

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»
(ННГУ)

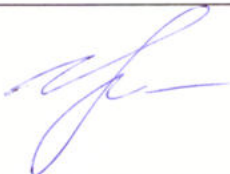
Директор НИИ химии
НИГУ им. Н.И. Лобачевского
Е.В. Сулейманов
«~~22~~» сентября 2020 г.



**Методика регистрации спектров флуоресценции в условиях
фоторазрушения образцов**

г. Нижний Новгород
2020 г.

Список исполнителей

Должность	Фамилия И.О.	Подпись
Ответственный исполнитель, профессор каф. химии нефти (нефтехимического синтеза), д.х.н.	Гришин И.Д.	

Настоящая методика предназначена для регистрации спектров флуоресценции образцов, нестабильных во времени, в том числе и из-за способности к фоторазрушению под действием возбуждающего излучения. Изложенные в данной методике положения могут быть использованы и при исследовании кинетических особенностей и механизмов протекающих реакций.

Принцип метода

Метод флуоресцентной спектроскопии основан на регистрации спектра или интенсивности флуоресценции, возникающей при облучении образца возбуждающим излучением. Достоинством данного метода является его высокая чувствительность, что позволяет определять присутствие веществ в чрезвычайно малых концентрациях (вплоть до 10^{-5} мг/мл). Регистрация спектров флуоресценции ряда веществ может сопровождаться их разрушением или участием в химической реакции. В случае, если применяемый при регистрации спектра прибор имеет низкую скорость развертки монохроматора эмиссии, а скорость превращения исследуемого соединения сравнима со скоростью регистрации спектра, возможно искажение регистрируемых спектров. В частности, наблюдается заниженная интенсивность сигнала в длинноволновой области за счет изменения концентрации вещества за время регистрации спектра. Решением указанной проблемы является увеличение скорости сканирования монохроматора эмиссии. Использование современных спектрофлуориметров, имеющих скорость сканирования более 50000 нм/мин позволяет проводить регистрацию спектров флуоресценции для веществ, способных к фоторазрушению, а также контролировать протекание фотохимических процессов методом флуоресцентной спектроскопии

Средства измерений

- Спектрофлуориметр RF-6000 производства фирмы Shimadzu.
- Система сбора и обработки данных для спектрофлуориметра: компьютер с программным обеспечением LabSolutions RF (для управления спектрофлуориметром) и LabSolutions UV-vis (для управления спектрофотометром).
- Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, специального класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г.
- Колба мерная 1-25-2, 1-100-2, ГОСТ 1770.
- Микрошприцы вместимостью 100, 2500 мм³, например, производства фирмы Hamilton, погрешность дозирования не более 2 % полного объема.

Вспомогательные средства, материалы и реактивы

- кювета кварцевая для спектрофлуориметра сечением 10*10 мм с плоскопараллельными гранями с четырьмя полированными сторонами Hellma 101-QS.

- Вода для лабораторного анализа (деионизованная), ГОСТ Р 52501,
- Диметилсульфоксид безводный производства Sigma-Aldrich кат. № 276855
- Метиленовый синий производства Sigma-Aldrich, кат. № M9140
- Изопропиламин производства Sigma-Aldrich, кат. № 471291

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

Требования к квалификации исполнителя и технике безопасности

Измерения выполняются оператором, имеющим опыт работы в области спектроскопии, прошедшим проверку знаний по технике безопасности, пожарной безопасности промышленной санитарии, техническое обучение и сдавшим экзамен на право допуска к самостоятельной работе.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и ГОСТ 12.1.018 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на спектрофлуориметр и спектрофотометр.

Условия измерений

При выполнении измерений в помещении лаборатории необходимо соблюдать

следующие условия:

- атмосферное давление $101,3 \text{ кПа} \pm 3 \text{ кПа}$;
- температура воздуха рабочего помещения $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$;
- напряжение в сети $220 \pm 10 \text{ В}$;
- частота переменного тока $50 \pm 1 \text{ Гц}$.

