

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

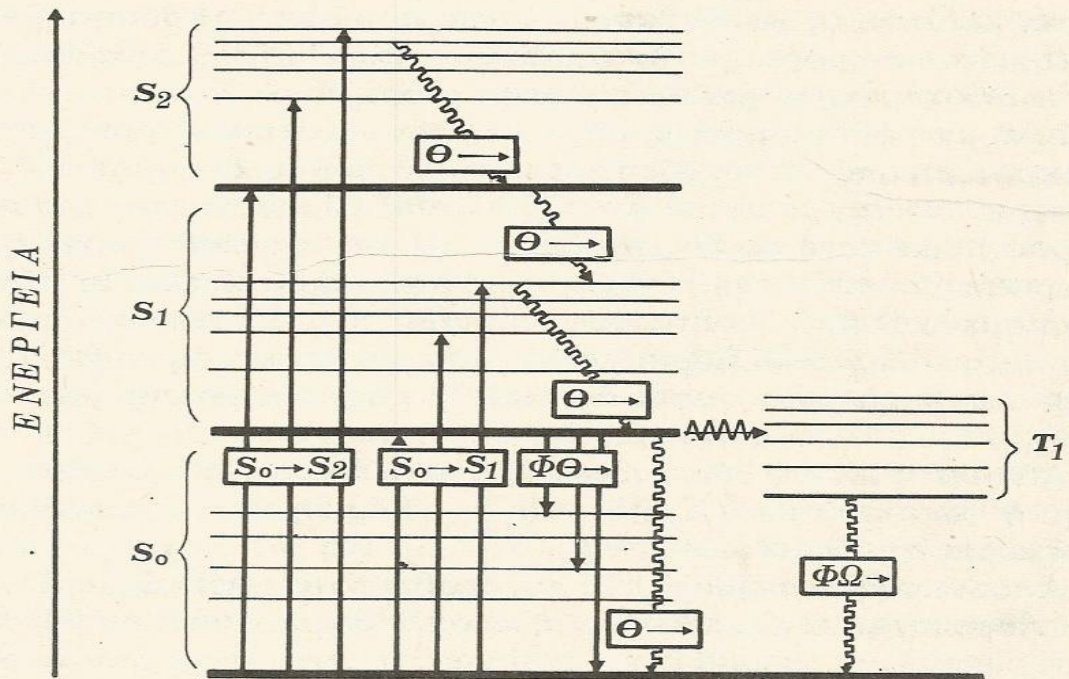
ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

10-1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως είναι γνωστό (σελ. 165) η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με απορρόφηση ενός φωτονίου δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλ' αποβάλλεται με διάφορους τρόπους, συνήθως υπό μορφή θερμότητας, αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας, η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια. Ειδικότερα, η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός, εάν η εκπομπή γίνεται σε χρόνο 10^{-9} - 10^{-6} s μετά τη διέγερση, και ως φωσφορισμός, όταν μεσολαβεί καθυστέρηση 10^{-4} - 10 s (ή και μεγαλύτερη) πριν από την εκπομπή. Εξαιτίας της μικρής διάρκειας του φθορισμού, η μέτρηση της εντάσεώς του γίνεται κατά τη διάρκεια της διεγέρσεως και όχι μετά τον τερματισμό της. Την Αναλυτική Χημεία ενδιαφέρει κυρίως ο φθορισμός (φθορισμομετρία), ο οποίος και μελετάται παρακάτω.

Μηχανισμός φθορισμού. Μία ηλεκτρονική στάθμη ενέργειας ενός μορίου χαρακτηρίζεται ως απλή (singlet) και συμβολίζεται με το S, όταν το συνολικό σπιν (spin) είναι μηδέν (αντιπαράλληλα σπιν σε όλα τα ζεύγη ηλεκτρονίων), ενώ όταν τούτο είναι διαφορετικό από μηδέν, η στάθμη χαρακτηρίζεται ως τριπλή (triplet) και συμβολίζεται με το T. Μία κατάσταση T είναι πτωχότερη σε ενέργεια από την αντίστοιχη κατάσταση S. Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα μόριο συνεπάγεται μετάπτωση ηλεκτρονίων (ηλεκτρονική διέγερση) από μη δεσμικά (η) ή δεσμικά (π) τροχιακά σε αντιδεσμικά (π*) τροχιακά, οπότε το μόριο μεταβαίνει από τη θεμελιώδη απλή κατάσταση S_0 σε διεγερμένες καταστάσεις S_1, S_2, \dots , που συνίστανται από αριθμό δονητικών σταθμών. Η μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι επιτρεπόμενη, ενώ η μετάπτωση $S_0 \rightarrow T_1$ είναι "απαγορευμένη", λόγω της μικρής πιθανότητας να συμβεί αναστροφή του σπιν στο διεγερμένο ηλεκτρόνιο (η μετάπτωση $S_0 \rightarrow T_1$ είναι περίπου 10^6 φορές λιγότερο πιθανή από τη μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$).

Κατά την αποδιέγερση του μορίου όλες οι δονητικές στάθμες των διεγερμένων απλών καταστάσεων καταλήγουν στη χαμηλότερη δονητική στάθμη της ηλεκτρονικής καταστάσεώς τους, μέσω μίας διεργα-



Σχήμα 10-1. Ενεργειακές στάθμες και μεταπτώσεις μορίου φθορίζουσας ενώσεως. S_0 , S_1 και S_2 : Θεμελιώδης, πρώτη διεγερμένη και δεύτερη διεγερμένη ηλεκτρονική απλή κατάσταση. T_1 : πρώτη τριπλή διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση. \rightarrow μετάπτωση που οφείλεται σε απορρόφηση ή εκπομπή ακτινοβολίας, $\sim\sim\sim$ μετάπτωση λόγω δονητικής επαναφοράς και εσωτερικής μετατροπής, που συνεπάγεται έκλυση θερμότητας ($\Theta \rightarrow$), $\sim\sim\sim$ διασυστηματική διασταύρωση, $\Phi \Theta \rightarrow$: εκπομπή φθορισμού και $\Phi \Omega \rightarrow$: εκπομπή φωσφορισμού.

σίας που λέγεται δονητική ή θερμική επαναφορά (vibrational ή thermal relaxation), με την οποία πετυχαίνεται σταδιακά και ταχύτατα μεταφορά θερμότητας στα μόρια του διαλύτη με τα οποία συγκρούεται το διεγερμένο μόριο. Εξαιτίας της μερικής επικάλυψης των ανώτερων διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων, πετυχαίνεται επίσης ταχύτατα η διεργασία της εσωτερικής μετατροπής (internal conversion), δηλαδή της μεταπτώσεως από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη ανώτερης ηλεκτρονικής καταστάσεως στην υψηλότερη δονητική στάθμη της χαμηλότερης ηλεκτρονικής καταστάσεως, η οποία έχει την ίδια ενέργεια. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η κατάληξη όλων των απλών διεγερμένων καταστάσεων στη χαμηλότερη στάθμη δονήσεως της διεγερμένης καταστάσεως S_1 , με έκλυση θερμότητας. Η πιο πέρα αποδιέγερση σε θερμοκρασία δωματίου από την S_1 στην S_0 πραγματοποιείται με μία από τις παρακάτω τέσσερις διεργασίες:

1. Εσωτερική μετατροπή $S_1 \rightarrow S_0 + \text{θερμότητα}$ (το βέλος υποδηλώνει μετάπτωση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας). Η διεργασία αυτή παρατηρείται σε μόρια με υψηλό βαθμό δονητικής ελευθερίας, όπως είναι τα αλειφατικά μόρια, τα οποία δε φθορίζουν.

