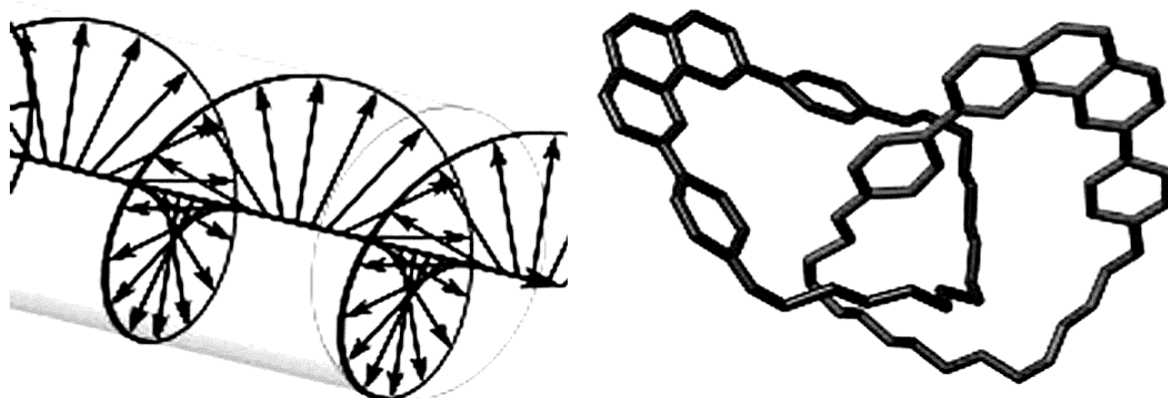
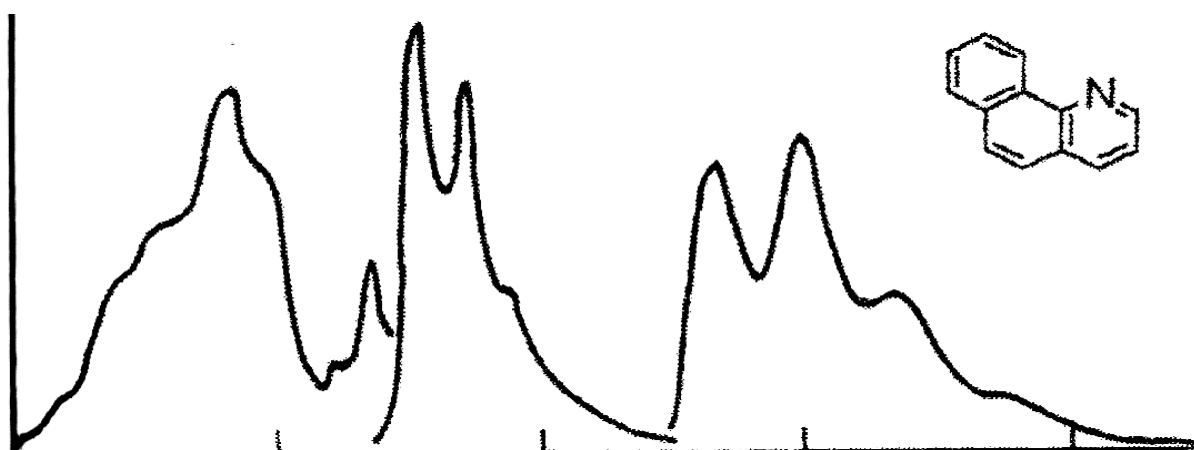


В.С. Сибирцев

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЛЮМИНОМЕТРИЯ
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**



**Санкт-Петербург
2018**

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

В.С. Сибирцев

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЛЮМИНОМЕТРИЯ
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 19.04.01 (биотехнология)
в качестве учебного пособия для реализации основных
профессиональных образовательных программ магистратуры**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт–Петербург
2018**

Сибирцев В.С. Молекулярная люминометрия в биотехнологических исследованиях. Учебное пособие. -СПб: Университет ИТМО, 2018. -62 с.

Рецензенты: Радин М.А., канд. хим. наук, доцент кафедры физико-химических основ процессов горения и тушения Санкт-Петербургского университета государственной противопожарной службы МЧС России

Данное пособие соответствует программе дисциплины М.1.2.3. «Методологические основы исследований в биотехнологии» студентов–магистров профиля 19.04.01 (*биотехнология*); содержит избранные теоретические разделы упомянутой дисциплины, относящиеся к рассмотрению основных методов молекулярной люминометрии, применяемых в современных биотехнологических исследованиях, и предназначено для самостоятельной работы студентов по данной дисциплине.



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, 2018
© В.С. Сибирцев, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Общая теория молекулярного эмиссионного спектро- фотометрического анализа (МЭСА)	7
2. Современное техническое обеспечение МЭСА	21
3. Индикаторные методы МЭСА	30
Список литературы	52

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Методологические основы исследований в биотехнологии» является важной составляющей в системе знаний, умений и навыков, которые необходимо получить студентам–магистрам специальности 19.04.01 (*биотехнология*). В результате её освоения студенты должны получить представление об основных методах, применяемых в современных биотехнологических исследованиях, одним из наиболее широко используемых среди которых является молекулярная спектроскопия, также включающая в себя большую совокупность различных взаимосвязанных методов.

Спектроскопия – это совокупность методов физико–химического анализа, позволяющих судить о качественном и количественном составе пробы на основании анализа характера электромагнитного излучения, поглощаемого или излучаемого образцом.

При этом, под длиной волны подразумевается расстояние от одного максимума (*или минимума*) колебаний до другого.

А под частотой – время, за которое один максимум (*или минимум*) колебаний в зафиксированной точке пространства сменится следующим.

Таким образом, частота любого колебания (ν) равна скорости его распространения в конкретной среде (ν^*), делённой на длину волны (λ) этого колебания: $\nu = \nu^* / \lambda$.

Кроме того, известно, что для электромагнитных колебаний в вакууме $\nu^* = 3 \times 10^8$ м/с. А в других средах ν^* тем меньше, чем плотнее среда, в которой электромагнитные колебания распространяются (*в то время как у акустико–механических колебаний – наоборот, скорость распространения тем больше, чем плотнее среда – поскольку там колеблются сами частицы среды*) и чем больше длина волны этих колебаний.

На последнем эффекте, в частности, основано разложение полихроматического света (*состоящего из фотонов со множеством различных длин волн*) в монохроматический спектр (*в котором фотоны с разными длинами волн двигаются под разными углами по отношению друг к другу – как например, в случае появления радуги*).

По длине волны электромагнитные колебания подразделяются на:

- радиоволны (с $\lambda > 1$ мм);
- инфракрасные (ИК) волны (с λ от 1 мм до 0,75 мкм), подразделяемые, в свою очередь, на ближний (с λ от 750 до 3000 нм), средний (с λ от 3 до 15 мкм) и дальний (с λ от 15 мкм до 1 мм) ИК диапазоны;
- волны видимого диапазона (ВД) (с λ от 750 до 350 нм);
- ультрафиолетовые волны (УФ) (с λ от 350 до 50 нм), подразделяемые, в свою очередь, на ближний (с λ от 350 до 200 нм), средний (с

λ от 200 до 150 нм) и дальний (с λ от 150 нм до 50 нм) УФ диапазоны;

- рентгеновское излучение (с λ от 50 до 1 нм)
- и γ -излучение (с $\lambda < 1$ нм).

Энергия квантов электромагнитного излучения определяется длиной волны или частотой этого излучения как

$$E = h\nu = hc/\lambda,$$

где $h = 6,6 \times 10^{-34}$ Дж·с – постоянная Планка (*т.е. чем меньше длина волны электромагнитного излучения, тем больше энергия его квантов, и наоборот*).

А общая энергия любой молекулы определяется:

- + энергией его внутриядерных связей в атомах
- + энергией внутренних электронных оболочек
- + энергией внешних электронных оболочек
- + энергией колебаний атомов в молекуле
- + энергией вращения атомов в молекуле.

Причем, величина энергий в данном ряду уменьшается (*т.е. наибольшая энергия нужна, чтобы разорвать внутриядерные связи в атомах; а наименьшая – чтобы изменить интенсивность вращения атомов в молекуле*).

И если энергии поглощенного кванта излучения достаточно для изменения какого-либо из вышеупомянутых параметров состояния молекулы – то часть этой энергии может расходоваться и на изменение менее энергоёмких состояний данной молекулы (*т.е. если изменяется, например, энергия какого-либо из внешних электронов молекулы – то одновременно с этим изменяется и интенсивность колебательных и вращательных движений друг относительно друга атомов в этой молекуле*).

Проходя через любое вещество, электромагнитное излучение, исходящее от какого-либо внешнего по отношению к анализируемому образцу источника, прежде всего, частично отражается от его поверхности (*либо близких к ней областей; либо поверхностей достаточно крупных гетерогенных частиц, присутствующих в объеме образца*). Что составляет предмет спектроскопий зеркального, диффузного и внутреннего отражения (*позволяющих судить о надмолекулярной структуре, а также атомарном и молекулярном составе исследуемых дисперсных систем; а также приповерхностных областей даже мало оптически прозрачных объектов*).

Затем, внешнее электромагнитное излучение частично рассеивается в толще образца. Причем, в тем большей степени, чем более образец неоднороден.

Определение степени этого рассеяния составляет, в частности, предмет турбидо- и нефелометрии и применяется для оценки количества механических либо биологических примесей в растворе или газовой среде,

диспергированности коллоидных растворов и т.п. Но и для однородных по своему составу образцов полезно бывает снимать спектры «рэлеевского» (упругого) рассеяния (позволяющие оценить общее количество молекул в анализируемом образце, а также размер оных), и особенно, спектры «рамановского» (комбинационного, неупругого) рассеяния (позволяющие проводить не только количественный, но и качественный анализ молекулярного состава исследуемых образцов).

Помимо этого, для излучения с длинами волн, близкими к рентгеновскому диапазону, образцы с кристаллической структурой играют роль 3-мерной дифракционной решетки. И расшифровка получаемой таким образом дифракционной картины (с тем, чтобы узнать взаиморасположение атомов в исследуемом кристаллическом образце) составляет предмет рентгеноструктурного анализа.

Кроме того, проходя сквозь толщу образца, часть электромагнитного излучения может поглощаться. Но поглощаются при этом только те кванты излучения, энергия которых соответствует разности энергий между основным и возбужденным уровнями, определяющими состояние атомов, ионов, молекул и иных частиц, составляющих анализируемых образец. В соответствии с этим,

- лишь энергии γ -частиц достаточно, чтобы разорвать внутриядерные связи в атомах;
- энергии квантов рентгеновского излучения достаточно для перехода внутренних электронов в атомах и молекулах из основного в возбужденное состояние;
- энергии фотонов ближнего УФ и ИК, а также видимого света достаточно для перехода внешних (валентных, химически активных) электронов в атомах и молекулах из основного в возбужденное состояние;
- энергии фотонов среднего ИК излучения достаточно для изменения интенсивности колебаний атомов в молекуле;
- энергии фотонов дальнего ИК излучения достаточно для изменения интенсивности вращений атомов в молекуле;
- энергии радиоволн с λ от 10^{-2} до 10 м достаточно для изменения спинового момента электронов;
- энергии радиоволн с λ больше 10 м достаточно лишь для изменения спинового момента ядер атомов.

Вышеупомянутое составляет предметы, соответственно: радиометрии, рентгеновской, ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной спектроскопий; а также спектроскопий электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

И наконец, после того, как кванты внешнего излучения были поглощены веществом – они могут быть вторично испущены, в результате обратного перехода электронов из высокоэнергетического возбужденного состояния в низкоэнергетическое основное.

Это составляет предмет фотолюминесцентных методов анализа. Которые подразделяются, в свою очередь, на рентгенофлуоресцентный и атомно-эмиссионный элементный анализ; а также молекулярный фотолюминесцентный анализ.

Причем, в зависимости от времени задержки между поглощением и вторичным излучением фотонов (τ_3), последнее явление подразделяется ещё на флуоресценцию (с $\tau_3 < 10$ мс) и фосфоресценцию (с $\tau_3 > 10$ мс).

