

Π.Χ. ΙΩΑΝΝΟΥ
Καθηγήτρια
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ
“ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ”

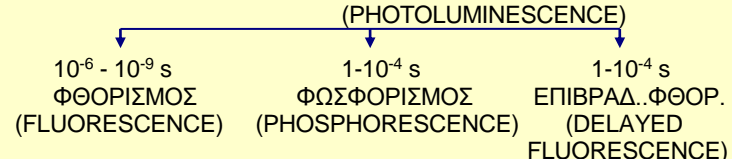
ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

Ορισμοί

Ο όρος *φωταύγεια* (luminescence) ή "ψυχρή ακτινοβολία" περιλαμβάνει όλους τους τύπους ακτινοβολίας εκτός από τη θερμική ακτινοβολία, ή ακτινοβολία μέλανος σώματος (incandescence), που εκπέμπουν τα πυρακτωμένα σώματα λόγω της υψηλής τους θερμοκρασίας.

Ένα σύστημα, το οποίο εκπέμπει φωταύγεια, χάνει συνεχώς ενέργεια με συνέπεια να απαιτείται για τη συνέχιση του φαινομένου η παροχή κάποιας μορφής ενέργειας. Οι κατηγορίες φωταύγειας σχετίζονται με την πηγή της ενέργειας διέγερσης. Στον πίνακα 1.1 συνοψίζονται τα κυριότερα είδη φωταύγειας.

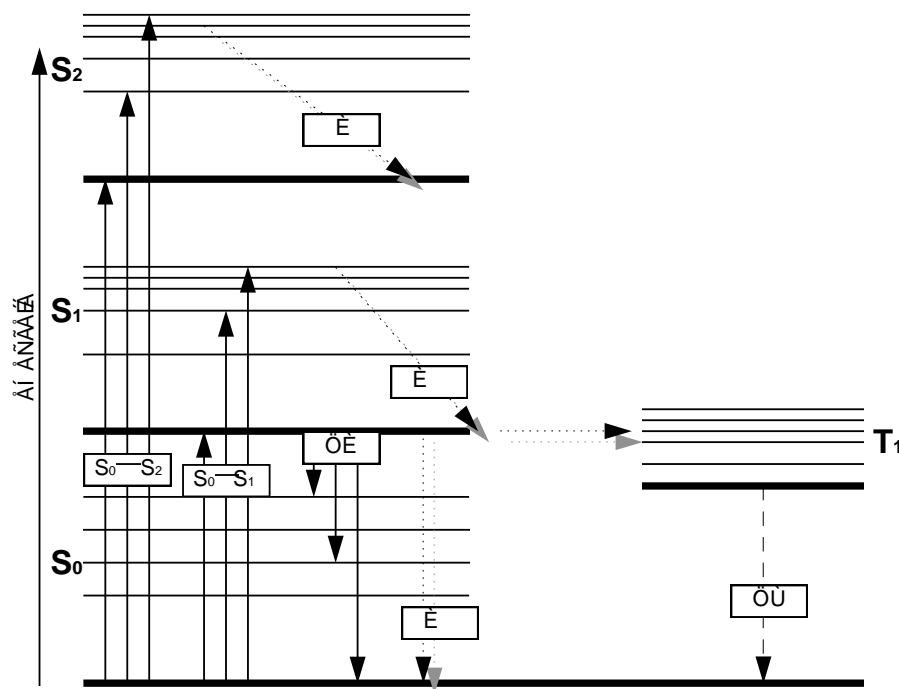
Πίνακας 1.1.
Πηγές ενέργειας και κυριότερα είδη φωταύγειας

ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (LUMINESCENCE)	
ΠΗΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	ΕΙΔΟΣ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΡΕΥΜΑ	ΗΛΕΚΤΡΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (ELECTROLUMINESCENCE)
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	ΡΑΔΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (RADIOLUMINESCENCE)
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (CHEMILUMINESCENCE)
ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (BIOLUMINESCENCE)
ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ	ΘΕΡΜΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (THERMOLUMINESCENCE)
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΡΙΒΗΣ	ΤΡΙΒΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (TRIBOLUMINESCENCE)
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΦΩΤΟΝΙΩΝ	ΦΩΤΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (PHOTOLUMINESCENCE)
	 <p>The diagram shows a horizontal line with three arrows pointing downwards to the following categories:</p> <ul style="list-style-type: none">$10^{-6} - 10^{-9}$ s ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (FLUORESCENCE)$1 - 10^{-4}$ s ΦΩΣΦΟΡΙΣΜΟΣ (PHOSPHORESCENCE)$1 - 10^{-4}$ s ΕΠΙΒΡΑΔ..ΦΘΟΡ. (DELAYED FLUORESCENCE)

Το πιο αξιοποιημένο είδος φωταύγειας είναι η φωτοφωταύγεια, διότι επιτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό από τα άλλα είδη φωταύγειας τον πειραματικό έλεγχο της διέγερσης με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας .

Μηχανισμοί φωτοφωταύγειας

Όταν ένα μόριο απορροφά φωτεινή ακτινοβολία, τα ηλεκτρόνιά του μεταβαίνουν από τη χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη σε κάποια από τις διεγερμένες. Η αποβολή της απορροφούμενης ενέργειας μπορεί να συμβεί μέσω μη ακτινοβόλων διαδικασιών με παραγωγή θερμότητας, ή ακόμη με μεταφορά της ενέργειας του μορίου σε άλλο μόριο. Επίσης, το μόριο μπορεί να αποβάλλει μέρος της απορροφούμενης ενέργειας με ακτινοβολία φθορισμού, φωσφορισμού ή επιβραδυνόμενου φθορισμού, ανάλογα με το μηχανισμό εκπομπής ακτινοβολίας (σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1.

Ενεργειακές στάθμες και μεταπτώσεις μορίου φθορίζουσας ένωσης. S_0, S_1 και S_2 = θεμελιώδης, πρώτη και δεύτερη διεγερμένη απλή κατάσταση, αντίστοιχα. T_1 = πρώτη τριπλή κατάσταση, \uparrow ή \downarrow = μετάπτωση οφειλόμενη σε απορρόφηση ή εκπομπή ακτινοβολίας, αντίστοιχα, $\cdots \rightarrow$ = μετάπτωση μη συνεπαγομένη απορρόφηση ή εκπομπή ακτινοβολίας, Θ = έκλυση θερμότητας, $\Phi\Theta$ = εκπομπή φωσφορισμού.

Φθορισμός (Fluorescence)

Ο φθορισμός είναι μία διαδικασία τριών σταδίων, η οποία λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα μόρια (συνήθως πολυαρωματικούς ή ετεροκυκλικούς υδρογονάνθρακες), τα οποία ονομάζονται φθορισμοφόρα (fluorophores ή fluorescent dyes).

Στάδιο 1. Διέγερση

Σε θερμοκρασία δωματίου τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη χαμηλότερη δονητική στάθμη της θεμελιώδους ηλεκτρονικής κατάστασης, S_0 .

Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα μόριο -μία διαδικασία που διαρκεί $\sim 10^{-15}$ s-, συνεπάγεται μετάπτωση ηλεκτρονίων από μη δεσμικά (n) 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, S_n . Κάθε κατάσταση αποτελείται από αριθμό δονητικών και περιστροφικών σταθμών. Κατά την επιτρεπόμενη $S_0^{\text{TM}}S_1$ μετάπτωση απορροφάται ακτινοβολία που αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά των S_1 και S_0 καταστάσεων.

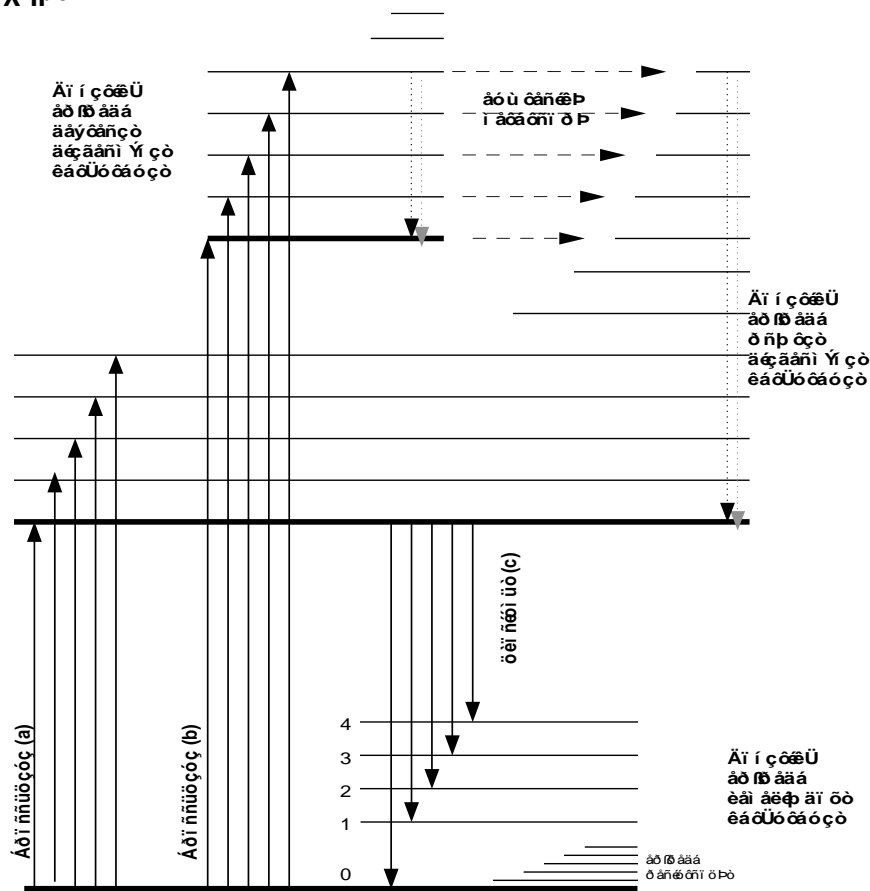
Στάδιο 2. Διεγερμένη κατάσταση - Χρόνος ζωής

Ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης κυμαίνεται μεταξύ 1 και 10 nsec. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρόνου το φθορισμοφόρο μόριο υφίσταται αλλαγές διαμόρφωσης (conformational changes) και υπόκειται σε μεγάλο αριθμό πιθανών αλληλεπιδράσεων με το μοριακό του περιβάλλον. Οι παραπάνω διαδικασίες έχουν δύο σημαντικές συνέπειες :

⇒ Κατά την αποδιέγερση του μορίου από μία υψηλότερη δονητική στάθμη οποιασδήποτε διεγερμένης κατάστασης μέρος της δονητικής ενέργειας χάνεται λόγω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη με μια διαδικασία που λέγεται *θερμική επαναφορά* (vibrational or thermal relaxation), και λαμβάνει χώρα σταδιακά -κάθε στάδιο διαρκεί 10^{-14} - 10^{-13} sec (σχ. 1.1 και 1.2). Επίσης, εξαιτίας της μερικής επικάλυψης των ανώτερων διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων, επιτυγχάνεται ταχύτατα η διεργασία της *εσωτερικής μετατροπής* (internal conversion), οπότε το μόριο ξαναχάνει την περίσσεια της δονητικής του ενέργειας. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω διαδικασιών τα μόρια που μετέβηκαν σε υψηλότερες δονητικές στάθμες επανέρχονται ταχέως στη χαμηλότερη δονητική στάθμη 0 της S_1 (σχ. 1.2). Από τη στάθμη αυτή το όριο μπορεί να γυρίσει σε οποιαδήποτε από τις δονητικές στάθμες της θεμελιώδους κατάστασης εκπέμποντας φθορισμό (μετάπτωση c, σχ. 1.2).

