

ТЕМА 4. ЕЛЕКТРОННА СПЕКТРОСКОПІЯ. УФ-СПЕКТРОСКОПІЯ. ЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ, ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії електронної спектроскопії, УФ-спектроскопії, люмінесцентного, флуоресцентного аналізу, навчитися використовувати фотоколориметричний метод на практиці.

План

1. Електронна спектроскопія.
2. УФ-спектроскопія.
3. Люмінесцентний, флуоресцентний аналізи.



Основні терміни та поняття: електронна спектроскопія, УФ-спектроскопія, люмінесценція, флуоресценція.

1. Електронна спектроскопія



Електронна спектроскопія (electron spectroscopy) ґрунтується на електронних переходах, тобто на переходах між електронними станами частинок, є дуже чутливим і зручним методом для визначення спектрів поглинання, пропускання або відбиття, вивчення кінетики реакції, що супроводжується спектральними змінами.

У випадку, коли орієнтація частинки (атома, молекули) у просторі й відносно положення ядер є незмінними, атомна система представляє собою систему електронів, які знаходяться в постійному полі позитивних зарядів ядер. Така система, відповідно до постулату Бора, має певний набір енергетичних станів. Вони називаються *стаціонарними електронними станами*, а переходи між ними – *електронними переходами*. Кожному з електронних станів відповідає певний розподіл електронної щільності (хвильова функція). У кожному електронному стані частинка характеризується певним набором фізичних і хімічних властивостей.

Дія на речовину електромагнітного випромінювання оптичного діапазону (120-1100 нм) може призвести до переходу валентних електронів на більш віддалені від ядра орбіталі або їх повернення до основного стану. Процеси першого типу супроводжуються поглинанням енергії. Методи, які вивчають такі переходи, називаються *абсорбційними* (УФ-спектроскопія). Процеси другого типу супроводжуються виділенням енергії. Відповідні методи називаються *емісійними* (люмінесцентна спектроскопія). У залежності від природи частинок, що взаємодіють із випромінюванням виділяють *методи атомної та молекулярної спектроскопії*. У «чистому» вигляді електронні

переходи спостерігаються досить рідко. Спектральні сигнали відповідають електронно-коливальним або електронно-коливально-обертальним переходам.

Частота поглинутого чи виділеного випромінювання представляє собою коливання електронної хмари частинки (атома, молекули) відносно ядерного кістяка, іншими словами частоту коливання її перемінного дипольного моменту: $\nu_e = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m_e}}$, де m_e – маса електрону; K – силова стала, яка характеризує силу взаємодії електронів з ядром.

Інтенсивність сигналів визначається енергією, що поглинається чи випромінюється при коливанні електронної хмари або числом поглинутих (випромінених) квантів енергії за одиницю часу. Інтенсивність залежить від наповненості електронних рівнів і ймовірностей переходів між ними.

Поява того чи іншого електронного переходу й відповідного йому спектрального сигналу залежить від виконання ряду умов, які називають правилом відбору чи заборони, і факторів, які можуть зняти наявні заборони на електронні переходи.

Електронна спектроскопія дозволяє з високою точністю визначати наявність у молекулах певних структурних груп (які називають хромофорними), для яких добре вивчені характеристичні електронні спектри. Метод абсорбційної електронної спектроскопії є дуже чутливим і дозволяє отримувати чіткі смуги поглинання навіть при невеликій концентрації досліджуваної речовини. Через це він частіше використовується для якісного аналізу будови молекул, хоча може бути використаний і для кількісного аналізу за коефіцієнтом екстинкції ϵ (зазвичай – у розрахунку на моль речовини).