Подготовка к проведению измерений

Подготовка к анализу

Для проведения анализа можно применять стеклянную, полиэтиленовую, тефлоновую или полипропиленовую посуду. Вся химическая посуда, применяемая при установлении градуировочной характеристики, предварительно обрабатывается спирто-щелочной смесью.

Посуду предварительно моют дистиллированной или деионизованной водой, затем спирто-щелочной смесью, ополаскивают деионизованной водой до нейтральной реакции (контроль рН по индикаторной бумаге) и высушивают. Посуда маркируется. Чистую посуду хранят в закрытом виде.

Кварцевые кюветы обрабатывают хромовой смесью, ополаскивают деионизованной водой до нейтральной реакции (контроль рН по индикаторной бумаге) и высушивают.

Регистрация спектров флуоресценции веществ в условиях фоторазрушения

Методика определения квантового выхода флуоресценции рассмотрена на примере исследования комплексов красителя метиленового синего с изопропиламином.

Для приготовления раствора метиленового синего 2 мг вещества помещают в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят до метки диметилсульфоксидом. Полученный раствор переливают в сосуд из темного стекла. 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу объемом 25 см³ и доводят до метки диметилсульфоксидом. В результате получается раствор с концентрацией $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

2,5 мл полученного раствора помещают в кювету из кварцевого стекла и проводят регистрацию трехмерного спектра флуоресценции при следующих параметрах прибора:

Тип спектра:	3D
Скорость сканирования:	средняя
Скорость сканирования	60000 нм/мин
Чувствительность:	низкая
Ширина щели возбуждения:	5 нм
Ширина щели испускания:	5 нм
Шаг сканирования	5 нм

Зарегистрированный спектр приведен на рисунке 1.

Добавляют в кювету 10 мкл изопропиламина при помощи микрошприца, погружая кончик иглы непосредственно в раствор в кювете. Проводят регистрацию 3D-спектра при описанных выше параметрах регистрации. Зарегистрированный спектр приведен на рисунке 2.