Далее, если молекулы веществ, составляющих 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 светопоглощения 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 в возбужденное состояния (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 упомянутые 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 составляют случаи применения лазерной или светодиодной спектроскопии; либо использования дополнительных устройств, пропускающих только определенным образом поляризованный свет (*поляриметрия*); либо применения явлений хемо-, био-, электро-, соно- и т.п. люминесценции.

1. ОБЩАЯ ТЕОРИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ЭМИССИОННОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (МЭСА)

Как уже говорилось выше, 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 одного) 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);
- триболюминесценцию (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 , которое ещё называют временем жизни возбужденного $\bar{e}$ -состояния, временем затухания люминесценции и т.п.) различают: флуоресценцию (с $\tau_3 < 10$ мс) и фосфоресценцию (с $\tau_3 > 10$ мс).

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 и молекулярную.

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

А для молекулярной люминесценции (МЭСА) 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 ($\bar{e}$) с основного энергетического уровня

(с наименьшей возможной для данного $\bar{e}$ 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 $\bar{e}$ 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 $\bar{e}$ -уровни различаются на «синглетные» (S – характеризующимися малым временем нахождения на них $\bar{e}$ и антипараллельным спином одного в $\bar{e}$ -паре) и «триплетные» (T – или так называемые метастабильные уровни – со значительно большим временем нахождения на них $\bar{e}$ и параллельным спином одного в $\bar{e}$ -паре).

Далее, при переходе $\bar{e}$ 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 $\bar{e}$ 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.1.1) – поскольку при этом имеет место дополнительная безизлучательная 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.

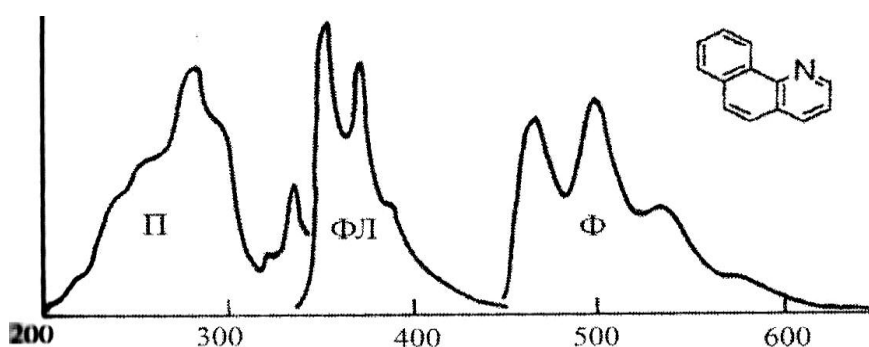


Рис.1.1. Спектры поглощения (Π), флуоресценции ($\Phi\text{Л}$) и фосфоресценции (Φ) бензхинолина в этаноле. При этом, по оси ординат отложена интенсивность поглощения (Π) либо люминесценции, а по оси абсцисс – длина волны поглощаемого (Π) или излучаемого. Кроме того, спектры Π и $\Phi\text{Л}$ получены при комнатной температуре, а спектр Φ – 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 $\bar{e}$ с основного S_0 - на возбужденный S_1 -уровень (*осуществляемого также, как и в случае ранее рассмотренной «стоксовой» люминесценции*) – происходит дальнейший переход того же $\bar{e}$ с нестабильного S_1 -уровня на метастабильный T_1 -уровень с той же энергией. Находясь на последнем достаточно долгое время, $\bar{e}$ может успеть поглотить ещё один квант энергии. Что приводит к переходу данного $\bar{e}$ 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:

$$h\nu_{\text{III}} < h\nu_{\text{II}} < h\nu_{\text{III}} + h\nu_{\text{II}}).$$

Вследствие этого, квантовый выход люминесценции (Φ_K , определяемый отношением числа квантов света, вторично излучаемых веществом, к числу квантов света, поглощенному непосредственно перед этим тем же количеством того же вещества) при любом виде люминесценции меньше или равен единице. А энергетический выход люминесценции (Φ_E , определяемый отношением энергии, излучаемой веществом, к энергии, поглощенной непосредственно перед этим тем же количеством того же вещества) – ещё меньше Φ_K .

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 с τ_3 , как при фосфоресценции. При этом, поглотив квант света, $\bar{e}$ сначала переходит в метастабильное возбужденное состояние – в котором может находиться достаточно долго. После чего, в результате соударения молекул, $\bar{e}$ сообщает дополнительную энергию – достаточную для перехода его на следующий, уже нестабильный энергетический уровень. С которого и происходит переход рассматриваемого $\bar{e}$ 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, главной областью применения МЭСА являются количественные определения веществ с пределом обнаружения до 10^{-9} моль/л. Причем последний гораздо меньше, чем при осуществлении молекулярного абсорбционного спектрофотометрического анализа в видимой, а также ближней ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра (ВдМАСА).

А это имеет место, в частности, потому, 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.

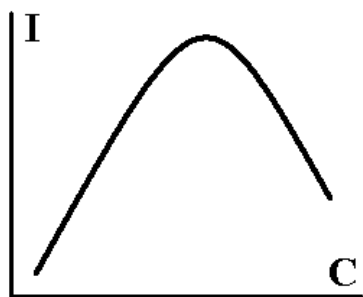


Рис. 1.2. Зависимость интенсивности люминесценции (I) от концентрации люминофора в системе (C).

Однако при этом следует учитывать, что при осуществлении количественного МЭСА, интенсивность люминесценции (I) с увеличением концентрации люминофора в образце (C) сначала (*при малых C*) экспоненциально увеличивается. Затем, в некотором диапазоне концентраций люминофора I изменяется мало. А при ещё большем увеличении C интенсивность люминесценции образца начинает значительно уменьшаться, как показано на рис.1.2.

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

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

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

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

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 излученных 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 невозбужденные молекулы люминофора поглощают кванты света, испускаемые его возбужденными 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) Безизлучательно поглощение молекулами растворителя или не люминесцирующих 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 безизлучательная 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:

$$I_L \sim k \cdot C.$$

Вследствие чего, при люминесцентном анализе стремятся максимально разбавлять пробу. Причем, интенсивность люминесценции, также как и в случае регистрации интенсивности светопоглощения образцов, как правило, определяют в «относительных единицах» в виде:

$$I = \lg(F_H/F_O),$$

где F_H и F_O – величины выходных сигналов фотодетекторов в измерительном и опорном (*фоновом*) каналах; либо разность выходных сигналов фотодетекторов в измерительном и опорном (*фоновом*) каналах при наличии на этих фотодетекторах входных сигналов (*сигнал + шум*) и их отсутствии (*шум*).

Однако, у спектров фотолюминесценции, в отличие от спектров светопоглощения, есть не одна, а три степени свободы – по характеристическим диапазонам длин волн максимумов возбуждения и испускания; а также по времени задержки испускания относительно возбуждения (τ_3).

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 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:

(1) Синхронные спектры – получаемые сканированием с одновремен-

ным синхронным изменением длин волн возбуждения и эмиссии, с сохранением постоянного сдвига ($\Delta\lambda_{\text{сф}}$) между ними. При этом, $\Delta\lambda_{\text{сф}}$ обычно устанавливают равным разности длин волн максимумов возбуждения и эмиссии, наблюдаемых для исследуемого образца на классических спектрах люминесцентного возбуждения и эмиссии. Однако для лучшей селекции пиков отдельных компонентов в сложных смесях либо пиков различных мономеров в гетерополимерных системах (*таких например, как белки*) $\Delta\lambda_{\text{сф}}$ при записи синхронных спектров может выбираться иным.

(2) 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 $\Delta\lambda_{\text{сф}}$ в этом случае (*как и в случае регистрации «классически»х спектров люминесценции*) является величиной переменной по длине волны. Но регистрация люминесценции образца при этом производится всё же не при фиксированной длине волны возбуждения ($\lambda_{\text{в}}$) или эмиссии ($\lambda_{\text{э}}$), как при «классическом» способе регистрации – а при $\lambda_{\text{в}}$ и $\lambda_{\text{э}}$, изменяющихся в процессе сканирования.

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

При этом, в ряде случаев, при правильно подобранном $\Delta\lambda_{\text{сф}}$ синхронные и асинхронные спектры позволяют более отчетливо выявить пики, наблюдаемые на «классических» спектрах люминесценции сложных образцов (см. рис.1.3–1.6). Кроме того, при подобом способе регистрации спектров люминесценции в значительной степени уменьшается фоновое излучение (*проявляющееся за счёт рэлеевского и комбинационного рассеяния света молекулами растворителя, механизмы которого будут рассмотрены ниже*). Однако, для проявления такого эффекта необходимо, чтобы уже на «классическом» спектре люминесцентного возбуждения или испускания образца наблюдалась «тонкая колебательная структура» (*проявляющаяся расщеплением одного широкополосного пика на несколько узкополосных*).

А, кроме того, для правильной интерпретации синхронные и асинхронные спектров необходимо учитывать, что они, в отличие от «классических» спектров люминесценции, только формально подразделяются на спектры эмиссии и возбуждения (*по тому, длины волн от какого монохроматора – эмиссии или возбуждения – указываются по оси абсцисс такого спектра*) – а по сути, представляют собой единый спектр, где каждому пику соответствуют свои, отличные от других пиков, длины волн как люминесцентного возбуждения, так и эмиссии.

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.1.4).

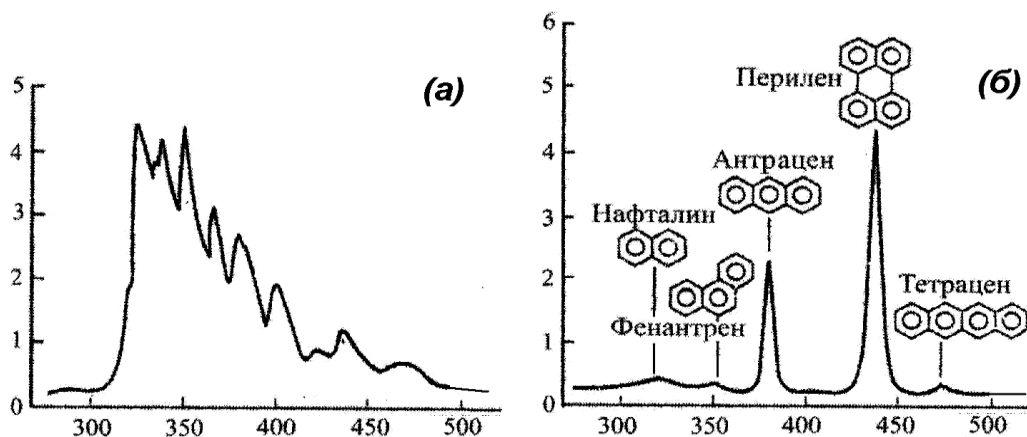


Рис. 1.3. Спектры флуоресцентной эмиссии смеси нафталина, фенантрена, антрацена, перилена и тетрацена: (а) «классический» и (б) синхронный с правильно подобранным $\Delta\lambda_{\text{СФ}}$.

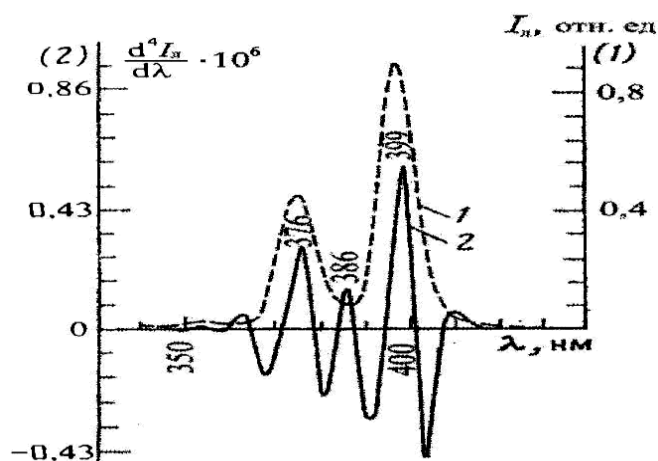


Рис. 1.4. Синхронный спектр флуоресцентной эмиссии смеси антрацена ($1,0 \times 10^{-7}$ М), 9,10-диметилантрацена ($2,0 \times 10^{-8}$ М) и 1,2-бензантрацена ($1,5 \times 10^{-7}$ М), измеренный при $\Delta\lambda_{\text{СФ}} = 5$ нм (пунктирная линия 1). И спектр производной 4-го порядка от спектра 1 (сплошная линия 2).