2. Εκπομπή φθορισμού: $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_\phi$ (η συχνότητα φθορισμού ν_ϕ είναι μικρότερη από τη συχνότητα της ακτινοβολίας διεγέρσεως ν_s εξαιτίας της απώλειας, με τη μορφή θερμότητας, μέρους της ενέργειας, που απορροφήθηκε κατά τις διεργασίες της δονητικής επαναφοράς και της εσωτερικής μετατροπής). Η διεργασία αυτή παρατηρείται σε μόρια με περιορισμένο βαθμό δονητικής ελευθερίας, όπως είναι τα αρωματικά μόρια και μερικά άλλα μόρια με πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, στα οποία η διεργασία της εσωτερικής μετατροπής είναι αμελητέα.

3. Διασύστηματική διασταύρωση: $S_1 \rightarrow T_1$, που ακολουθείται από εκπομπή φωσφορισμού, $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\phi\text{οσ}}$. Επειδή η T_1 έχει μικρότερη ενέργεια από την S_1 , είναι $\nu_\phi > \nu_{\phi\text{οσ}}$.

4. Απόσβεση (quenching), δια συγκρούσεως με μόρια άλλων ουσιών, οπότε παρατηρείται εξασθένηση ή και πλήρης εξαφάνιση του φθορισμού.

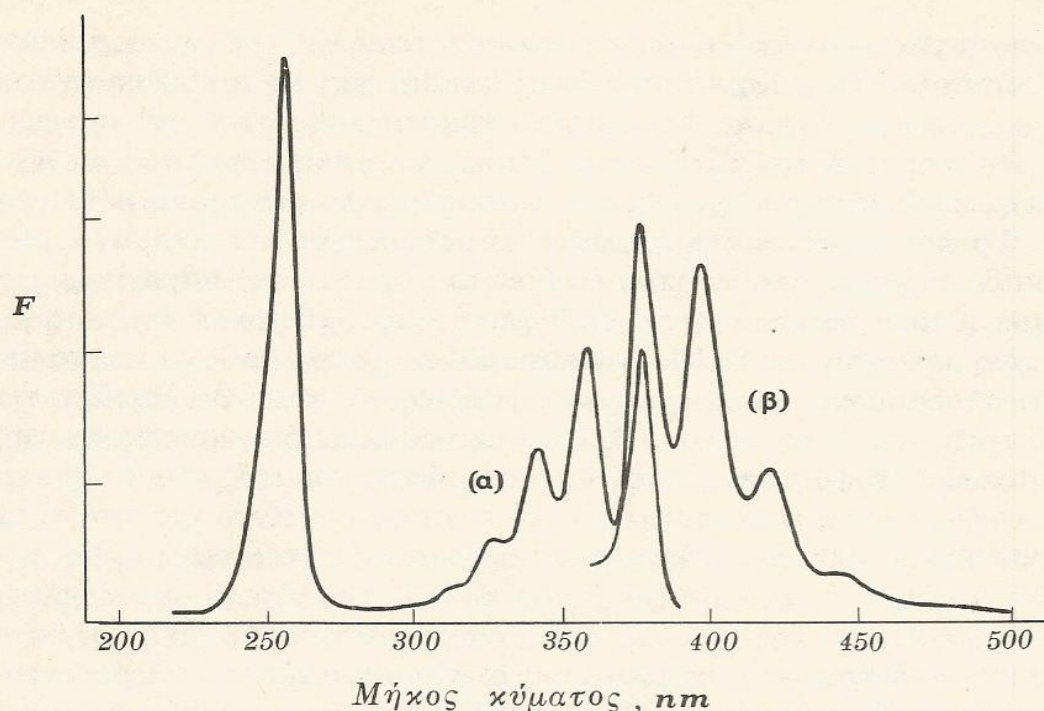
Επειδή το αποδιεγειρόμενο μόριο μπορεί να καταλήξει σε οποιαδήποτε από τις στάθμες δονήσεως (ταλαντώσεως) της S_0 , το φάσμα φθορισμού συνίσταται από πλήθος γραμμών, κυρίως στην περιοχή του ορατού. Με την παρουσία διαλύτη οι γραμμές πλατύνονται και αλληλεπικαλύπτονται, και γι' αυτό τα λαμβανόμενα φάσματα (μοριακού) φθορισμού είναι *φάσματα ταινιών*, παρόμοια με τα φάσματα απορροφήσεως στο υπεριώδες ή το ορατό. Επειδή η εμφάνιση φθορισμού προέρχεται από τη μετάπτωση του μορίου από μία μόνο ηλεκτρονική στάθμη, την S_1 , εμφανίζεται μόνο μία ζώνη φθορισμού, έστω και εάν το μόριο εμφανίζει περισσότερες ζώνες απορροφήσεως.

Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής (φθορισμού). Κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μιάς ουσίας λαμβάνονται δύο είδη φασμάτων, διεγέρσεως και εκπομπής. Η γραφική απεικόνιση της εντάσεως της ακτινοβολίας φθορισμού F (για σταθερό μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας φθορισμού, συνήθως το μήκος κύματος μέγιστου φθορισμού) ως συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως αποτελεί το *φάσμα διεγέρσεως* (excitation spectrum) της εξεταζόμενης ουσίας, ενώ η γραφική παράσταση του F (για σταθερό λ της ακτινοβολίας διεγέρσεως) ως συνάρτηση του λ της ακτινοβολίας φθορισμού αποτελεί το *φάσμα εκπομπής (φθορισμού)* (emission ή fluorescence spectrum) της ουσίας. Τα φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής λαμβάνονται με τα φασματοφθορισμόμετρα (σελ. 255), τα οποία έχουν δύο μονοχρωμάτορες,

τον ένα για την ακτινοβολία διεγέρσεως και τον άλλο για την ακτινοβολία φθορισμού. Το φάσμα διεγέρσεως λαμβάνεται με τοποθέτηση του μονοχρωμάτορα φθορισμού στο μήκος κύματος, στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη τιμή του F, και σάρωση με το μονοχρωμάτορα διεγέρσεως της επιθυμητής περιοχής του φάσματος, με σύγχρονη μέτρηση του F. Το φάσμα εκπομπής λαμβάνεται με τοποθέτηση του μονοχρωμάτορα διεγέρσεως στο λ, όπου το F είναι μέγιστο, και σάρωση με το μονοχρωμάτορα φθορισμού της επιθυμητής περιοχής του φάσματος, με σύγχρονη μέτρηση του F. Με τον παραπάνω τρόπο λαμβάνονται τα "αδιόρθωτα" φάσματα διεγέρσεως και φθορισμού, γιατί δε λαμβάνεται υπόψη η εξάρτηση της ισχύος P_0 της ακτινοβολίας διεγέρσεως και της αποκρίσεως του φωτοανιχνευτή από το μήκος κύματος. Τα φάσματα αυτά συνήθως είναι ικανοποιητικά για εργασία ρουτίνας και από αυτά μπορούν να παρθούν τα αντίστοιχα "διορθωμένα" φάσματα με κατάλληλες διορθώσεις 1) στην τιμή του P_0 για κάθε λ ή καλύτερα με αυτόματη ρύθμιση του εύρους της σχισμής του μονοχρωμάτορα διεγέρσεως, ώστε η ισχύς P_0 να διατηρείται σταθερή και 2) στο σήμα εξόδου του ανιχνευτή. Επειδή το "διορθωμένο" φάσμα διεγέρσεως είναι πανομοιότυπο με το φάσμα απορροφήσεως της ουσίας, επιδιώκουμε τη λήψη τέτοιων φασμάτων, οποτεδήποτε είναι δυνατόν, διότι με αυτά καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση μιάς φθορίζουσας ουσίας σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Το "διορθωμένο" φάσμα εκπομπής αποτελεί περίπου είδωλο του φάσματος απορροφήσεως, μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μιάς φθορίζουσας ουσίας.