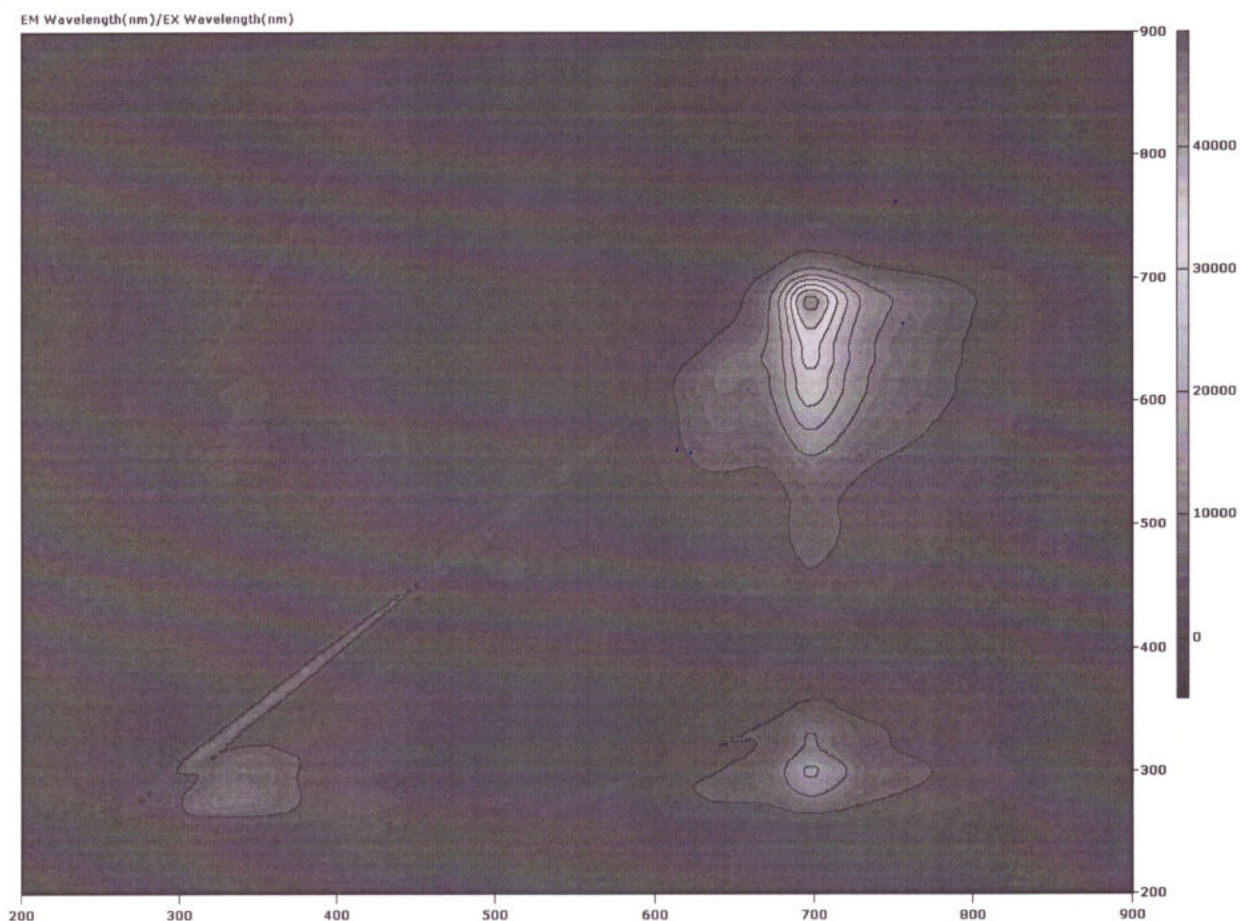


Рис.1. Зарегистрированный спектр красителя метиленового синего в растворе диметилсульфоксида.

Как видно из сравнения спектров, приведенных на рисунках 1 и 2, введение изопрпиламина в исследуемый раствор приводит к снижению интенсивности флуоресценции метиленового синего. Наряду с этим в спектре появляется новое соединение, эффективно испускающее на длине волны 720 нм при облучении светом с длиной волны 420 нм. Данное соединение является нестабильным и распадается, о чем говорит падение интенсивности флуоресценции во времени.

Для оценки скорости падения концентрации соединения во времени проводят анализ зависимости интенсивности флуоресценции на заданной длине волны от времени. Для этого в кювету помещают 2,5 мл нового раствора метиленового синего, вводят 10 мкл изопрпиламина и проводят регистрацию зависимости интенсивности флуоресценции от времени при следующих параметрах прибора:

Длина волны возбуждения	440 нм
Длина волны испускания	720 нм
Время между измерениями	10 с
Время накопления сигнала	10 мс

