طیف بینی فوتولومینسانس مولکولی

فصلنامه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران

طیف‌بینی فوتولومینسانس مولکولی

الهه رحیم‌پور [1*]

اطلاعات مقاله:

نشریه رویکردهای نوین در
آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال پنجم، شماره ۲، ۱۴۰۰
صفحات: ۵۹-۵۳
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir
تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۸
نشر آنلاین: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱

الهه رحیم‌پور

چکیده

لومینسانس فرایند انتقال الکترون به صورت تابش از حالت‌های برانگیخته الکترونی به حالت پایه الکترونی است. این برانگیختگی می‌توانند توسط منابع انرژی مختلف صورت گیرد. بر اساس منبع برانگیختگی، لومینسانس می‌تواند انواع مختلف داشته باشد. فوتولومینسانس یکی از پرکاربرد ترین انواع لومینسانس است که برانگیختگی توسط فوتون و فرایند جذب نور انجام می‌شود. فوتولومینسانس یک تکنیک ساده، ارزان و غیر مخرب بوده که بسیار انتخابی‌تر از طیف‌بینی جذب مولکولی عمل می‌کند. موضوع اصلی این مقاله در مورد فرایندهای فوتولومینساس است که می‌توان به فرایندهایی مثل فلورسانس و فسفرسانس اشاره کرد. موارد مورد بحث در این مقاله شامل اساس هر یک از فرایندها، موارد خاموش کننده نظیر آسایش ارتعاشی، تبدیل درونی، تبدیل بیرونی و عبور بین سیستمی و بیان کمّی این روش‌ها است. همچنین مثال‌هایی در مورد کاربرد این روش‌ها برای آنالیت‌های آلی و معدنی مختلف و قابلیت اندازه‌گیری آن‌ها به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر اساس لومینسنت بودن یا نبودن آن‌ها آورده می‌شود. نهایتا روش‌های مورد بحث از نظر ویژگی‌های تجزیه‌ای نظیر مقیاس عمل، صحت، دقت، حساسیت و گزینش‌پذیری مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. انتظار می‌رود آشنایی با این تکنیک‌ها منجر به درک مفیدی از کاربرد این روش‌ها در زمینه‌های مختلف علوم نظیر شیمی، داروسازی، پزشکی، صنعتی، کشاورزی و محیط زیست شود.

واژگان کلیدی: فوتولومینسانس، فلورسانس، فسفرسانس، آسایش مولکولی، دستگاه‌وری

نویسندگان:

۱*. مرکز تحقیقات آنالیز داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

ایمیل: rahimpour_e@yahoo.com
تلفن: ۰۹۱۴۱۴۸۷۳۲۱

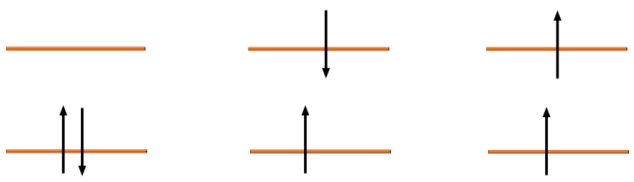
*. نویسنده مسئول

۱- مقدمه

قبل از آغاز قرن نوزدهم در اکثر آنالیزهای شیمیایی کمّی از وزنسنجی و حجم سنجی به عنوان روش تجزیه‌ای استفاده می‌شد. با وجود اینکه در برخی موارد نتایج حاصل از این روش‌ها دارای صحت بالایی می‌باشد، ولی آنالیز معمولاً به غلظت بالای آنالیت محدود بود [۱]. روش‌های دیگری که بعد از این دوره توسعه یافت و می‌توانست آنالیت‌هایی در سطح جزء را آنالیز کند، روش‌های نوری بودند. لومینسانس به عنوان یک روش نوری، فرایند نشر نور از حالت‌های برانگیخته الکترونی است. بسته به اینکه برانگیختگی توسط چه منبع انرژی صورت گرفته باشد، لومینسانس انواع مختلفی دارد. در فوتولومینسانس که یکی از پرکاربردترین انواع لومینسانس است، برانگیختگی توسط فوتون نور انجام می‌شود. فلورسانس و فسفرسانس از انواع فرایندهای فوتولومینسانس هستند. از اوایل تا اواسط دهه ۱۸۰۰ از فلورسانس مولکولی برای آنالیز کیفی و نیمه کمّی استفاده می‌شده است که نهایتا در دهه ۱۹۲۰ روش‌های کمّی ظاهر شدند. دستگاه‌وری طیف بینی فلورسانس با استفاده از فیلتر و تکفام‌ساز به عنوان طول موج‌گزین به ترتیب در دهه ۱۹۳۰ و ۱۹۵۰ توسعه یافتند. با وجود اینکه مفهوم فسفرسانس در حدود ۲۰۰ سال قبل‌تر از فلورسانس مطرح بوده ولی کاربردهای کمّی و کیفی فسفرسانس مولکولی بعد از گسترش دستگاهوری فلورسانس توجه زیادی به خود جلب نکرد [۲].