⇒ Στην ιδανική περίπτωση, όπου όλα τα μόρια που απορροφούν ακτινοβολία επιστρέφουν στη θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας φθορισμό, η κβαντική απόδοση φθορισμού θα είναι ίση με τη μονάδα. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις, ένα ποσοστό μορίων μπορεί να επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση με άλλους μηχανισμούς - για παράδειγμα με μετάπτωση στην τριπλή κατάσταση ή με το να υποστούν φωτοχημική αντίδραση είτε στην πρώτη, είτε σε υψηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Στις περιπτώσεις αυτές η κβαντική απόδοση του φθορισμού θα είναι μικρότερη της μονάδας ή ακόμα και σχεδόν μηδενική.

Σχήμα 1.2.



Οι μεταπτώσεις που αφορούν στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού (.....TM = μετάπτωση συνεπαγόμενη αποβολή θερμικής ενέργειας).

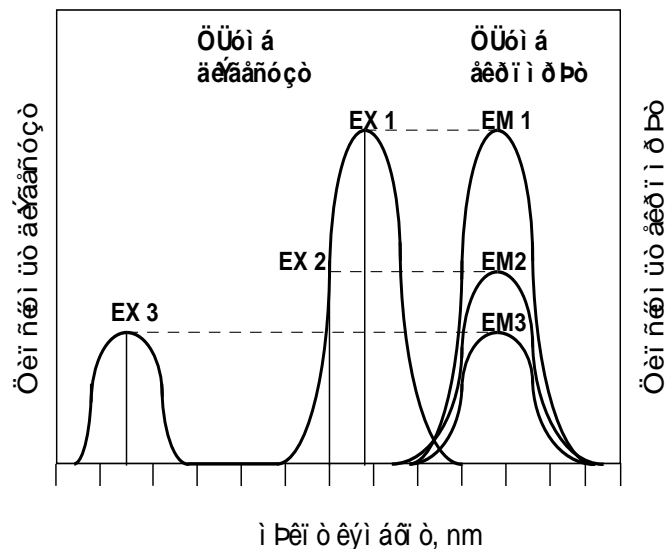
Στάδιο 3. Εκπομπή φθορισμού - Φάσματα

Με πολύ λίγες εξαιρέσεις, ο φθορισμός πάντα εκπέμπεται από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη της πρώτης διεγερμένης κατάστασης. Εκπομπή ενός φωτονίου $h\nu_{em}$, έχει ως αποτέλεσμα την επιστροφή του φθορισμοφόρου στη θεμελιώδη κατάσταση, S_0 .

Το γεγονός ότι σε θερμοκρασία δωματίου η απορρόφηση λαμβάνει χώρα σχεδόν αποκλειστικά από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη της θεμελιώδους κατάστασης, ενώ η εκπομπή λαμβάνει χώρα αποκλειστικά από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη της πρώτης διεγερμένης κατάστασης εξηγεί ότι μία μόνο μετάπτωση, γνωστή ως 0-0 μετάπτωση, είναι κοινή και στα δύο φάσματα απορρόφησης και εκπομπής. Αντίθετα, όλες οι άλλες μεταπτώσεις στην απορρόφηση (μετάπτωση a, σχ. 1.2) απαιτούν περισσότερη ενέργεια από όλες τις παρατηρούμενες μεταπτώσεις στο φάσμα εκπομπής (μετάπτωση c, σχ. 1.2). Αυτό σημαίνει ότι το φάσμα εκπομπής φθορισμού επικαλύπτει την υψηλότερη ζώνη απορρόφησης σε μήκος κύματος, που αντιστοιχεί στην 0-0 μετάπτωση, ενώ το υπόλοιπο του φάσματος εκπομπής τοποθετείται σε μήκη κύματος μεγαλύτερα αυτών του φάσματος απορρόφησης.

Με λίγες εξαιρέσεις το φάσμα εκπομπής είναι σχεδόν είδωλο της πρώτης ζώνης απορρόφησης, γιατί η κατανομή των δονητικών σταθμών στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση είναι αυτή, η οποία και καθορίζει το σχήμα του φάσματος εκπομπής φθορισμού (σχ. 1.2).

Κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, το φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης, λόγω της μερικής απώλειας ενέργειας κατά τη διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης (σχ. 1.3). Ωστόσο, η ισχύς της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της διέγερσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος (σχ.1.3).



Σχήμα 1.3.

Διέγερση φθορισμοφόρου σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος (EX1, EX2, EX3) δεν αλλάζει τη μορφή του φάσματος εκπομπής αλλά προκαλεί διαφοροποιήσεις στην ισχύ του εκπεμπόμενου φθορισμού (EM1, EM2, EM3).

Η διαφορά ενέργειας, $h\nu_{ex} - h\nu_{em}$, μεταξύ των μεγίστων των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής ονομάζεται μετατόπιση κατά Stokes'. Η μετατόπιση Stokes' επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία των τεχνικών φθορισμού.

Η όλη διαδικασία φθορισμού είναι κυκλική. Αν δεν καταστρέφεται το φθορισμοφόρο στη διεγερμένη κατάσταση, ένα σημαντικό φαινόμενο γνωστό ως *φωτολεύκανση**, το ίδιο φθορισμοφόρο μπορεί να διεγείρεται και να ανιχνεύεται επανειλημμένα.

Θεωρητικά, ένα φθορισμοφόρο με υψηλή κβαντική απόδοση και χρόνο ζωής φθορισμού 5ns μπορεί να διεγερθεί πάνω από 200×10^6 φορές το δευτερόλεπτο και να εκπέμψει τον ίδιο αριθμό φωτονίων.

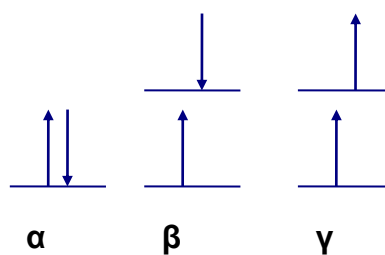
Σε διαλύματα πολυατομικών μορίων, οι μεταπτώσεις που αντιστοιχούν στο $h\nu_{ex}$ και $h\nu_{em}$ εμφανίζονται ως πλατύ ενεργειακό φάσμα - φάσμα διέγερσης και φάσμα εκπομπής φθορισμού, αντίστοιχα. Το εύρος των κορυφών αυτών των φασμάτων αποτελεί παράμετρο ιδιαίτερης σημασίας για εφαρμογές, στις οποίες δύο ή περισσότερα φθορισμοφόρα ανιχνεύονται ταυτόχρονα.

Ηλεκτρονικές μεταπτώσεις φθορισμού

Στη θεμελιώδη απλή κατάσταση (S_0) τα ηλεκτρόνια του μορίου (που βρίσκονται σε δεσμικά (π) ή μη δεσμικά (n) τροχιακά) έχουν αντιπαράλληλα σπιν (συνολικό σπιν=0). Όταν ένα ηλεκτρόνιο κατά τη διέγερση μεταβεί σε ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο σε αντιδεσμικά (π^*) τροχιακά μπορεί να λάβουν χώρα δύο διεργασίες: i) το διεγερμένο ηλεκτρόνιο να διατηρεί αντιπαράλληλο σπιν ως προς το

*Κάτω από συνθήκες ισχυρής ακτινοβολίας, η αμετάκλητη/irreversible καταστροφή ή φωτολεύκανση των διεγερμένων φθορισμοφόρων αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανίχνευση φθορισμού. Πρόσφατες μελέτες δίνουν λεπτομερή περιγραφή των πολλαπλών φωτοχημικών πορειών που είναι υπεύθυνες για τη φωτολεύκανση της φλουορεσκεΐνης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η φωτολεύκανση προέρχεται από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση η οποία δημιουργείται από την απλή κατάσταση S_1 μέσω της ενδοσυστηματικής διασταύρωσης.

έτερο ηλεκτρόνιο, οπότε η διεγερμένη κατάσταση είναι απλή (S_1) και ii) το διεγερμένο ηλεκτρόνιο να αποκτήσει σπιν παράλληλο με αυτό του άλλου ηλεκτρονίου, δηλαδή να συμβεί αναστροφή του σπιν και η διεγερμένη κατάσταση είναι *τριπλή* (T_1) (σχήμα 3.1). Κατά τη διέγερση λαμβάνουν χώρα μόνο μεταπτώσεις S-S λόγω του ότι οι S-T μεταπτώσεις έχουν πολύ μικρή πιθανότητα να συμβούν και καλούνται απαγορευμένες. Κατά την εκπομπή ακτινοβολίας μπορεί να συμβεί μετάπτωση S-S με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού, αλλά μπορεί η απλή διεγερμένη κατάσταση να μεταφέρει την ενέργειά της στην τριπλή διεγερμένη και στη συνέχεια να μεταπέσει στην αρχική κατάσταση. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ο φωσφορισμός. Να σημειωθεί ότι, η τριπλή διεγερμένη κατάσταση βρίσκεται χαμηλότερα ενεργειακά από την αντίστοιχη απλή.



Σχήμα 1.4.