Число сканов	200
Ширина щели возбуждения:	5 нм
Ширина щели испускания:	5 нм

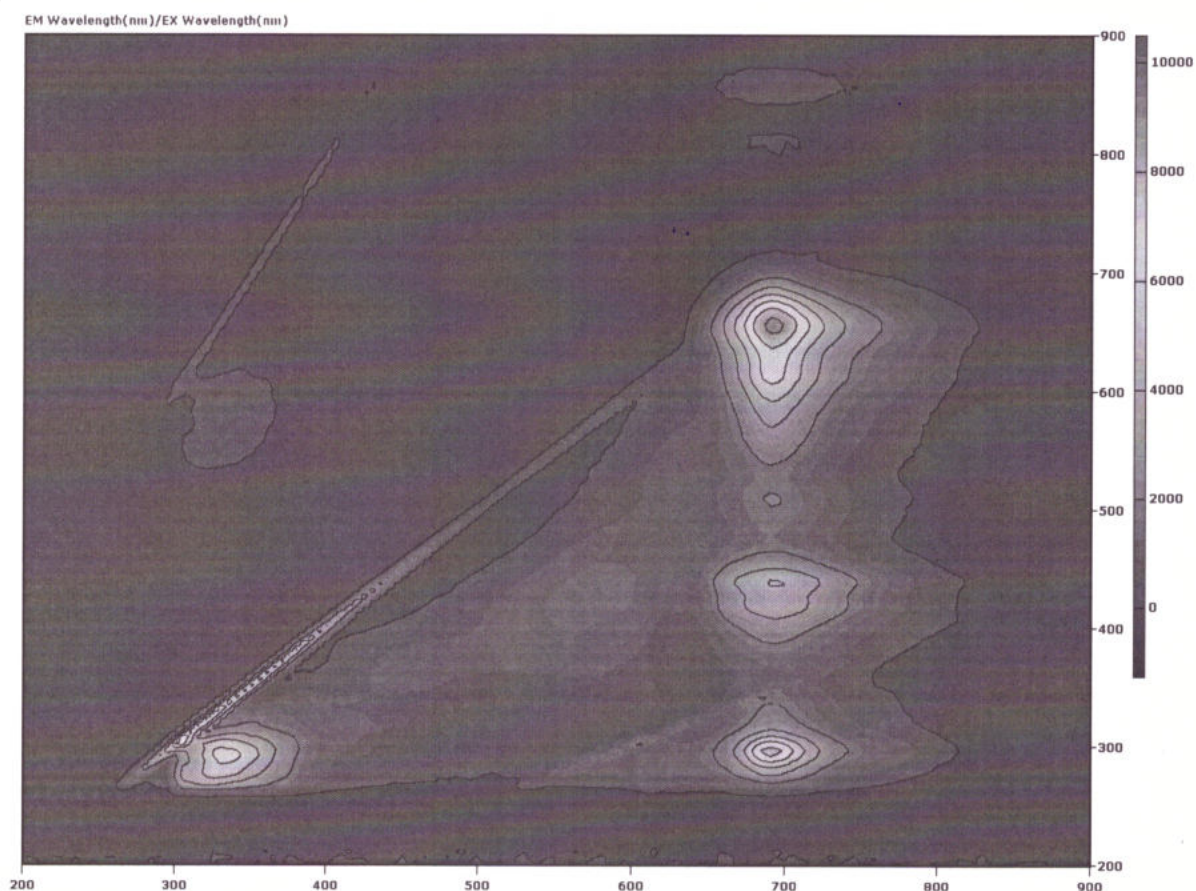


Рис.2. Зарегистрированный спектр красителя метиленового синего после добавления изопропиламина в растворе диметилсульфоксида.

Зарегистрированная в указанных условиях зависимость приведена на рисунке 3.

Как видно из представленных данных, интенсивность сигнала уменьшается во времени. По этой причине регистрацию спектра флуоресценции исследуемого соединения следует проводить при высокой скорости сканирования.

Регистрацию спектра флуоресценции целевого продукта проводят при следующих параметрах прибора:

Длина волны возбуждения	440 нм
Диапазон волн испускания	200-900 нм
Длина волны испускания	720 нм
Шаг сканирования	1 нм
Ширина щели возбуждения:	5 нм
Ширина щели испускания:	5 нм
Скорость сканирования	60000 нм/мин

Зарегистрированный спектр приведен на рисунке 4.