۲ طیف‌بینی فوتولومینسانس مولکولی

فوتولومینسانس طی دو مرحله انجام می‌شود: جذب و نشر. جذب یک فوتون مرئی یا فرابنفش یک الکترون ظرفیت را از حالت پایه به حالت برانگیخته ارتقا می‌دهد. در پدیده فلورسانس الکترون از یک حالت برانگیخته یکتایی[۱] به حالت پایه یکتایی و بدون تغییر اسپین منتقل شده و فتون نشر می نماید. احتمال انتقال فلورسانس بسیار بالاست و طول عمر متوسط الکترون در حالت برانگیخته برابر $۱۰^{-۸}$ – $۱۰^{-۵}$ ثانیه است. بدین ترتیب که فلورسانس سریعاً بعد از حذف منبع تحریک از بین می‌رود. اگر انتقال الکترون از حالت برانگیخته سه تایی[۲] به حالت پایه یکتایی رخ دهد، در این حالت پدیده را فسفرسانس می‌نامند. چون طول عمر متوسط فسفرسانس در محدوده $۱۰^{-۴}$ – $۱۰^{۴}$ ثانیه است، فسفرسانس می‌تواند برای مدتی بعد از حذف منبع تحریک ادامه یابد (شکل ۱) [۳].



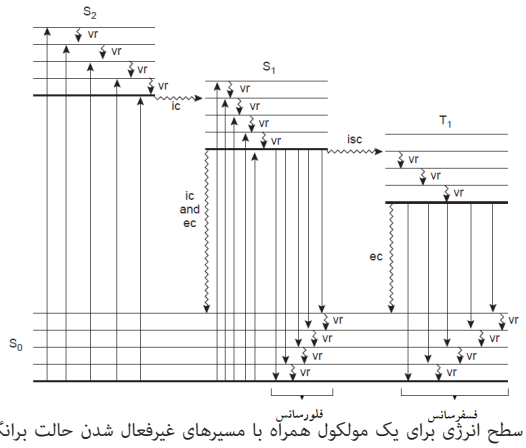
شکل ۱: تفاوت بین انتقالات یکتایی و سه‌تایی

۳ -انواع مسیرهای آسایش مولکولی

فرض کنید مولکول در آغاز در پایین‌ترین سطح انرژی حالت الکترونی پایه قرار داد. حالت پایه که در شکل ۲ نشان داده شده است، حالت یکتایی بوده که S` نامگذاری شده است. جذب یک فوتون با انرژی مناسب مولکول را به یکی از چندین سطوح انرژی ارتعاشی در نخستین حالت الکترونی برانگیخته، $S_۲$، که هر دو یکتایی هستند، قرار می‌دهد. آسایش از حالت الکترونی برانگیخته به حالت الکترونی پایه می‌تواند از چندین مکانیسم صورت گیرد که ممکن است شامل نشر فوتون باشد که در بالا توضیح داده شد و یا غیرتابشی باشد که طی آن هیچ فوتونی نشر نمی‌شود. این مکانیسم‌های غیر تابشی در شکل ۲ آورده شده است و در ادامه توضیح داده می‌شود.

۳-۱ آسایش ارتعاشی

یک نوع از غیرفعال شدن غیرتابشی آسایش ارتعاشی است که مولکول در سطح انرژی ارتعاشی برانگیخته انرژی خود را از دست داده و به سطح انرژی ارتعاشی پایین‌تر در همان حالت الکترونی جابجا می‌شود. آسایش ارتعاشی بسیار سریع بوده که طول عمر متوسط آن در حدود ۱۰-۱۲ ثانیه یا کمتر است. بنابراین الکترون برانگیخته شده به یکی از ترازهای ارتعاشی در سطح الکترونی برانگیخته، بلافاصله به پایین ترین سطح ارتعاشی در همان سطح الکترونی منتقل می‌شود [٤].



شکل ۲: دیاگرام سطح انرژی برای یک مولکول همراه با مسیرهای غیرفعال شدن حالت برانگیخته: rv آسایش ارتعاشی؛ ci تبدیل درونی، و csi عبور بین سیستمی است. پایین‌ترین انرژی ارتعاشی برای هر حالت الکترونی با خط پررنگ نشان داده شده است.

۳-۲ تبدیل درونی

نوع دیگر آسایش غیرتابشی تبدیل درونی است که طی آن الکترون برانگیخته در سطح ارتعاشی پایین یک حالت الکترونی برانگیخته مستقیماً به سطح انرژی ارتعاشی بالای حالت الکترونی انرژی پایین‌تر با همان اسپین منتقل می‌شود. با ترکیب تبدیل درونی و آسایش ارتعاشی، یک مولکول در حالت الکترونی برانگیخته می‌تواند بدون نشر فوتون به حالت الکترونی پایه برگردد [٤].

۳-۳ تبدیل بیرونی

تبدیل بیرونی نوع دیگر آسایش غیرتابشی است که مازاد انرژی به حلال یا سایر اجزا در ماتریس نمونه منتقل می‌شود [٤].