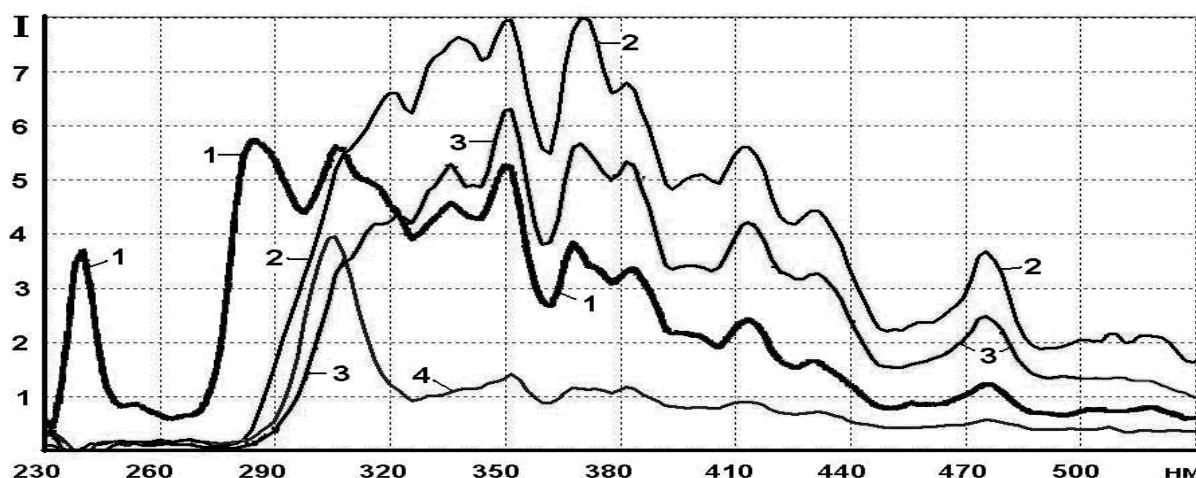


Рис. 1.5. Синхронные спектры фотофлуоресцентного возбуждения, регистрируемые при $\Delta\lambda_{\text{СФ}} = 10$ нм для водных растворов 4-х разных белков (см. линии 1–4) с концентрацией каждого 10 г/л (данные автора).

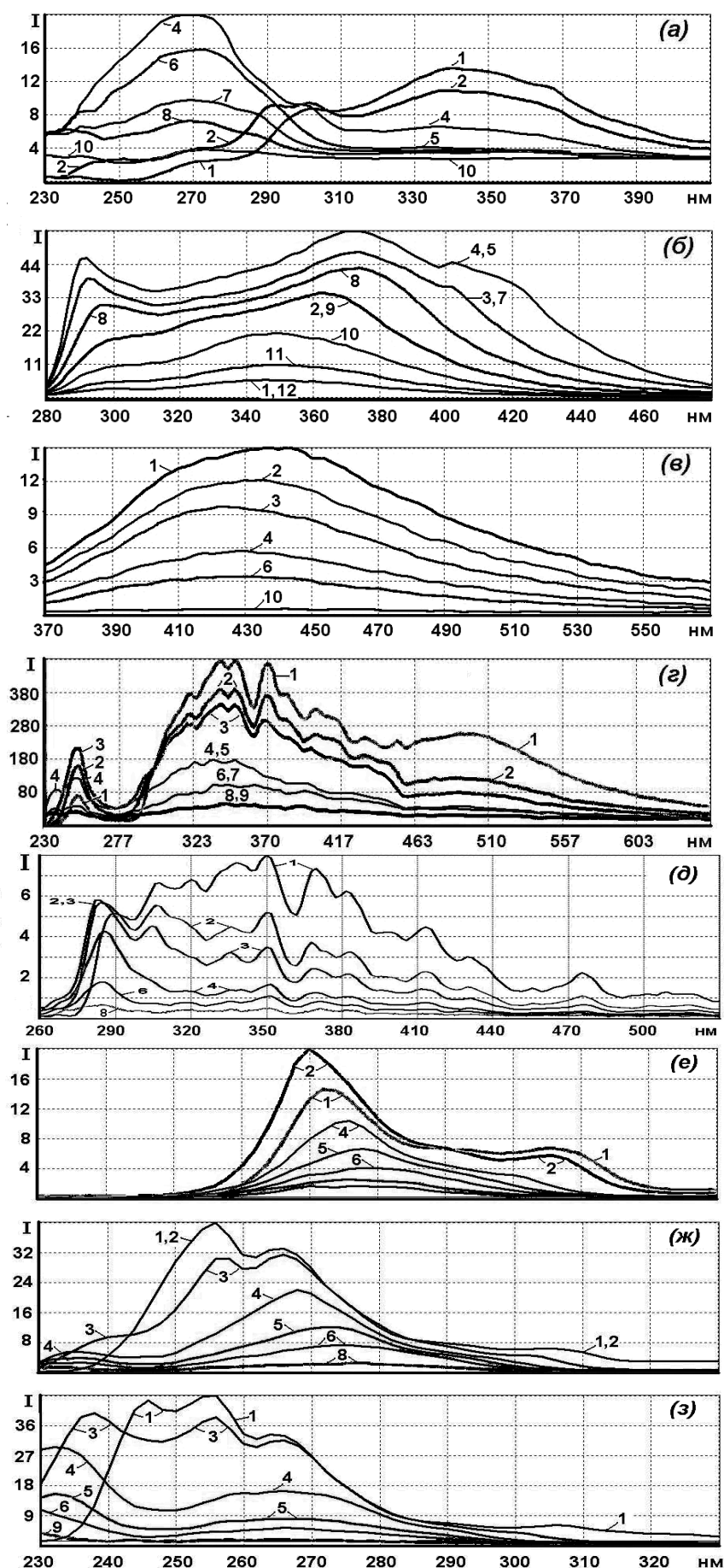


Рис. 1.6. Спектры флуоресценции водных растворов с разными концентрациями молочного белка казеина (данные автора): (а) спектры возбуждения при длине волны эмиссии ($\lambda_{\text{э}}$) 435 нм; (б–в) спектры эмиссии при длинах волн возбуждения ($\lambda_{\text{в}}$) 270 и 345 нм; (г–з) синхронные спектры с $\Delta\lambda_{\text{сф}} = \lambda_{\text{э}} - \lambda_{\text{в}} = 0, 10, 30, 60$ и 90 нм (здесь по оси абсцисс указаны длины волн возбуждения). Линиям 1–12 на рис. а–в соответствуют концентрации казеина: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 и 0.005 г/л. Линиям 1–6 на рис. г–з соответствуют концентрации казеина: 25, 10, 5, 1.3, 0.6, 0.3, 0.15, 0.08 и 0.04 г/л.

Также для увеличения структурированности, а также общей интенсивности спектров люминесценции исследуемых образцов (*что, в свою очередь, позволяет увеличить селективность и чувствительность МЭСА*) регистрацию оных спектров люминесценции стараются осуществлять при пониженных температурах.

Причем в ряде случаев температуру анализируемых образцов понижают вплоть до 77 К (*температура 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, смесь этанола с изопропанолом и т.п.*), имеющие аморфную (или иначе, стеклообразную) структуру даже при весьма низких температурах (*что важно из-за того, что при кристаллизации образцов, как правило, проявляется анизотропия их оптических свойств + могут значительно увеличиваться мешающие МЭСА светотражение, светорассеяние и тушение люминесценции*).

При этом, как уже говорилось, в спектрах люминесценции образцов, регистрируемых при низких температурах, по сравнению с аналогичными спектрами, регистрируемыми при более высоких температурах, в отличие от инфракрасных фотоадсорбционных спектров, как правило, увеличиваются общий квантовый и энергетический выходы флуоресценции (*а значит, и интенсивность аналитического сигнала по отношению к фону*);

+ с большей эффективностью может 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 может проявляться тонкая колебательная структура спектров возбуждения и испускания люминесценции (*что увеличивает характеричность этих спектров*).

Также эффекты, аналогичные наблюдаемым 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 700–1500 °С 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 же, используемые для определения органических соединений получают, как правило, более мягким способом. Но такие кристаллофосфоры отличаются, обычно, и меньшей чувствительностью определения, чем в случае анализа неорганических соединений.

При этом поглощает энергию, необходимую для возбуждения фотолюминесценции, 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.1.7–1.8.

Также немалое влияние на характер спектров люминесценции анализируемых систем могут оказывать: (1) общий уровень их ионной силы; (2) pH, 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 вышепересмотренных механизмов) люминесценцию молекул анализируемых веществ; и т.п. (см. рис.1.8).

В результате всего вышесказанного, методы МЭСА в большей мере, чем 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).

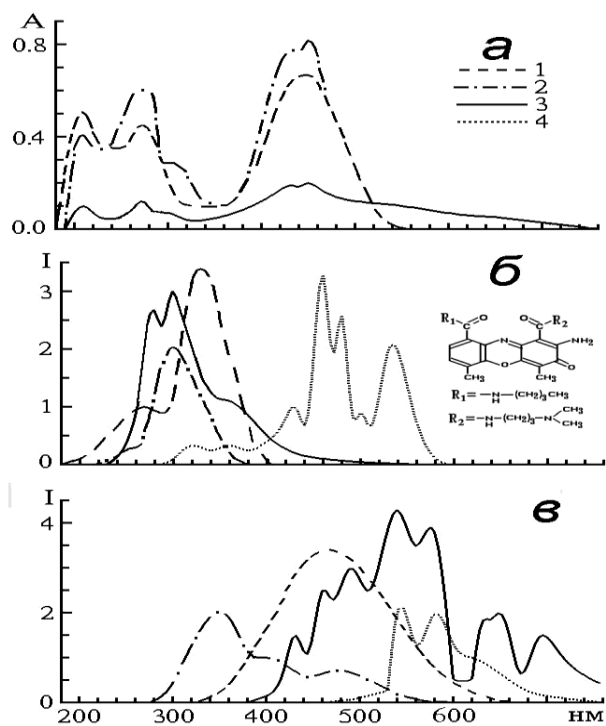


Рис. 1.7. Спектры поглощения (а), флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) 2-амино-4,6-диметил-3Н-3-оксофеноксазина (структурная формула показана на рисунке) с концентрацией $7,5 \times 10^{-5}$ моль/л — в воде (линия 1); 2-пропанол (линия 2) и октане (линии 3 и 4); снятые при длинах волн флуоресцентного 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 линий 1–3).

При этом, в наиболее сложном случае (когда требуется исследовать характер спектров молекулярной фотолюминесценции 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.