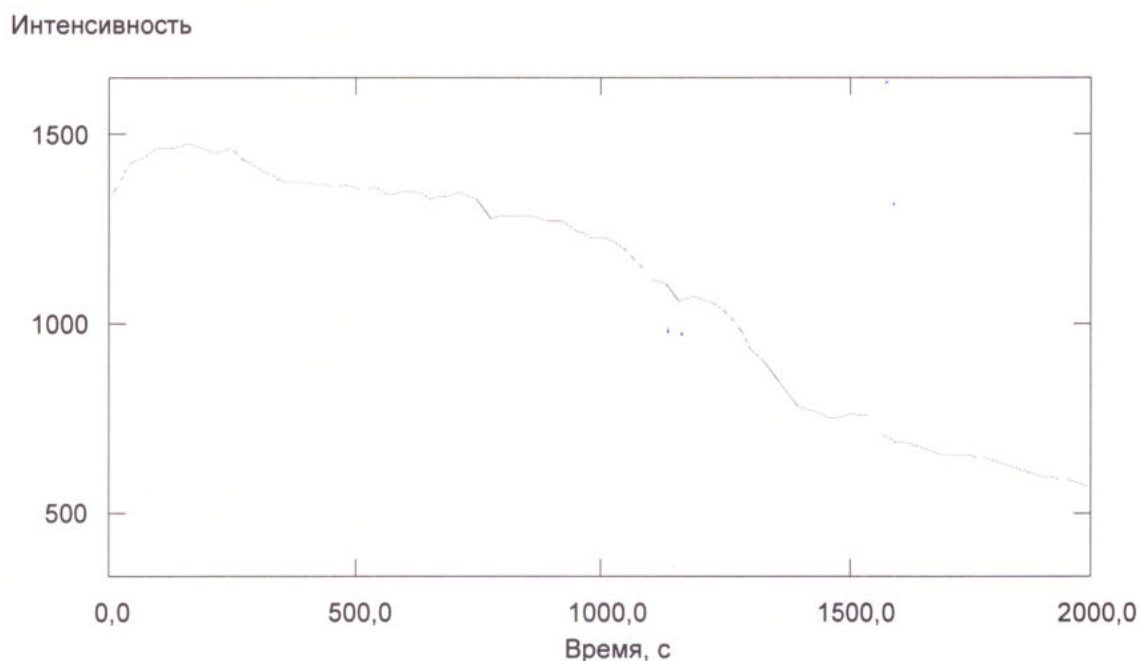


Рис.3. Зарегистрированная зависимость интенсивности флуоресценции от времени для продукта взаимодействия метиленового синего и изопрпиламина в среде диметилсульфоксида.

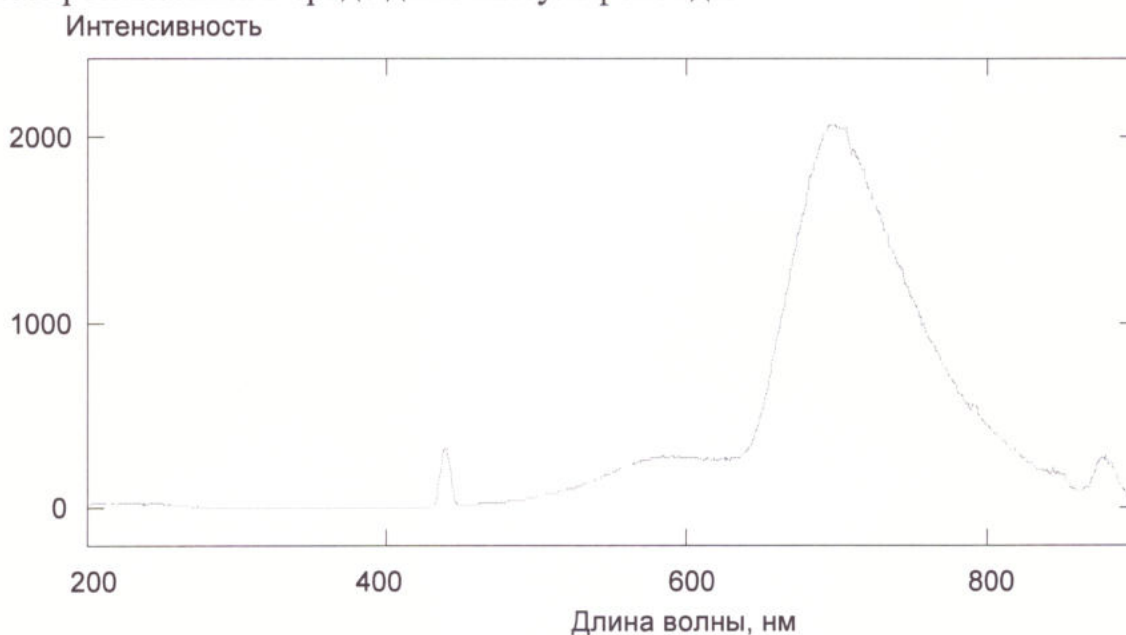


Рис.4. Зарегистрированный спектр флуоресценции продукта взаимодействия метиленового синего и изопрпиламина.

Используя разработанную методику, основанную на регистрации трехмерных спектров флуоресценции, зависимости флуоресценции от времени и регистрации спектра флуоресценции при высокой скорости сканирования,

можно проводить регистрацию спектров нестабильных соединений, способных к фоторазрушению в условиях анализа.