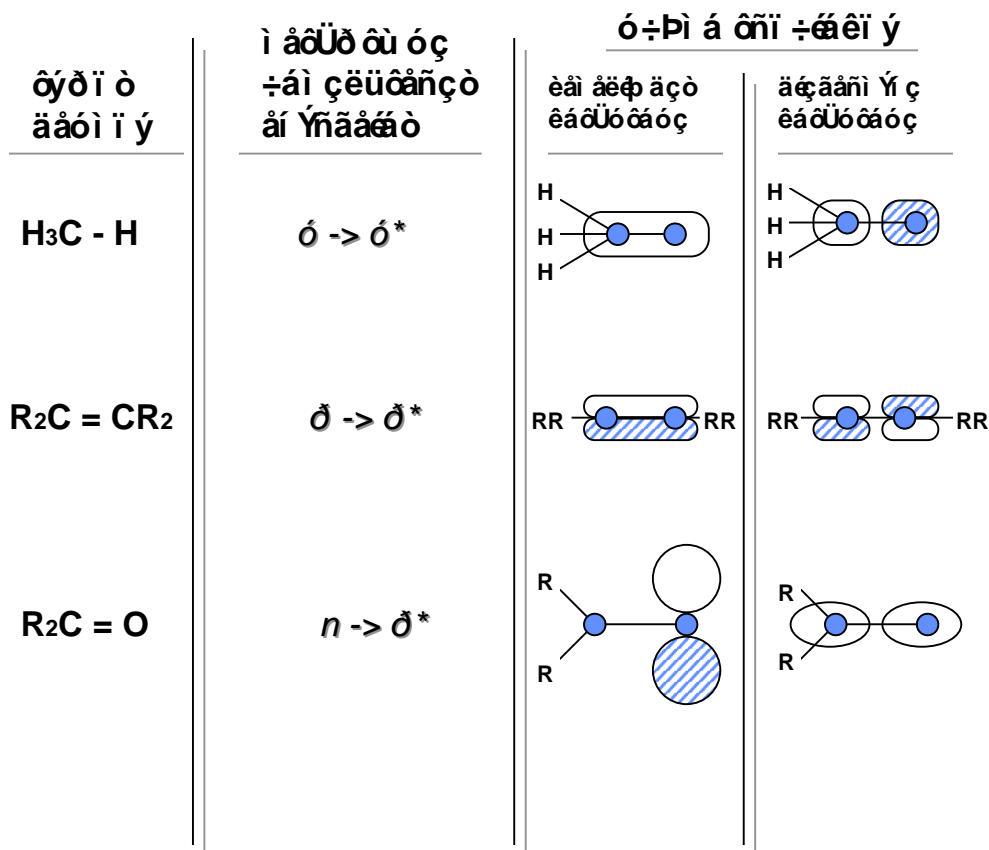
(α) θεμελιώδης απλή,
 (β) διεγερμένη απλή, και
 (γ) διεγερμένη τριπλή κατάσταση

Οι ηλεκτρονικές κατανομές και ενέργειες ενός μορίου στη θεμελιώδη και στη διεγερμένη κατάσταση εξαρτώνται από τις ηλεκτροστατικές έλξεις ηλεκτρονίων και πρωτονίων, τις ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ ηλεκτρονίων, τις ενδοπυρηνικές δονήσεις, τη μοριακή περιστροφή, καθώς και των μαγνητικών αλληλεπιδράσεων προερχόμενων από το σπιν των ηλεκτρονίων και το σπιν των πυρήνων.

Το τροχιακό του ηλεκτρονικού ζεύγους που σχηματίζει απλό δεσμό είναι συμμετρικό γύρω από το δεσμό, με την πυκνότητα του ηλεκτρικού φορτίου συγκεντρωμένη μεταξύ των δύο ατόμων (σχ. 1.5). Αυτό το είδος του τροχιακού είναι γνωστό ως σ (δεσμικό) τροχιακό. Η απορρόφηση φωτός διεγείρει το ένα ζεύγος ηλεκτρονίων σε ένα σ^* (αντιδεσμικό), στο οποίο υπάρχει κομβική επιφάνεια (δηλ. περιοχή μηδενικού φορτίου) στο επίπεδο που είναι κάθετο στο επίπεδο του δεσμού.

Οι σ - σ^* μεταπτώσεις απαιτούν μεγάλα ποσά ενέργειας και μόνο στις κορεσμένες ενώσεις που απορροφούν σε $\lambda \leq 200\text{nm}$ αντιστοιχούν στη χαμηλότερη ενεργειακά μετάπτωση. Σε κορεσμένα μόρια που έχουν άτομα με μονήρη ηλεκτρόνια οι σ^* διεγερμένες καταστάσεις μπορούν να δημιουργηθούν με διέγερση ενός μονήρους

(αντιδεσμικού) ηλεκτρονίου. Τέτοιες $n-\sigma^*$ μεταπτώσεις είναι πιθανότατα οι χαμηλότερες ενεργειακά μεταπτώσεις στις αλειφατικές αλκοόλες, αιθέρες, αμίνες, αλογονούχα αλκύλια κ.α. Η απορρόφηση είναι διάχυτη και τοποθετείται γύρω στα 200nm για τους αλκυλαιθέρες και τις αλκοόλες, και σε υψηλότερα μήκη κύματος στις αλογονούχες ενώσεις. Φθορισμός συνήθως δεν παρατηρείται από τις σ^* διεγερμένες καταστάσεις.



Σχήμα 1.5.
Τύποι ηλεκτρονικών μεταπτώσεων

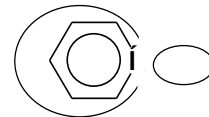
Γενικά, ο φθορισμός συνδέεται με το π ηλεκτρονικό σύστημα ενός ακόρεστου μορίου. Αν το ακόρεστο σύστημα δεν περιέχει κάποιο άτομο, όπως O, N ή S, που έχει μονήρη ηλεκτρονιακά ζεύγη, η χαμηλότερη ενεργειακά ηλεκτρονική μετάπτωση αντιστοιχεί στην προώθηση ενός από τα ηλεκτρόνια του π τροχιακού της θεμελιώδους κατάστασης στο υψηλότερο π^* τροχιακό (π.χ. αλκένιο στο σχ. 1.5). Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ του τροχιακού της θεμελιώδους κατάστασης και του χαμηλότερου ενεργειακά διεγερμένου τροχιακού είναι τώρα μικρότερη, και η πρώτη ζώνη απορρόφησης βρίσκεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η $\pi-\pi^*$ μετάπτωση είναι ισχυρή (ϵ_{max} συνήθως μεταξύ 10.000 και 100.000) και συχνά δίνει φθορισμό, εκτός

και αν είτε είναι μερικώς απαγορευμένη από παράγοντες συμμετρίας, είτε υπάρχει απλή-απλή μετάπτωση χαμηλότερης ενέργειας.

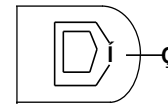
Ακόρεστα συστήματα που περιέχουν ένα άτομο με μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων συχνά προκαλούν μεταπτώσεις χαμηλότερης ενέργειας από την $\pi-\pi^*$ μετάπτωση (π.χ. η ομάδα του καρβονυλίου σχ. 1.5). Τα ηλεκτρόνια στο n-τροχιακό έχουν την υψηλότερη ενέργεια και μπορούν να υποστούν μετάπτωση σε ένα υψηλότερο π^* τροχιακό, π.χ. n- π^* μετάπτωση, η οποία είναι γενικά η χαμηλότερη ενεργειακά απλή-απλή μετάπτωση. Τέτοιες μεταπτώσεις έχουν μικρή πιθανότητα να συμβούν ($\epsilon_{\max} < 2000$) και οι n- π^* διεγερμένες καταστάσεις έχουν σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής. Γι' αυτό υπόκεινται πολύ περισσότερο σε μη ακτινοβολούσες διαδικασίες απενεργοποίησης από ότι οι $\pi-\pi^*$ διεγερμένες καταστάσεις, με αποτέλεσμα ο φθορισμός που προέρχεται από αυτές να είναι πολύ ασθενής.

Σε πιο πολύπλοκα συζυγικά συστήματα, π.χ. εκείνα που περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο και ένα άτομο αζώτου (σχ. 1.6), είναι απαραίτητη η κατηγοριοποίηση των τροχιακών που περιέχουν μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων, όπως στην περίπτωση της πυριδίνης, του πυρολίου και της ανιλίνης.

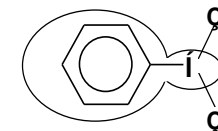
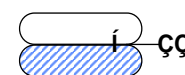
δ οñāβ ζ
(éàì ßā
áëèç èäð ßāñáóç)



δ οñüèé
(áëèç èäð ßāñáóç)



άί ãβ ζ
(áëèç èäð ßāñáóç
üòáí ãñ áéäð ßāñáí)



Σχήμα 1.6.

Αλληλεπίδραση ενός μονήρους ζεύγους με το π -τροχιακό.

Χρόνος ζωής φθορισμού

Μια σημαντική ιδιότητα των φθοριζόντων μορίων είναι ο χρόνος ζωής (τ) της χαμηλότερης απλής διεγερμένης κατάστασης. Ο μέσος χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης είναι ο μέσος χρόνος για κάθε γεγονός φθορισμού. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των γεγονότων φθορισμού και όσο ταχύτερες είναι οι διαδικασίες που συναγωνίζονται το φθορισμό για απενεργοποίηση της χαμηλότερης απλής διεγερμένης κατάστασης, τόσο μικρότερος θα είναι ο τ . Η μέτρηση του χρόνου ζωής φθορισμού αποτελεί πολύτιμη τεχνική στην ανάλυση σύνθετων φθορισμοφόρων ουσιών με επικαλυπτόμενες κορυφές φθορισμού. Η κβαντική απόδοση φθορισμού, Φ , και ο χρόνος ζωής φθορισμού, τ , συνδέονται με τη σχέση :

$$\Phi = k_f \tau, \quad (k_f = \text{σταθ.}) \quad (1)$$

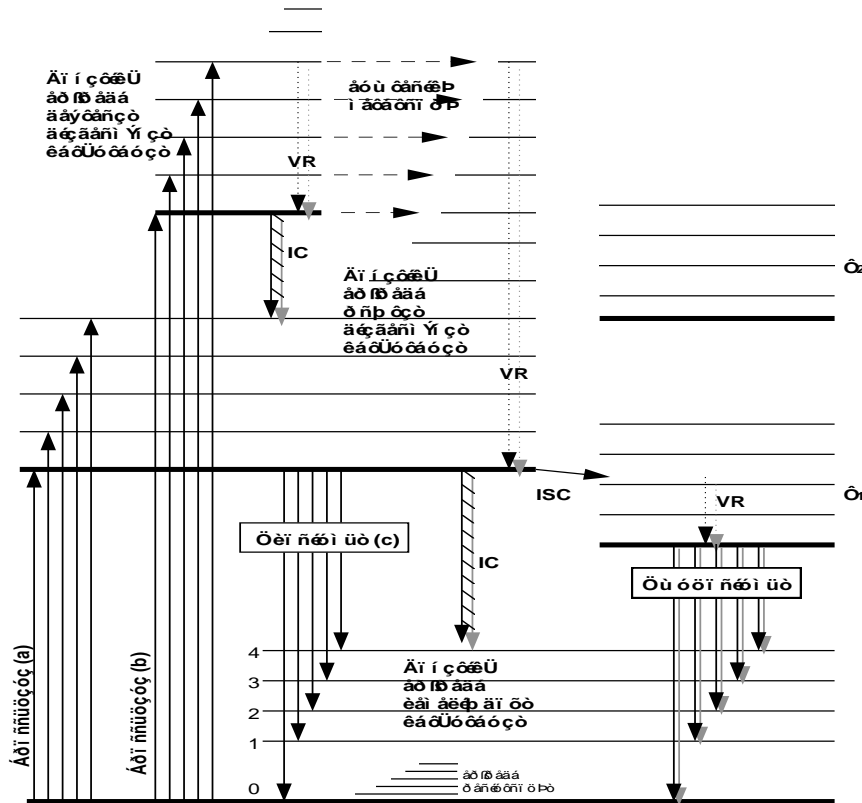
Μεταξύ των διαδικασιών που συναγωνίζονται το φθορισμό είναι η ενδοσυστηματική διασταύρωση από τη χαμηλότερη απλή διεγερμένη κατάσταση στη χαμηλότερη τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Η ενδοσυστηματική διασταύρωση είναι μια διαδικασία χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, η οποία καταλήγει σε αλλαγή του σπιν του τροχιακού του διεγερμένου μορίου. Παρόλο που μειώνει την κβαντική απόδοση φθορισμού, καταλήγει σε συσσώρευση πληθυσμού στη χαμηλότερη τριπλή κατάσταση.