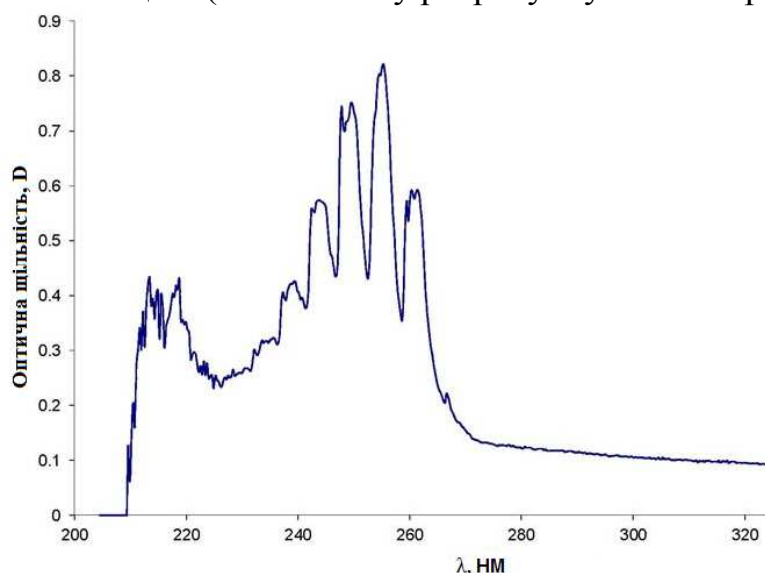


Рис. 11. Електронний спектр поглинання бензену.

Завдяки високій чутливості електронної спектроскопії реєстрація спектрів при одноразовому проходженні світла через кювету отримала досить велике поширення як один з головних методів експрес-аналізу проб речовин на хімічному виробництві. Для більш точного аналізу будови речовини дані електронної спектроскопії повинні бути доповнені результатами коливальної спектроскопії.

2. УФ-спектроскопія

З точки зору енергії переходів у молекулі принципової різниці між УФ та видимою ділянками спектру немає. Відокремлення видимої частини спектру в самостійну ділянку обумовлено суб'єктивними причинами – межами сприйняття електромагнітного випромінювання людським оком.

УФ-спектроскопія (англ. molecular electron spectroscopy або UV-spectroscopy) відноситься до молекулярної абсорбційної електронної спектроскопії. Також молекулярну абсорбційну спектроскопію в УФ і видимій ділянках спектра називають *спектрофотометрією* або *фотометрією*. Це один із розділів оптичної спектроскопії, що базується на отриманні та дослідженні спектрів поглинання в УФ-ділянці спектра (діапазон довжин хвиль $\Delta\lambda$: 190/400 нм; $\lambda < 190$ нм — вакуумна УФ-ділянка малопридатна для роботи через сильне поглинання хвиль повітрям). Поглинання УФ-випромінювання зумовлене електронними переходами в атомах з основного енергетичного стану в більш високий (збуджений); у молекулах — зі зв'язувальної орбіталі (основний стан) на розпушувальну орбіталь (збуджений стан).

Застосування електронної спектроскопії в УФ і видимій ділянках спектра для аналізу функціональних груп обмежене тим, що відповідні спектри мають невелике число смуг поглинання. Їх перевага в порівнянні зі спектроскопією в ІЧ-ділянці спектра полягає в більшій чутливості, що дозволяє досліджувати дуже розбавлені розчини. Наявні недорогі, прості в обігу сучасні записувальні спектрофотометри (СФ) дають можливість швидко виявляти присутність сильних хромофорних груп у зразку.

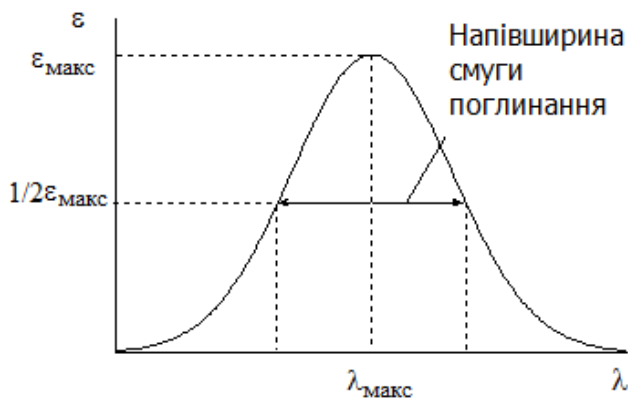
УФ-спектри, що містять дві або більшу кількість інтенсивних смуг поглинання, дозволяють надійно довести ідентичність зразка, особливо якщо є спектр еталонного зразка. Вивчення молекулярних спектрів — це найважливіший спосіб кількісного хімічного аналізу. Тут досить виміряти аналітичний сигнал на заздалегідь обраній довжині хвилі. Спектри потрібні для вирішення більш складних завдань:

– за спектром індивідуальної речовини вибирають ту довжину хвилі, на якій надалі, в ході кількісного аналізу, вимірюватимуть аналітичний сигнал цієї речовини. У молекулярно-абсорбційному (спектрофотометричному) аналізі аналітичний сигнал зазвичай вимірюють на довжині хвилі, що відповідає максимуму на спектральній кривій;

– зіставляючи спектри передбачуваних компонентів проби, з'ясовують можливість визначення одних речовин у присутності інших. Якщо спектри компонентів проби накладаються один на одного, результати аналізу суміші будуть завищеними.

