного контроля физических, химических, механических, термических, реологических и некоторых других свойств нефтяного сырья и продуктов нефтепереработки;
- Встроенные микропроцессорные комплексы для управления технологическими процессами и измерением широкого круга параметров энергетических установок и систем энергоснабжения;
- Физико-математическое моделирование технологических процессов нефтепереработки и топливно-энергетического комплекса;
- Информационно-аналитические системы и комплексы различного профиля, адаптированные под специфические условия работы на предприятиях ТЭК.

Уникальная программа обучения сочетает фундаментальную подготовку в области информационных систем, физической оптики, молекулярной спектроскопии, аналитической и физической химии, компьютерной метрологии, общехимической технологии и автоматики.

В рамках специальных дисциплин изучаются приборы и методы контроля качества продукции и принципы построения автоматизированных анализаторных систем для предприятий ТЭК, нефтяной и химической промышленности.

Такие системы как основа информационных технологий контроля качества и мониторинга безопасности могут успешно применяться практически на всех предприятиях и лабораториях химического и нефтехимического профиля, а также в металлургической, пищевой и фармацевтической промышленности.

Выпускники кафедры имеют широкие перспективы трудоустройства в современных крупных компаниях ТЭК, таких как Роснефть, ПТК, Газпром, Киришинефтеоргсинтез, Лукойл, ТНК-ВР, а также на предприятиях и лабораториях пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности.

Практика эксплуатации предприятий ТЭК подтверждает необходимость создания и применения эффективных систем контроля за безопасностью и систем экологического мониторинга.

В связи с этим с 2011 года были разработаны и открыты бакалаврская и магистерская программы по направлению подготовки 241000 " Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии ". Основной целью образовательной магистерской программы "Информационные ресурсосберегающие технологии и экологические аспекты на предприятиях ТЭК" является подготовка высококвалифицированных специалистов, соответствующих современным требованиям к выпускникам вуза, с учетом потребностей рынка труда Санкт-Петербурга и регионов России. Будущие магистры будут способны использовать информационные технологии и математическое моделирование для описания различных физических и физико-химических процессов, для контроля качества продукции нефтепереработки, работать на современном оборудовании в научных, научно-производственных и производственных лабораториях по исследованию выпускаемой продукции и т.д.

Основными направлениями научной деятельности в рамках магистерской программы являются:

- Создание приборов и датчиков физических величин и физико-химических параметров углеводородного сырья и продуктов (в том числе на основе нанотехнологий);
- Разработка приборов для измерения параметров качества нефтепродуктов и пищевых продуктов на основе компьютерных технологий;
- Создание эффективных информационных систем контроля качества продукции и коммерческого учета на предприятиях ТЭК на основе приборов и устройств различного назначения;
- Создание эффективных информационных систем мониторинга безопасности эксплуатации объектов ТЭК.

Подготовка магистров ведется с участием ряда промышленных предприятий, научно-производственных объединений, научно-исследовательских институтов и вузов Санкт-Петербурга, что дает возможность получить отличные знания и неоценимый опыт в различных сферах деятельности: производственной, научно-исследовательской, административной и т.д.

Биотехнология и биоинженерия являются приоритетными направлениями современной науки и промышленного производства. Продукты биотехнологии и биоинженерии востребованы в медицине, фармации, биологии, и других высокотехнологичных отраслях народного хозяйства. Разработка новых источников энергии, создание биосовместимых материалов и синтез биологически активных веществ – главные составляющие этих двух наук и отраслей производства. В частности, интенсивно развиваются производство и применение ферментов в переработке различных видов сырья и в получении биопрепаратов. Ферментные технологии имеют преимущества с экономической, технологической и экологической точек зрения, поэтому годовой оборот ферментных препаратов составляет десятки миллионов долларов США и он непрерывно растёт. По объёму производства ферментные препараты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Ферментативные процессы, применяемые в технологиях, аналогичны природным, но они более безопасны и для здоровья человека и для окружающей среды.

Развитие этих отраслей сдерживается недостатком специалистов высшего уровня, подготовленных в области информационного обеспечения и средств измерения живых систем и биологических структур.

Для решения проблемы подготовки магистров на стыке информационных технологий, биологии и инженерии объединены усилия двух кафедр: Кафедра химии и молекулярной биологии ИХиБТ и кафедра ИТТЭК, имеющих опыт подготовки специалистов бакалавров и магистров в информационных технологиях и биотехнологии.

В учебный план предлагаемой программы включены, наряду с общеобразовательными, дисциплины по информационной, биологической, химической, технологической подготовке и ряду других отраслей знаний, необходимых в подготовке специалистов заявленного уровня.

В настоящее время на каф. ИТТЭК под руководством проф. Успенской М.В., ведутся работы по направлениям, связанных с созданием материалов для фармакологии и регенеративной медицины, предметов санитарно-гигиенического назначения, а также биосовместимых и биodeградируемых материалов.

Также на кафедре под руководством проф. Неелова И.М. активно развивается моделирование полимеров и биополимеров, начиная от структуры веществ и физико-химических процессов, протекающих в живых организмах до физико-механических и эксплуатационных характеристик материалов и биосистем.

Профессорско-преподавательский состав на кафедре насчитывает 18 человек, из них 6 профессоров и докторов наук.

В настоящее время на базе кафедр НИУ ИТМО создан Международный научно-исследовательский институт биоинженерии, возглавляемый проф. М.В. Успенской, что значительно расширяет экспериментальную базу и научный потенциал кафедр и способствует повышению уровня подготовки кадров высшей категории.

В настоящее время на кафедре трудятся 18 преподавателей, шестеро из них являются докторами наук, профессорами, признанными на международном уровне, членами ученых советов в России и за рубежом.

Сибирцев Владимир Станиславович

**Экспериментальные методы исследования
физико–химических систем.**

Часть 3. Молекулярная спектроскопия.

Учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно–издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49