۳-٤ عبور بین سیستمی

عبور بین سیستمی نوعی آسایش غیرتابشی است که الکترون برانگیخته از سطح انرژی ارتعاشی

[۱] Singlet
[۲] Triplet

پایه در یک حالت الکترونی برانگیخته به سطح انرژی ارتعاشی بالا در یک حالت الکترونی با انرژی پایین‌تر اما با اسپین متفاوت منتقل می‌شود. عبور بین سیستمی بین حالت برانگیخته یکتایی، S1، و حالت برانگیخته سه-تایی، T1، در شکل 2 نشان داده شده است [٤].

٤- بیان کمّی فلورسانس

در صورتی که آسایش تابشی موثرتر از آسایش های غیرتابشی باشد، فلورسانس مشاهده می‌شود. بیان کمّی موثر بودن فلورسانس با استفاده از عبارت بهره کوانتومی، $f\Phi$، است که به صورت نسبت تعداد فوتون های نشر شده (در نتیجه آسایش نوری) به کل فوتون های جذب شده تعریف می‌شود. محدوده بهره کوانتومی می‌تواند از 0 تا ١ باشد. بر اساس بهره کوانتومی، شدت فلورسانس، I_f، متناسب با مقدار تابش جذب شده منبع تحریک و بهره کوانتومی فلورسانس است و توسط معادله (١) زیر بیان می‌شود.

$$I_f = K\Phi_f (P_0 - P_T) \quad (١)$$

که P_0 توان تابش خروجی از منبع و P_T توان تابشی عبوری از ماده است و k ثابت اندازه‌گیری فلورسانس است. با توجه به قانون بیر لامبرت می‌توان P را به غلظت نسبت داد. بدین ترتیب که داریم:

$$\frac{P_T}{P_0} = ١٠^{-\varepsilon bc} \quad (٢)$$

که C غلظت گونه فلورسانس کننده و ε نیز ضریب جذب مولی است. با نوآرایی معادله (٢) برحسب P_T و جایگذاری در معادله (١)، معادله (٣) بدست می‌آید.

$$I_f = K\Phi_f P_0 (١٠-١٠^{-\varepsilon bc}) \quad (٣)$$

برای غلظت‌های پایین گونه‌های فلورسانس کننده، وقتی cbε کمتر از ٠/٠١ است، این معادله به صورت معادله (٤) ساده می‌شود:

$$I_f = ٢/٣٠٣\ K\Phi_f P_0 \varepsilon bc \quad (٤)$$

بنابراین شدت فلورسانس با افزایش ضریب کوانتومی، قدرت منبع تحریک و ضریب مولی جذب و غلظت گونه‌های فلورسانس کننده افزایش می‌یابد.

فلورسانس معمولاً برای مولکول‌هایی مشاهده می‌شود که پایین‌ترین انرژی جذب آن‌ها انتقال $\pi\rightarrow\pi^*$ است، اگرچه برخی از انتقالات $\pi\rightarrow\pi^*$ نیز فلورسانس ضعیف نشان می‌دهند. اگر چه ترکیبات آروماتیک غیر هتروسیکلی غیراستخلاف‌دار بهره کوانتومی مطلوبی نشان می‌دهند، استخلاف‌دار کردن حلقه آروماتیک اثر زیادی بر بهره کوانتومی دارد. برای مثال حضور گروه‌های الکترون کشنده، مثل $-NO_2$، بهره کوانتومی را کاهش می‌دهد، در حالی که اضافه کردن گروه الکترون دهنده، مثل OH-، بهره کوانتومی را افزایش می‌دهد. همچنین فلورسانس برای سیستم‌های حلقوی آروماتیک و مولکول‌های آروماتیک با ساختار مسطح صلب افزایش می‌یابد. صلب بودن سیستم سبب کاهش آسایش‌های غیرتابشی نظیر آسایش ارتعاشی و تبدیل درونی شده و نهایتا فلورسانس را افزایش می‌دهد. بهره کوانتومی فلورسانس می‌توانند تحت تاثیر متغیرهایی مثل دما، حلال و pH نیز باشد. افزایش دما منجر به کاهش بهره کوانتومی می‌شود، این می‌تواند به دلیل برخوردهای بین مولکول و تبدیل درونی باشد که آسایش‌های غیر تابشی را افزایش می‌دهد. کاهش ویسکوزیته حلال بهره کوانتومی را کاهش می‌دهد. در حلال با ویسکوزیته بالا آسایش‌های غیرتابشی نظیر تبدیل بیرونی کاهش یافته و بهره کوانتومی فلورسانس افزایش می‌یابد. برای یک آنالیت با گروه‌های عاملی اسیدی و بازی، تغییر در Hp می‌تواند ساختار آنالیت و در نهایت خواص فلورسانس را تحت تاثیر قرار دهد [٥].