Слід відзначити, що молекулярні абсорбційні спектри в УФ і видимій ділянці складаються не з окремих чітко визначених ліній, а з широких смуг. Енергія електромагнітного випромінювання УФ- та видимого діапазону відповідає енергії збудження валентних електронів.

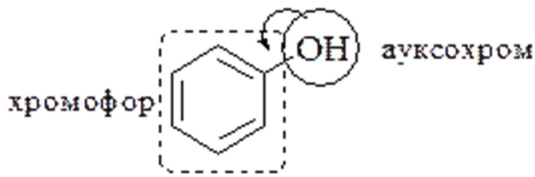
Положення максимуму смуги поглинання ($I_{\text{макс}}$) відповідає довжині хвилі такого електромагнітного випромінювання, енергія якого дорівнює енергії



необхідної для електронного переходу. Для характеристики ширини смуги поглинання використовується величина *півширини смуги поглинання*. Інтенсивність поглинання, яку можна охарактеризувати за допомогою молярного коефіцієнта поглинання, залежить від імовірності даного електронного переходу. Поглинання з

$\epsilon_{\text{макс}} > 10^4$ вважається інтенсивним (максимально можливе значення ϵ складає приблизно 2×10^5), поглинання з $\epsilon_{\text{макс}} < 10^3$ вважається мало інтенсивним. Об'єктами дослідження в спектрофотометрії найчастіше є органічні речовини.

Групи, які обумовлюють появу смуг поглинання в молекулярних спектрах, називаються *хромофорами*. Атоми або групи атомів, які самі по собі не зумовлюють появу смуг поглинання, але впливають на характер поглинання хромофорів, називаються *ауксохромами*.



Ауксохром мають неподілені електронні пари, які знаходяться в сполученні з р-електронною системою хромофора, і можуть зміщувати смугу поглинання хромофора в більш

довгохвильову ділянку (*батохромний зсув*) або в більш короткохвильову ділянку (*гіпохромний зсув*), збільшувати її інтенсивність (*гіперхромний ефект*) або зменшувати її (*гіпохромний ефект*).

Вимірювання аналітичного сигналу

Об'єктами дослідження в фотометрії зазвичай є розчини. Принцип вимірювання аналітичного сигналу полягає в порівнянні інтенсивності двох світлових потоків, один з яких проходить через досліджуваний розчин, а другий — через розчин порівняння.

Принципова схема однопроменевого приладу наведена на рис. 12.

Джерела випромінювання, використовувані в фотометрії, дають безперервні спектри. Залежно від того, яким чином відбувається виділення з безперервного спектру випускання джерела потрібного спектрального інтервалу, абсорбційні спектрометри можна поділити на 2 класи: *фотоелектроколориметри (ФЕК)* і *спектрофотометри (СФ)*.

У ФЕКах для виділення потрібного інтервалу довжин хвиль застосовують *набір світлофільтрів*. Величина півширини пропускання використовуваних світлофільтрів становить у середньому 25-45 нм. Нижня межа робочих довжин хвиль становить для більшості моделей ФЕКів приблизно 315 нм.

ФЕКи використовують зазвичай для проведення серійних вимірів концентрації речовин, що поглинають у видимій або довгохвильовій УФ-ділянці.



Рис. 12. Принципова схема однопроменевого приладу для вимірювання поглинання світла в УФ та видимій областях спектру.



У СФ для виділення із спектру випромінювання джерела випромінювання з потрібною довжиною хвилі застосовують *монохроматори*: дифракційні ґрати або призми. Монохроматор дозволяє отримати електромагнітне випромінювання з набагато вищим ступенем монохроматичності, ніж світлофільтр. СФ мають більш складну будову, ніж ФЕК, і використовуються для отримання спектрів поглинання речовин, визначення концентрації речовин, що поглинають при довжинах хвиль менше 300 нм, мають вузькі смуги поглинання і т.д.

