

Люминесценция, ее виды

Люминесценция – излучение, представляющее собой избыток над тепловым излучением тела, если его длительность после прекращения внешнего воздействия значительно превышает период световых колебаний(от 10⁻¹⁰с до нескольких часов).

Люминесценцию наблюдают в видимой, УФ- и ИК-областях спектра.



Виды люминесценции:

по виду возбуждения различают :

-
- Фотолюминесценция (возбуждение светом)
 - Радиолюминесценция (возбуждение проникающей радиацией)
 - Триболюминесценция (возбуждения при механических воздействиях)
 - Электролюминесценция (возбуждение электрическим полем)
 - Хемилюминесценция (возбуждение при химических реакциях),
 - Биолюминесценция
 - Лиолюминесценция (возбуждение при растворении кристаллов) и т.д.
-



Виды люминесценции:

по длительности свечения различают:

- флуоресценцию (быстрозатухающая люминесценция)
- Фосфоресценцию (длительная люминесценция)

по механизму элементарных процессов:

- Резонансная
 - Метастабильная (вынужденная)
 - Спонтанная
 - Рекомбинационная
-



- **Люминесценцию характеризуют спектрами поглощения и люминесценции, энергетическим выходом, квантовым выходом.**
- **Выход люминесценции V** - величина выхода люминесценции V характеризует эффективность трансформации возбуждающего света в свет люминесценции.
- **Энергетическим выходом люминесценции $V_{\text{э}}$** называют отношение излучаемой веществом энергии $E_{\text{в}}$ к поглощенной энергии возбуждения $E_{\text{п}}$, за счет которой возникает люминесценция

- **Квантовый выход люминесценции V_k** — это отношение числа квантов люминесценции, излученных веществом, к числу поглощенных квантов возбуждающего света



Выход люминесценции зависит от таких факторов:

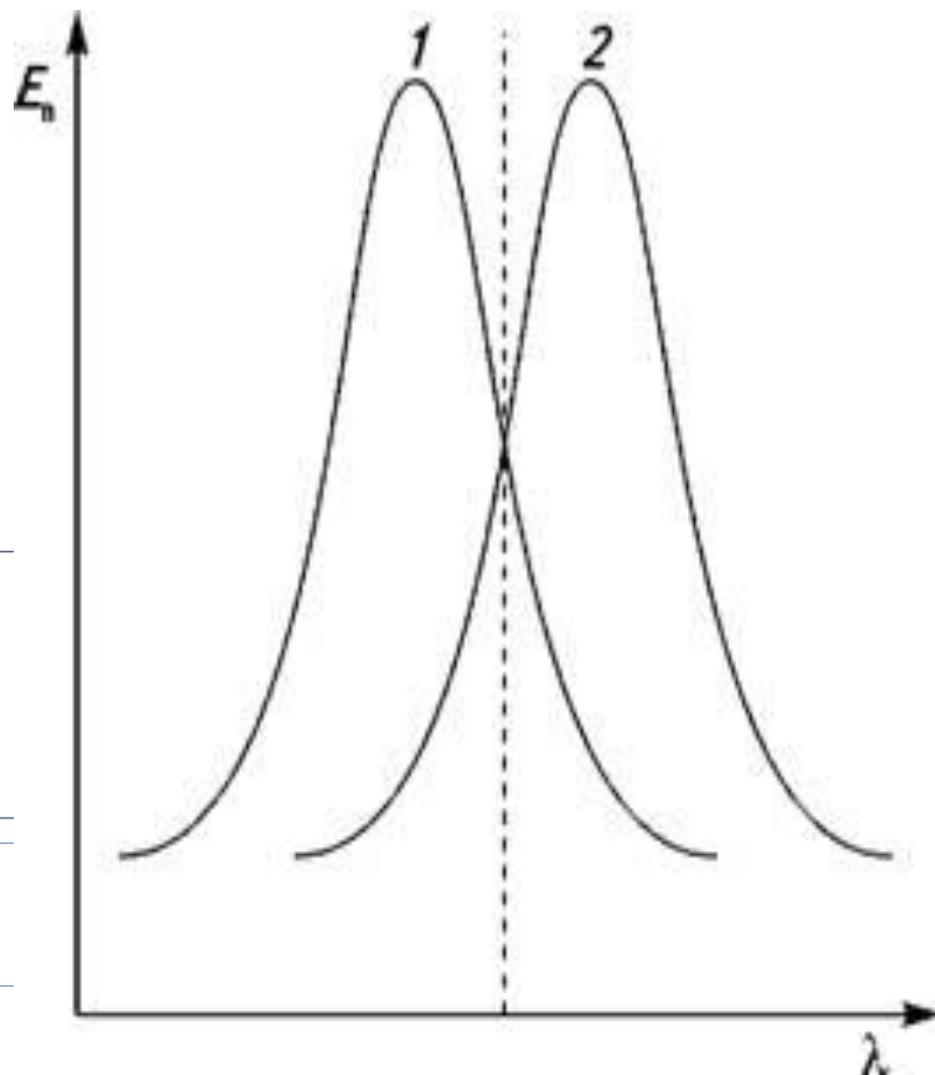
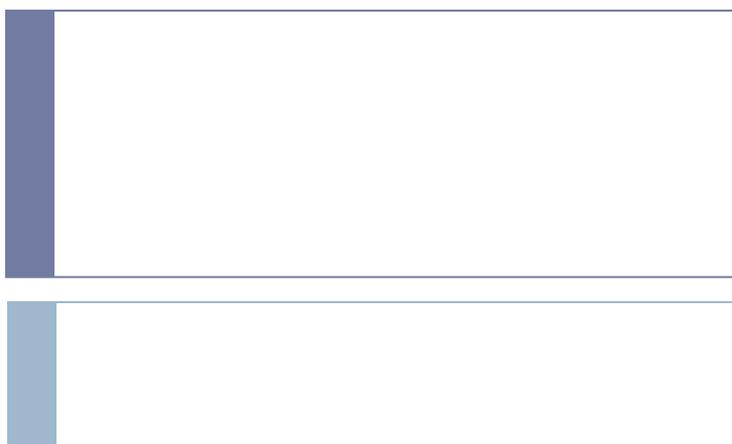
- длины волны возбуждающего света
- ▣- концентрации люминесцирующего вещества
- ▣- посторонних примесей
- ▣- температуры

Уменьшение величины выхода люминесценции под влиянием этих факторов получило название **тушения (гашения) люминесценции.**

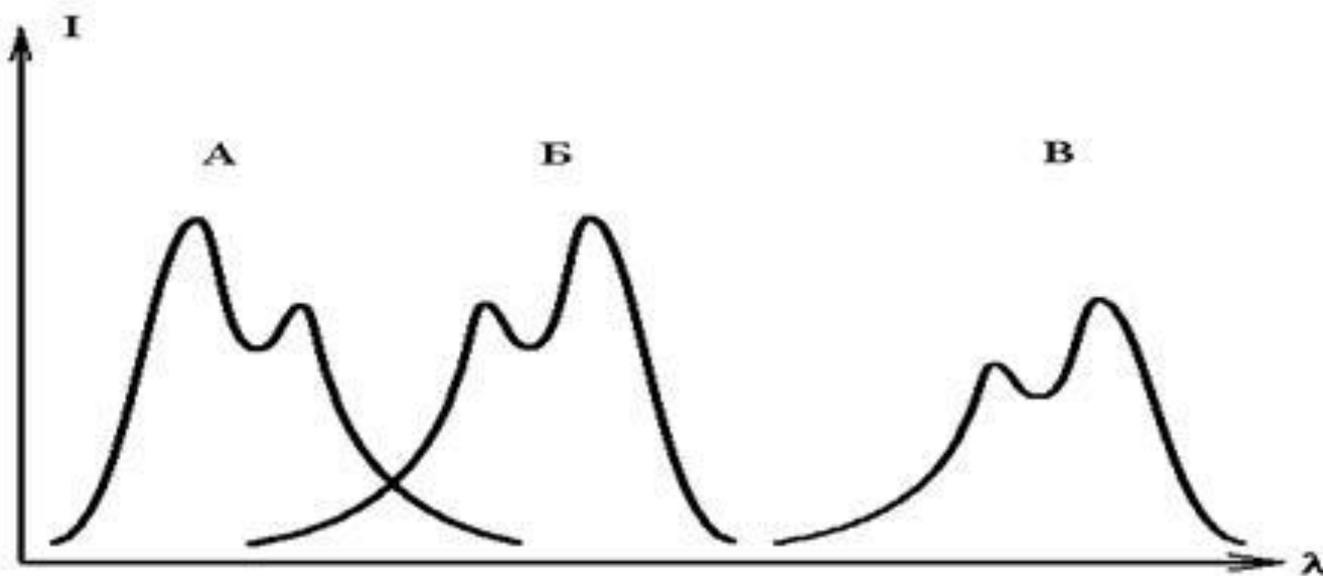
Прежде всего нужно учитывать влияние концентрации люминесцирующего вещества C , так как при больших концентрациях может наступить явление **концентрационного тушения.**

