

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Флуориметрия

ОФС.1.2.1.1.0006.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0045-07

Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия) является методом анализа, основанным на измерении флуоресценции. Флуоресценция (один из видов люминесценции) – испускание света химическим веществом, находящимся в возбуждённом состоянии, при переходе в основное состояние. Первоначальный переход вещества из основного в возбуждённое состояние происходит при этом виде люминесценции за счёт поглощения им световой энергии при облучении ультрафиолетовым, видимым или иным электромагнитным излучением. 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). 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

флуоресценции, которая представляет собой долгоживущее свечение, имеющее время жизни от 10^{-3} с до нескольких мин.

Метод флуориметрии в 10 – 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 (этинилэстрадиол).

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

Спектр испускания флуоресценции представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны (в нм) или частоты (в см^{-1}) при заданной длине волны возбуждения. *Спектр возбуждения флуоресценции* 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 испускания.

Приборы. Для проведения флуориметрического анализа используют приборы двух типов: *фильтрационный флуориметр* и *спектрофлуориметр*.

Фильтрационный 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. Геометрия прямого угла предусматривает детектирование только произведенного

флуоресцентного сигнала. Однако детектор все-таки получает часть возбуждающего излучения в результате рассеивающих свойств самого раствора, а также из-за присутствия в растворе твердых частиц. 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.

Спектрофлуориметры отличаются от фильтрационных 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.

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;

- 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.

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.

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.

Интенсивность флуоресценции зависит от:

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

Эффективность флуоресценции обратно пропорциональна температуре. Для некоторых веществ эффективность флуоресценции может снижаться на 1 – 2 % при повышении температуры на 1 °С. 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.

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.

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.

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.

Методика. Растворяют испытуемый образец в растворителе или в смеси растворителей, указанных в нормативной документации. Переносят раствор в кювету или пробирку флуориметра и облучают возбуждающим светом при длине волны, указанной в нормативной документации.

Измеряют интенсивность испускаемого света под углом 90° к возбуждающему свету после прохождения через светофильтр или монохроматор, пропускающий преимущественно испускаемый диапазон длин волн.

Последовательность выполнения анализа. Вначале в прибор помещают растворитель или смесь растворителей, используемых для растворения вещества, и устанавливают регистрирующее устройство на нулевое значение. Затем вводят раствор стандартного образца и устанавливают чувствительность прибора таким образом, чтобы отклик показаний был не менее 50. Если для регулировки чувствительности требуется изменение ширины щели, должны быть повторены обнуление прибора на растворитель и измерение интенсивности флуоресценции стандартного образца. После этого вводят растворы испытуемых образцов неизвестной концентрации и регистрируют показания прибора. В случае линейной зависимости интенсивности испускаемого света от концентрации вещества рассчитывают последнюю в испытуемом растворе (C) по формуле:

$$C = \frac{I \cdot C_0}{I_0},$$

где C_0 – концентрация вещества в стандартном растворе;

I – интенсивность света, испускаемого испытуемым раствором;

I_0 – интенсивность света, испускаемого стандартным раствором.

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 условиях калибровочной кривой.