Розчини речовин, поглинання яких вимірюється, поміщають у спеціальні посудини прямокутної або, рідше, циліндричної форми – *кювети*. Кювета, що містить розчин досліджуваної речовини, називається *робочою*, а кювета, що містить розчин порівняння – *кюветою порівняння*.

Кювети, які використовують для роботи у видимій ділянці спектра, можуть бути зроблені зі скла. Для роботи в ділянці довжини хвиль менше ніж 325 нм необхідні кварцеві кювети. Матеріалом для виготовлення кювет є також органічні полімери. Як правило, кожен прилад для фотометричних вимірювань забезпечений набором кювет (товщиною від 0,1 до 5 см). Найчастіше в роботі, особливо для СФ, використовуються кювети товщиною 1 см. Крім звичайних кювет, існують кювети спеціальної конструкції, наприклад, термостатовані, проточні.

В однопроменевих приладах у потік випромінювання спочатку поміщають кювету порівняння і налаштовують за нею прилад на нуль оптичної щільності. Потім у потік випромінювання поміщають робочу кювету. При зміні налаштувань приладу дослід слід повторити. В двопроменевих спектрометрах потік, що виходить з монохроматора, за допомогою дзеркала спеціальної

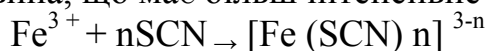
конструкції розщеплюється на два однакових потоки: один спрямовується на кювету порівняння, а другий – на робочу кювету. Потоки, що виходять з кювет, спрямовується на один і той же детектор. Двопроменеві прилади зручні при автоматичній реєстрації спектрів поглинання, оскільки їх не потрібно повторно налаштовувати при зміні довжини хвилі.

Практичне застосування та основні прийоми фотометричного аналізу

Спектрофотометрія є одним з найбільш застосовуваних і розроблених інструментальних методів аналізу. До її переваг відносять досить високу чутливість (для речовин, що добре поглинають, вона становить приблизно 10^{-6} – 10^{-7} моль/л), універсальність, просте апаратне оформлення, можливість автоматизації аналізу і т.д. Нижня межа визначуваних концентрацій зазвичай характеризується значеннями порядку 0,1-1,0 мкг/мл. Відносна похибка результату аналізу (при традиційному способі фотометричних вимірювань) становить 2-5%, а в деяких випадках може бути знижена до 1%.

Пряма фотометрія. Використовується для визначення речовин, що мають досить інтенсивне власне поглинання. У прямій фотометрії вимірюють оптичну щільність розчину речовини при довжині хвилі, що відповідає максимальному поглинанню, і далі одним із способів визначають концентрацію речовини в цьому розчині. Пряма фотометрія зазвичай використовується для аналізу матриць відносно простого складу, в яких відсутні речовини, що володіють таким же характером поглинання, що й речовина, яка визначається, або компоненти, що заважають можна легко відокремити в процесі пробопідготовки.

Значно частіше в фотометрії, особливо у разі визначення неорганічних речовин, що мають незначне власне поглинання, вимірюванню оптичної щільності передують проведення хімічної реакції, в якій утворюється нова речовина, що має більш інтенсивне поглинання. Наприклад:



В основі отримання забарвлених продуктів можуть лежати реакції комплексоутворення, окислювально-відновні реакції, різні реакції за участю функціональних груп органічних сполук і т.д.

До фотометричних реакцій ставляться такі вимоги: чуттєвість, контрастність, надійність, вибірковість.

До недоліків фотометричних методів слід віднести невисоку селективність багатьох реакцій, які використовують у фотометрії, необхідність попереднього розведення проби. Часто потрібно попередньо відокремити компоненти, що заважають визначенню. Це збільшує час проведення аналізу та зменшує точність.

Фотометричний аналіз широко застосовують у контрольно-аналітичних лабораторіях на підприємствах хімічної, харчової, нафтопереробної промисловості, в криміналістиці, в сільському господарстві, в клінічному аналізі та наукових дослідженнях, в моніторингу стану навколишнього середовища.

3. Люмінесцентний, флуоресцентний аналізи



За певних умов частина поглиненої речовиною енергії може виділитися у вигляді вторинного випромінювання. Це явище називають **люмінесценцією**. Кванти вторинного випромінювання, що випускається атомами, які люмінесцюються, молекулами або іонами, мають меншу енергію, ніж кванти, які ті ж частинки поглинали при своєму збудженні.