٥-بیان کمّی فسفرسانس

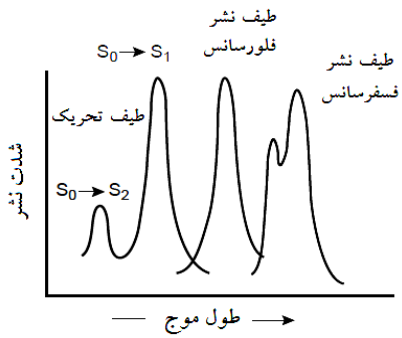
شدت فسفرسانس، pI، با معادله‌ای مشابه معادله (٤) برای فلورسانس نشان داده می‌شود:

$$I_P = ٢/٣٠٣\ K\Phi_f P_0 \varepsilon bc \quad (٥)$$

که در معادله (٥) Pε بهره کوانتومی فسفرسانس است. فسفرسانس برای مولکول‌های با انتقالات $\pi\rightarrow\pi^*$ که احتمال بیشتری برای عبور بین سیستمی نسبت به انتقالات $\pi\rightarrow\pi^*$ دارند، بسیار مطلوب است. برای مثال، فسفرسانس برای مولکلول‌های آروماتیک دارای گروه‌های کربونیل یا هتروات‌ها مشاهده می‌شود. همچنین ترکیبات آروماتیک دارای اتم-های هالوژن احتمال فسفرسانس دارند. یک اصل کلی افزایش فسفرسانس همزمان با کاهش فلورسانس است. چون طول عمر متوسط برای فسفرسانس بسیار طولانی، در محدوده‌ای از 10^{-4} s تا 10^{4} ثانیه است، بهره کوانتومی فسفرسانس معمولاً کوچک است. بهبود در بهره کوانتومی فسفرسانس با کاهش در میزان تبدیل بیرونی حاصل می‌شود. این بهبود می‌تواند با کاهش دما، استفاده از حلال با ویسکوزیته بالا، تثبیت نمونه بر روی سوبسترای جامد، و یا حلال پوشی مولکول انجام گیرد [٦].

٦- طیف تحریک در مقابل طیف نشر

همانطوری که در شکل ٢ نشان داده شده است، بعد از تحریک الکترون در یکی از ترازهای انرژی ارتعاشی برانگیخته قرار می‌گیرد اما نهایتاً به سمت پایین‌ترین تراز ارتعاشی آن حالت الکترونی آسایش می‌کند. در این صورت با توجه به اینکه تغییر در انرژی برای نشر فلورسانس و فسفرسانس معمولاً کمتر از جذب است، طیف فلورسانس و فسفرسانس مولکولی به طول موج‌های بالاتر از طیف جذبی آن جابجا می‌شود. شکل ٣ طیف تحریک یک سیستم فرضی را نشان می‌دهد. باید گفت که با نادیده گرفتن تغییرات شدت منبع و پاسخ آشکارساز، طیف تحریک نمونه تقریباً با طیف جذبی آن یکسان است. برای بدست آوردن طیف نشری، طول موج ماکسیمم برای تحریک مولکول استفاده می‌شود و شدت نور نشر شده برحسب طول موج کنترل می‌شود. اگرچه، یک مولکول تنها یک طیف تحریک دارد، ولی می‌تواند دو طیف نشری داشته باشد، یکی برای فلورسانس و دیگری برای فسفرسانس که هر دو در طول موج‌های بالاتر نسبت به طول موج تحریک ظاهر می‌شوند [٤].



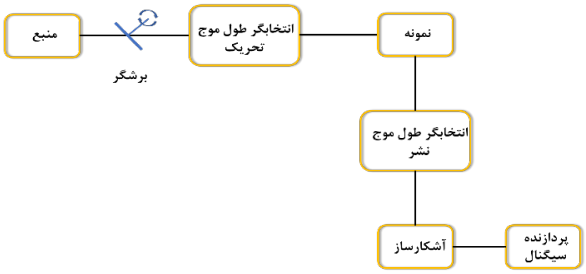
شکل ٣: نمونه‌ای از طیف نشر و تحریک مولکولی

۷- دستگاه‌وری

طرح کلی دستگاه برای فلورسانس و فسفرسانس مولکولی مشابه سایر طیف بینی‌ها است که تفاوت آن‌ها در بخش زیر بحث شده است.

۷-۱ فلورسانس مولکولی

شمایی از دستگاوری فلورسانس مولکولی در شکل ٤ آورده شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود برخلاف دستگاهای طیف بینی جذب مولکولی، مسیرهای نوری برای منبع و آشکارساز در زاویه ۹۰ درجه قرار دارند تا در غیاب نور منبع، نور ساطع شده اندازه‌گیری شود.