Φωσφορισμός (Phosphorescence)

Ως φωσφορισμός χαρακτηρίζεται η εκπομπή ακτινοβολίας από μία τριπλή διεγερμένη κατάσταση σε μία απλή. Μια τέτοια μετάπτωση είναι απαγορευμένη κβαντομηχανικά γι'αυτό και ο χρόνος ζωής του φωσφορισμού είναι μεγαλύτερος από αυτόν του φθορισμού.

Η τριπλή κατάσταση πρωτοσυνδέθηκε με το φωσφορισμό το 1944 από τους Lewis και Kasha. Η μετατροπή μιας διεγερμένης απλής κατάστασης με διατηρούμενο spin σε μια τριπλή κατάσταση με μεταβολή της γωνιακής στροφορμής του spin καταπατά τον κλασικό νόμο της διατήρησης της γωνιακής στροφορμής (είναι "απαγορευμένη λόγω spin"). Η μετάπτωση αυτή καλείται απλή-τριπλή ενδοσυστηματική διασταύρωση (ISC, intersystem crossing) (σχ. 1.7).

Επειδή η μετάπτωση στη θεμελιώδη κατάσταση είναι επίσης "απαγορευμένη λόγω spin", το μόριο θα παραμείνει στη χαμηλότερη τριπλή κατάσταση πολύ περισσότερο χρόνο με αποτέλεσμα μεγάλη διάρκεια ζωής της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.



Σχήμα 1.7.

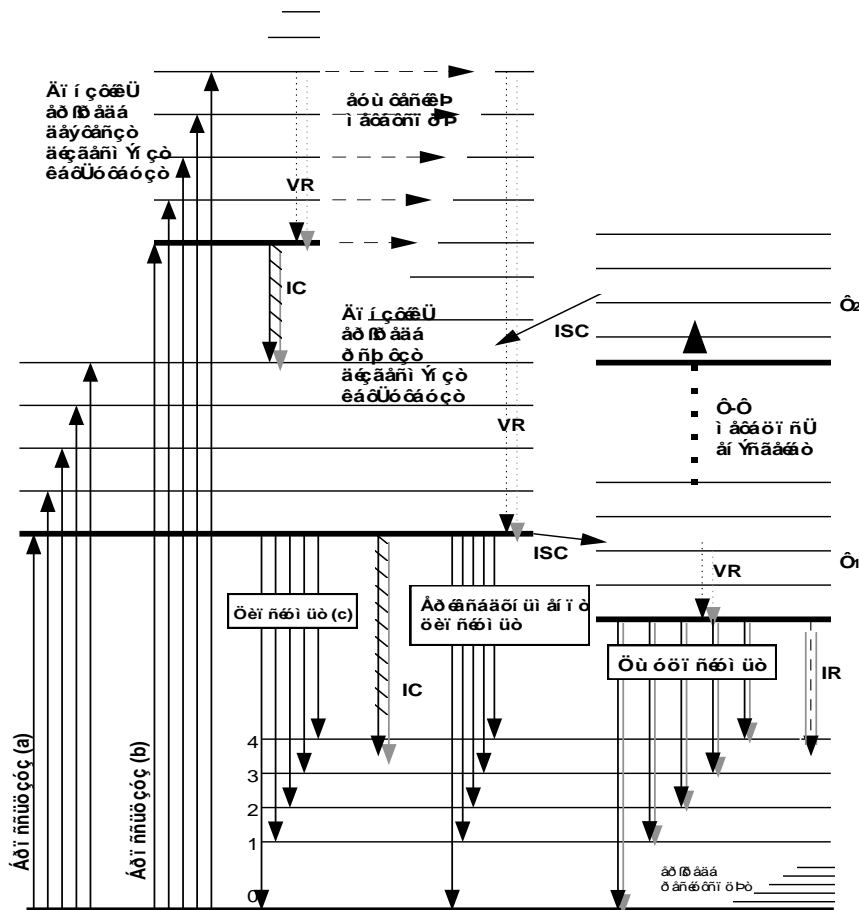
Διάγραμμα μεταφοράς ενέργειας στο φωσφορισμό. VR: δονητική επαναφορά, IC: εσωτερική μετατροπή, ISC: ενδοσυστηματική διασταύρωση. Ph: εκπομπή φωσφορισμού.

Επιβραδυνόμενος φθορισμός (Delayed fluorescence)

Στο σχήμα 1.8 παρουσιάζεται ο μηχανισμός επιβραδυνόμενου φθορισμού.

Η αποδιέγερση του μορίου από την απλή διεγερμένη κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω απλής-τριπλής ενδοσυστηματικής διασταύρωσης, η οποία αποτελεσματικά μειώνει τον άμεσο φθορισμό. Το μόριο στη διεγερμένη τριπλή κατάσταση μπορεί περαιτέρω να ενεργοποιηθεί μεταβαίνοντας σε μία απλή διεγερμένη κατάσταση και αποδιηγερόμενο να εκπέμψει φθορισμό με χρόνο ζωής χαρακτηριστικό για το φωσφορισμό.

Ο επιβραδυνόμενος φθορισμός μπορεί να είναι αποτέλεσμα τριών διαφορετικών μηχανισμών, γι'αυτό διακρίνεται σε επιβραδυνόμενο φθορισμό E⁻ και P⁻ τύπου, όπως επίσης και σε επιβραδυνόμενο φθορισμό ανασυνδυασμού.



Σχήμα 1.8.

Διάγραμμα μεταφοράς ενέργειας στον επιβραδυνόμενο φθορισμό.

Φθορισμός συμπλόκων ενώσεων

Οργανομεταλλικές ενώσεις και σύμπλοκα εκπέμπουν χαρακτηριστικό φθορισμό, μερικές φορές με νέες ενδιαφέρουσες και χρήσιμες ιδιότητες. Η φωταύγεια που εκπέμπεται εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι παραμαγνητικές ιδιότητες των μεταλλοϊόντων, το φαινόμενο του βαρέως ατόμου, η δομική ακαμψία, και οι οπτικές ιδιότητες του ιόντος και του υποκαταστάτη. Το μεταλλοϊόν μπορεί να προκαλέσει απόσβεση φθορισμού του υποκαταστάτη, να αλλάξει τη δομή του υποκαταστάτη, να σταθεροποιήσει συγκεκριμένες διαμορφώσεις του, να λάβει μέρος

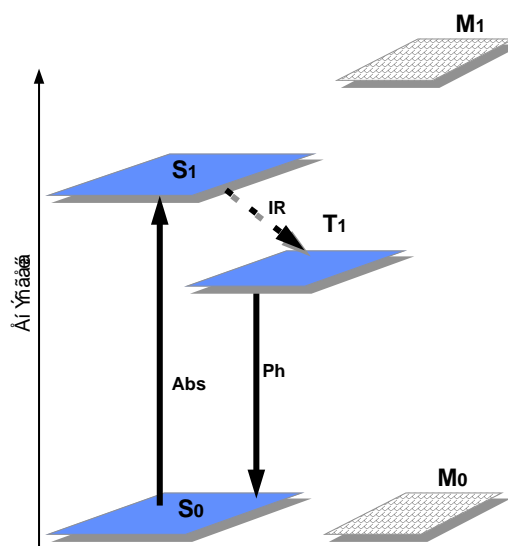
σε ηλεκτρονική μεταφορά, να δεχτεί ενέργεια από υποκαταστάτες ή να σταθεροποιήσει τριπλές καταστάσεις υποκαταστατών κ.ά.

Οι τέσσερις γενικοί μηχανισμοί φθορισμού συμπλόκων ενώσεων μεταλλοϊόντων και οργανικών υποκαταστατών παρουσιάζονται στο σχήματα 1.9 - 1.12.

Με την εισαγωγή μεταλλικού ιόντος προστίθεται μια τρίτη ενεργειακή στάθμη στις απλές και τριπλές στάθμες του οργανικού μορίου.

Στο σχήμα 1.9 φαίνεται ο μηχανισμός μεταφοράς ενέργειας σε ένα σύμπλοκο, όπου η ενεργειακή στάθμη του διεγερμένου μετάλλου (M_1) είναι επάνω από τα επίπεδα T_1 και S_1 του υποκαταστάτη.

Σε αυτήν την περίπτωση το μέταλλο δρα ως εσωτερικό άτομο και μπορεί να επηρεάσει τη φωτοφωταύγεια μόνο σταθεροποιώντας συγκεκριμένες διαμορφώσεις του υποκαταστάτη. Αυτοί οι τύποι των συμπλόκων μπορούν να παράγουν είτε φθορισμό είτε φωσφορισμό και γενικά σχηματίζονται με μέταλλα που δεν ανήκουν στα στοιχεία μετάπτωσης. Το Gd^{3+} έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη μελέτη τριπλών καταστάσεων των συμπλεκτικών υποκαταστατών διότι σχηματίζει φωσφορίζοντα μόρια. Το ενεργειακό επίπεδο του Gd^{3+} είναι τόσο υψηλά ώστε να μην μπορεί να δεχτεί ενέργεια από οργανικούς υποκαταστάτες.



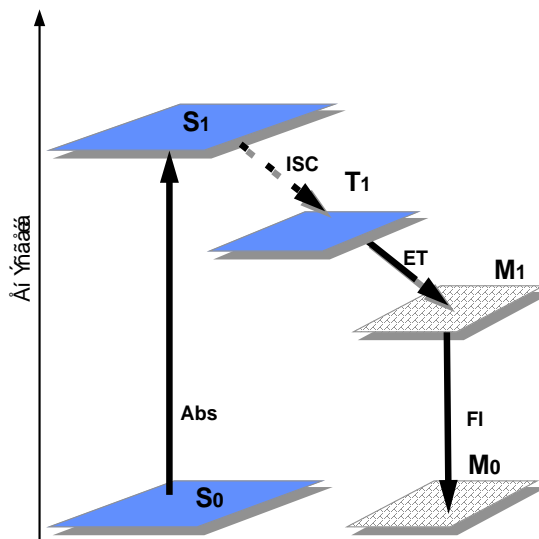
Σχήμα 1.9.

Διάγραμμα ροής ενέργειας για την περίπτωση ενός φωσφορίζοντος συμπλόκου.

Σχήμα 1.10.

Διάγραμμα ροής ενέργειας για την περίπτωση φθορισμού συμπλόκου με το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας.

Στο σχήμα 1.10 παρουσιάζεται η μεταφορά ενέργειας για την περίπτωση ευαισθητοποίησης φθορισμού. Το μεταλλοϊόν λαμβάνει ενέργεια διέγερσης από τον υποκαταστάτη μέσω της τριπλής του κατάστασης. Το συμπλοκοποιημένο μέταλλο (τρισθενή λανθανοειδή ιόντα όπως Tb^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} και Eu^{3+} , καθώς και ορισμένα σύμπλοκα Cr και Pt) αποσβένουν αποτελεσματικά το φθορισμό του υποκαταστάτη και εκπέμπουν τυπικό



φθορισμό ιόντος χαρακτηριστικό των $d-d^*$ και $f-f^*$ μεταπτώσεων. Αυτοί οι τύποι συμπλόκων έχουν γραμμικά φάσματα εκπομπής και μεγάλους χρόνους ζωής φθορισμού, οι οποίοι ευρέως χρησιμοποιούνται στους ανοσοπροσδιορισμούς.