Στο σχήμα 10-2 παρέχονται τα φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής του ανθρακενίου. Από το σχήμα καταφαίνεται α) η σχέση ειδώλου-αντικειμένου μεταξύ των δύο φασμάτων, β) η μετατόπιση του φάσματος εκπομπής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, γ) η εμφάνιση μιάς μόνο ζώνης στο φάσμα εκπομπής (με τρεις κορυφές) έναντι δύο ζωνών στο φάσμα διεγέρσεως (και επομένως και στο φάσμα απορροφήσεως), δ) η σύμπτωση των δύο φασμάτων σε μήκος κύματος 375 nm, που αντιστοιχεί στη μετάπτωση από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη της S_1 στη χαμηλότερη δονητική στάθμη της S_0 (μετάπτωση O-O') και ε) η δυνατότητα λήψεως φάσματος διεγέρσεως, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του μορίου σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση ($10^{-7}M$).

Παράγοντες που επιδρούν στο φθορισμό. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση φθορισμού είναι η ύπαρξη τέτοιας δομής στο μόριο, ώστε να απορροφάται ακτινοβολία στο υπεριώδες ή το ορατό. Επιπλέον, η ακαμψία του μορίου πρέπει να είναι μεγάλη, ώστε η διαφορά



Σχήμα 10-2. α) Φάσμα διεγέρσεως ανθρακενίου $6 \times 10^{-7} M$ σε κυκλοεξάνιο ($\lambda = 397 \text{ nm}$).
β) Φάσμα εκπομπής ανθρακενίου $3 \times 10^{-7} M$ σε κυκλοεξάνιο ($\lambda = 250 \text{ nm}$).

μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων S_1 και S_0 να είναι τέτοια, που να αποτρέπει τη διεργασία της εσωτερικής μετατροπής σε όφελος της διεργασίας φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ολοκληρωμένης εντάσεως της ζώνης με το μεγαλύτερο μήκος κύματος στο φάσμα απορροφήσεως. Έτσι, κατά κανόνα φθορίζουν οι ενώσεις, που περιέχουν αρωματικούς πυρήνες ή πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς. Έχει βρεθεί ότι διεγέρσεις του τύπου $\eta \rightarrow \pi^*$ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα διασυστηματικής διασταυρώσεως $S_1 \xrightarrow{AAAA} T_1$ (που μειώνει το φθορισμό) από ό,τι διεγέρσεις του τύπου $\pi \rightarrow \pi^*$. Έτσι, για παράδειγμα, το βενζόλιο φθορίζει, ενώ η πυριδίνη όχι. Ο φθορισμός των αρωματικών ενώσεων αυξάνεται με την επιπεδότητα (planarity) του μορίου, η οποία συχνά καθορίζεται από τη μοριακή ακαμψία. Για παράδειγμα, το φαινανθρένιο (τρεις ενωμένοι αρωματικοί δακτύλιοι) φθορίζει, ενώ το *cis*-στιλβένιο, α, β -διφαινυλ-αιθυλένιο, δε φθορίζει. Οι υποκαταστάτες είναι δυνατόν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό το φθορισμό των μορίων. Π.χ. ηλεκτρονιοδότες, όπως οι ομάδες $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, αυξάνουν το φθορισμό, διότι διευκολύνουν τη μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_0$ (σελ. 247). Αντίθετα, ηλεκτρονιόφιλες ομάδες, όπως π.χ. $-\text{COOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{N}=\text{N}$, και ομάδες που περιέχουν αλογόνα (Cl , Br , I) μειώνουν ή ακόμη και εξαλείφουν τελείως το φθορισμό. Κατά κανόνα, ο σχηματι-

σμός χηλικών ενώσεων με μεταλλοϊόντα ενισχύει το φθορισμό, με αύξηση της ακαμψίας του μορίου και ελαχιστοποίηση των εσωτερικών δονήσεων, που ευνοούν την εσωτερική μετατροπή.

Εκτός από τη δομή των μορίων, στο φθορισμό επιδρούν και οι παρακάτω παράγοντες:

1. *Ξένα μόρια*. Η ύπαρξη ξένων μορίων συνεπάγεται αλλοίωση της εντάσεως φθορισμού, όταν αυτά απορροφούν την ακτινοβολία διεγέρσεως ή φθορισμού (φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου) ή αλληλεπιδρούν με το φθορίζον μόριο προκαλώντας απόσβεση (σελ. 248) ή φθορίζουν από μόνα τους. Σε πολλές περιπτώσεις, η παρεμποδιστική δράση των ξένων μορίων χρησιμοποιείται για τον έμμεσο φθορισμομετρικό προσδιορισμό τους.

2. *Διαλύτης*. Ο διαλύτης παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στα χαρακτηριστικά του φάσματος εκπομπής, όσο και στην ένταση φθορισμού. Ο φθορισμός αυξάνεται, κατά κανόνα, με την πολικότητα και το ιξώδες του διαλύτη. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά την ακτινοβολία διεγέρσεως ή φθορισμού. Ουσίες που από μόνες τους δεν φθορίζουν, μπορούν να γίνουν φθορίζουσες με τη χρησιμοποίηση ιξωδών διαλυτών ή υαλώδους μήτρας.

3. *pH*. Πολλές ιονιζόμενες ουσίες φθορίζουν μόνο υπό τη μία ιονική μορφή τους και γι' αυτό το pH επηρεάζει έντονα το φθορισμό τους. Π.χ. η ανιλίνη φθορίζει σε ουδέτερα ή αλκαλικά διαλύματα, όχι όμως σε pH 2, διότι φθορίζει το μόριό της και όχι το κατιόν του ανιλινίου. Αντίθετα, η κινίνη φθορίζει μόνο σε ισχυρώς όξινα διαλύματα. Ορισμένες ουσίες μάλιστα είναι τόσο ευαίσθητες στο pH, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως *φθορισμομετρικοί δείκτες* σε ογκομετρήσεις εξουδετερώσεως, πλεονεκτώντας έναντι των πρωτολυτικών δεικτών ως προς το ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε θολά ή έγχρωμα ή πολύ αραιά διαλύματα. Σε μερικές περιπτώσεις, η επίδραση του pH χρησιμοποιείται για την ελαχιστοποίηση παρεμποδίσεων και για την εκτέλεση φθορισμομετρικής αναλύσεως μείγματος (σελ. 261). Τέλος, η φθορισμομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό σταθερών ιονισμού ασθενών οξέων κατά τρόπο ανάλογο με τη φασματοφωτομετρία (σελ. 214).

4. *Θερμοκρασία*. Αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως συνεπάγεται μείωση της εντάσεως φθορισμού, διότι η αυξανόμενη τυχαία κίνηση των μορίων αυξάνει την πιθανότητα συγκρούσεων μεταξύ των μορίων και συνεπώς την αποδιέγερσή τους με έκλυση θερμότητας. Πολλές ουσίες που δε φθορίζουν σε θερμοκρασία δωματίου, είναι δυνατόν να φθορίζουν όταν διεγείρονται σε χαμηλή θερμοκρασία. Απαιτείται εξισορρόπηση της θερμοκρασίας προτύπων και αγνώστων, καθώς επίσης και

ταχεία ανάγνωση της ενδείξεως φθορισμού για την αποφυγή θερμάνσεως του δείγματος.

5. *Οξυγόνο.* Η παρουσία του οξυγόνου μπορεί να παρεμποδίζει είτε με άμεση οξειδωση της φθορίζουσας ουσίας προς μη φθορίζον προϊόν, είτε με απόσβεση του φθορισμού (π.χ. το ανθρακένιο είναι ευεπηρεαστο στο διαλυμένο οξυγόνο). Γι' αυτό απαιτείται απαέρωση του διαλύματος με διαβίβαση αζώτου, ιδιαίτερα κατά την εργασία σε οργανικούς διαλύτες.