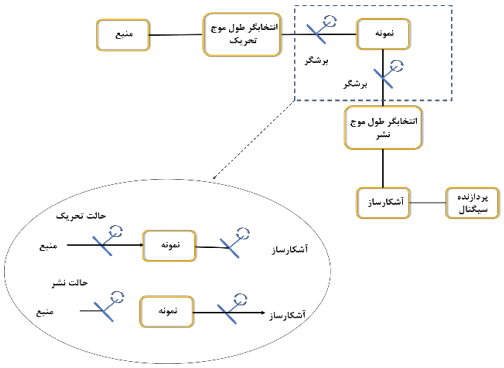
شکل ٤: دیاگرام بلوکی طیف سنج فلورسانس مولکولی

معمولا دو طرح دستگاهی برای اندازه‌گیری فلورسانس مولکولی استفاده می‌شود. ۱) فلوریمتر که انتخابگر طول موج‌های تحریک و نشر، صافی‌های تداخلی و جذبی هستند. منبع تحریک برای فلوریمتر معمولاً لامپ بخار جیوه با فشار پایین است که خطوط نشری زیاد توزیع شده در نواحی مرئی و فرابنفش (۲۵٤ nm، ۳۱۲، ۳٦٥، ٤۰٥، ٤۳٦، ٥٤٦، ٥۷۷، ٦۹۱ و ۷۷۳) را فراهم می‌کند. ۲) طیف سنج که وقتی یک تکفام‌ساز برای انتخاب طول موج‌های تحریک و نشر استفاده می‌شود، دستگاه طیف سنج نامیده می‌شود. هر دو دستگاه برای آنالیز کمّی استفاده می‌شود، با این تفاوت که از طیف‌سنج می‌توان برای ثبت طیف تحریک و نشر نیز استفاده کرد. برای طیف بینی فلورسانس عموما یک منبع تابش پیوسته استفاده می‌شود. لامپ های زنون با فشار بالا از منابع پیوسته معمول استفاده شده در این دستگاه‌ها است. همانطوری که قبلا هم گفته شد، منبع تابش در دستگاه‌های فلورسانس مولکولی در زاویه ۹۰ درجه نسبت به تکفام‌ساز قرار دارد که این بدین دلیل است که فقط نورهای نشر شده از نمونه، و نه منبع به آشکارساز برسد. این آرایش ۹۰ درجه ای نسبت به ۱۸۰ درجه‌ای به طور موثری سبب افزایش نسبت سیگنال به نویز و کاهش حد تشخیص روش فلورسانس می‌شود. سل‌های نمونه برای فلورسانس مولکولی مشابه سل‌های جذب مولکولی نوری است با این تفاوت که هر چهار طرف سل شفاف است. تکفام‌سازهای استفاده شده در دستگاه‌های طیف بینی فلورسانس باید امکان تغییر عرض شکاف

برای هر دو نوع طیف تحریک و نشری را داشته باشند تا برای به دست آوردن حساسیت بیشتر (عرض شکاف بیشتر) یا تفکیک بهتر (عرض شکاف کمتر) قابل تنظیم باشند. آشکارسازهای لوله فوتوتکثیر کننده متداول ترین آشکارساز تجاری برای تکنیک طیف‌بینی هستند. برای پوشش دادن کل طیف VU-vis معمولا از دو آشکارساز لوله فوتوتکثیر کننده با دامنه طول موجی متفاوت نیز استفاده می‌شود [۷].

۷-۲ فسفرسانس مولکولی

دستگاه‌وری طیف‌سنجی فسفرسانس دقیقا مشابه طیف‌سنجی فلورسانس است با این تفاوت که چون طول عمر فلورسانس بسیار کوتاه‌تر از طول عمر فسفرسانس است، اندازه‌گیری با ایجاد زمان تاخیر بین تحریک و اندازه‌گیری نشر فسفرسانس امکان‌پذیر است. یک طرح دستگاهی نوعی در شکل ٥ آورده شده است.



شکل ٤: دیاگرام بلوکی طیف‌سنج فلورسانس مولکولی

همانطوری که در شکل فوق نشان داده شده است، دو برشگر[۳] خارج از فاز قبل و بعد از سل نمونه می‌چرخند به طوری که نشر فلورسانس زمانی که منبع تحریک روی نمونه متمرکز می‌شود، بلوکه می‌شود، و در زمان اندازه‌گیری نشر فسفرسانس منبع تحریک بلوکه می‌شود. چون فسفرسانس فرایند آهسته‌ای است، آماده‌سازی باید چنان انجام شود که از غیرفعال شدن حالت برانگیخته با تبدیل بیرونی جلوگیری شود. معمولاً این مشکل با حل کردن نمونه در حلال آلی مناسب (مخلوطی از اتانول، ایزوپنتان و دی‌اتیل اتر) انجام می‌شود. محلول حاصل در دماهای N_2 مایع منجمد شده و جامد شفاف نوری تشکیل می‌دهد. تبدیل بیرونی در مخلوط جامد به دلیل کاهش برخوردهای بین آنالیت و حلال به حداقل می‌رسد. تبدیل بیرونی همچنین با تثبیت نمونه بر روی سوبسترای جامد به حداقل می‌رسد که امکان اندازه‌گیری فسفرسانس در دمای اتاق را فراهم می‌آورد. یک روش این است که یک قطره محلول محتوی آنالیت را روی یک صفحه کاغذ صافی کوچک سوار شده بر روی پروب نمونه قرار داده می‌شود. بعد از خشک کردن نمونه زیر لامپ حرارتی، پروب نمونه در درون طیف سنج فلورسانس برای آنالیز قرار می‌گیرد. سایر سطوح جامد که می‌توانند استفاده شوند عبارتند از ژل سیلیکا، آلومینا، سدیم استات و ساکارز. این روش به ویژه برای آنالیز صفحات کروماتوگرافی لایه نازک مناسب است [۸].