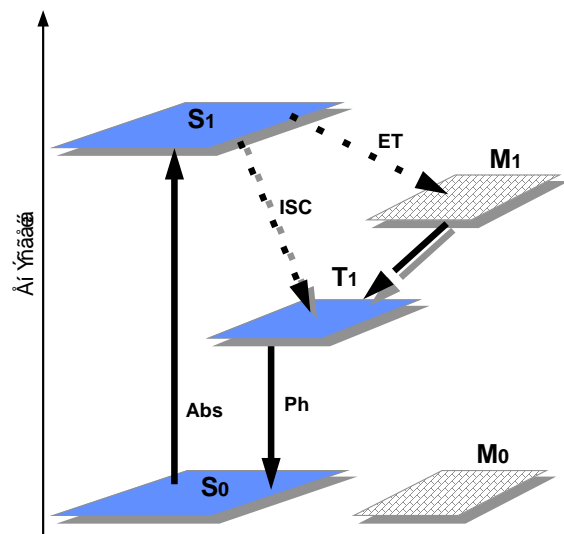
Για στοιχεία μετάπτωσης, τα ηλεκτρόνια των οποίων δεν είναι καλά προασπισμένα από εξωτερικές επιδράσεις, η φωταύγεια αποσβένεται σημαντικά. Αντίθετα, οι 4f στάθμες των σπανίων γαιών είναι καλά προασπισμένες από εξωτερικές επιδράσεις κι αυτό έχει τρία αποτελέσματα :

- ⇒ η φωταύγεια που αντιστοιχεί στις μεταπτώσεις μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων των λανθανοϊόντων δεν αποσβένεται τόσο εύκολα,
- ⇒ διατηρείται κατά μεγάλο μέρος η φύση της ατομικής εκπομπής και γι'αυτό το φάσμα εκπομπής είναι γραμμικό, και
- ⇒ φαινόμενα εκπομπής μπορούν να λάβουν χώρα από επίπεδα υψηλότερα της πρώτης διεγερμένης κατάστασης προς επίπεδα υψηλότερα της θεμελιώδους κατάστασης. Για αυτό μπορούν να παρατηρηθούν πολλές γραμμές εκπομπής από μία σπάνια γη.

Έχουν μετρηθεί οι αποδόσεις φωταύγειας και οι χρόνοι ζωής φθορισμού πολλών συμπλόκων ενώσεων των ιόντων τερβίου, ευρωπαϊού και σμαρρίου σε μια ποικιλία διαλυτών σε θερμοκρασία δωματίου, και παρουσιάζουν τα εξής ενδιαφέροντα σημεία :

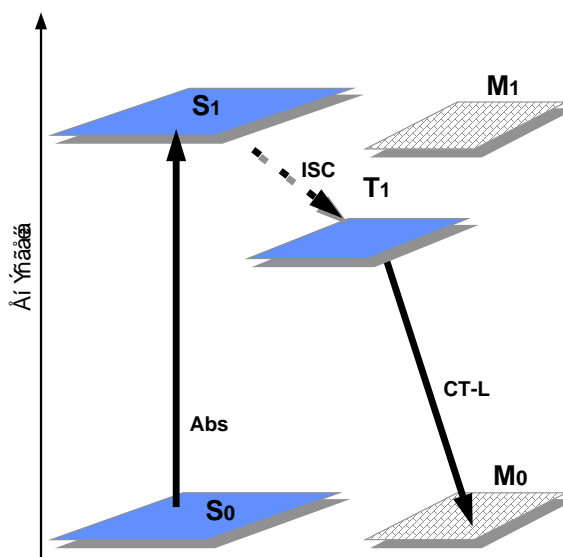
- ⇒ η ενδοσυστηματική διασταύρωση στις ατομικές στάθμες των σπανίων γαιών πρέπει να είναι ικανοποιητική ώστε να συναγωνιστεί με τον υψηλό βαθμό των διαδικασιών μετατροπής χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, οι οποίες συμβαίνουν από τις τριπλές καταστάσεις,
- ⇒ το διαλυμένο οξυγόνο έχει αμελητέα επίδραση παρά τους σχετικά μεγάλους χρόνους ζωής φθορισμού, και
- ⇒ η απόδοση φθορισμού ορισμένων συμπλόκων είναι αρκετά μεγάλη.

Στο σχήμα 1.11 φαίνονται τα ενεργειακά επίπεδα ενός τυπικού συμπλόκου με στοιχεία μετάπτωσης. Το ενεργειακό επίπεδο του διεγερμένου ιόντος, που βρίσκεται μεταξύ των S_1 και T_1 επιπέδων του υποκαταστάτη, αποτελείστικά αποσβένει το φθορισμό και ευνοεί την ενδοσυστηματική διασταύρωση στην τριπλή κατάσταση. Τέτοια σύμπλοκα (π.χ. Pd και Pt-πορφυρίνες) εμφανίζουν ισχυρό φωσφορισμό κάτω από κατάλληλες συνθήκες, και επίσης έχουν βρει εφαρμογή στους ανοσοπροσδιορισμούς φωσφορισμού. Οι μεταλλοπορφυρίνες επίσης εμφανίζουν φθορισμό από το S_2 επίπεδο. Ο $S_2 - S_0$ φθορισμός, ο οποίος καλείται Soret φθορισμός και διεγείρεται από τη Soret ζώνη ($S_0 - S_2$), με απορρόφηση γύρω στα 400 nm, πρωτοπαρατηρήθηκε σε σύμπλοκα Zn^{2+} και Gd^{3+} με τετραβενζοπορφυρίνες και επίσης έχει παρατηρηθεί σε σύμπλοκα Y, Lu, και Th με πορφυρίνες.



Σχήμα 1.11
Ενεργειακό διάγραμμα ροής για ευαισθητοποιημένο φωσφορισμό μετάλλου

Στο σχήμα 1.12 δίνεται η ενεργειακή ροή σε σύμπλοκα με μεταφορά φορτίου μετάλλου-υποκαταστάτη. Σύμπλοκα του Ru, Os, ή Ir με αζωτοετεροκυκλικούς υποκαταστάτες εμφανίζουν αποτελεσματική φωταύγεια που οφείλεται στη μεταφορά φορτίου με μεγάλους χρόνους ζωής και μεγάλες μετατοπίσεις κατά Stokes'. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ως συλλέκτες ηλιακής ενέργειας καθώς και πρόσφατα σε ανοσοχημικές τεχνικές.



Σχήμα 1.12.

Ενεργειακό διάγραμμα ροής για φθορισμό μετάλλου με μεταφορά φορτίου.

Παράγοντες που επηρεάζουν τη φωτοφωταύγεια

Οτιδήποτε μπορεί να επηρεάσει τις ενεργειακές μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο, μπορεί να επηρεάσει και το φαινόμενο της φωτοφωταύγειας.

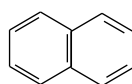
Η φωτοφωταύγεια ευνοείται όταν η απορρόφηση είναι αποτελεσματική (υψηλές μοριακές απορροφητικότητες). Ο φθορισμός ευνοείται όταν η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των διεγερμένων απλών και τριπλών καταστάσεων είναι σχετικά μεγάλη και όταν η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της πρώτης διεγερμένης απλής κατάστασης και της θεμελιώδους κατάστασης είναι ικανοποιητικά μεγάλη για να αποφευχθεί υπολογίσιμη επαναφορά στη θεμελιώδη κατάσταση με μη ακτινοβολούσες διαδικασίες. Κάθε φυσικός ή χημικός παράγοντας, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει οποιαδήποτε από τις μεταπτώσεις μπορεί να επηρεάσει τη φωτοφωταύγεια.

α) Δομική ακαμψία - Χημική δομή

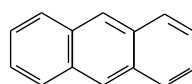
Η ακαμψία του μορίου αποτρέπει την απώλεια ενέργειας μέσω περιστροφικών ή δονητικών κινήσεων, ενώ παράλληλα καταλήγει σε σημαντικό διαχωρισμό της θεμελιώδους απλής και της χαμηλότερης διεγερμένης απλής κατάστασης, με αποτέλεσμα την αύξηση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού.

Οργανικές ενώσεις, οι οποίες εκπέμπουν φθορισμό, περιέχουν συνήθως πολλαπλούς συζυγιακούς δεσμούς, όπως οι αρωματικές ενώσεις. Οι sp^2 δεσμοί μεταξύ των ανθράκων στους δακτυλίους προκαλούν την επιθυμητή επίπεδη δομή, ενώ οι εναλλασσόμενοι διπλοί δεσμοί δίνουν δυσκαμψία και παρέχουν τα απαραίτητα για το φθορισμό π ηλεκτρόνια. Η επίπεδη δομή των φθορίζουσών ενώσεων επιτρέπει τη διασπορά των π ηλεκτρονίων του μορίου και αυξάνει την πιθανότητα εκπομπής φθορισμού, εφόσον τα ηλεκτρόνια μπορούν να μετακινηθούν στην κατάλληλη περιοχή και να επανέλθουν σε ένα χαμηλότερο εντοπισμένο τροχιακό.

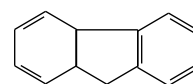
Παραδείγματα υδρογονανθράκων που εκπέμπουν φθορισμό λόγω ακαμψίας δομής είναι το ναφθαλένιο, το ανθρακένιο, το φλουορένιο, περιλένιο, και το 9,10-δифαινυλ-ανθρακένιο (σχ. 1.13).



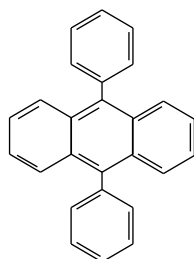
Ί α δ ε ε ε γ ε



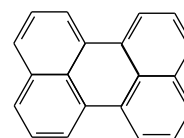
Ά ι ε η α ε γ ε



Ό ε ι ο ι η γ ε



9,10-Ά φ α ε δ ο ε α ι ε η α ε γ ε



Δ η η α ε γ ε

Η αύξηση της ακαμψίας του μορίου, άρα η ελαχιστοποίηση των εσωτερικών δονήσεων που ευνοούν την εσωτερική μετατροπή, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φθορισμού και μπορεί να επιτευχθεί με συμπλοκοποίηση ενός πολυσχιδής υποκαταστάτη, φθορίζοντος ή μη, με ένα μεταλλοϊόν.

Σχήμα 1.13.

Δομές φθορίζοντων μορίων με αυξημένη ακαμψία.

β) Ετεροάτομα και υποκαταστάτες

Υποκαταστάτες, οι οποίοι μπορούν να απεντοπίσουν τα π ηλεκτρόνια, αυξάνουν γενικά την πιθανότητα μιας μετάπτωσης με εκπομπή ακτινοβολίας με αποτέλεσμα την αύξηση φθορισμού. Γενικά, οι ορθο- και παρα- (προσανατολισμένοι) υποκαταστάτες δίνουν τα ηλεκτρόνια τους στο δακτύλιο και αυξάνουν την πιθανότητα εκπομπής φθορισμού.