6. *Φωτοδιάσπαση.* Επειδή χρησιμοποιείται ακτινοβολία διεγέρσεως μεγάλης ισχύος, υπάρχει κίνδυνος φωτοδιασπάσεως της φθορίζουσας ουσίας. Γι' αυτό οι μετρήσεις γίνονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα και σε ορισμένες περιπτώσεις επιλέγεται μήκος κύματος ακτινοβολίας διεγέρσεως που δεν απορροφάται ισχυρά.

7. *Συγκέντρωση.* Η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού F εξαρτάται από τη συγκέντρωση c της φθορίζουσας ουσίας (εξισ. 10-7). Το θέμα αυτό εξετάζεται διεξοδικά παρακάτω.

Ποσοτική φθορισμομετρία. Αν και είναι δυνατόν όλη η απορροφούμενη από το μόριο ενέργεια να αποδοθεί ως φθορισμός, συνήθως ένα μέρος της χάνεται με άλλους μηχανισμούς (σελ. 248). Εάν ορισθεί ως *συντελεστής κβαντικής αποδόσεως φθορισμού* (fluorescence quantum yield) Φ ο λόγος

$$\Phi = \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια/s}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια/s}} = \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια}} \quad (10-1)$$

που μπορεί να λάβει τιμές από 0 έως 1, τότε η ισχύς της ακτινοβολίας φθορισμού F είναι ανάλογη της ισχύος της απορροφούμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα και το συντελεστή Φ , δηλαδή

$$F = \Phi(P_0 - P) \quad (10-2)$$

όπου P_0 και P είναι η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της εξερχόμενης ακτινοβολίας, αντίστοιχα. Ο νόμος του Beer (σελ. 168) γράφεται και με τη μορφή

-Αντίστοιχα, η ισχύς ακτινοβολίας φθορισμού F δίνεται από την σχέση

$$F=2,3\Phi P_0 \epsilon bc = k\Phi P_0 \epsilon bc = k'c \quad (10-7)$$

όπου

ϵ = μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας στο μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας διεγέρσεως

b = πάχος κυψελίδας (ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία)

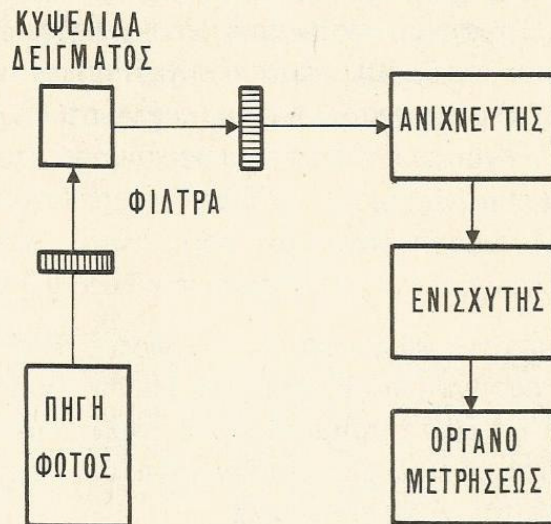
c = συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας (mol/L)

k = σταθερά αναλογίας, που εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διατάξεως μετρήσεως (ο φθορισμός εκπέμπεται προς όλες τις κατευθύνσεις, μετρείται όμως μικρό μέρος αυτού, συνήθως σε γωνία 90° ως προς τη διεγείρουσα ακτινοβολία)

P_0 = ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης (10-7), $F=f(c)$, δίνει καμπύλη αναφοράς, ανάλογη με αυτή που λαμβάνεται με βάση το νόμο του Beer στη φασματοφωτομετρία απορροφήσεως που είναι ευθεία μέχρι μία μέγιστη συγκέντρωση $c_{\text{μεγ}}$, η οποία ορίζεται από τη σχέση $c_{\text{μεγ}} = 0,05/\epsilon b$. Για $c > c_{\text{μεγ}}$ παρατηρούνται αρνητικές αποκλίσεις (γνωστές ως φαινόμενο αναστροφής λόγω συγκεντρώσεως), και τελικά, όταν η απορρόφηση της προσπίπτουσας στο διάλυμα ακτινοβολίας είναι σχεδόν πλήρης, η εξίσωση (10-7) γίνεται $F=k\Phi P_0$, δηλαδή το σήμα του ανιχνευτή γίνεται ανεξάρτητο της συγκεντρώσεως της φθορίζουσας ουσίας. Επειδή η καμπύλη αναφοράς συνήθως καλύπτει ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (δυναμική περιοχή $\sim 10^3$ ή ακόμα και 10^5), πολλές φορές χρησιμοποιούνται διαγράμματα $\log F - \log c$, που λαμβάνονται απ' ευθείας σε λογαριθμικό χάρτη (log-log) πολλών κύκλων.

Στο σχήμα 10-3 παρέχεται σχηματικό διάγραμμα ενός φθορισμομέτρου. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή φωτός διέρχεται από ένα πρωτογενές φίλτρο (φίλτρο διεγέρσεως), το οποίο επιτρέπει τη διόδο μόνον εκείνου του τμήματος της δέσμης φωτός, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη διεγερση των μορίων (το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας διεγέρσεως, συνήθως 95-98%, διέρχεται από την κυψελίδα του δείγματος, χωρίς να απορροφηθεί απ' αυτό). Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις (ο φθορισμός είναι μία ισοτροπική ιδιότητα), συνήθως όμως μετρείται υπό γωνία 90° ως προς τη διεγείρουσα ακτινοβολία, για ελαχιστοποίηση της ανιχνεύσεως της δέσμης διεγέρσεως και της παράσιτης ακτινοβολίας (ευθυγραμμία πηγής φωτός-δείγματος-ανιχνευτή καθιστά προβληματική τη διάκριση της ασθενούς ακτινοβολίας φθορισμού από την ισχυρή ακτινοβολία διεγέρσεως). Η ακτινοβολία φθορισμού διέρχεται από ένα δευτερογενές φίλτρο (φίλτρο φθορισμού), το οποίο επιτρέπει τη διόδο μικρού τμήματός της (από τη μία και από την άλλη μεριά της κορυφής της ταινίας φθορισμού) και προσπίπτει στον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστή). Το σήμα εξόδου του ανιχνευτή ενισχύεται και παρουσιάζεται σε ένα όργανο μετρήσεως (αναλογικό ή ψηφιακό μετρητή, καταγραφέα ή παλμογράφο).



Σχήμα 10-3. Σχηματικό διάγραμμα φθορισμομέτρου.