۸ -کاربردهای کمّی با استفاده از لومینسانس مولکولی

فلورسانس مولکولی و در مواردی فسفرسانس برای آنالیز کمّی آنالیت در ماتریس‌های مختلف استفاده می‌شود. در صورتی که بهره کوانتومی آنالیت برای فلورسانس یا فسفرسانس مطلوب باشد، آنالیز کمّی مستقیم انجام می‌گیرد. در صورتی که آنالیت فلورسنت یا فسفرسنت نباشد، یا زمانی که بهره کوانتومی فلورسانس یا فسفرسانس نامطلوب باشد، آنالیز غیرمستقیم انجام می‌شود. یک روش برای آنالیز غیرمستقیم این است که آنالیت با معرف واکنش داده و محصولی با خاصیت فلورسانس تشکیل دهد یا اینکه کاهش در فلورسانس یک مولکول فلورسنت در صورت افزوده شدن آنالیت به آن اندازه‌گیری شود. وقتی واکنش بین آنالیت و گونه‌های فلورسنت غیرفعال‌سازی غیرتابشی را افزایش می‌دهد یا محصول غیرفلورسنت تولید می‌کند. کاهش یا به اصطلاح خاموشی در فلورسانس مشاهده می‌شود. همانطوری که قبلا هم گفته شد ترکیبات آلی محتوی حلقه‌های آروماتیک عموماً فلورسنت هستند و هتروسیکل‌های آروماتیک اغلب

[۳] Chopper

فسفرسنت هستند. با توجه به اینکه اکثر ترکیبات بیوشیمیایی دارویی و زیست محیطی مهم آروماتیک هستند که به طور مستقیم توسط طیف‌سنج‌های فلورسانس و فسفرسانس قابل اندازه‌گیری هستند. اکثر آمینواسیدهای آروماتیک (نظیر (فنیل آلانین (F)، تیروزین (F)، تریپتوفان (P،F) ویتامین‌ها (نظیر ویتامین A (F)، ویتامین ۲B (F)، ویتامین $B_۶$ (F F)، ویتامین $B_{۱۲}$ (F)، ویتامین E (F)، فولیک اسید (F))، کاتکول آمین‌ها (نظیر دوپامین (F)، نوراپی نفرین (F)، داروها و مواد دارویی (نظیر کینین (F)، سالسیلیک اسید (F)، مورفین (F)، باربیتورات‌ها (F)، کدئین (P)، کافئین (P)، سولفونامید (P) و آلاینده‌های محیطی (نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای: پایرن (F)، بنزو [α] پایرن (F)، حشره‌کش ارگانوتیوفسفر (F)، حشره کش کاربامات (F) جزو موادی هستند که می‌توانند به صورت مستقیم آنالیز شوند. اگر هم یک آنالیت آلی ذاتاً فلورسنت یا فسفرسنت نیست، می‌توان آن را در یک واکنش شیمیایی که محصول فلورسنت یا فسفرسنت تولید می‌کند، شرکت داد. برای مثال، آنزیم کراتین فسفوکیناز برای کاتالیز تشکیل کراتین از فسفوکراتین استفاده می‌شود. چون کراتین ذاتا فلورسنت نیست، اندازه‌گیری این آنزیم به صورت مستقیم امکانپذیر نمی باشد. بنابراین کراتین تشکیل شده، با نین هیدرین واکنش می@ دهد تا محصول فلورسنت تشکیل دهد که از روی اندازه‌گیری میزان فلورسانس این محصول به صورت غیر مستقیم مقدار کراتین تولید شده و نهایتا فعالیت آنزیم مشخص می‌شود.

در مورد آنالیت‌های معدنی هم، اکثر یون‌های معدنی، به استثنای چندین یون فلزی (تربیوم و یوروپیوم) فلورسانس چندانی ندارند تا به صورت مستقیم قابل اندازه‌گیری باشند. بنابراین اکثراً به صورت غیرمستقیم و از طریق واکنش با لیگاند آلی برای تشکیل کمپلکس فلز-لیگاند فلورسنت یا فسفرسنت (چندان معمول نیست) اندازه‌گیری می‌شوند. یک مثال از لیگاند شلاته کننده نمک سدیمی ۳،۲،٤- تری هیدروکسی آزوبنزن- ٥-سولفونیک اسید، که آلیزارین گارنت R نیز نامیده می‌شود، با $AL^{+۳}$ است که کمپلکس فلورسنت تشکیل می‌دهد و از طریق اندازه گیری شدت فلورسانس این کمپلکس مقدار آلومینیوم به صور غیر مستقیم قابل اندازه گیری است. مثال‌های دیگری از معرف‌های کی‌لیت کننده که کمپلکس فلز-لیگاند فلورسنت با یون‌های فلزی تشکیل می‌دهند، عبارتند از۸-هیدروکسی کینولئین برای فلزات $AL^{۳+}$، $Be^{۲+}$، $Zn^{۲+}$، Li^{+}، $Mg^{۲+}$، فلاوونالبرای $Zr^{۲+}$، $Sn^{٤+}$، بنزوئین برای $B_٤O_٧^{-۲}$، $Zn^{۲+}$، ۲، ۳، ٤، ٥، ۷-پنتاهیدروکسی فلاوون برای $Be^{۲+}$، و ۲-(o-هیدروکسی فنیل) بنزوکسازول برای $Cd^{۲+}$.