Οι μετα- (προσανατολισμένοι) υποκαταστάτες μετακινούν τα e^- από το δακτύλιο και μειώνουν την πιθανότητα φθορισμού. Οι επιδράσεις πολλών κοινών υποκαταστατών στο φθορισμό των αρωματικών ενώσεων δίνονται στον πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2.

Επίδραση υποκαταστατών στα μήκη κύματος εκπομπής και στην ένταση φθορισμού

Υποκαταστάτης	Επίδραση στο μήκος κύματος	Επίδραση στην ένταση
Αλκυλομάδα	Καμία	Ασθενής αύξηση
COOH, CHO, COOR, CRO	Αύξηση	Μείωση
OH, OMe, OEt	Αύξηση	Αύξηση
CN	Καμία	Αύξηση
NH ₂ , NHR, NHR ₂	Αύξηση	Αύξηση
NO ₂ , NO	Μεγάλη αύξηση	Μεγάλη αύξηση ή ολοκληρωτική απόσβεση
SH	Αύξηση	Μείωση
SO ₃ H	Καμία	Καμία
F, Cl, Br, I	Αύξηση	Μείωση

γ) Επίδραση βαρέως ατόμου (Heavy atom effect)

Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία που συνδέονται με σχετικά βαριά άτομα, επηρεάζουν τα σπιν των ηλεκτρονίων σε ένα μόριο πολύ περισσότερο από τα ελαφρότερα άτομα.

Η προσθήκη βαρέως ατόμου σε ένα μόριο φέρνει πιο κοντά ενεργειακά τα ηλεκτρόνια της διεγερμένης απλής και τριπλής κατάστασης. Αυτό μειώνει την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των απλών και τριπλών καταστάσεων αυξάνοντας την πιθανότητα ενδομοριακής διασταύρωσης και φωσφορισμού, ενώ συγχρόνως μειώνεται η πιθανότητα φθορισμού. Ο αυξημένος φωσφορισμός και ο μειωμένος φθορισμός με την προσθήκη βαρέως ατόμου αποτελεί το φαινόμενο του βαρέως ατόμου.

Αν το βαρύ άτομο είναι υποκαταστάτης του μορίου που εκπέμπει φωταύγεια τότε έχουμε το εσωτερικό φαινόμενο του βαρέως ατόμου. Το εξωτερικό φαινόμενο υφίσταται όταν το βαρύ άτομο αποτελεί μέρος του διαλύματος (συνήθως του διαλύτη).

δ) Επίδραση περιβάλλοντος

Πολλοί παράγοντες περιβάλλοντος συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη, της θερμοκρασίας, του pH, της παρουσίας διαλυμένου οξυγόνου, των δεσμών υδρογόνου, την παρουσία άλλων διαλυμένων ουσιών μπορούν να επηρεάσουν τη φωτοφωταύγεια μιας ένωσης.

i) Επίδραση διαλύτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο διαλύτης παρουσιάζει το φαινόμενο της αύξησης του πλάτους των φασματικών ζωνών εκπομπής φθορισμού. Γενικά, η πολικότητα του διαλύτη καθορίζει την έκταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσδιοριζόμενου συστατικού και του διαλύτη. Ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του συστατικού και του διαλύτη σταθεροποιεί (χαμηλώνει) τις ενεργειακές στάθμες της φθορίζουσας ένωσης. Ένας διαλύτης, ο οποίος περιέχει ένα βαρύ άτομο, μπορεί να επηρεάσει τη φωτοφωταύγεια του μορίου με το εξωτερικό φαινόμενο βαρέως ατόμου.

ii) Επίδραση θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη μέση ταχύτητα του εκπέμποντος μορίου και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των συγκρούσεων μεταξύ των μορίων. Όταν το μόριο της διεγερμένης κατάστασης συγκρούεται με ένα άλλο μόριο, η πιθανότητα εσωτερικής μετατροπής αυξάνεται προκαλώντας μείωση του φθορισμού.

iii) Επίδραση pH.

Η αλλαγή του pH ενός διαλύματος μπορεί να έχει επίδραση στο φθορισμό μιας ένωσης αν η ένωση περιέχει είτε όξινη είτε βασική ομάδα.

Πολλές ιονιζόμενες ουσίες φθορίζουν μόνο υπό τη μία ιοντική μορφή τους και αυτός είναι ο λόγος που το pH επηρεάζει έντονα το φθορισμό τους. Μάλιστα, ο φθορισμός ορισμένων ουσιών είναι τόσο ευαίσθητος στη μεταβολή του pH, ώστε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φθορισμομετρικοί δείκτες σε ογκομετρήσεις εξουδετέρωσης και για τον προσδιορισμό σταθερών ιονισμού ασθενών οξέων κατά τρόπο ανάλογο με αυτό της φασματοφωτομετρίας.

iv) Επίδραση οξυγόνου. Η παρουσία οξυγόνου μπορεί να παρεμποδίζει είτε με άμεση οξειδωση της φθορίζουσας ουσίας προς μη φθορίζον προϊόν, είτε με απόσβεση του φθορισμού. Γι'αυτό το λόγο σε μελέτες φθορισμού, και ιδιαίτερα φωσφορισμού, είναι σημαντική η απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου ιδιαίτερα κατά την εργασία σε οργανικούς διαλύτες.

(v) Επίδραση ξένων μορίων. Η ύπαρξη ξένων μορίων συνεπάγεται αλλοίωση της ισχύος φθορισμού, όταν αυτά απορροφούν την ακτινοβολία διέγερσης ή φθορισμού (φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου) διότι αλληλεπιδρούν με το φθορίζον μόριο προκαλώντας απόσβεση φθορισμού. Σε πολλές περιπτώσεις, η παρεμποδιστική δράση των ξένων μορίων χρησιμοποιείται για τον έμμεσο φθορισμομετρικό προσδιορισμό τους.

(vi) Επιφανειοδραστικά. Υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία όπου αναφέρεται η θετική επίδραση των μικυλλιακών συστημάτων στο φθορισμό. Η αύξηση του φθορισμού οφείλεται στο γεγονός, ότι τα μικκύλια προσφέρουν στον αναλύτη ένα μικροπεριβάλλον που δρα σαν ασπίδα και μειώνει ή εξαλείφει φαινόμενα που μειώνουν τον φθορισμό, π.χ. το μικκύλιο απομονώνει κατά κάποιο τρόπο τον αναλύτη από την υδατική φάση και έτσι μειώνεται η απόσβεση δόνησης από τα μόρια του νερού. Η κυριότερη χρησιμότητα των μικυλλιακών συστημάτων όσον αφορά τα φθορισμομετρικά χαρακτηριστικά των ουσιών, είναι η αύξηση της κβαντικής απόδοσης του μορίου.

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Βασικές αρχές ποσοτικής φθορισμομετρίας

Η φθορισμομετρία είναι μια πολυσύνθετη αναλυτική τεχνική που επιτρέπει εκτός από τους ποσοτικούς ή ποιοτικούς προσδιορισμούς τον προσδιορισμό πολλών άλλων παραμέτρων. Οι μεταβλητές, οι οποίες συνήθως μπορούν να μετρηθούν είναι η μοριακή απορροφητικότητα (ϵ), τα φάσματα απορρόφησης ή διέγερσης και το φάσμα εκπομπής, ο συντελεστής κβαντικής απόδοσης (Φ), ο χρόνος ζωής διεγερμένης κατάστασης (τ), καθώς και η πόλωση φθορισμού (P).

Σύμφωνα με το νόμο απορρόφησης του Lambert-Beer η ισχύς της απορροφούμενης ακτινοβολίας δίνεται από τη σχέση:

$$I_A = I_0 - I_1 = I_0 (1 - 10^{-\epsilon l c}) \quad (1)$$

Η ισχύς της ακτινοβολίας φθορισμού, I_F , είναι συνάρτηση της ισχύος της απορροφούμενης ακτινοβολίας, I_A , και της κβαντικής απόδοσης φθορισμού, Φ .

$$I_F = \Phi I_A = \Phi_F I_0 (1 - 10^{-\epsilon l c}) \quad (2)$$

Η κβαντική απόδοση, Φ , ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων. Η κβαντική απόδοση δε μπορεί να υπερβεί τη μονάδα ($0 < \Phi < 1$) κατά τη διάρκεια των κανονικών τύπων φθορισμού. Είναι δε σταθερή για μια συγκεκριμένη ουσία κάτω από δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Σε αραιά διαλύματα, όπου η απορρόφηση A είναι μικρότερη του 0,02, ισχύει η σχέση:

$$I_F = \Phi I_A \quad 2,303 \epsilon l c = \kappa' c \quad (3)$$

Ευαισθησία φθορισμομετρικής ανάλυσης.

Θεωρητικά η ευαισθησία της φθορισμομετρίας είναι εξαιρετικά υψηλή και αγγίζει τα όρια απλού μορίου. Ένα φθορίζον μόριο με υψηλή κβαντική απόδοση και χρόνο ζωής φθορισμού της τάξης των 5ns μπορεί να διεγερθεί 200×10^6 φορές/s και να εκπέμψει τον ίδιο περίπου αριθμό φωτονίων. Στην πράξη όμως τα όρια ανίχνευσης που έχουν επιτευχθεί, αν και ιδιαίτερα ικανοποιητικά (10^{-14} M), δεν ανταποκρίνονται στις δυνατότητες της τεχνικής. Αιτία αυτού είναι η ύπαρξη διαφόρων παραγόντων, όπως η ακτινοβολία υποβάθρου προερχόμενη από το δείγμα, το διαλύτη, τις κυψελίδες, τα οπτικά των οργάνων κ.α.

Ορισμός ευαισθησίας

Στη φθορισμομετρική ανάλυση ο όρος ευαισθησία περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές έννοιες:

- i. Την ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης οργανολογίας. Ορίζεται από το λόγο σήμα/θόρυβο του οργάνου υπό καθορισμένες συνθήκες
- ii. Την απόλυτη ευαισθησία. Ορίζεται από τα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ουσίας (ικανότητα διέγερσης, κβαντική απόδοση, φασματικό εύρος) υπό συγκεκριμένες συνθήκες και

iii. Την ευαισθησία της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου. Εξαρτάται από την ευαισθησία της οργανολογίας και την απόλυτη ευαισθησία του συστήματος αλλά πολύ συχνά προσδιορίζεται από το συνολικό σήμα υποβάθρου.