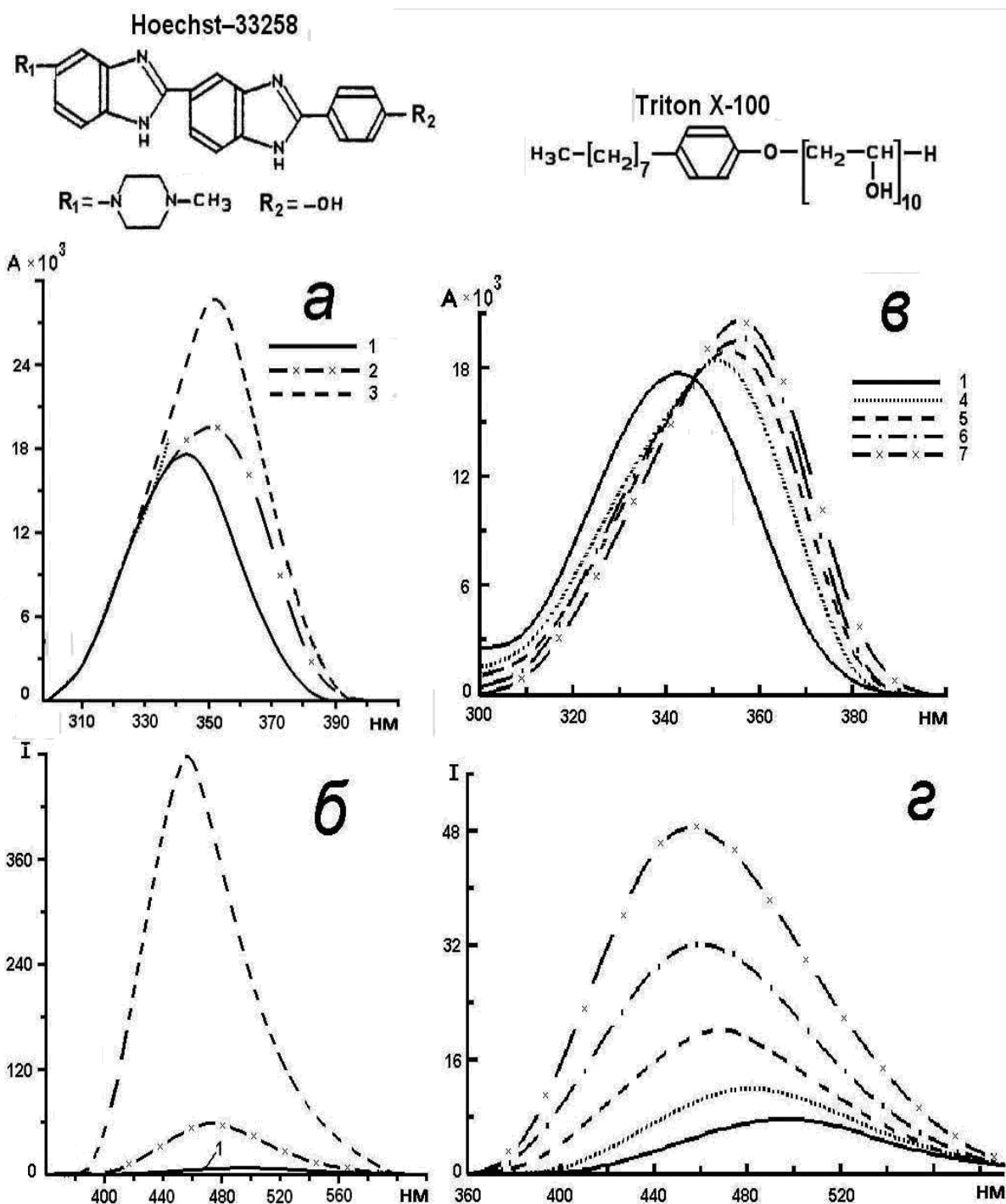


Рис. 1.8. Спектры поглощения (**а, в**) и флуоресцентной эмиссии (при длине волны возбуждения, соответствующей максимуму поглощения люминофора в каждом конкретном случае) (**б, д**) люминофора Hoechst-33258 с концентрацией $6,5 \times 10^{-7}$ моль/л в воде (линии 1), 50% водном растворе сахарозы (увеличивающей вязкость раствора) (линии 2), 2-пропанол (с малой жиэлектрической проницаемостью среды) (линии 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 (линии 4–7, соответственно).

2. СОВРЕМЕННОЕ ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЭСА

В настоящее время, среди разных типов люминометров наиболее распространены фотолюминометры – которые, в свою очередь, подразделяются на атомарные и молекулярные.

Кроме того, достаточно распространены хемолюминометры (*характеризующиеся наибольшей дешевизной, компактностью и простотой исполнения*); рентгеновские флуориметры (*используемые для регистрации люминесценции, возбуждаемой рентгеновским облучением образцов*); сцинтилляционные датчики (*используемые для регистрации люминесценции, возбуждаемой γ -облучением образцов*), устройства, применяемые для возбуждения люминесценции потоком электронов, электромагнитными и иными полями и т.п.

При этом, приборы, используемые в настоящее время для молекулярной фотолюминиметрии по своему устройству и исполнению, в основном, аналогичны абсорбционным фотометрам. В качестве примера, на рис.2.1 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_L), то часть возбуждающего света (I_0). И устройство **9** в качестве аналитического сигнала вычисляет $A = \lg(I_L/I_0)$.

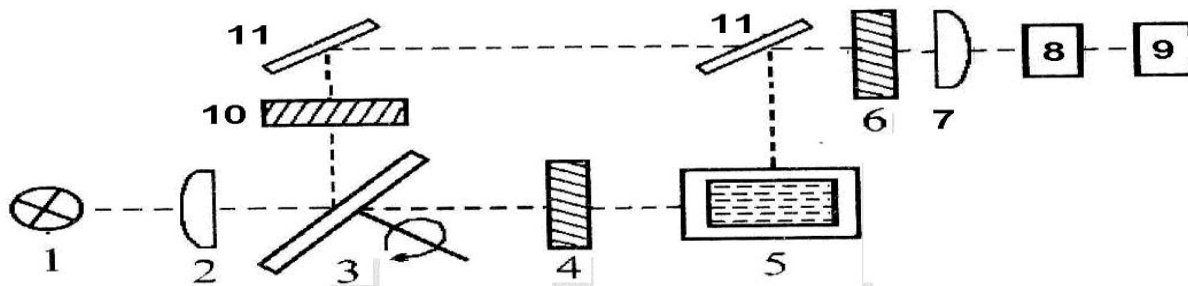


Рис. 2.1. Схема устройства фотолюминометра.

Большую сложность, и соответственно, дороговизну фотолюминометров по сравнению с фотометрами, применяемыми для ВдМАСА, помимо более мелкосерийных объемов производства фотолюминометров, составляет необходимость использования в этих приборах:

- + двух монохроматоров или оптических фильтров (*той же конструкции, что и в фотометрах, применяемых для ВдМАСА*), располагаемых как до, так и после образца (*в каналах возбуждения и эмиссии одного*) даже при однолучевом варианте исполнения прибора;

- + источника светового облучения образца той же конструкции, что и в случае ВдМАСА, но 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 сверхярких либо лазерных светодиодов с разными длинами волн излучения, лазеры с перестраиваемой частотой и т.п. – а кроме того, в случае осуществления МЭСА, по сравнению с ВдМАСА возрастают также требования к стабильности используемого источника излучения и однородности его спектра испускания (*или, по крайней мере, сглаживания «линейчатости» одного*);

- + фотодетектора той же конструкции, что и в случае ВдМАСА, но с увеличенной чувствительностью к слабым внешним световым потокам при пониженной величине фоновых (*темнового*) сигнала;

- + как правило, 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, необходимости анализа крупных объектов (*не помещающихся в кюветное отделение люминометра*), а также 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, либо если позволяют возможности регистрирующего устройства, по времени задержки люминесценции*).

Кроме того, в качестве опорного сигнала (*по отношению к которому определяется интенсивность люминесценции фоновых, 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. 2.1);
- (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 фотофлуоресценции используют:

- либо механические прерыватели (*подобные модулятору 3, показанному на вышеприведенной схеме фотолюминометра*) – по-очередно (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*).

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 оного проявляется только при одном, конкретном приборном $\tau_3 = \tau_3^*$ (т.е. определить τ_3^* , не зная его заранее, в этом случае существенно сложнее).

Существенно реже в настоящее время используются приборы, позволяющие определять время затухания (τ_3) флуоресценции, также как и при фосфоресценции изменяющееся даже при изменении характера микроокружения анализируемого вещества в образце (*вследствие, например, его комплексообразования, сорбции, изменения характера растворителя, присутствия в образце различных примесей и т.п.*) либо при изменении про-

странственной структуры этого вещества (*наблюдающейся, в частности, при регуляции ферментативной активности клеток в процессе их жизнедеятельности или при обратимой денатурации белков и нуклеиновых кислот*).

Связано это, в частности, с тем, что здесь требуется существенно большее быстроедействие всех частей прибора. Но и для таких целей сегодня можно найти подходящие измерительные системы – такие например, как «FluoTime 300», выпускаемая компанией «PicoQuant» (Германия) (см. <https://technoinfo.ru> или <https://picoquant.com>), позволяющая с соотношением величины полезного сигнала к шуму 26000/1 (*достигаемой за счет того, термостабилизируемый охлаждаемый ФЭУ, используемый этой системой в качестве фотодетектора, работает в режиме подсчета отдельных квантов, а в качестве источника фотовозбуждения используется импульсный лазер с перестраиваемой частотой*) в диапазоне длин волн от 185 до 1700 нм и температур от -15°C до $+110^{\circ}\text{C}$ определять τ_3 в диапазоне от 10 пс до нескольких секунд.

Помимо этого, поскольку интенсивность излучения источника света, линейная дисперсия призматических 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 коррекцию. 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 в случае ВдМАСА*), 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*);

+ приспособления для получения различных спектров отражения, позволяющие анализировать твердые и жидкие образцы с малой оптической прозрачностью либо значительной способностью к тушению флуоресценции; а также создавать компактные переносные фотолуминометры для анализа приповерхностных областей больших объектов (*хотя аналогичные приспособления изготавливаются и в качестве отдельных модулей, вставляемых в кюветное отделение стационарных фотолуминометров*) – 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, на сайтах bio-chim.ru , analit-spb.ru , nytek.ru или czl.ru*), весьма компактные переносные фотолуминометры могут быть изготовлены в настоящее время даже без приспособлений для регистрации спектров отражения.

Так например, анализатор «Флюорат-02» (*см. например <http://apl54.ru>*); 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>*); 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 биолуминесцентной реакции, протекающей с участием этого вещества – см. <http://testo.spb.ru>*) включает в себя:

+ микрокювету с образцом

- + отражающе–фокусирующую сферу вокруг оной
- + 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. Плюс, при достаточной интенсивности источника излучения и чувствительности фотодетектора современные спектрофлуориметры могут быть использованы также для регистрации рэлеевского и комбинационного светорассеяния образцов.

В качестве примера такого прибора можно привести спектрофлуориметр «СМ 2203» (*см. например <http://solar-lab.ru>*), общая оптическая схема которого показана на рис.2.2. 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 светопоглощения 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 вышеупоминавшемуся фотодиоду **13**). Либо при осуществлении МЭСА или КР-спектроскопии, люминесцентное или рассеянное излучение от кюветы **15** через поляризационный фильтр **18** (аналогичный вышеупоминавшемуся фильтру **14** и также используемый лишь при необходимости осуществления поляризационных измерений) торроидальным 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.

Помимо этого, МЭСА (также как и 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 двухмерных 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 интенсив-

ность люминесценции образца. А по осям X и Y – длины волн возбуждения и испускания этой люминесценции.

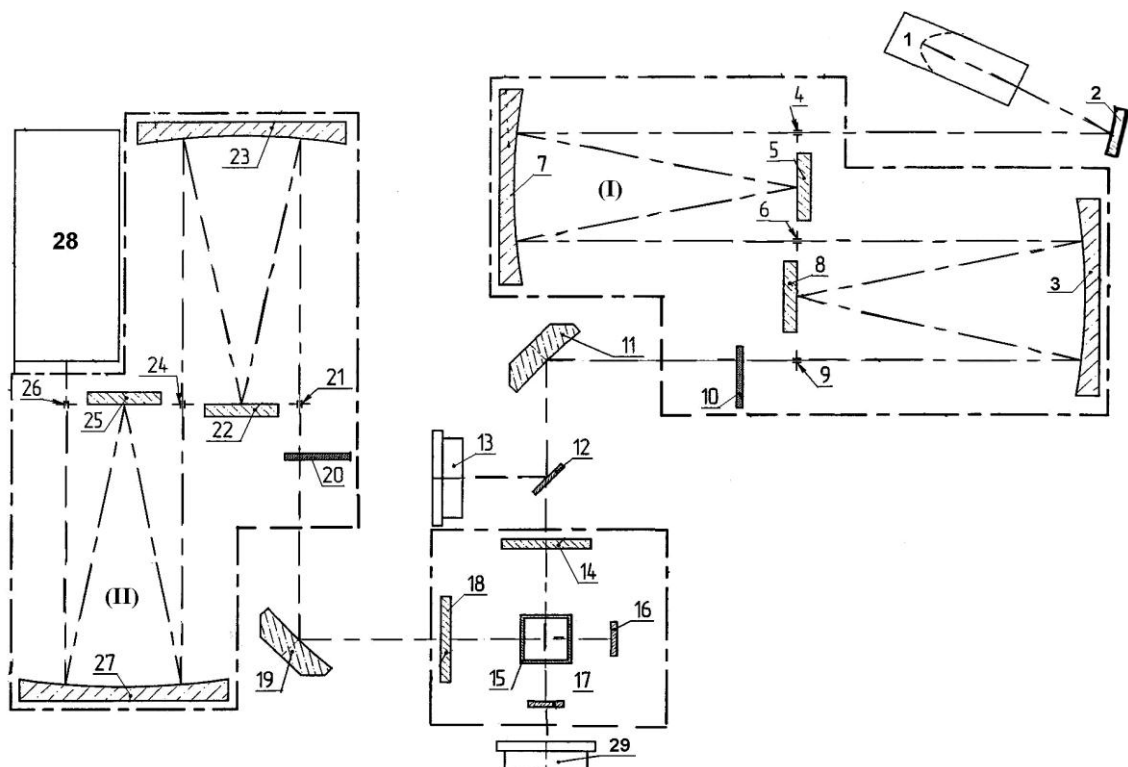


Рис. 2.2. Оптическая схема спектрофлуориметра «СМ 2203».