Види люмінесценції класифікують за способом збудження. Найбільш відомі з них такі:

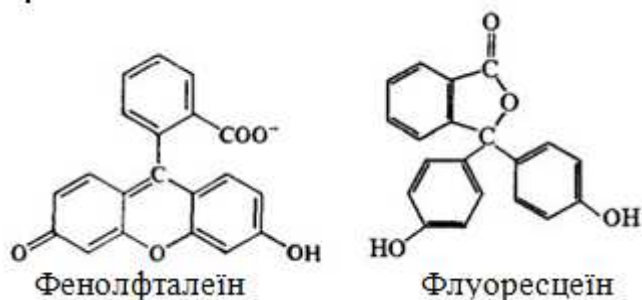
1. *Катодолюмінесценція* (свічення під дією потоку електронів, наприклад, світіння екрана кінескопа або рідкокристалічного екрана, світіння ламп денного світла).

2. *Хемілюмінесценція* (свічення за рахунок хімічної реакції, наприклад, у світлячків).

3. *Фотолюмінесценція*. У цьому випадку проба світиться за рахунок опромінення невидимим УФ-світлом від зовнішнього джерела. Саме цей вид люмінесценції зазвичай застосовують у хімічному аналізі.

Види люмінесценції класифікують і за часом життя збудженого стану. В аналізі переважно використовують *флуоресценцію* – у цьому випадку збуджений стан молекули нестійкий, і вторинне випромінювання проби в УФ- або видимій ділянці спектра припиняється відразу після видалення джерела порушення. Іноді використовують і *фосфоресценцію* – у цьому випадку світіння речовини триває протягом декількох секунд, хвилин або навіть годин після припинення збудження.

За спектрами люмінесценції впізнають особливо небезпечні органічні речовини в об'єктах довкілля (на рівні $10^{-6}\%$ і нижче), токсиканти (діоксини, нітрозаміни, пестициди), біологічно активні речовини (вітаміни, гормони, антибіотики). Люмінесцентні детектори застосовують у хроматографічному аналізі. Люмінесцентний аналіз застосовують у криміналістичній експертизі та для діагностики захворювань.



Давати люмінесценцію можуть далеко не всі молекули, які поглинають світло. Велика частина органічних речовин, здатних на це, є ароматичними сполуками, що мають жорстку структуру молекули. Зокрема, фенолфталеїн і флуоресцеїн мають схожу будову молекул, але у

фенолфталеїну всі три бензольних кільця можуть вільно коливатися один щодо одного, і ця сполука не дає люмінесценцію. У флуоресцеїну ж можливість внутрішньо молекулярних коливань набагато менша (кисневий місток жорстко

фіксує два бензольних кільця), і це з'єднання інтенсивно світиться у видимій ділянці при опроміненні його розчину УФ-світлом.

Апаратура для люмінесцентного аналізу

Для ідентифікації індивідуальних сполук та вибору оптимальних умов вимірювання їх аналітичного сигналу треба вивчити спектри збудження й спектри випромінювання люмінесценції. З цією метою використовують різні

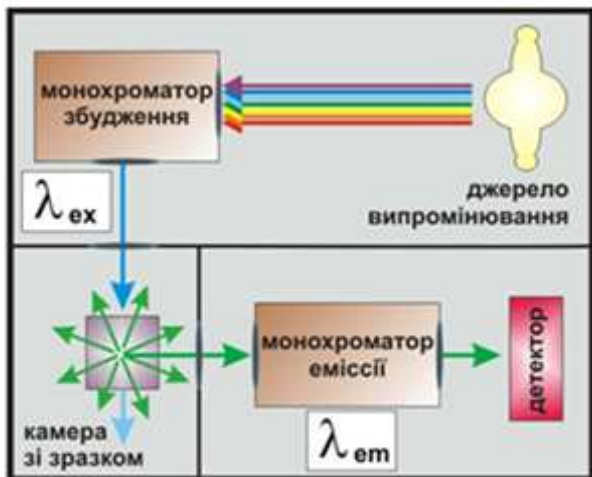


Рис. 13. Спрощена схема спектрофлуориметру

спектрофлуориметри (рис. 13). Це більш складні й дорожчі прилади, ніж СФ.