Ποικιλία παραμέτρων μπορεί να συνεισφέρει τελικά στο φθορισμό υποβάθρου, συμπεριλαμβανομένων των οργανολογικών αλλά και αυτών που προέρχονται από το προς ανάλυση δείγμα. Συνοπτικά οι παράμετροι αυτές είναι:

A) Σκέδαση (Scattering)

-Rayleigh (μόρια διαλύτη, μέγεθος $\ll \lambda$)

-Tyndall (κολλοειδή σωματίδια $< \lambda$ ($\sim 0,05-0,2 \mu\text{m}$))

-Raman (δονητικές και περιστροφικές κινήσεις μορίων διαλύτη)

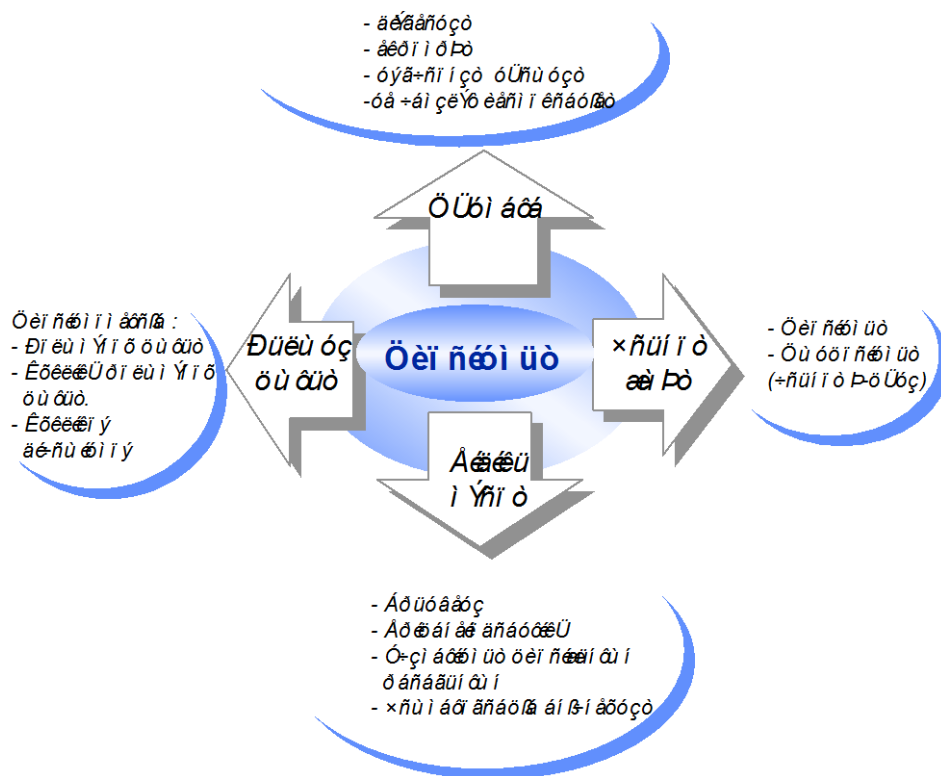
B) Ενδογενής φθορισμός

Γ) Απόσβεση (Quenching)

Δ) Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου (Inner filter effect)

■ Πολυπαραμετρικότητα φθορισμομετρικής ανάλυσης

Αναλυτικές τεχνικές μέτρησης, οι οποίες χρησιμοποιούν πάνω από μία παράμετρο για απλή μέτρηση μπορούν να χαρακτηρισθούν ως πολυπαραμετρικές τεχνικές. Η μέτρηση της φωταύγειας είναι εν γένει μια πολυπαραμετρική τεχνική διότι περιλαμβάνει την ταυτόχρονη χρήση ενός μήκους κύματος απορρόφησης και ενός μήκους κύματος φωταύγειας.



Σχήμα 2.1

Πολυπαραμετρικότητα φθορισμομετρικής ανάλυσης

Η μετρούμενη ένταση φθορισμού θα μπορεί να παρουσιαστεί ως συνάρτηση των λ_{ex} και λ_{em} .

$$I_L = f(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \quad (4)$$

Εκλεκτική μέτρηση μεμονωμένων φθορισμοφόρων ουσιών σε απλά ή ακόμη και πολύπλοκα μίγματα μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη επιλογή των δύο παραμέτρων (λ_{ex} , λ_{em}).

Μια άλλη παράμετρος συχνά χρησιμοποιούμενη στη μέτρηση φθορισμού, είναι ο χρόνος ζωής του φθορισμοφόρου. Ο φθορισμός φθίνει μετά την αρχική διέγερση ακολουθώντας κινητική πρώτης τάξης. Ο χρόνος που απαιτείται ώστε ο φθορισμός να φτάσει το $1/e$ της αρχικής του τιμής είναι χαρακτηριστική παράμετρος του μορίου. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων, στον οποίο ο χρόνος απόσβεσης των ενώσεων που εκπέμπουν φθορισμό χρησιμοποιείται για την αύξηση της εκλεκτικότητας των μετρήσεων.

Η εκλεκτικότητα των μετρήσεων φθορισμού μπορεί να βελτιωθεί μέσω οργανολογίας αλλά και μαθηματικών προσεγγίσεων.

Στο σχήμα 2.1 παρουσιάζονται ορισμένες παράμετροι φωταύγειας, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκλεκτικές μετρήσεις. Πολλές παράμετροι φωταύγειας μπορούν να αξιοποιηθούν ταυτόχρονα ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερος βαθμός εκλεκτικότητας και τελικά, εξειδικευμένη μέτρηση. Μαθηματική έκφραση της έντασης φθορισμού, I_F συναρτήσει τριών παραμέτρων δίνεται από τη σχέση:

$$I_F = f(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, P) \quad (5)$$

όπου P είναι μια αυθαίρετη παράμετρος από τις πολλές του σχήματος 2.1. Η εκλεκτικότητα των μετρήσεων είναι δυνατόν να αυξηθεί με την αξιοποίηση περισσότερων παραμέτρων.

Κλασική φθορισμομετρία

Η μετρούμενη ισχύς της ακτινοβολίας φθορισμού μπορεί να παρουσιαστεί ως συνάρτηση δύο παραμέτρων, λ_{ex} και λ_{em} :

$$I_F = f(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \quad (6)$$

Η εκλεκτική μέτρηση ενός μεμονωμένου φθορισμοφόρου σε απλό ή σύνθετο μίγμα μπορεί να επιτευχθεί με την κατάλληλη επιλογή των δύο αυτών παραμέτρων. Δύο πολύ χρήσιμες ιδιότητες των περισσοτέρων φθορισμοφόρων είναι αυτές που καθορίζουν την εκλεκτικότητα της εξίσωσης (6). Η πρώτη ιδιότητα αφορά στο γεγονός, ότι το φάσμα φθορισμού μίας ουσίας είναι ανεξάρτητο του μήκους κύματος διέγερσης και η δεύτερη, στο ότι το φάσμα διέγερσης είναι ανεξάρτητο του μήκους κύματος εκπομπής φθορισμού. Μεταβολές στο φάσμα φθορισμού με την μεταβολή του λ_{ex} μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα, ότι το δείγμα περιέχει άνω του ενός συστατικού και αντίστροφα. Η εκλεκτικότητα των φασματοσκοπικών μετρήσεων φθορισμού ελαττώνεται ταχύτατα με την αύξηση του αριθμού των συστατικών. Ικανοποιητική εκλεκτικότητα επιτυγχάνεται μόνο σε περιπτώσεις μορίων με στενές ζώνες διέγερσης και εκπομπής.

Η κλασική φθορισμομετρία περιλαμβάνει τη λήψη δύο φασμάτων, του φάσματος διέγερσης (λ_{em} =σταθερό) και του φάσματος εκπομπής (λ_{ex} =σταθερό), την επιλογή των δύο μεγίστων για τη μέτρηση της έντασης φθορισμού η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας.

Τεχνική Πόλωσης Φθορισμού (Fluorescence Polarization)

Η διέγερση φθοριζόντων μορίων από πολωμένο φως μπορεί να καταλήξει, κάτω από ορισμένες συνθήκες, σε φθορισμό στον οποίο το εκπεμπόμενο φως είναι επίσης πολωμένο.

Όταν μια φθορίζουσα ένωση διεγείρεται με γραμμικά πολωμένο φως, έχει την υψηλότερη πιθανότητα διέγερσης όταν τα δίπολα των μορίων είναι προσανατολισμένα παράλληλα με το ηλεκτρικό διάνυσμα του πολωμένου φωτός. Οι αρχές της *φωτοεπιλογής* υπαγορεύουν, ότι η φωταύγεια, η οποία προέρχεται από την παραπάνω απορρόφηση είναι επίσης πολωμένη. Τα μόρια αυτά παραμένουν στη διεγερμένη κατάσταση για περιορισμένο χρόνο πριν εκπέμψουν φωταύγεια και γι'αυτό είναι

ελεύθερα να περιστραφούν, ενώ κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μπορεί να συμβεί μερική αποπόλωση φθορισμού.

Ο βαθμός της αποπόλωσης λόγω της περιστροφικής κίνησης εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή των μορίων καθώς και του ιξώδους του διαλύτη, ενώ συχνά χρησιμοποιείται στη βιοχημεία για τη μελέτη σημαντικών διεργασιών, όπως η σύνδεση υποκαταστάτη, η αποδιάταξη και η συσσωμάτωση. Σε μερικές περιπτώσεις η μεταφορά ενέργειας συνεισφέρει στην αποπόλωση, και πειράματα πόλωσης φωταύγειας μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τις διεγερμένες καταστάσεις του μορίου που εκπέμπει φωταύγεια.

Ο χρόνος της περιστροφικής επαναφοράς είναι περίπου 1ns για μικρά μόρια και περίπου 100 ns για πρωτεΐνες. Είναι δε συνάρτηση του ιξώδους, του όγκου του μορίου, της θερμοκρασίας και μίας σταθεράς των αερίων. Οι βαθμοί πόλωσης φθορισμού γενικά υπολογίζονται από τη σχέση:

$$P = (I_H - I_V) / (I_H + I_V) \quad (7)$$

όπου I_V και I_H είναι οι εντάσεις των συνιστωσών της ακτινοβολίας εκπομπής κάθετα και παράλληλα, αντίστοιχα, ως προς την επιφάνεια πόλωσης της ακτινοβολίας διέγερσης.

Στην τεχνική πολωμένου φωτός λαμβάνονται φάσματα εκπομπής μετά τη διέγερση με πολωμένο φως και μετρείται η ένταση φθορισμού παράλληλα (H) και κάθετα (V) ως προς το επίπεδο πόλωσης της διεγείρουσας ακτινοβολίας.

Τεχνική Χρονικά Διαχωριζόμενου Φθορισμού (Time-resolved fluorimetry)

Η τεχνική του χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού βασίζεται στο διαφορετικό χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης διαφόρων μορίων.

Ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης ή ο χρόνος απόσβεσης της εκπομπής (τ_f), είναι συνάρτηση της φυσικής διάρκειας ζωής φθορισμού (τ_n) και της κβαντικής απόδοσης (Φ):

$$\tau_f = \Phi \cdot \tau_n \quad (8)$$

Η ένταση φθορισμού σε χρόνο t , I_{Ft} , μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$I_{Ft} = I_{F0} \cdot e^{-t/\tau} \quad (9)$$

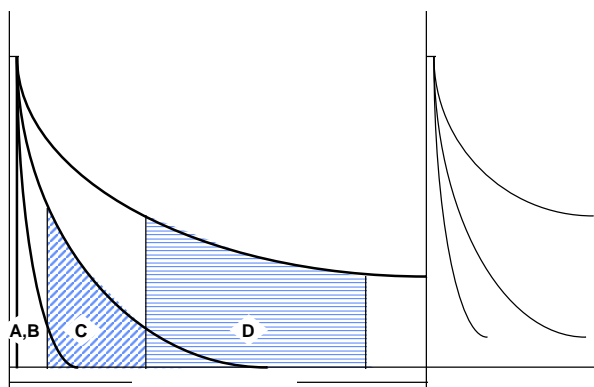
όπου I_{F0} η ένταση φθορισμού σε χρόνο 0 και τ ο χρόνος ζωής φθορισμού.