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>.

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.).

И наконец, при измерении слабых световых потоков (которые, в частности, при фотоМЭСА в разы слабее, чем при ВдМАСА – из-за необходимости использования в фотолюминометрах 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 люминометрия – в которой в качестве детектора ис-

пользуется 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 протускивании 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) Фотолюминометры, работающие по лидарному принципу (что также 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.

3. ИНДИКАТОРНЫЕ МЕТОДЫ МЭСА

И наконец, также как и в случае ВдМАСА, при осуществлении МЭСА для увеличения чувствительности и селективности весьма часто применяются не только прямые (*безиндикаторные*), 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 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 ($\lambda_{\text{и}}$, $\lambda_{\text{в}}$, τ_3).
- (4) Так называемый, сортовой анализ (*или иначе, качественные индикаторные методы*) – при осуществлении которого изменение интенсивности или иных характеристик люминесценции индикатора ($\lambda_{\text{и}}$, $\lambda_{\text{в}}$, τ_3) 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 непосредственное количественное 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} мг/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 (*либо, что существенно реже, изменять длину волны возбуждения или длительность задержки между испусканием и возбуждением*) в результате:

- (1) комплексообразования с ионами металлов (*металло ФЛИ*);
- (2) взаимодействия с H^+ или OH^- ионами (*кисотно–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 (ХЛИ) 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, люминесцентные индикаторы (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 металлофлуоресцентных индикаторов (МФИ) наибольшее применение в настоящее время имеют:

- кальцеин (*иначе, флуорексон – широко используется для определения присутствия Са и Мг в разнообразных биологических материалах; а также ионов Со, Си, Fe, Мп, Нд и других металлов – представляет собой сложную смесь разных хелатобразующих реагентов, аких 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 В, Ge, Si, Sb, Zn, Си, Ag, Со, 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(сали-цилиден)этилендиамин, N,N'-бис(салицили-ден)-2,3-диаминобензофуран. Все эти индикаторы широко используются для определения Al, Ga, Мг и других химических элементов*),
- о,о'-диоксиазобензол (ЛИ-6) (*область применения у этого и других азосоединений та же, что и у соединения ЛИ-5*).

Структурные формулы наиболее широкоиспользуемых в настоящее время МФИ приведены на рис.3.1.

В процессе титрования с помощью МФИ 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.

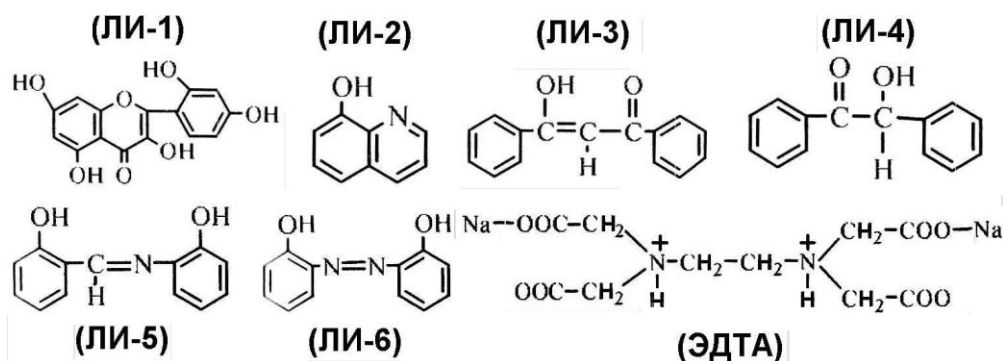


Рис. 3.1. Структурные формулы наиболее широкоиспользуемых в настоящее время металлофлуоресцентных индикаторов.

Чувствительность кисотно–основных ФЛИ к изменению рН, как правило, определяется переходами между их молекулярной и ионизированными формами (см. рис.3.2) – что может сопровождаться смещением длины волны испускания, возбуждения или поглощения данного индикатора. В настоящее время известно более 200 кисотно–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);
- антраниловая 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.

расным цветом; а комплексы Ru^{3+} с теми же соединениями – нет.

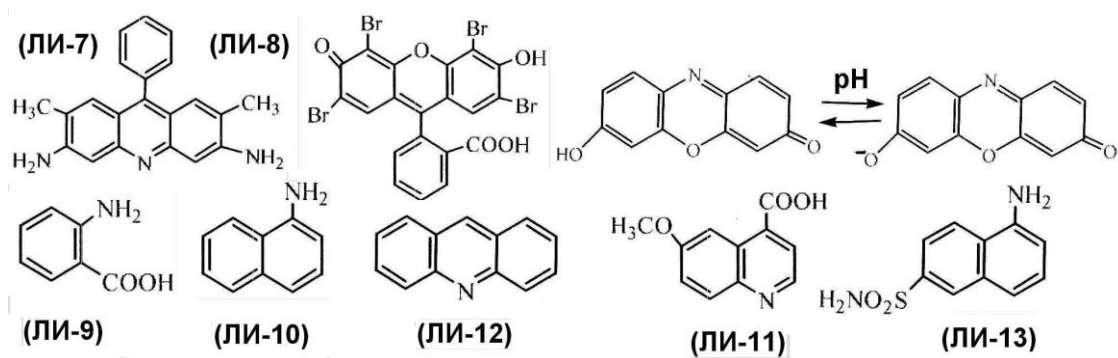


Рис. 3.2. Структурные формулы наиболее широкоиспользуемых в настоящее время кислотно–основных флуоресцентных индикаторов.

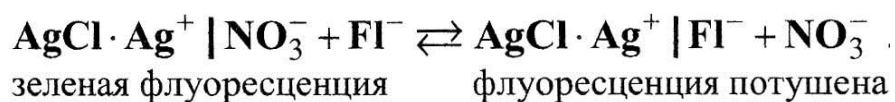
Так например, комплексы Ru^{2+} с 2,2-дипиридилем, 1,10-фенантролином и некоторыми их метилпроизводными флуоресцируют оранжево–

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

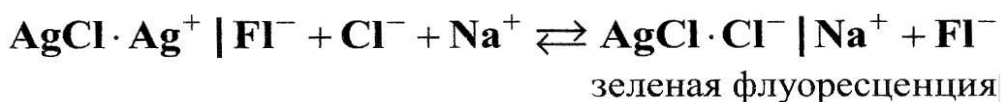
Адсорбционные ФЛИ применяют в различных методах осадительного титрования. При этом, в качестве индикаторов используют люминофоры, являющиеся слабыми органическими кислотами или основаниями. При определенных значениях рН они могут существовать как в электронейтральной (*недиссоциированной*), так и в анионной 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 (НФИ) (см. табл. 3.1), 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 NO_3^- 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 NO_3^- :



После же 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 FI^- заменяются на положительно заряженные Na^+ . И при переходе FI^- из сорбированного в растворенное состояние снова начинает проявляться активная флуоресценция этих ионов:



При обратном же порядке титрования (к NaCl прибавляют AgNO_3) 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 FI^- – 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.

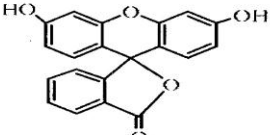
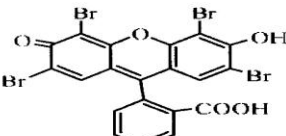
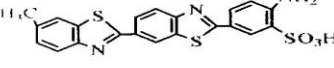
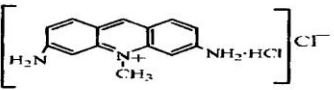
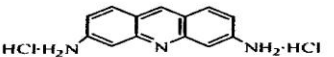
А методы хемилюминесценции по типу реакций, энергия которых используется для возбуждения люминесценции молекул, делят на:

- электрохемилюминесценцию (возбуждаемую реакциями, инициируемыми, в свою очередь, электрическим полем);
- биолюминесценцию (возбуждаемую энергией биохимических реакций);
- адсорбциолюминесценцию (возникающую, например, на поверхности твердых тел за счёт энергии, выделяющейся при адсорбции там некоторых газов);
- кандолюминесценцию (возбуждаемую за счёт энергии химических реакций, протекающих с рекомбинацией атомов);
- редоксолюминесценцию (возбуждаемую за счёт энергии окислительно–восстановительных реакций) и т.д.

Причем, поскольку количественные определения в хемилюминес-

центном 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, pH 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, pH и т.п.*).

Таблица 3.1. Наиболее распространенные в настоящее время адсорбционные флуоресцентные индикаторы.

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

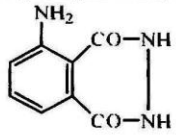
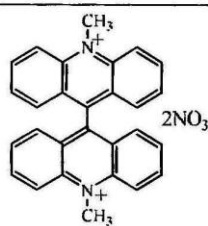
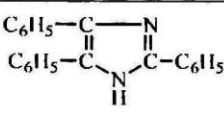
При этом, можно выделить следующие основные группы анализируемых соединений.

- (1) ХЛИ (*см. табл.3.2*) – 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 (O_2 , пероксиды, гипохлориды, гипобромиды, персульфаты, перманганаты, хроматы и т.п.).

- (3) Катализаторы индикаторных реакций (такие как Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} и т.п.).
- (4) Ингибиторы индикаторных реакций (например, ароматические соединения, содержащие фенольные и аминогруппы, которые способны ингибировать различные радикальные процессы).
- (5) Вещества, способные изменять pH среды.
- (6) Вещества, дезактивирующие возбужденное состояние ХЛИ (KI и т.п.).
- (7) Примеси, взвеси и т.п., способные поглощать излучение ХЛИ.

Таблица 3.2. Наиболее распространенные в настоящее время хемилюминесцентные индикаторы.

Индикатор	Определяемое вещество	Титрант
 Люминол (гидразид 3-аминофталевой кислоты)	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^-
 Люцигенин (N,N'-диметил-9,9-диакридиний нитрат)	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^+
 Лофин(2,4,5-трифенилимидазол)	H^+ (OH^-)	OH^- (H^+) $(pH_{кит} = 8,9-9,4)$
$(Si_6H_6O_3)_n$ Силоксен	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 ката-

лизаторы 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, Γ , 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 . А α -аминокислоты (*являющиеся ингибиторами индикаторных реакций*), переводят в комплексные соединения с медью (*являющиеся катализаторами индикаторных реакций*).

Определения с помощью методов ХЛА, как правило, требуют несложной аппаратуры (см. рис.3.3) 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) интенсивность свечения ХЛИ через определенное время после начала индикаторной реакции;
- (2) 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. 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.

На рис.3.3. 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).