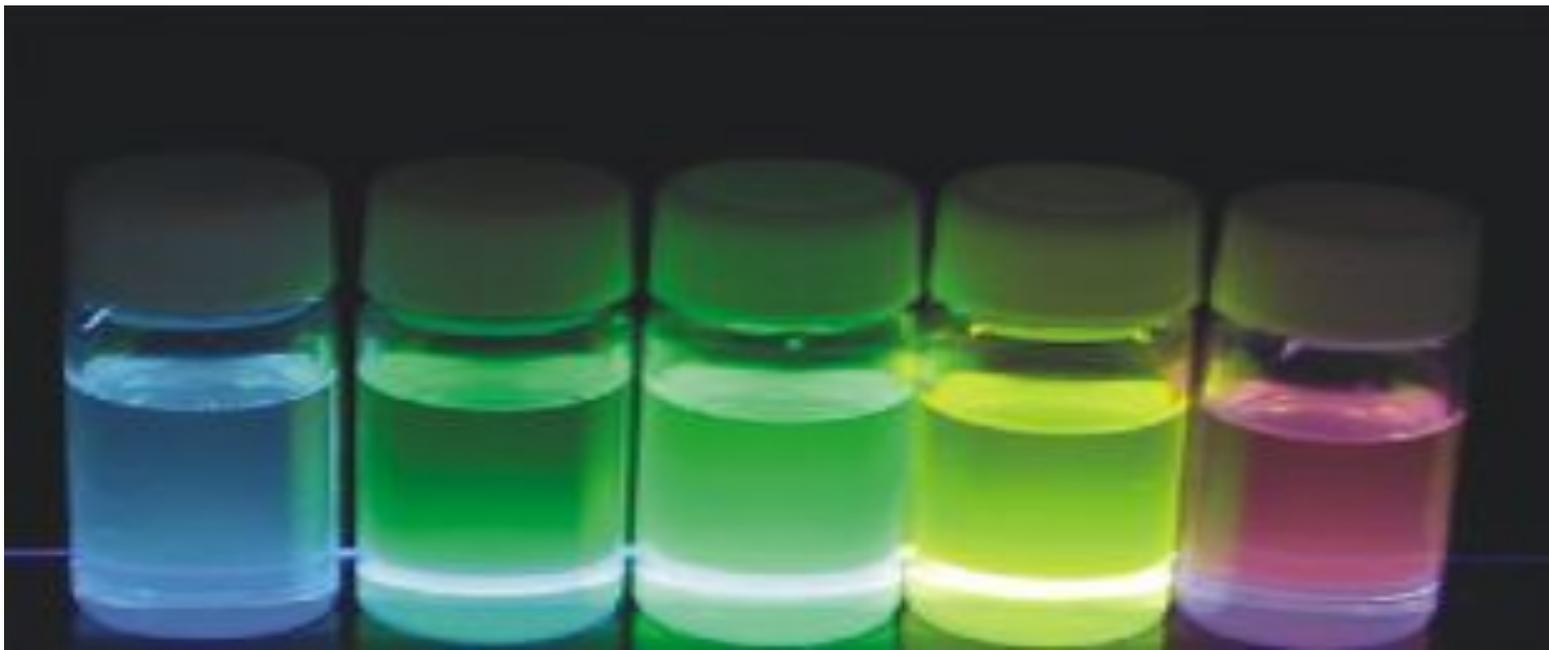
- Спектры поглощения и люминесценции у многих веществ тесно связаны между собой и подчиняются ряду важных закономерностей или правил.
- Согласно **правилу Стокса — Ломмеля** спектр излучения в целом и его максимум по сравнению со спектром поглощения и его максимумом всегда сдвинут в сторону длинных волн.
- Установлено зеркальное подобие спектров поглощения и излучения для обширного ряда веществ — **правило Левшина**: спектры поглощения и излучения, изображенные в функции, оказываются зеркально-симметричными относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров.