Τα φασματοφθορισμόμετρα μοιάζουν με τα φασματοφωτόμετρα, περιέχουν όμως δύο μονοχρωμάτορες, για την απομόνωση του επιθυμητού μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως και της ακτινοβολίας φθορισμού. Στο εμπόριο διατίθενται δύο τύποι φασματοφθορισμομέτρων. Στον πρώτο τύπο χρησιμοποιείται φίλτρο για την επιλογή της

ακτινοβολίας διεγέρσεως και φράγμα (ή πρίσμα) για την απομόνωση μιάς κορυφής του φάσματος εκπομπής (στο εμπόριο διατίθενται φασματοφωτόμετρα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φασματοφθορισμόμετρα αυτού του τύπου με την προσθήκη ορισμένων εξαρτημάτων προσαρμογής, δηλαδή: ξεχωριστής πηγής φωτός, υποδοχέα φίλτρων, κυψελίδων και διατάξεως για τον εστιασμό της ακτινοβολίας φθορισμού στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα). Στο δεύτερο τύπο χρησιμοποιούνται δύο φράγματα (ή πρίσματα) για την απομόνωση πολύ στενών τμημάτων της ακτινοβολίας διεγέρσεως και φθορισμού. Τα όργανα του δεύτερου τύπου χρησιμοποιούνται κυρίως για τη λήψη των φασμάτων διεγέρσεως και φθορισμού κατά τη μελέτη των ηλεκτρονικών και δομικών χαρακτηριστικών ενός μορίου και την ταυτοποίηση των ουσιών, μπορούν δε να χρησιμοποιηθούν και στην ποσοτική ανάλυση, όπου όμως είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τα φθηνότερα φασματοφθορισμόμετρα του πρώτου ή ακόμα καλύτερα τα συγκριτικώς πολύ φθηνότερα φθορισμόμετρα. Πολλά φασματοφθορισμόμετρα διαθέτουν και δεύτερο ανιχνευτή (αναφοράς), για τον έλεγχο της σταθερότητας της εντάσεως της ακτινοβολίας διεγέρσεως κατά τη διάρκεια των μετρήσεων.

Για την ίδια πηγή φωτός, τα φίλτρα επιτρέπουν τη διόδο δέσμης φωτός μεγαλύτερου εύρους από ό,τι οι μονοχρωμάτορες (σελ. 183), επομένως και μεγαλύτερης ισχύος P_0 , καθιστώντας έτσι τα φθορισμόμετρα περισσότερο ευαίσθητα από τα φασματοφθορισμόμετρα.

Οι βασικές μονάδες των φθορισμομέτρων και φασματοφθορισμομέτρων διαφέρουν μόνο ως προς τις λεπτομέρειες από τις αντίστοιχες μονάδες των φωτομέτρων και φασματοφωτομέτρων, γι' αυτό παρακάτω εξετάζονται κυρίως οι διαφορές αυτές.

Πηγές φωτός. Στη φθορισμομετρία απαιτείται πολύ ισχυρότερη πηγή από τη λυχνία βολφραμίου ή υδρογόνου, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη φασματοφωτομετρία (σελ. 181). Χρησιμοποιούνται συνήθως: α) λυχνία τόξου υδραργύρου υψηλής πίεσεως, η οποία παρέχει γραμμικό φάσμα με εντονότερη γραμμή στα 366 nm, β) λυχνία τόξου υργαργύρου χαμηλής πίεσεως, με εντονότερη γραμμή στα 254 nm, γ) λυχνία τόξου υδραργύρου χαμηλής πίεσεως με επικάλυψη φωσφόρου, με ταινιωτό φάσμα εκπομπής από 300-400 nm και μέγιστο στα 360-365 nm, και δ) λυχνία τόξου αερίου ξένου, η οποία παρέχει συνεχές φάσμα στην περιοχή 250-600 nm (μέγιστο στα ~470 nm). Ακτινοβολίες με $\lambda < 300$ nm είναι επικίνδυνες για τους οφθαλμούς, γι' αυτό ουδέποτε πρέπει να βλέπουμε με γυμνούς οφθαλμούς μία πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας μικρών μηκών κύματος. Επίσης απαιτείται καταστροφή του παραγόμενου, στο χώρο της λυχνίας ξένου, όζοντος, με ειδική συ-

σκευή. Κατά τα τελευταία έτη χρησιμοποιούνται ως πηγές ακτινοβολίας οι λέηζερ (lasers), που είναι ενισχυτές φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή, κύρια πλεονεκτήματα των οποίων είναι ο υψηλός βαθμός μονοχρωματικότητας και η μεγάλη ισχύς της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Όταν απαιτείται υπεριώδης ακτινοβολία για τη διέγερση, χρησιμοποιούνται οι λέηζερ χρωστικών με επιλογή μήκους κύματος (tunable dye lasers), που είναι όμως υψηλού κόστους.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας μιάς πηγής φωτός είναι η σταθερότητα και η έντασή της. Χρησιμοποίηση σταθεροποιητή τάσεως στο τροφοδοτικό της πηγής και ψύξη αυτής ενισχύουν τη σταθερότητά της. Η ένταση της πηγής πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη (μεγάλο P_0), χωρίς όμως να μειώνει τη σταθερότητα της λυχνίας. Μεταβολές στην ένταση της πηγής και στην απόκριση του ανιχνευτή, που οφείλονται στην παλαιώση (γήρανσή) τους, επιβάλλουν τη βαθμονόμηση του οργάνου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ράβδοι υάλου, που περιέχουν άλατα ουρανίου, ή πρότυπο διάλυμα θειικής κινίνης.

Επιλογείς μηκών κύματος. Χρησιμοποιούνται φίλτρα υάλου ή αποκοπής ή συμβολής (σελ. 183). Τα περισσότερα από τα φασματοφθορισμόμετρα περιέχουν φράγματα. Τα φίλτρα επιτρέπουν τη δίοδο μεγαλύτερου κλάσματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως από ό,τι τα φράγματα, λόγω του μεγαλύτερου εύρους ταινίας των φίλτρων (σελ. 183). Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα μεν για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων, γίνεται όμως μειονέκτημα, όταν συνυπάρχουν παρεμποδίζουσες ουσίες, που διεγείρονται σε συχνότητες παραπλήσιες με την προσδιοριζόμενη ουσία, οπότε απαιτείται κατά το δυνατόν μονοχρωματική ακτινοβολία (πρέπει να συνεξετάζονται η απαιτούμενη εκλεκτικότητα και η ευαισθησία). Κατά τη λήψη ενός φάσματος διεγέρσεως, είναι προτιμότερο το εύρος των σχισμών του μεν μονοχρωμάτορα διεγέρσεως να είναι μικρό (για την επίτευξη καλής διαχωριστικότητας), του δε μονοχρωμάτορα εκπομπής μεγάλο (για την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας). Το αντίστροφο ισχύει για τη λήψη φάσματος εκπομπής.

Ανιχνευτές. Χρησιμοποιούνται σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα φωτοπολλαπλασιαστές, λόγω της μικρής εντάσεως της ακτινοβολίας φθορισμού. Οι συνήθως χρησιμοποιούμενοι έχουν μέγιστο φασματικής αποκρίσεως στην περιοχή 300-500 nm. Για μετρήσεις φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος προτιμάται ειδική φωτολυχνία, ευαίσθητη στην ερυθρή περιοχή.

Θάλαμος κυψελίδων. Χρησιμοποιούνται ορθογώνιες ή κυλινδρικές κυψελίδες από ύαλο ή χαλαζία, που συνήθως τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο κάνιστρο. Ο θάλαμος κυψελίδων είναι επιμελώς μαυρι-

σμένος εσωτερικώς και είναι έτσι κατασκευασμένος, ώστε οποιαδήποτε σκεδαζόμενη ακτινοβολία, που δεν εξέρχεται από το θάλαμο ή δεν απορροφάται από το δείγμα, να απορροφάται από τα μαύρα τοιχώματα του θαλάμου και να μην εξέρχεται μαζί με την ακτινοβολία φθορισμού. Αυτό είναι απαραίτητο, διότι περισσότερο από το 95% της ακτινοβολίας διεγέρσεως συνήθως δεν απορροφάται από το διάλυμα, αλλά διέρχεται απ' αυτό. Εκτός από τη συνήθη διάταξη μετρήσεως της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας σε ορθή γωνία, χρησιμοποιείται και η διάταξη μετρήσεως υπό γωνία 45° (τεχνική φθορισμού εμπρόσθιας όψεως, front face fluorescence technique), κατάλληλη για πολύ αραιά ή θολά διαλύματα. Εκτός από τις κλασικές κυψελίδες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικροκυψελίδες (ιδιαίτερα με λήξερς) και κυψελίδες ροής.