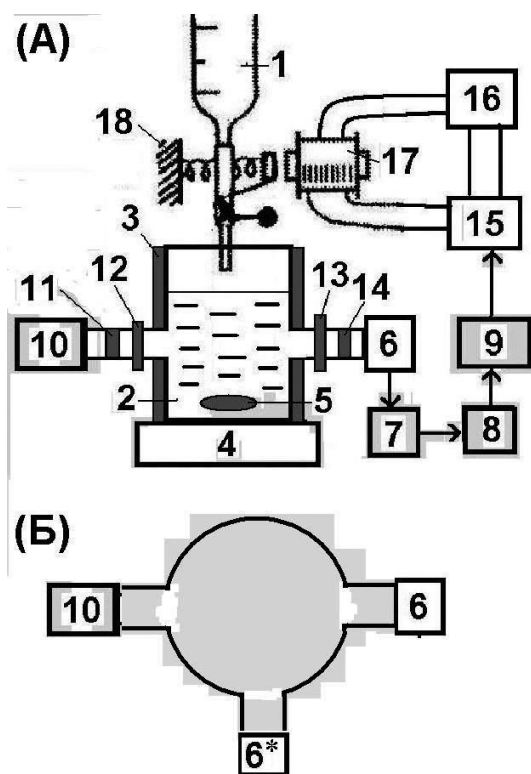


Рис. 3.3. Схема установки для фото- и люминесцентного индикаторного титрования жидких растворов.

(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 допол-

В случае, если в качестве фотодетектора 6 или 6* используется ФЭУ, либо полупроводниковый светочувствительный элемент (ПСЭ) – 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, 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*

нительный съёмный светофильтр (13) (необходимый для отсечения рассеянного образом 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 оно), 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 силикоксен – для растворов с $pH < 3,5$ либо растворов, содержащих сильные окислители (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 (абсорбо- или кандо-) люминесценцию на поверхности кристаллофоров. При этом, основа кристаллофора выступает в качестве приёмника энергии, выделяющейся при абсорб-

ции или рекомбинации газов на его поверхности. А ионы, активирующие 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, пропорционально-му, 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 «сшивают» с каким-либо биологически активным соединением – которое, в свою очередь, уже взаимодействует интересующим нас образом с исследуемым объектом*).

Для иллюстрации вышесказанного ниже приведены несколько примеров применения косвенных методов МЭСА.

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.3.5. При этом S1-форма (*превалирующая 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; превалирующая 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.

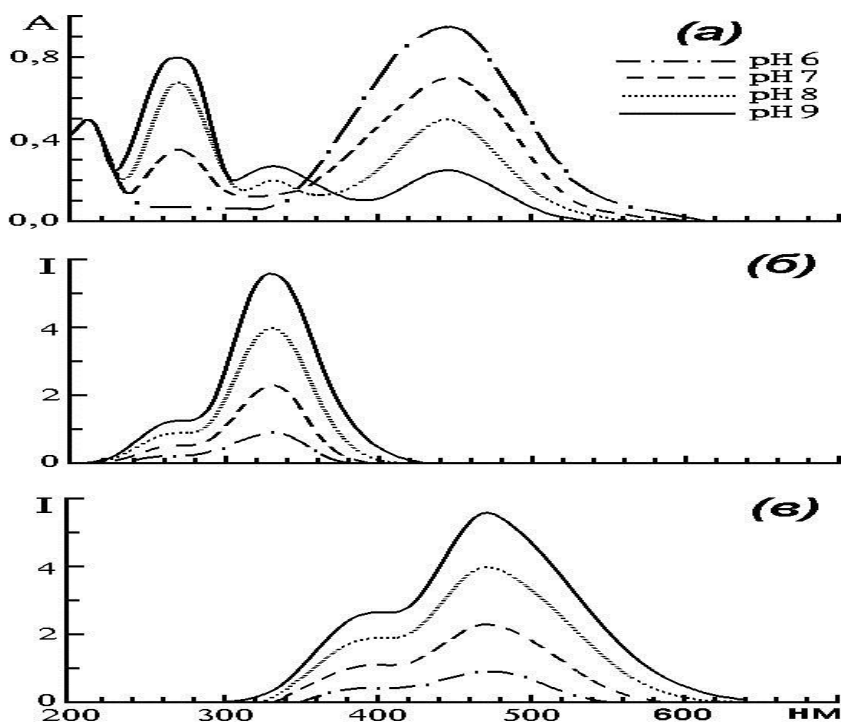


Рис. 3.4. Спектры поглощения (а), а также флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) 2-амино-4,6-диметил-3Н-3-оксофеноксазина, структурная формула которого показана на рис.3.5, в его водных растворах с концентрацией $7,6 \times 10^{-5}$ моль/л и различными значениями pH. Здесь по оси абсцисс обозначена 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.

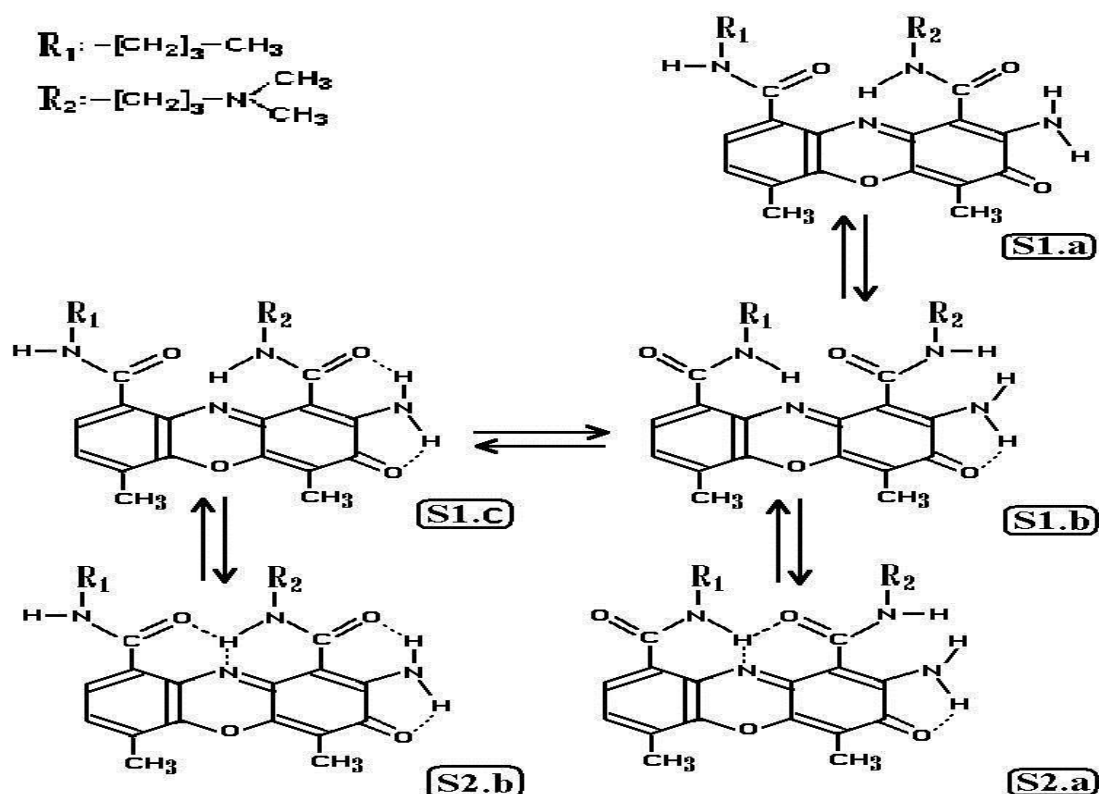


Рис. 3.5. Вероятные структуры равновесных форм, в которых оксофеноксазин, спектры которого показаны на рис.3.4, находится в водных средах с различными рН, и схема взаимопереходов между ними. Пунктиром обозначены возможные внутримолекулярные водородные связи.

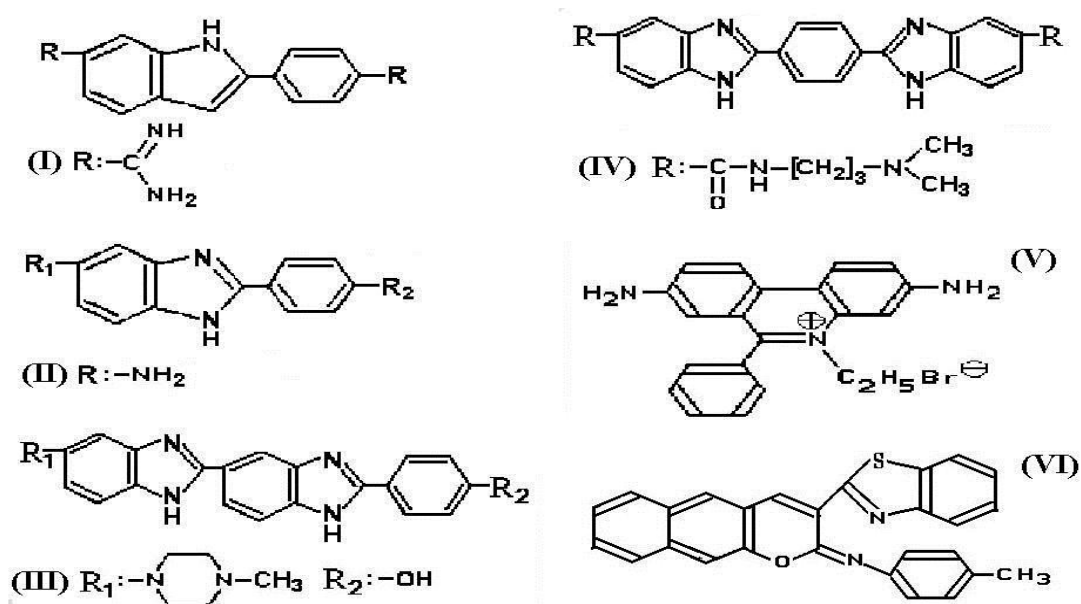


Рис. 3.6. Структурные формулы различных ДНК-специфичных флуорофоров. Цифрами обозначены: (I) DAPI, (III) Hoechst-33258, (V) этидий

бромид.