□ **Спектры
поглощения и
флуоресценции
пересекаются**



Спектры поглощения (А), флуоресценции (Б) и фосфоресценции (В) одного соединения





Флуориметрия

(ОФС 42-0045-07)

Флуориметрия

(или флуоресцентная спектрофотометрия)

- основана на измерении флуоресценции - интенсивности флуоресцентного света, излучаемого испытуемым образцом в возбужденном состоянии, которое было достигнуто поглощением лучевой энергии в результате воздействия УФ, видимого или других видов электромагнитного излучения.**



Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия)

- **Флуоресценция органических соединений охватывает спектральную область от 200 до 830 нм.**
- **Как правило, длина волны флуоресцентного излучения больше длины волны возбуждения на 20-30 нм и более из-за потери части энергии в возбуждённом состоянии (Стоксов сдвиг).**



Флуориметрия

(или флуоресцентная спектрофотометрия)

- ❑ **Поглощение и испускание излучения** осуществляется благодаря переходу электронов между различными энергетическими уровнями или молекулярными орбиталями. Испускание света происходит через определённый промежуток времени после его поглощения; этот промежуток времени представляет собой длительность пребывания молекулы в возбуждённом состоянии. Для большинства флуоресцирующих веществ время затухания флуоресценции составляет обычно 10^{-9} – 10^{-8} с. Короткое время жизни флуоресценции отличает этот тип люминесценции от фосфоресценции, которая представляет собой долгоживущее свечение, имеющее время жизни от 10^{-3} с до нескольких мин.

Флуориметрия

(или флуоресцентная спектрофотометрия)

- ❑ **Метод флуориметрии в 100 раз чувствительнее абсорбционной спектрофотометрии, но флуоресцентными свойствами обладает только ограниченный круг соединений: ароматические, особенно с конденсированными структурами, гетероциклические и карбонильные соединения. Из фармацевтических субстанций определению методом флуориметрии подлежат аминокислоты (фенилаланин, триптофан, тирозин), алкалоиды (стрихнин, резерпин, хинин), витамины (фолиевая кислота, рибофлавин, ретинола ацетат), стероидные гормоны**

$$I = I_0 * 2,3 * \epsilon * C * \beta * \varphi, \text{ где}$$

Интенсивность флуоресценции измеряется в условных единицах, пропорциональных отклику детектора и обозначается символом I.

- I – общая интенсивность флуоресценции, квант/с;**
- I₀ – интенсивность возбуждающего света, квант/с;**
- C – молярная концентрация раствора, моль/л;**
- ε – молярный коэффициент поглощения;**
- β – толщина флуориметрического слоя, см;**
- φ – квантовый выход флуоресценции.**



□ Флуоресцентный спектр испускания

представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны (в нм) или частоты (в см⁻¹) при заданной длине волны возбуждения.

□ Флуоресцентный спектр возбуждения

представляет собой зависимость интенсивности излучения в максимуме испускания флуорофора от длины волны или частоты возбуждающего света.