Η χρησιμοποίηση μικροεπεξεργαστών στα φθορισμόμετρα και τα φασματοφθορισμόμετρα κατά τα τελευταία έτη βελτίωσε σημαντικά τη λειτουργία τους και κατέστησε δυνατή την αυτοματοποίηση πολλών διεργασιών (προγραμματισμός λήψεως φασμάτων, λήψη φασμάτων, λήψη διορθωμένων φασμάτων, αυτόματη βαθμονόμηση, λήψη φασμάτων με σύγχρονη σάρωση των δύο μονοχρωματόρων κλπ).

Κατά τη λήψη των φασμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο σκεδασμός ακτινοβολίας από το διαλύτη, φαινόμενο που είναι έντονο όταν χρησιμοποιείται ακτινοβολία διεγέρσεως μεγάλης ισχύος. Εμφανίζονται έτσι δύο ζώνες εκπομπής, από τις οποίες η μία έχει το ίδιο μήκος κύματος με τη διεγείρουσα ακτινοβολία (σκεδασμός Rayleigh), ενώ η άλλη αντιστοιχεί σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (σκεδασμός Raman). Η διαφορά συχνότητας $\Delta\nu$ μεταξύ ακτινοβολίας διεγέρσεως και ακτινοβολίας Raman εξαρτάται μόνο από το διαλύτη και είναι ανεξάρτητη από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως.

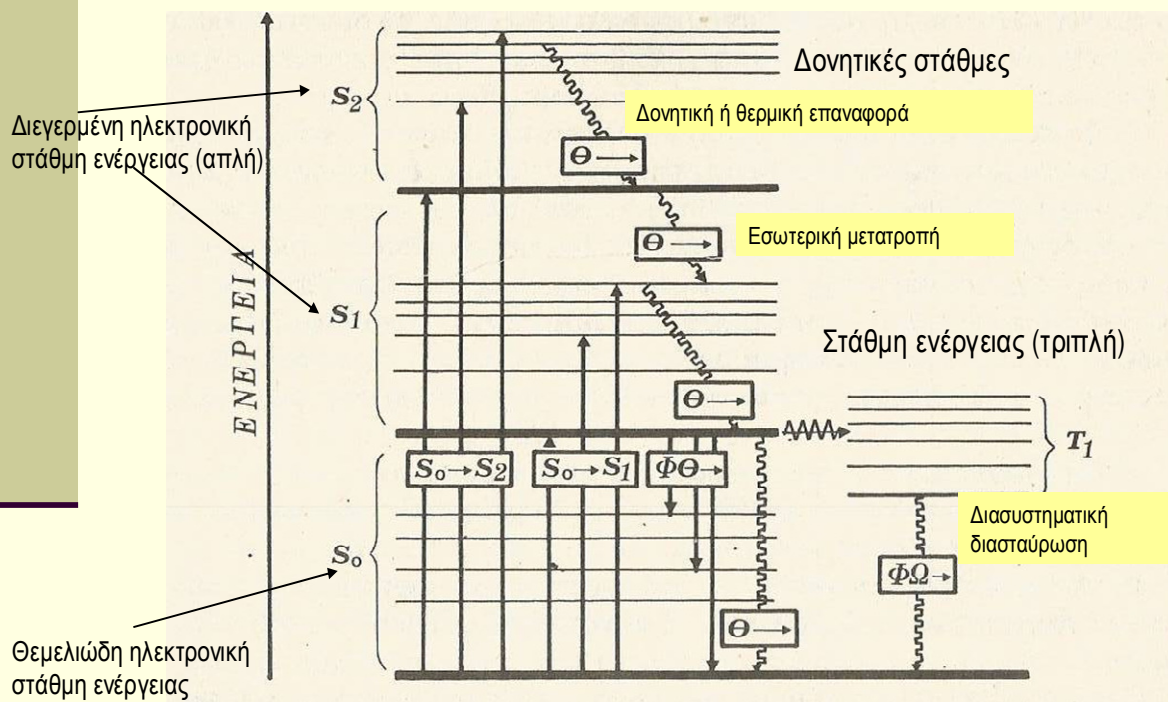
10-3. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

Η φθορισμομετρία, εξαιτίας της αυξημένης ευαισθησίας και εκλεκτικότητάς της, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη χημική ανάλυση, κατ' εσχολήν δε στον προσδιορισμό της συγκεντρώσεως πολύ αραιών διαλυμάτων (10^{-4} – 10^{-9} M). Ιδιαίτερη σπουδαιότητα έχουν οι εφαρμογές της φθορισμομετρίας στη Φαρμακευτική Ανάλυση, την Τοξικολογία, την Κλινική Χημεία, την Εγκληματολογία, τη Βιοχημεία, την Ιατρική, τη Χημεία Τροφίμων, τη Χημεία Φυσικών Προϊόντων, την Περιβαλλοντική Χημεία (μελέτη της μόλυνσεως της ατμόσφαιρας) κλπ.

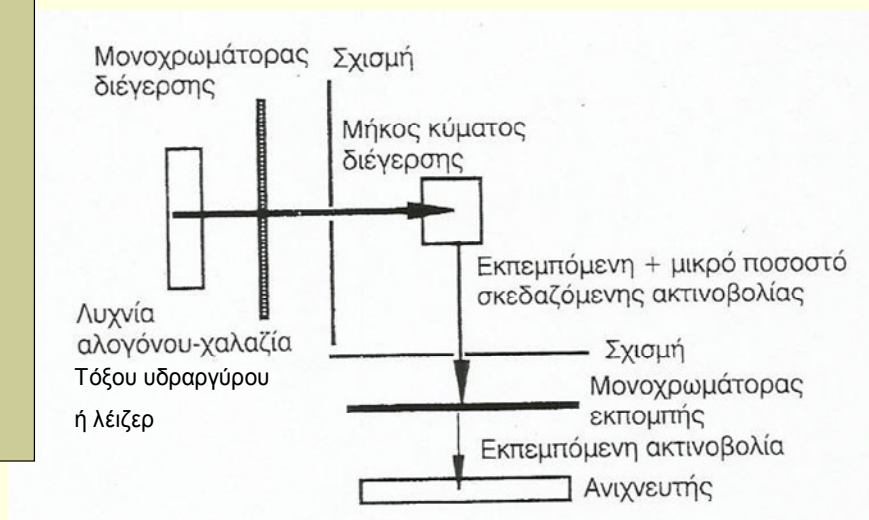
Η φθορισμομετρική ανάλυση μπορεί να είναι είτε άμεση, όταν η προσδιοριζόμενη ουσία φθορίζει σημαντικά, ή έμμεση, όταν η ουσία φθορίζει ελάχιστα ή καθόλου, μπορεί όμως να μετατραπεί σε εντόνως φθορίζον προϊόν με κατάλληλη χημική αντίδραση, ή να προκαλεί ενί-

ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

Μηχανισμός φθορισμού, φωσφορισμού



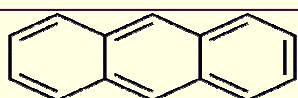
Οργανολογία



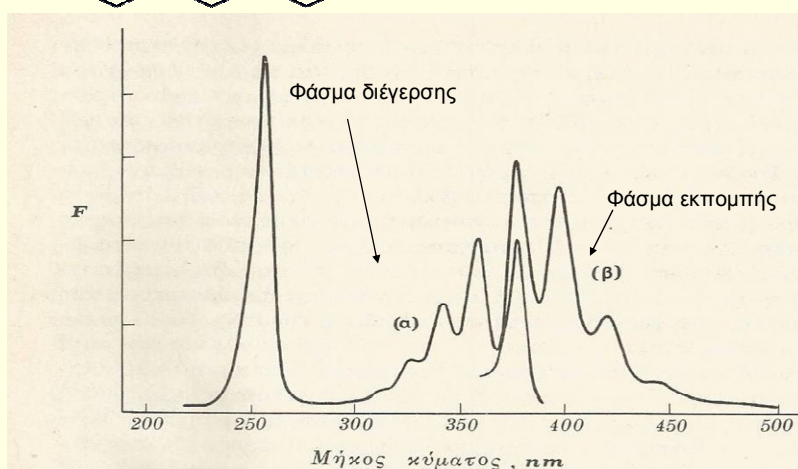
Φάσμα διέγερσης: λ_{\max} φθορισμού, σάρωση στα διάφορα λ ακτινοβολίας διέγερσης