برای آنالیت‌های معدنی غیرفلزی نیز معمولا اندازه‌گیری به صورت غیر مستقیم انجام می‌شود. که عمدتا به واسطه توانایی برای کاهش یا خاموشی فلورسانس گونه‌های فلورسنت قابل کمّی‌سازی هستند. مثال در این مورد، شامل آنالیز F- است که بر اساس توانایی آن برای خاموشی فلورسانس کمپلکس آلیزارین $AL^{۳-}$ انجام می‌شود [۹, ۱۰].

۹- ارزیابی روش‌های فوتولومینسانس

۹-۱- مقیاس عمل

فوتولومینسانس مولکولی می‌تواند برای آنالیز آنالیت‌ها در مقیاس ناچیز در نمونه‌های ماکرو و میکرو استفاده شود. حد تشخیص برای طیف‌بینی فلورسانس به شدت تحت تاثیر بهره کوانتومی آنالیت است. برای آنالیت‌هایی با Φ_f > ۰/۵، در صورت استفاده از طیف‌سنج‌های فلورسانس با کیفیت بالا، حد تشخیص در حدود پیکومولار قابل دستیابی است. برای مثال، حد تشخیص برای کینین سولفات، با Φ_f برابر با ۰/۵۵، معمولاً بین ppb ۱ و ppTr ۱ (قسمت در تریلیون) است.

حدود تشخیص برای فسفرسانس که کمی ضعیف‌تر از فسفرسانس است، با مقادیر نوعی در محدوده نانومولار برای اندازه‌گیری‌های فسفرسانس در دمای پایین و در محدوده میکرومولار برای اندازه‌گیری‌های فسفرسانس در دمای پایین با یک سوبسترای جامد است.

۹-۲- صحت

صحت روش فلورسانس در صورتی که مزاحمت‌های شیمیایی و طیفی قابل توجه نباشد، معمولاً ٪ ۱-۵ است. صحت این روش نیز می‌تواند توسط پارامترهای موثر بر سایر روش‌هایی طیف بینی تحت تاثیر قرار گیرد. علاوه بر این، صحت توسط مزاحمت‌های موثر بر بهره کوانتومی فلورسانس نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. صحت روش فسفرسانس کمی بیشتر از صحت فلورسانس است.

۹-۳- دقت

در روش فلورسانس، وقتی غلظت آنالیت بالاتر از حد تشخیص باشد، انحراف استاندارد نسبی معمولاً در حدود ٪ ۰/۵-۲ است. در حالی که دقت روش فسفرسانس به انحراف استاندارد نسبی ٪ ۵-۱۰ محدود می‌شود. پایداری منبع تحریک عامل دستگاهی محدود کننده و تحت تاثیر قرار دهنده¬ی دقت در روش‌های فوتولومینسانس است.

۹-٤- حساسیت

از معادلات ٤ و ٥ دیده می‌شود که حساسیت روش فلورسانس و فسفرسانس توسط تعدادی از پارامترها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. که مهمترین آن بهره کوانتومی است. دما و ترکیب محلول بر روی Φ_f و Φp تاثیر بسزایی دارد. در کنار بهره کوانتومی، حساسیت روش‌های فوتولومینسانس با منبع تحریکی با شدت نشر (P.) بزرگتر در طول موج موردنظر و با انتخاب طول موج تحریک که مطابق با بیشینه جذب باشد (Φ) بهتر می‌شود.

۹-۵-گزینش‌پذیری

فلورسانس و فسفرسانس مولکولی نسبت به جذب مولکولی به دو دلیل گزینش‌پذیری بالاتری دارد: اول اینکه هر ترکیبی که می‌تواند نور جذب کند، الزاماً فلورسنت یا فسفرسنت نیست و دوم اینکه گزینش‌پذیری کامل بین آنالیت و گونه مزاحم در صورت تفاوت در طیف تحریک یا نشر امکان‌پذیر است. در لومینسانس مولکولی شدت نشر کل برابر جمع خطی گونه‌های فلورسانس کننده و فسفرسانس کننده است. آنالیز نمونه n جزئی، می‌تواند توسط اندازه‌گیری شدت نشر کل در n طول موج انجام شود [۱۱].