При этом спектр возбуждения обычно совпадает со спектром поглощения, так же как и интенсивность флуоресценции пропорциональна светопоглощению. Комбинирование спектров испускания, полученных при различных длинах волн возбуждения, даёт трёхмерную карту

Интенсивность флуоресценции зависит от

- - температуры**
- - растворителя**
- - величины рН испытуемого раствора**
- - присутствия в растворе посторонних частиц**
- - концентрации кислорода в испытуемом растворе**
- - постороннего освещения**



Влияние различных факторов:

- ▣ **Эффективность флуоресценции обратно пропорциональна температуре. Для некоторых веществ эффективность флуоресценции может снижаться на 12 % при повышении температуры на 1 оС. В таких случаях требуется термостатирование образцов.**
- ▣ **Интенсивность и спектральное распределение флуоресценции зависит от растворителя. Многие соединения, флуоресцирующие в органических растворителях, фактически не флуоресцируют в воде.**

Влияние различных факторов:

- Перед измерением флуоресценции из испытуемого раствора фильтрованием или центрифугированием должны быть удалены твёрдые частицы, так как они могут поглощать некоторую долю возбуждающей энергии, дезактивировать возбужденные молекулы или завышать измеряемую величину из-за многократных отражений в кювете с образцом.**
- Интенсивность флуоресценции обратно пропорциональна концентрации кислорода, являющегося сильным гасителем флуоресценции. По степени тушения флуоресценции можно определять концентрацию кислорода в окружающей среде. Для удаления кислорода через испытуемый образец пропускают азот или гелий.**

Влияние различных факторов:

- Большинство флуоресцирующих веществ чувствительно к свету. Во время облучения во флуориметре они могут подвергаться фоторазложению с образованием других флуоресцирующих продуктов. Такие эффекты обнаруживаются при наблюдении за откликом детектора во времени и могут быть снижены путём приглушения света с помощью светофильтров или экранов.**
-



Измерение флуоресценции

Флуоресценцию определяют в растворах с концентрацией от 10^{-5} М и менее, в диапазоне, для которого наблюдается прямая зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации.

При более высоких концентрациях всё более значительная часть поступающего света поглощается образцом вблизи поверхности кюветы, и линейная зависимость величины сигнала от концентрации определяемого вещества нарушается.

Все замеры интенсивности флуоресценции должны быть скорректированы с растворителем.

Количественное определение

- Рассчитывают концентрацию вещества в испытуемом растворе (C_x) по формуле:

$$C_x = \frac{I_x \times C_{ст}}{I_{ст}},$$

- ▶ где:
- ▶ $C_{ст}$ - концентрация вещества в стандартном растворе;
- ▶ I_x - интенсивность света, испускаемого испытуемым раствором;
- ▶ $I_{ст}$ - интенсивность света, испускаемого стандартным раствором.



Приборы для проведения флуориметрического анализа

Для проведения флуориметрического анализа используют приборы двух типов:

фльтрационный флуориметр и спектрофлуориметр.

Фльтрационный флуориметр состоит из источника излучения, первичного фильтра длин волн, камеры для образца, вторичного фильтра длин волн и системы детектирования флуоресценции. Как правило, детектор помещен под углом 90° к возбуждающему световому потоку. Однако детектор все-таки получает часть возбуждающего излучения в результате рассеивающих свойств самого раствора, а также из-за присутствия в растворе твердых частиц.

Приборы для проведения флуориметрического анализа

Для устранения этого остаточного рассеяния используются спектральные фильтры. Первичный фильтр отбирает коротковолновое излучение, способное к возбуждению испытуемых образцов, вторичный фильтр пропускает флуоресценцию в длинноволновой области, но блокирует рассеянное возбуждение. Детекторы флуориметров преобразуют оптический сигнал в электрический с помощью фотоумножителей разных типов. Каждый тип детектора имеет специальные характеристики: спектральная область максимальной чувствительности, степень усиления, соотношение сигнал/шум.

Приборы для проведения флуориметрического анализа

Спектрофлуориметры отличаются от ***фльтрационных флуориметров*** тем, что вместо спектральных фильтров в них используются монохроматоры типа призмы или решетки.