Як джерело збудження найчастіше використовують потужні УФ-лампи (ртутні, ксенонові та ін.), а також лазери. Первинні та вторинні монохроматори включають дифракційні решітки або призми, виготовлені з кварцу, а також щілини регульованої ширини. Первинний монохроматор потрібен, щоб задати оптимальні умови збудження для сполуки (X), яка визначається, а також затримати світло лампи з тією ж довжиною хвилі, що буде випускати X

при люмінесценції. Вторинний монохроматор потрібен, для того, щоб створити оптимальні умови реєстрації аналітичного сигналу X і не допустити потрапляння збуджувального світла на фотоприймач. Без цих монохроматорів фоновий фотопотік виявився б настільки сильним, що зафіксувати аналітичний сигнал X (люмінесцентне випромінювання) було б неможливо.

У спрощених і дешевих приладах для люмінесцентного аналізу (флуориметр) замість монохроматорів використовують змінні світлофільтри (первинний і вторинний). Приймачем люмінесценції, як і в спектрофлуориметрі, зазвичай служить фотоелемент або фотопомножувач. Фотострум підсилюють, а потім вимірюють за допомогою мікроамперметру.

Спектри люмінесценції

У звичайних умовах спектри люмінесценції індивідуальних речовин є широкосмуговими. Спектри випромінювання люмінесценції схожі на спектри поглинання відповідних молекул. Однак збуджені молекули X встигають розтратити деяку частину раніше поглиненої енергії (на так звані безвипромінювальні переходи), перш ніж випустити квант вторинного випромінювання. Саме тому спектр випускання люмінесценції зміщений по відношенню до спектру поглинання в більш довгохвильову ділянку. Найчастіше речовина поглинає збуджувальне світло в УФ-ділянці, а люмінесціює – у видимій.

Якщо речовина здатна флуоресціювати і фосфоресціювати, то її спектр випускання фосфоресценції зрушать в довгохвильову сторону ще сильніше, ніж спектр флуоресценції.

За появою люмінесценції при УФ-опроміненні проби, а також за характерним кольором люмінесценції можна візуально впізнавати деякі

елементи, наприклад, уран, що знаходиться в розчині у вигляді іонів. Відомий цілий ряд якісних реакцій, що призводять до утворення люмінесцювальних сполук (можна відкривати субмікрограмову кількість іонів кадмію за реакцією з кальцеїном, іони цинку – з саліциловою кислотою, іони алюмінію – з 8-оксихинолином). Присутність деяких органічних сполук виявляють за характерним кольором люмінесценції, сполуки, не здатні до лімінісценції, при цьому не заважають.

Метрологічні характеристики люмінесцентного аналізу

Основна перевага люмінесцентного аналізу – його висока чутливість і висока селективність. Так можна визначати концентрації порядку 10^{-7} - 10^{-8} г/л, а в окремих випадках – до 10^{-12} г/л.

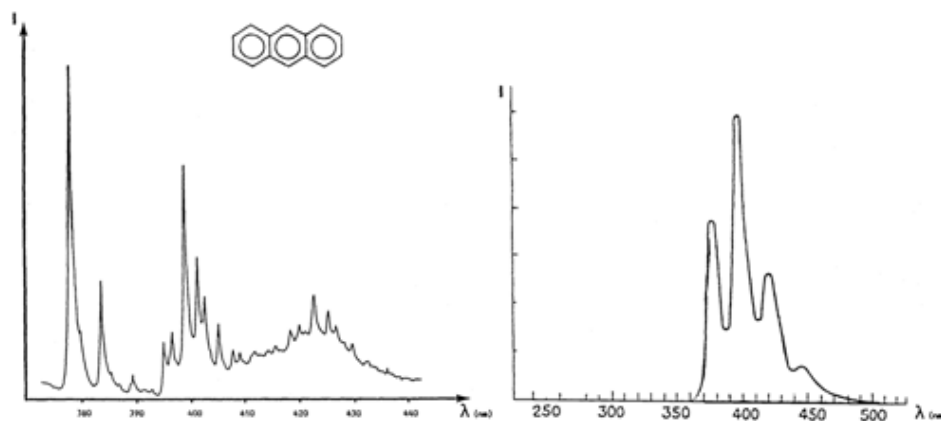


Рис. 14. Спектр люмінесценції розчину антрацену в н-гексані при кімнатній температурі (праворуч) і при -196°C (ліворуч)