۱۰- نتیجه‌گیری

نشر یک فوتون از حالت برانگیخته یکتایی به حالت پایه یکتایی را پدیده فلورسانس و نشر فوتون از حالت برانگیخته سه‌تایی به حالت پایه یکتایی را پدیده فسفرسانس می‌نامند که کاربرد روش فلورسانس معمول‌تر از فسفرسانس است. شدت فلورسانس با افزایش ضریب کوانتومی، قدرت منبع تحریک و ضریب مولی جذب و غلظت گونه‌های فلورسانس کننده افزایش می‌یابد. برای غلظت‌های پایین آنالیت، شدت نشر فلورسانس به صورت خطی تابعی از غلظت آنالیت است. یکی از مهم‌ترین قابلیت‌های روش فلورسانس به عنوان یک روش تجزیه‌ای برای بررسی‌های کمّی ترکیبات شیمیایی، حساسیت بسیار خوب و گستره خطی نسبتاً زیاد آن در مقایسه با روش‌های جذبی است که امکان اندازه‌گیری محدوده وسیعی از آنالیت-های آلی و معدنی در زمینه‌های مختلف علوم نظیر شیمی، داروسازی، پزشکی، صنعتی، کشاورزی و محیط زیست فراهم کرده

است. گروه هدف ما در این مقاله بیشتر دانشجویان کارشناسی علاقه مند به دسترسی به منبع کاملی در زمینه فوتولومینسانس است و امیدواریم مطالب مطرح شده مفید باشند.

۱۱- منابع

[1]. Beck II, C.M. (1997). Toward a revival of classical analysis, Metrologia, 34, 19,

[2] .Valeur, B., & Berberan-Santos, M.N. (2011). A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. J. Chem. Edu. 88, 731-738.

[3]. Schulman, S.G. (2017) Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physicochemical principles and practice. Elsevier, ISBN: 9781483160993.

[4]. So, P.T., & Dong, C.Y. (2001) Fluorescence spectrophotometry. Chem. Phys. Corpus ID: 7354121.

[5]. Bernhardt, K., Trissl, H.-W. (1999). Theories for kinetics and yields of fluorescence and photochemistry: how, if at all, can different models of antenna organization be distinguished experimentally? Biochim. Biophys. Acta 1409, 125-142,

[6]. Baryshnikov, G., Minaev, B. & Ågren, H., (2017). Theory and calculation of the phosphorescence phenomenon. Chem. Rev. 117(9), 6500-6537.

[7]. Szabo, A.G., (2000). Spectrophotometry and Spectrofluorimetry, Oxford University Press.

[8]. Das, S., Powe, A.M., Baker, G.A., Valle, B., El-Zahab, B., Sintim, H.O., Lowry, M., Fakayode, S.O., McCarroll, M.E., Patonay, G. & Li, M., (2012). Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry. Anal. Chem. 84(2), 597-625.

[9]. Gomez-Hens, A. & Valcarcel, M., (1982). Spectrofluorimetric determination of inorganic anions: a review. Analyst, 107(1274), 465-494.

[10]. Bonfilio, R.B.D.A.M., De Araujo, M.B. & Salgado, H.R.N., (2010). Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review. WSEAS Trans. Biol. Biomed. 7(4), 316-338.

[11]. Goldberg, M.E., (1987). Spectrophotometry & spectrofluorimetry: A practical approach: edited by Harris, D.A. and Bashford, C.L. IRL Press, Oxford, pp. 192.

University of Maragheh

Journal of New Approaches in Iranian Scientific Laboratories

ILRS
Iranian Laboratory Research Society

Molecular Photoluminescence Spectroscopy

Elaheh Rahimpour[1*]

Article Info:

NAISL
Volume 5, Number 2, 2021
Pages: 53-59
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir
Date Received: 2022/04/17
Acceptance date: 2022/08/30
Online publishing: 2023/07/22

Elaheh Rahimpour

Abstract

Luminescence is the process of electron transfer in the radiation form from an excited electronic state to a ground state. This excitation can be induced by different energy sources. Depending on the excitation source, luminescence can take various forms. Photoluminescence is one of the most widely used types of luminescence, in which excitation takes place by photons and through the process of absorption. Photoluminescence is a simple, inexpensive, and non-destructive technique that is much more selective than molecular absorption spectroscopy. The main topic of this article is photoluminescence processes, which are fluorescence and phosphorescence. The topics discussed in this paper include the basis of each process, quenching factors such as vibrational relaxation, internal conversion, external conversion, and inter-system crossing, and the quantitative expression of these methods. Examples of their application for the determination of various organic and inorganic analytes and the ability to their measuring as directly and indirectly based on whether they are luminescent or not are also given. Finally, the methods are evaluated in terms of analytical characteristics such as the scale of operation, accuracy, precision, sensitivity and selectivity. Familiarity with these techniques is expected to lead to a useful understanding of their application in various fields of science such as chemistry, pharmacy, medicine, industry, agriculture and the environment.

Key Words: **Photoluminescence, Fluorescence, Phosphorescence, Molecular relaxation, Instrumentation.**

Authors:
1`. Pharmaceutical Analysis Research Center and Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Tel: 09141487321
E-mail: rahimpour_e@yahoo.com

*.Corresponding author