Эти приборы более предпочтительны для аналитических целей.

В спектрофлуориметрах монохроматоры снабжены щелями. Чем уже щель, тем выше разрешение и спектральная чистота, но меньше чувствительность. Выбор размера щели определяется разделением между длинами волн возбуждающего и испускаемого излучения и необходимым уровнем чувствительности.

Приборы для проведения флуориметрического анализа

В качестве источников возбуждающего излучения в флуориметрах используют:

- ртутные лампы низкого давления, предоставляющие большое количество длин волн возбуждения, но не являющиеся источником излучения равномерного спектра;**
- ксеноновые газоразрядные лампы, обеспечивающие высокоинтенсивное почти равномерное излучение в широком диапазоне спектра (300 – 800 нм) и достаточно интенсивное в коротковолновой области вплоть до 200 нм;**



Приборы для проведения флуориметрического анализа

- лазеры, излучающие свет высокой интенсивности в очень узком интервале длин волн (не более 0,01 нм) и позволяющие благодаря этому не использовать монохроматоры или первичные светофильтры;
- светодиоды и светодиодные матрицы, излучающие свет в определённых диапазонах длин волн.



Приборы для проведения флуориметрического анализа

Для размещения анализируемых проб в флуориметрах используют, как правило, прямоугольные кварцевые кюветы, отполированные со всех 4 вертикальных сторон, иногда – цилиндрические кюветы или пробирки.

Обычно объем испытуемых образцов составляет 2 – 3 мл, но к некоторым приборам прилагаются кюветы вместимостью от 100 до 300 мкл или капиллярные держатели для еще меньшего объема.



Примеры флуориметров



- **Спектрофлуориметр CM 2203 предназначен для анализа ультрафиолетовой и видимой области спектра,**
- **Выполняет функции четырёх приборов:**
- **Спектрофлуориметра**
- **Хемилюминометра**
- **Спектрофотометра**
- **Спектрофосфориметра**
- **Качественный и количественный анализ растворов и биологических объектов.**



-
- ▣ **Флуориметр обеспечивает регистрацию спектров возбуждения и флуоресценции, автоматический поиск спектральных максимумов, спектрофлуориметр СМ 2203 позволяет делать выбор уровня усиления сигнала, автоматические измерения с усреднением данных, операции со спектрами, калибровки, количественные измерения, сохранение, распечатку и воспроизведение методик и результатов анализа.**
-
- 

Применение флуориметрии в фармацевтическом анализе

- **Идентификация.** Спектры флуоресценции специфичны для определяемых веществ. Поэтому флуоресценция может быть применена для их идентификации.
 - **Количественный анализ.** При количественных определениях интенсивность флуоресценции раствора испытуемого образца сравнивают с интенсивностью флуоресценции раствора стандартного образца флуоресцирующего вещества известной концентрации, измеренной в идентичных условиях на одном и том же приборе.
-



Применение флуориметрии в фармацевтическом анализе

- ▣ В случае линейной зависимости интенсивности испускаемого света от концентрации вещества рассчитывают последнюю в испытуемом растворе (C) по формуле:

- ▶
$$C = \frac{I * C_0}{I_0},$$

где C_0 – концентрация вещества в стандартном растворе;

- ▶ I – интенсивность света, испускаемого испытуемым раствором;
- ▶ I_0 – интенсивность света, испускаемого стандартным раствором.



Применение флуориметрии в фармацевтическом анализе

Если интенсивность флуоресценции не прямо пропорциональна концентрации раствора, измерение может быть произведено с использованием калибровочной кривой.

В некоторых случаях измерение флуоресценции испытуемого образца может быть выполнено относительно независимого стандарта (например, флуоресцентного стекла или раствора другого флуоресцентного вещества). В качестве стандартов могут быть использованы: раствор известной концентрации хинина в 0,05 М растворе серной кислоты или раствор флуоресцеина в 0,1 М растворе натрия гидроксида. В таких случаях концентрацию испытуемого образца следует определять с использованием предварительно полученной в тех же

**□ Спасибо за
внимание**