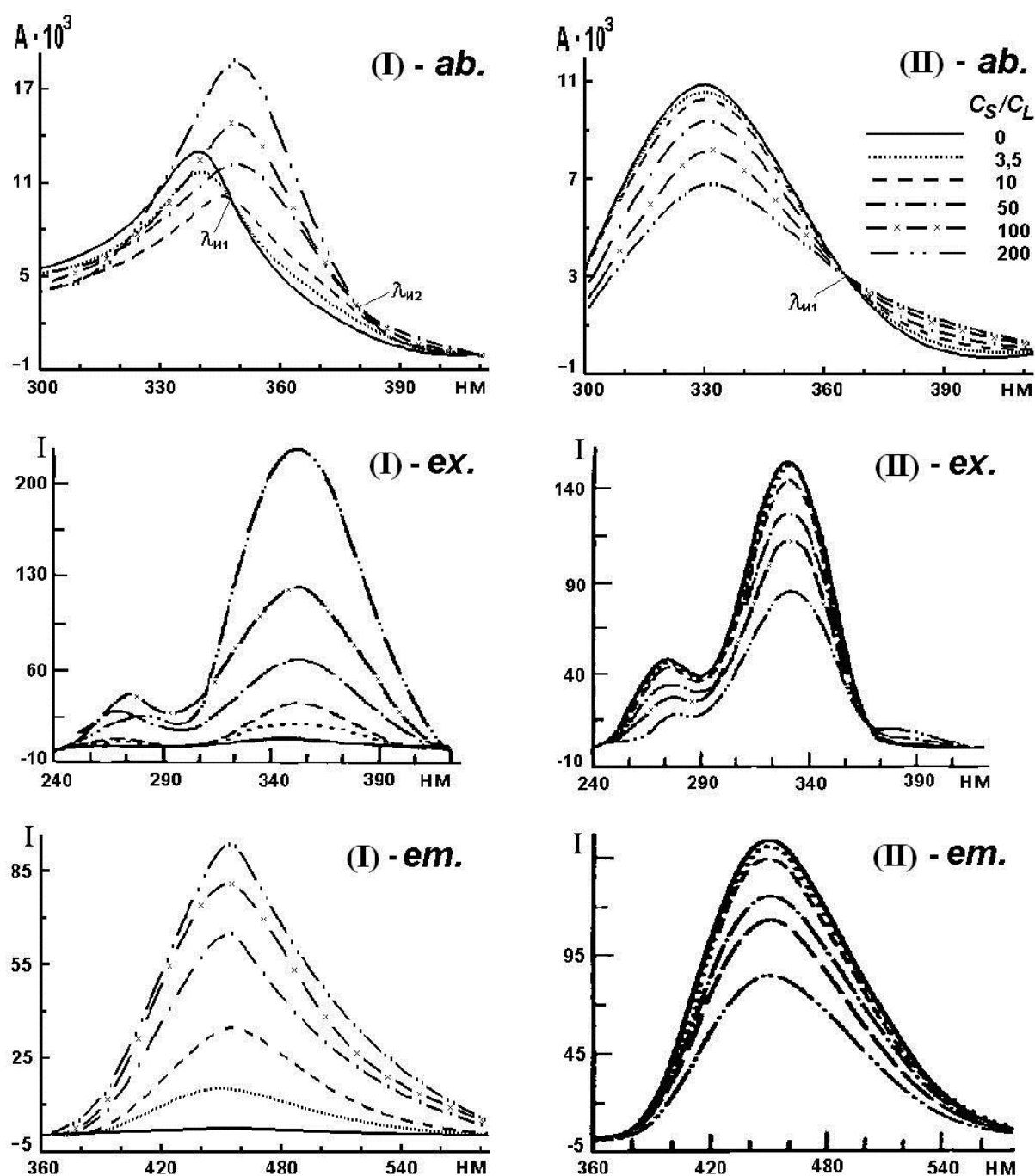


Рис. 3.7. Спектры поглощения (*ab*), а также флуоресцентного возбуждения (*ex*) и эмиссии (*em*) флуорофоров (I) и (II) (см. рис.3.6) в их водных растворах с концентрациями $6,4 \times 10^{-7}$ моль/л и $pH=7,2$ в присутствии различных количеств ДНК тимуса теленка. Условные обозначения: C_S/C_L – отношения молярных концентраций ДНК/лиганд, соответствующие указанному типу кривых; λ_{m1} – изобестические точки. По оси абсцисс обозначена длина волны, а по оси ординат – коэффициенты поглощения (A) либо

флуоресценции (I) анализируемого раствора.

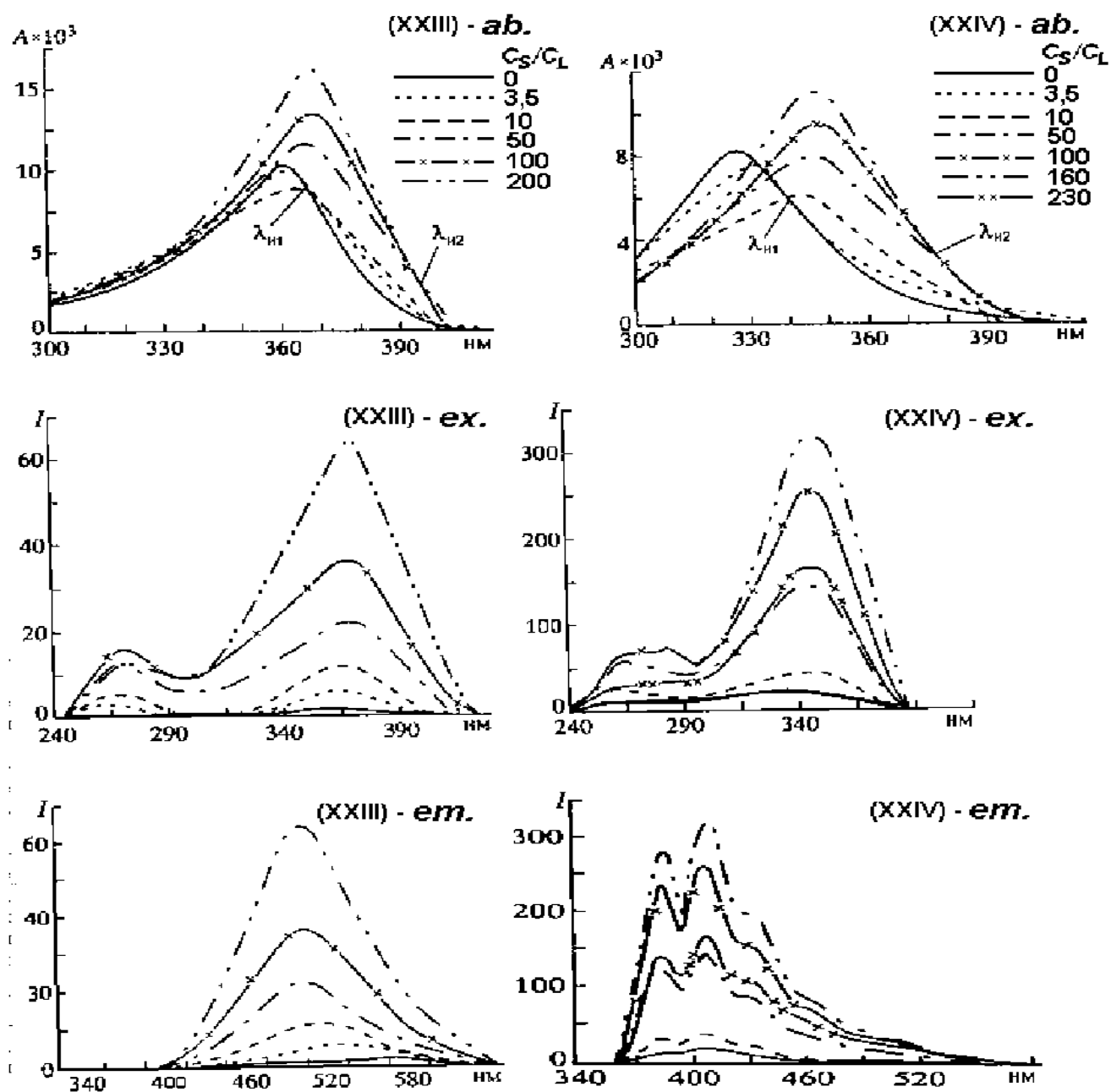


Рис. 3.8. Спектры поглощения (*ab*), а также флуоресцентного возбуждения (*ex*) и эмиссии (*em*) флуорофоров (III) и (IV) (см. рис.3.6) в их водных растворах с концентрациями $6,4 \times 10^{-7}$ моль/л и рН=7,2 в присутствии различных количеств ДНК тимуса теленка. Условные обозначения те же, что на рис.3.7.

При этом, у соединения I (DAPI), как и у феноксазина, показанного на рис.3.5, 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 амино–группы 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 релаксации. 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 оным – которое ослабляется лишь при специфическом взаимодействии соединения IV с ДНК (*в результате чего, фенилбисбензимидазольное «ядро» соединения IV «восстанавливает» свои люминесцентные свойства*).

Рис.3.9 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 двой-

ной 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.3.8), 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.3.9). Причем эффективность такого переноса энергии (Е) будет зависеть от расстояния (f) между молекулами донора и акцептора энергии, сорбированными на ДНК, как: $E = f_0^I / (f_0^I + f^I)$, где $f_0 = \text{const}$ – Форстеровский критический радиус, а $I = 2, 4$ 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 Е 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.

И наконец, рис.3.10 и 3.11 иллюстрируют возможность наличия в молекуле даже одного флуорофора сразу нескольких независимых люминесцирующих фрагментов. При этом, как было показано 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.

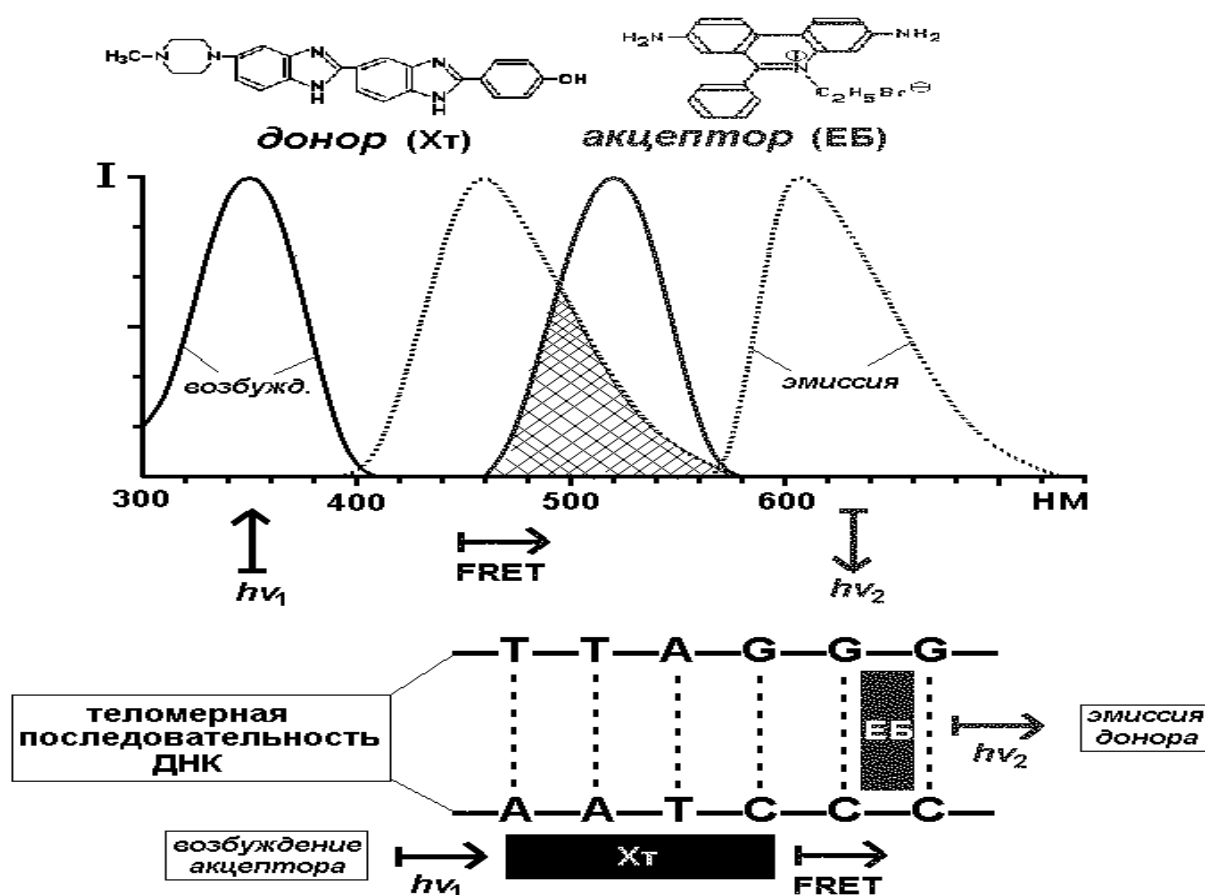


Рис. 3.9. Схема флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между молекулами флуорофоров III (Xt, Hoechst-33258) и V (EB, этидий бромид). Условные обозначения: I – интенсивность флуоресценции; $h\nu_1$ и $h\nu_2$ – кванты света, поглощаемый Xt и испускаемый EB, соответственно; A, T, G, C – разные нуклеотиды ДНК (аденин, тимин, гуанин и цитозин, соответственно).

