


**Государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Северо-Осетинская государственная  
медицинская академия»**



**Кафедра химии и физики  
Лекции по аналитической химии для  
студентов 2 к  
Фармацевтического ф-та  
к.х.н.- доцент Туриева А.А.**



# Лекция 36 (обзорная) Люминесцентный метод анализа

Люминесцентный анализ-  
совокупность оптических методов  
анализа ,основанных на явлении  
*люминесценции.*



## ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ-

СВЕЧЕНИЕ ВЕЩЕСТВА, ВОЗНИКАЮЩЕЕ ПРИ ЕГО  
ВОЗБУЖДЕНИИ РАЗЛИЧНЫМИ ИСТОЧНИКАМИ ЭНЕРГИИ

ПЕРВОЕ ОПИСАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КАК СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЕЧЕНИЯ РАСТВОРА ОСТАВИЛ В 1577 Г. ИСПАНСКИЙ ВРАЧ И БОТАНИК НИКОЛАС МОНАРДЕС. В 1852 Г. СТОКС УСТАНОВИЛ СВЯЗЬ МЕЖДУ ИНТЕНСИВНОСТЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И КОНЦЕНТРАЦИЕЙ. ОН ЖЕ ПРЕДЛОЖИЛ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ КАК МЕТОД ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. ПЕРВЫЙ ПРИМЕР ПРАКТИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ AL (III) ПО ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЕГО КОМПЛЕКСОВ С МОРИНОМ ОПУБЛИКОВАЛ ГОППЕЛЬШРЕДЕР В 1867 Г. ОН ЖЕ ВЕЛ И ТЕРМИН «ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ».

СЕГОДНЯ **ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА** ОХВАТЫВАЕТ ШИРОКИЙ КРУГ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗНООБРАЗНЫХ ОБЪЕКТОВ ОТ ПРОСТЫХ ИОНОВ И МОЛЕКУЛ ДО ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.

## Вещества ,обладающие способностью

### люминесцировать

- Вещества могут находиться в газообразном, жидком и твердом состояниях. Простейшими из них являются газы и пары различных элементов ( $O_2$ ,  $I_2$ ,  $Na_2$  и т. д.). Люминесцентными свойствами обладают соли некоторых веществ (редкоземельных элементов, ураниловых соединений), ароматические соединения (нафталин, бензол, антрацен, и производные и др.), растворы ряда красителей, а также многие другие вещества. Особый класс люминесцирующих соединений составляют так называемые кристаллофосфоры — неорганические вещества (например,  $ZnS$ ,  $CaS$  и др.), в кристаллическую решетку которых введены ионы тяжелых металлов (например,  $Ag$ ,  $Cu$ ,  $Mn$  и др.).
- Для того ,чтобы вещество начало люминесцировать, к нему необходимо извне подвести определенное количество энергии. Тогда его частицы переходят в новое, более богатое энергией, возбужденное состояние, в котором они пребывают определенное время, после чего вновь возвращаются в невозбужденное состояние, отдавая при этом часть энергии возбуждения в виде квантов люминесценции.
- Люминофоры (*от латинского  $lumen$  - свет и греческого  $phoros$  - несущий*) твёрдые и жидкие вещества, способные люминесцировать под действием различного рода возбуждений.

# Классификация различных видов люминесценции

По способу возбуждения :

- **Фотолюминесценция** – свечение вещества ,возникающее под воздействием излучения в УФ и видимой области спектра.
- **Хемилюминесценция** – свечение вещества за счет энергии химических реакций.
- **Рентгенолюминесценция** – свечение вещества под воздействием рентгеновских лучей.
- **Катодолюминесценция-**

По длительности послесвечения:

- **Флуоресценция** (спонтанная люминесценция) – свечение, прекращающееся сразу после прекращения действия источника возбуждения. Длительность послесвечения составляет.~  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$  с.
- **Фосфоресценция**–свечение, продолжающееся некоторое время после прекращения действия источника возбуждения. Длительность послесвечения составляет ~  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  с.

# Люминесцентный анализ

## Качественный анализ :

по цвету свечения и особенно по спектрам люминесценции можно установить присутствие того или иного вещества в пробе.

Основное внимание обращают на положение максимумов и ширину полос, наличие и характер их тонкой структуры.

## Количественный анализ

базируется на зависимости между интенсивностью люминесценции  $I_f$  (отн. ед.) и содержанием люминофора в пробе.

$$I_f = k \cdot c$$

где  $I_f$  - интенсивность люминесценции;

$c$  - молярная концентрация, моль/л;

$k$  – коэффициент, зависящий от природы вещества.