Φάσμα εκπομπής: λ_{\max} διέγερσης, σάρωση στα διάφορα λ ακτινοβολίας εκπομπής

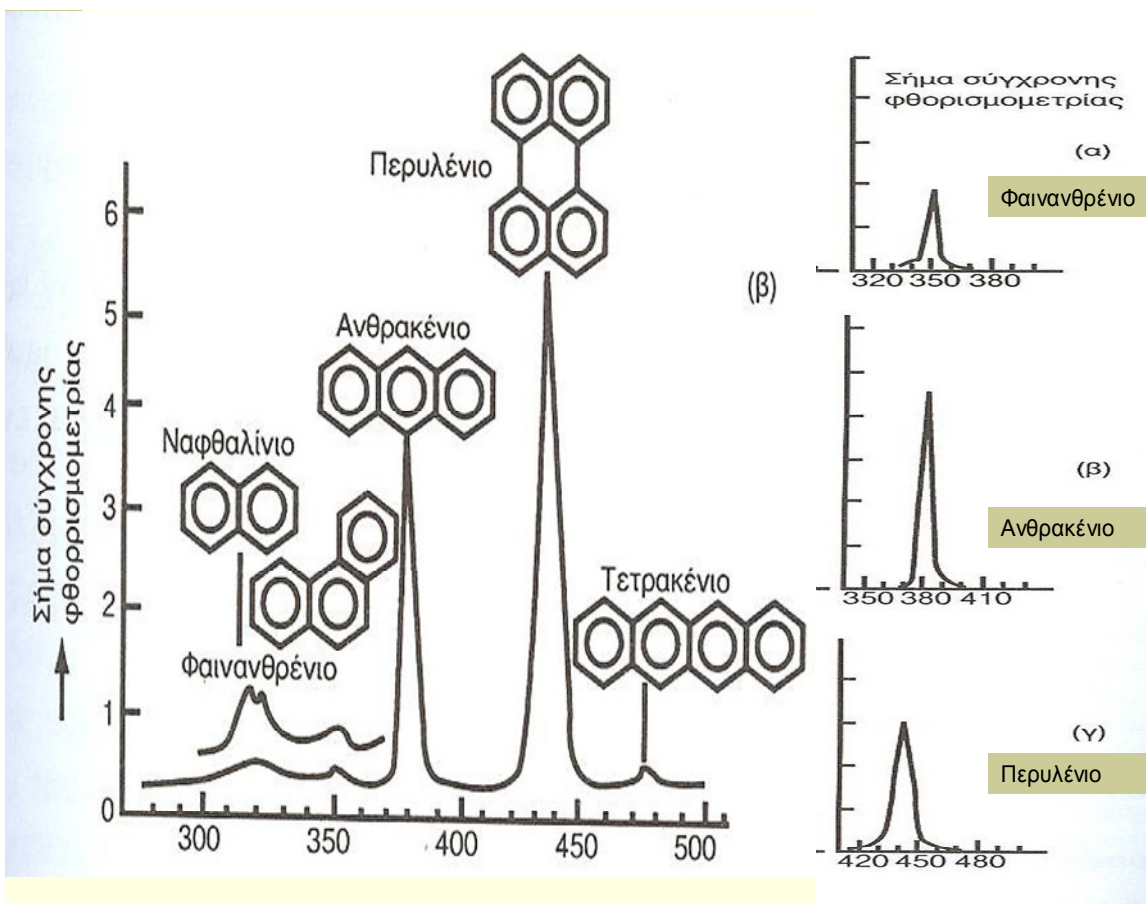
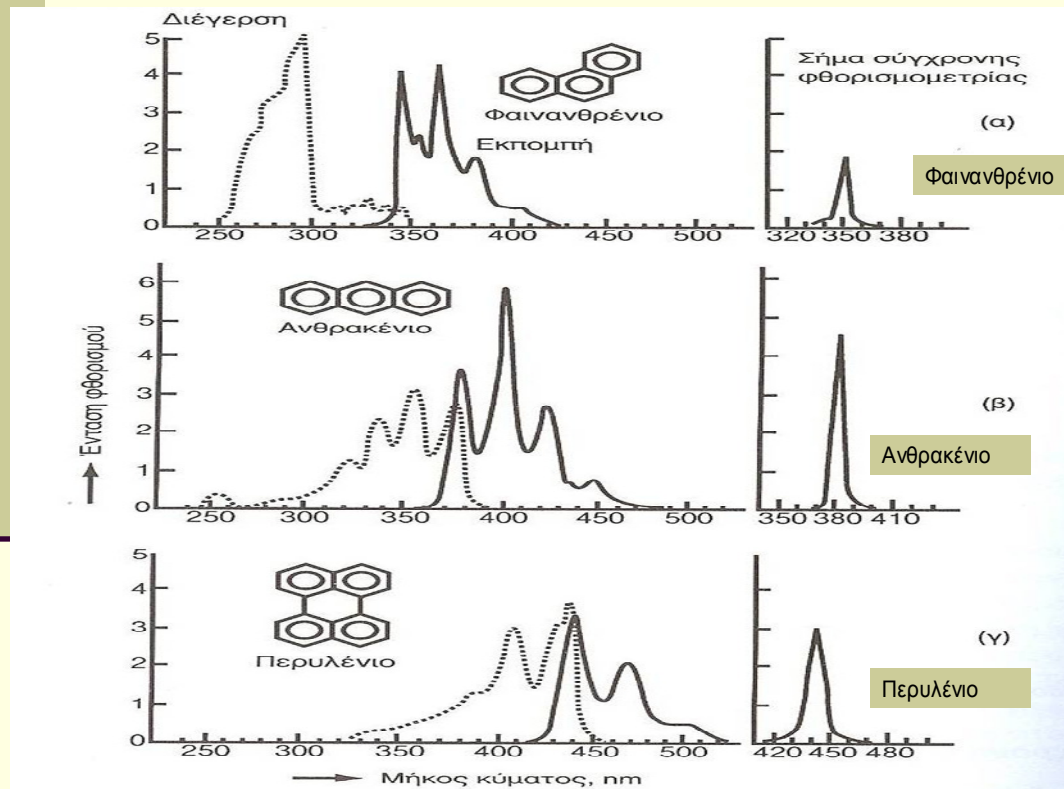
Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής



Ανθρακένιο



Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής



Παράγοντες που επιδρούν στον φθορισμό

- Ύπαρξη χρωμοφόρων ομάδων για απορρόφηση UV
- Ακαμψία μορίου (αυξάνει με την επιπεδότητα)
- Διεγέρσεις $\eta \rightarrow \pi^*$ δημιουργούν διασυστηματική διασταύρωση $S_1 \rightarrow T_1$ μειώνουν φθορισμό
- Διεγέρσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ αυξάνουν φθορισμό
- Ύπαρξη υποκαταστατών
 - α) ηλεκτρονιοδότες ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) αυξάνουν
 - β) ηλεκτρονιόφιλες $-\text{COOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{N}=\text{N}$, Cl , Br , I , μειώνουν
- Σχηματισμός χηλικών ενώσεων με μεταλλοίοντα, αυξάνει φθορισμό
- Ξένα μόρια (απορροφούν ακτινοβολία διέγερσης ή φθορισμού)
- Διαλύτης (αυξάνει με τη πολικότητα και το ιξώδες του διαλύτη)
- pH. (π.χ. ανιλίνη φθορίζει σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH και όχι σε όξινο)
- Θερμοκρασία. Αύξηση θερμοκρασίας συνεπάγεται μείωση φθορισμού
- Παρουσία οξυγόνου παρεμποδίζει
- Συγκέντρωση (αναλογική επίδραση)

ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

$$\Phi = \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια/s}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια/s}} = \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια}}$$

Συντελεστής
απόδοσης
Φθορισμού

που μπορεί να λάβει τιμές από 0 έως 1,

$$F = 2,3 \Phi P_0 \epsilon b c = k \Phi P_0 \epsilon b c = k' c$$

Ισχύς
ακτινοβολίας
Φθορισμού

όπου

ϵ = μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας στο μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας διεγέρσεως

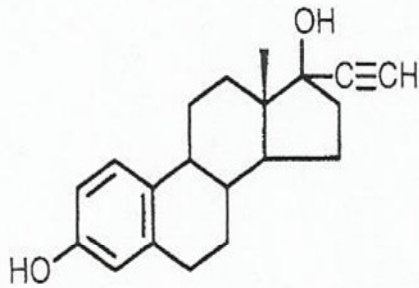
b = πάχος κυψελίδας (ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία)

c = συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας (mol/L)

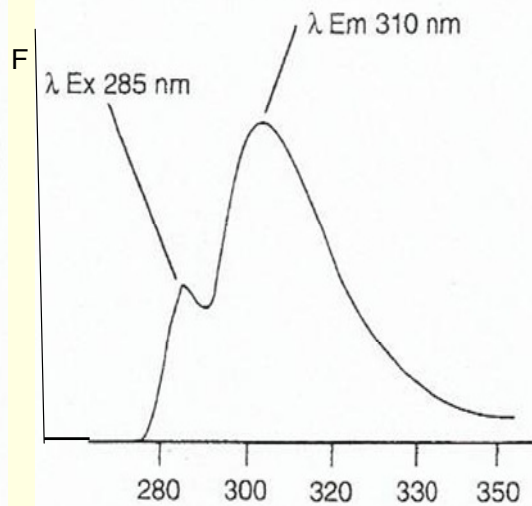
k = σταθερά αναλογίας, που εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτη-

Εφαρμογές φθορισμομετρίας

➤ Προσδιορισμός αιθινυλοιστραδιόλης σε δισκία



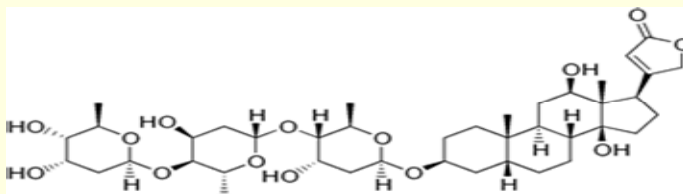
Αιθινυλοιστραδιόλη



Εφαρμογές φθορισμομετρίας

➤ Προσδιορισμός ρυθμού διαλυτοποίησης δισκίων (100μg/mL) διγοξίνης

$\lambda_{\text{Διέγερσης}}$ 360nm , $\lambda_{\text{εκπομπής}}$ 490nm

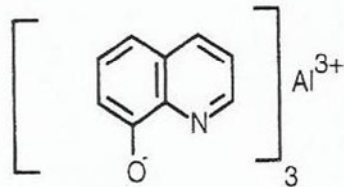


-Αφυδάτωση με HCL

-οξειδωση με H₂O₂

➤ Προσδιορισμός αργιλίου, σε νερό για ενέσιμα, ως φθορίζον σύμπλοκο

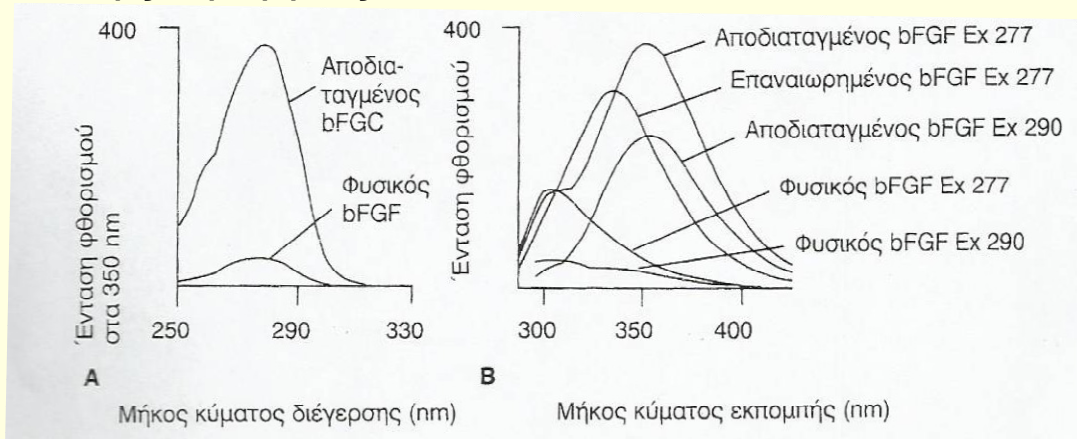
$\lambda_{\text{Διέγερσης}}$ 392nm , $\lambda_{\text{εκπομπής}}$ 518nm



Άλας αργιλίου με 8-υδροξικινολίνη

Εφαρμογές φθορισμομετρίας

- Προσδιορισμός σταθερότητας πεπτιδικών φαρμάκων σε διάλυμα
 - έλεγχος ανεπιθύμητων προσμίξεων (π.χ. ανοσογόνες πρωτεΐνες)
 - αλλαγές στη δομή τους



Εφαρμογές φθορισμομετρίας

Κλινική Παθολογία, Βιοχημεία, Φαρμακολογία	
Στεροειδή	κορτικοστεροειδή, οιστρογόνα, προγεστερόνη, ανδρογόνα, τεστοστερόνη.
Λιπίδια	χοληστερόλη, τριγλυκερίδια.
Αμινοξέα και μεταβολίτες	τρυπτοφάνη, σεροτονίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, κατεχολαμίνες, ιστιδίνη κρεατίνη.
Ανοσολογία	φθοριοανοσολογικοί προσδιορισμοί.
Ένζυμα	δεϋδρογονάσες, τρανσαμινάσες, φωσφατάσες, πρωτεάσες, λιπάσες, LDH-ισοένζυμα, περοξειδάσες.
Φάρμακα	βαρβιτουρικά, σαλκυκλικά, κινιδίνη, LSD, τετρακυκλίνες, μορφίνη.
Μεταβολίτες	γλυκόζη αίματος, πορφυρίνες, καρβονικά οξέα.
Βιταμίνες	A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , C και E
Ανόργανη Χημεία	
Ανιόντα	κυανιούχα, φθοριούχα, θειικά, φωσφορικά.
Κατιόντα	αργίλιο, αρσενικό, βηρύλλιο, βόριο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σπάνιες γαίες, σελήνιο, ουράνιο.
Περιβάλλον	
Ανίχνευση εκκρεόντων ρευμάτων, ταχύτητα διαλυτοποίησης ρύπων, προσδιορισμός χλωροφύλλης, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ανάλυση πετρελαίου, ταχύτητα ροής ποταμών και ρευμάτων.	
Βιομηχανία τροφίμων	
Αρωματικά και άλλα πρόσθετα, αφλατοξίνες.	