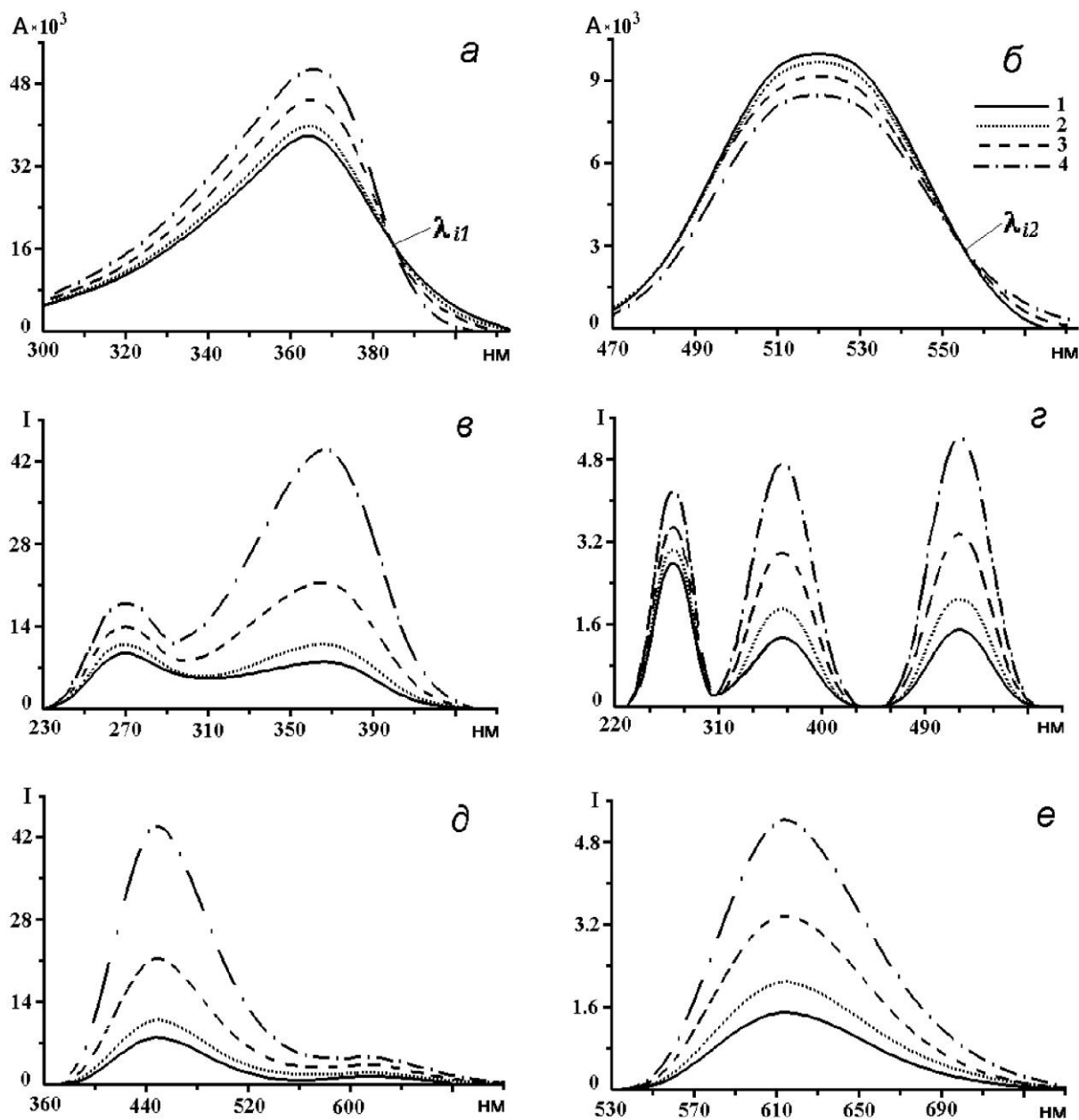


Рис. 3.10. Спектры поглощения (*а, б*), а также флуоресцентного возбуждения (*в, г*) и эмиссии (*д, е*) в водных растворах с концентрацией флуорофора VI (см. рис.3.6) $2,8 \times 10^{-5}$ моль/л в присутствии различных количеств ДНК, снятые при длинах волн эмиссии: 450 (*в*) и 615 (*г*) нм и длинах волн возбуждения флуоресценции: 365 (*д*) и 520 (*е*) нм, соответственно. Здесь кривым **1–4** соответствуют отношения молярных концентраций ДНК и красителя (C_D/C_L): 0, 1, 10 и 50; а λ_{i1} и λ_{i2} указывают положение изобеситических точек, зарегистрированных в спектрах поглощения флуорофора VI.

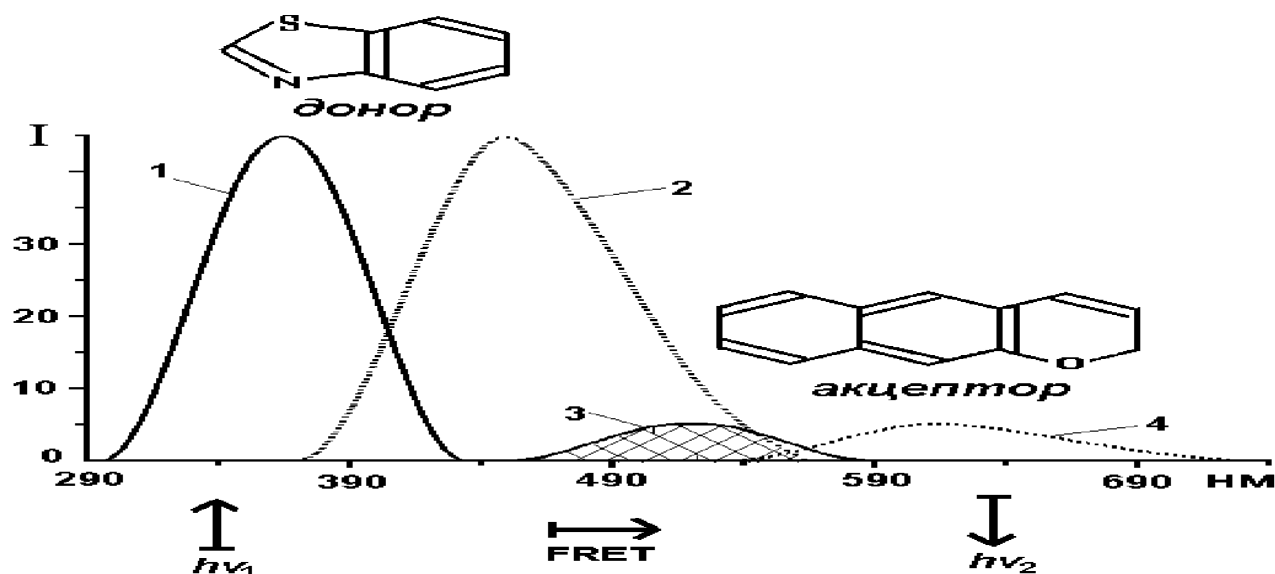


Рис. 3.11. Схема флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между бензтиазолиловым (*донор*) и бенз- α -хроменовым (*акцептор*) фрагментами молекулы флуорофора VI (см. рис.3.6) при соотношении мольных концентраций ДНК и флуорофора $C_S/C_L=50$. Здесь кривыми **1** и **2** обозначены спектры 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.

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.
12. Мак-Махон Дж. Аналитические приборы. Руководство по лабораторным, портативным и миниатюрным приборам. -СПб.: Профессия, 2013. -338с.
13. Пентин Ю.А., Курамшина Г.М. Основы молекулярной спектроскопии. -М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. -398с.
14. Пилипенко А.Т., Пятницкий И.В. Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. -М.: Химия, 1990. -815с.
15. Рабек Я. Экспериментальные методы в фотохимии и фотофизике. Т.1 и Т.2. -М.: Мир, 1985. -1150с.
16. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. -М.: Мир, 1989. -608с.
17. Васильев В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. Кн. 2. -М.: Дрофа, 2005. -384с.
18. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия. Кн. 2: Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. -М.: Высшая школа, 2005. -559с.
19. Балюстин, А.А. Аналитическая химия. В 3 т. Т. 1: Методы идентифи-

кации и определения веществ / под ред. Л.Н. Москвина. -М.: Академия, 2008. -576с.

Дополнительная

1. Аналитическая лазерная спектроскопия. / под ред. Н.Оменетто. -М.: Мир, 1982. -606с.
2. Биолюминесценция. 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. Спектральный анализ чистых веществ. / под ред. Х.И.Зильберштейна. -СПб.: Химия, 1994. -336с.
9. Спектроскопические методы определения следов элементов. / под ред. Д.Вайнфорднера. -М.: Мир, 1979. -494с.
10. Физические и физико-химические методы анализа. / под ред. Л.Н.Москвина. -СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. -142с.
11. Алексеева Т.А., Теплицкая Т.А. Спектрофлуориметрические методы анализа ароматических углеводородов в природных и техногенных средах. -М.: Гидрометеиздат, 1981. -215с.
12. Антонов В.С., Беков Г.И. и др. Лазерная аналитическая спектроскопия. -М.: Наука, 1986. -318с.
13. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. -М.: Мир, 1987. -462с.
14. Барашков Н.Н. Люминесцентный анализ на службе здоровья. -М.: Наука, 1985. -95с.
15. Барашков Н.Н., Гундер О.А. Флуоресцирующие полимеры. -М.: Химия, 1987. -223с.
16. Барлтроп Дж., Койл Дж. Возбужденные состояния в органической химии. -М.: Мир, 1978. -446с.
17. Баффингтон Р., Уилсон М. Детекторы для хроматографии. -М.: Мир, 1993. -79с.
18. Борн М., Вольф Э. Основы оптики / Пер. с англ. -М., 1973.
19. Бражников В.В. Детекторы для хроматографии. -М.: Машиностроение, 1992. -320с.
20. Булгаков Р.Г., Казаков В.П., Толстиков Г.А. Хемилюминесценция металлорганических соединений. -М.: Наука, 1989. -220с.

21. Гительзон И.И., Левин Л.А. и др. Биолюминесценция в океане. -СПб.: Гидрометеиздат, 1992. -282с.
22. Головина А.П., Левшин Л.В. Химический люминесцентный анализ неорганических веществ. -М.: Химия, 1978. -245с.
23. Гришаева Т.И. Методы люминесцентного анализа. -СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2003. -226с.
24. Демтредер В. Лазерная спектроскопия: Основные принципы
25. 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 аналитиче-

- ской 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., Свердлова О.В. Практическое руководство по молекулярной спектроскопии. -СПб.: Изд-во СПбГУ, 1995. -236с.
 45. Стенхольм С. Основы лазерной спектроскопии. -М.: Мир, 1987. -312с.
 46. Там Э., Бердж Р. и др. Сверхчувствительная лазерная спектроскопия. - М.: Мир, 1986. -519с.
 47. Теплицкая Т.А., Алексеева Т.А., Вальдман М.М. Атлас квазилинейчатых спектров люминесценции. -М.: Изд-во МГУ, 1978. -174с.
 48. Турро Н. Молекулярная фотохимия. -М.: Мир, 1967. -328с.
 49. Умланд Ф., Янсен Ф., Тириг Д., Вюнш Т. Комплексные соединения в аналитической химии. -М.: Мир, 1975. -531с.
 50. Чернова Р.К., Петрова И.К., Кудрявцева Л.М. Органические реагенты в флуориметрическом анализе неорганических ионов. - Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1982. -140с.
 51. Отто М. Современные методы аналитической химии: учебник для студентов вузов / Пер. с нем. А.В. Гармаш. -М.: Техносфера, 2008. -544с.
 52. Жуков А.Ф., Колосова И.Ф., Кузнецов В.В. и др. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа: учебник для вузов / Под ред. О.М. Петрухина. -М.: Химия, 2001. -496с.
 53. Слепушкин В.В., Стифатов Б.М., Рублинецкая Ю.В., Мощенская Е.Ю. Аналитическая химия. Ч.2. Физико-химические методы анализа: Практикум. – Самара: Самар. гос. тех. ун-т, 2011. – 286 с.
 54. Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. Кн.2. Оптические методы анализа. – М.: Колос, 2005. 288 с.
 55. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. -Л.: Химия, 1986.
 56. Булатов М.И., Маматнабиев Т.Э. Фотометрические методы анализа: учебное пособие. -СПб.: СПбГТИ(ТУ), 2008. -92с.
 57. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии. -Л.: Химия, 1985. -248с.
 58. Вязьмин С.Ю., Рябухин Д.С., Васильев А.В. Электронная спектроскопия органических соединений. -СПб.: СПбЛТА, 2011. -43с.

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 про-

водит 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 аналитических 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.

Владимир Станиславович Сибирцев

**Молекулярная люминометрия
в биотехнологических исследованиях**

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