Эта зависимость соблюдается лишь в том случае, если содержание определяемого компонента в пробе не превышает некоторого порогового значения:

$10^{-4} \dots 10^{-3}$  М (для жидких проб);

$10^{-4} \dots 10^{-3}$  % (для твердых проб).

# МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВЕЩЕСТВ В ЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

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

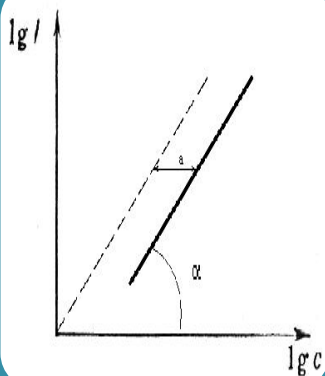
содержание определяемого вещества в стандартном образце должно быть точно известно

химический состав матрицы (основы) стандартного образца должен быть идентичен (или подобен в практически достижимой мере) матрице пробы

стандартный образец и проба должны обладать близкими физическими свойствами



Для расчета содержания вещества в пробе по результатам люминесцентных измерений чаще всего используют:



**Метод градуировочного графика**

$$I_s = k \cdot C_s$$

$$I_x = k \cdot C_x$$

**Метод одного стандарта**

В аналитике из всех видов люминесценции наибольшее распространение получила флуоресценция .

Флуоресцентный анализ – анализ ,основанный на использовании флуоресценции определяемого вещества ,возбуждаемой энергией излучения в УФ и видимой области спектра.



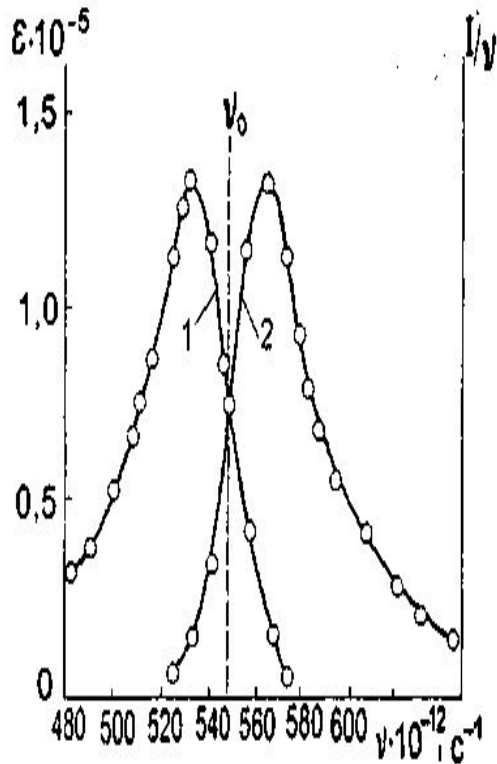
# Характеристики люминесценции (флуоресценции)

Спектры люминесценции- распределение излучаемой веществом энергии по частотам или длинам волн. Подобно спектрам поглощения, интенсивность и форма спектров люминесценции у разных веществ могут быть весьма различными, и они могут существенно изменяться при вариации тех же параметров (концентрации, величины рН раствора и т. д.). Спектры флуоресценции веществ связаны с их спектрами поглощения и подчиняются определенным закономерностям.

Закон Стокса – Ломмеля :

**«СПЕКТР ИЗЛУЧЕНИЯ В ЦЕЛОМ И ЕГО МАКСИМУМ ВСЕГДА СДВИНУТЫ ПО СРАВНЕНИЮ СО СПЕКТРОМ ПОГЛОЩЕНИЯ И ЕГО МАКСИМУМОМ В СТОРОНУ ДЛИННЫХ ВОЛН».**

ЗАКОН СТОКСА □- ЛОММЕЛЯ СТРОГО ВЫПОЛНЯЕТСЯ ДЛЯ ШИРОКОГО КРУГА ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ.



## Правило зеркальной симметрии спектров поглощения и излучения

Это правило характеризует взаимное расположение спектров поглощения и излучения веществ, обладающих люминесценцией, сформулировано следующим образом: «Нормированные (приведенные к одному максимуму) спектры поглощения и излучения, изображенные в функции частот, зеркально симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров». Это правило весьма полезно при выполнении люминесцентного анализа, а также при расшифровке спектров и установлении энергетических уровней исследуемых молекул. У веществ, подчиняющихся правилу зеркальной симметрии, можно по одному из спектров (поглощения или люминесценции) без их измерений установить форму другого спектра и выбрать подходящие для данного вида анализа светофильтры.

**Выход люминесценции** характеризует эффективность трансформации возбуждающего света в свет люминесценции в исследуемом веществе. Различают **энергетический** и **квантовый выходы люминесценции**.

- **Энергетическим выходом люминесценции** называют отношение излучаемой веществом энергии  $E_L$  к поглощенной энергии возбуждения  $E_P$ :

$$B_{ЭЛ} = \frac{E_L}{E_P}$$

- **Квантовым выходом люминесценции** называют отношение числа квантов люминесценции, излученных веществом  $N_L$  к числу поглощенных квантов возбуждающего света  $N_P$ :

$$B_{КВ} = \frac{N_L}{N_P}$$

# Условия проведения флуоресцентного анализа:

Квантовый выход  
 $= \text{const}$

Анализируемый  
раствор сильно  
разбавлен

Отсутствие  
посторонних  
примесей

$t^{\circ} = \text{const}$

Проведение  
люминесцентной реакции

# ТИТРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ

При флуориметрическом титровании за ходом титрования следят по флуоресценции титруемого раствора либо визуально, либо фотометрически. При этом титруемый раствор облучается источником возбуждающего излучения (например, ртутной лампой). При фотометрическом способе наблюдения за ходом титрования вычерчивают кривую титрования в координатах **показание прибора** (ось ординат) - **объем прибавленного титранта** (ось абсцисс). положение КТТ находят экстраполяцией – по пересечению линейных участков кривой титрования в области изменения её наклона.

**Флуоресцентный индикаторы** – такие органические соединения, которые при возбуждении лучами соответствующей длины волны изменяют флуоресценцию в точке эквивалентности или вблизи её.

Применяются в методах кислотно-основного титрования. Кислотно-основные флуоресцентные индикаторы обладают:

- Разной флуоресценцией в ионизированной и в нейтральной формах.
- Определённым интервалом изменения рН перехода цвета флуоресценции.



Эозин (тетра- бромфлуоресцеин)	0,0 - 3,0	Не флуоресцирует - зеленая	1 в водном р-ре *
4-Этоксинакри- дин	1,2 - 3,2	Зеленая - синяя	1 в этаноле
Антраниловая к-та	1,5 - 3,0 4,5 - 6,0	Не флуоресцирует - голубая Голубая - темно-синяя	0,1 в 50%- ном эта- ноле
Салициловая к-та	12,5 - 14,0 2,5 - 4,0	Темно-синяя - не флуоресцирует Не флуоресцирует - темно-синяя	0,5 в водном р-ре *
Эритрозин В (тетранод- флуоресце- ин)	2,5 - 4,0	Не флуоресцирует - светло-зе- леная	0,2 в водном р-ре *
2-Нафтиламин	2,8 - 4,4	Не флуоресцирует - фиолетовая	0,5 в этаноле
Хромотропо- вая к-та	3,1 - 4,4	Не флуоресцирует - голубая	5 в воде
1-Нафтиламин	3,4 - 4,8	Не флуоресцирует - синяя	0,5 в этаноле
Хинин	3,0 - 5,0 9,5 - 10,0	Синяя светло-фиолетовая Светло-фиолетовая - не флуорес- цирует	0,1 в этаноле
Морин	3,1 - 4,4 8,0 - 9,8	Не флуоресцирует - зеленая Зеленая желто-зеленая	0,2 в воде
Флуоресцеин	4,0 - 4,5/6,0	Розово-зеленая - зеленая	1 в водном р-ре *
Дихлорфлуо- ресцеин	4,0 - 6,6	Сине-зеленая - зеленая	1 в этаноле
Акридин	5,2 - 6,6	Зеленая - фиолетовая	0,1 в этаноле
Пиримидин	6,0 - 7,0	Не флуоресцирует - синяя	0,1 в воде

# Применение флуоресцентного анализа

- Флуориметрия – высокочувствительный фармакопейный метод количественного анализа. Его используют при определении очень малых количеств веществ в анализируемом растворе.
- Предел обнаружения определяемых веществ низкий:  $\sim 0,00000001\%$ . Метод позволяет определять малые концентрации – до  $10^{-12}$  -  $10^{-15}$  г/л.
- Аппаратное оформление метода сравнительно несложно.
- Погрешности флуориметрического анализа составляют около 2-5%, в отдельных случаях 10%.

# Область применения люминесцентного анализа очень обширна :

- С/х – средство отбора портящихся фруктов и овощей.
- Фарм. промышленности для установления чистоты ЛС.
- Диагностика и лечение кожных заболеваний.
- Отличие бактерий др. от др. по цвету люминесценции.

*Спасибо за  
внимание!*

Sense of chemistry  
twitter studio