Με λογαρίθμηση της σχέσης (9) λαμβάνεται η σχέση (10) σύμφωνα με την οποία ο λογάριθμος της έντασης φθορισμού είναι συνάρτηση του χρόνου με κλίση $1/\tau$.

$$\ln I_{Ft} = \ln I_{F0} - t/\tau \quad (10)$$

Η αρχή του χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού είναι σχετικά απλή και δίνεται στο σχήμα 2.2.

Ένας σύντομος παλμός φωτεινής ακτινοβολίας χρησιμοποιείται για τη διέγερση της φθορίζουσας ένωσης, της οποίας η διεγερμένη κατάσταση έχει χρόνο ζωής μεταξύ 100ns και 1μs. Το μη ειδικό σήμα υποβάθρου φθορισμού με χρόνο απόσβεσης μικρότερο των 10ns διαχωρίζεται με τη χρήση ελεγχόμενου συστήματος ανίχνευσης.



Σχήμα 2.2.

Αρχή μετρήσεων χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού για διαχωρισμό της ακτινοβολίας σκέδασης (A) και του φθορισμού υποβάθρου μικρής διάρκειας ζωής (B) από ακτινοβολία μεγάλου χρόνου ζωής (C και D).

Όταν ένα μίγμα φθορίζουσών ουσιών

διεγερθεί με ένα σύντομο παλμό φωτεινής ακτινοβολίας (π.χ. laser, flash lamp), τα διεγερμένα μόρια εκπέμπουν μικρής ή μεγάλης διάρκειας φθορισμό. Η πτώση της έντασης φθορισμού πρακτικά μηδενίζεται σε χρόνο $<100\mu\text{s}$, ενώ ο μεγάλου χρονικής διάρκειας φθορισμός μηδενίζεται σε χρόνο $>1000\mu\text{s}$. Εάν λοιπόν κατά τα πρώτα 400 μs ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι ανενεργός και δεν λαμβάνονται μετρήσεις φθορισμού, τα μικρής χρονικής διάρκειας σήματα υποβάθρου καθώς και η ακτινοβολία διέγερσης πρακτικά εξαφανίζονται. Αντίθετα, όταν οι μετρήσεις λαμβάνονται σε "παράθυρο χρόνου" 400-800 μs τα μόρια που εκπέμπουν μεγάλης διάρκειας φθορισμό εξακολουθούν να φθορίζουν. Σε αυτή την περίπτωση, οι μετρήσεις χαρακτηρίζονται

από πολύ υψηλή ευαισθησία, λόγω της μεγάλης αναλογίας του σήματος φθορισμού ως προς το θόρυβο.

Ειδικότερα, η τεχνική αυτή βρήκε ευρύτατες εφαρμογές χάρη στο μεγάλο χρόνο ζωής φθορισμού των συμπλόκων ενώσεων των σπανίων γαιών (ιδιαίτερα ιόντων Eu^{3+} και Tb^{3+}) σε σύγκριση με τα κλασικά φθορίζοντα μόρια (φλουορεσκεΐνη, ροδαμίνη). Κύρια πεδία εφαρμογών της τεχνικής αυτής σε συνδυασμό με τη χρήση των συμπλόκων των σπανίων γαιών ως ιχνηθετών αποτελούν οι υπερευαίσθητοι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, για τον προσδιορισμό ποικιλίας ουσιών κλινικού ενδιαφέροντος σε βιολογικά υγρά (π.χ. ορμόνες, καρκινικοί δείκτες).

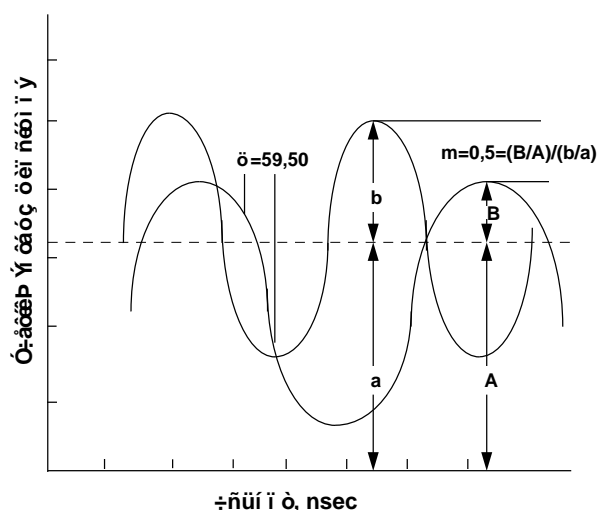
Τεχνική Φασικά Διαχωριζόμενου Φθορισμού (Phase-resolved fluorimetry)

Η τεχνική φασικά διαχωριζόμενου φθορισμού είναι μία επίσης βασική τεχνική, η οποία εκμεταλλεύεται τις διαφορές στους χρόνους ζωής της διεγερμένης κατάστασης, τ_f , μεταξύ του φθορισμοφόρου και του υποβάθρου, στους φθορισμομετρικούς προσδιορισμούς.

Η βασική αρχή της τεχνικής του φασικά διαχωριζόμενου φθορισμού δίνεται στο σχήμα (2.3).

Το δείγμα διεγείρεται με ημιτονοειδώς μεταβαλλόμενη ισχύ ακτινοβολίας και όχι με παλμό ακτινοβολίας όπως στην περίπτωση της τεχνικής του χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, εξαρτώμενη από το χρόνο απόσβεσης, αποδιαμορφώνεται και μετατοπίζεται κατά γωνία φ (σχ. 2.3).

Η μετατόπιση της φάσης και η αποδιαμόρφωση της εκπομπής, σε σχέση με την τυχαία ακτινοβολία, είναι παράμετροι οι οποίες μπορούν να



Σχήμα 2.3.

Βασική αρχή της τεχνικής του φασικά διαχωριζόμενου φθορισμού με διαμορφωμένη διέγερση (b) παράγοντας αποδιαμορφωμένη και μετατοπισμένη κατά φάση εκπομπή (B).

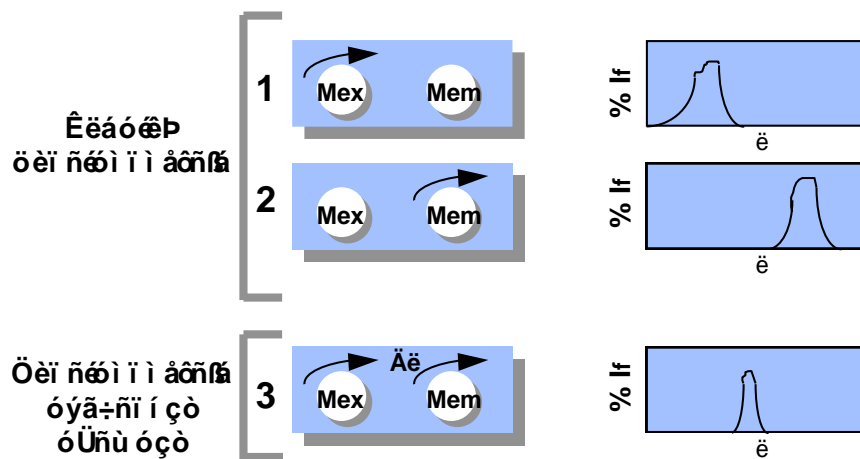
χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό ουσιών με μικρές διαφορές στο χρόνο ζωής τους, της τάξης του ns.

Φθορισμομετρία Σύγχρονης Σάρωσης (Φάσματος) (Synchronous Fluorescence Spectrometry)

Από την εισαγωγή της από τον Lloyd η φθορισμομετρία σύγχρονης σάρωσης έχει περιγραφεί ως μέθοδος βελτίωσης της εκλεκτικότητας της κλασικής φθορισμομετρίας, εκμεταλλευόμενη πλήρως τη δυνατότητα ταυτόχρονης μεταβολής των μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής.

Οι βασικές τεχνικές σύγχρονης σάρωσης είναι οι εξής :

- ┌ σύγχρονη σάρωση σταθερής διαφοράς μήκους κύματος -διατήρηση σταθερής διαφοράς μήκους κύματος $\Delta\lambda$,
- ┌ σύγχρονη σάρωση σταθερής διαφοράς ενέργειας -σταθερή διαφορά συχνότητας, $\Delta\nu$,
- ┌ σύγχρονη σάρωση μεταβλητού διαχωρισμού -τα μήκη κύματος της διέγερσης και της εκπομπής μεταβάλλονται ταυτόχρονα αλλά με διαφορετική ταχύτητα.



Σχήμα 2.4.

Σχηματική σύγκριση μεταξύ κλασικής [φάσμα διέγερσης (1) και φάσμα εκπομπής (2)] και φθορισμομετρίας σύγχρονης σάρωσης (3) (Mex = μονοχρωμάτορας διέγερσης, Mem = μονοχρωμάτορας εκπομπής).

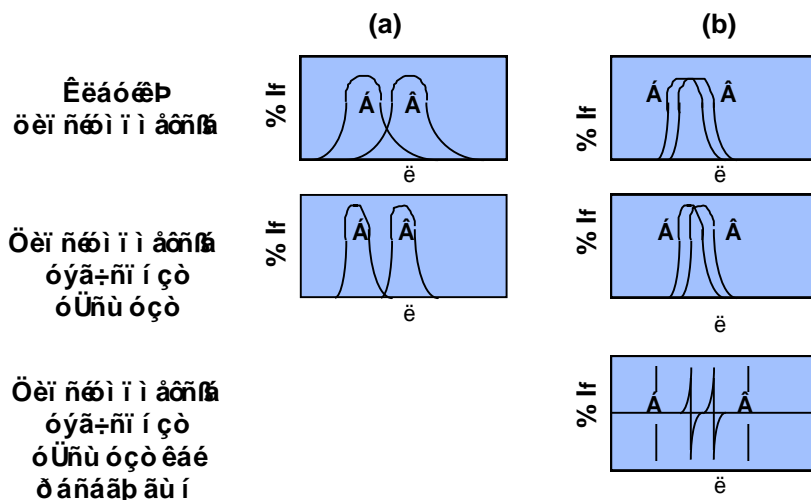
Τα φάσματα σύγχρονης σάρωσης είναι απλούστερα, με στενότερες κορυφές και μάλιστα πιο χαρακτηριστικές των κλασικών φασμάτων. Μια σχηματική παρουσίαση των αρχών της τεχνικής σύγχρονης σάρωσης δίνεται στο σχήμα 2.4.

Τα κύρια χαρακτηριστικά της φθορισμομετρίας σύγχρονης σάρωσης είναι τα εξής:

- Γ *ελάττωση του εύρους των φασματικών ζωνών*, το φαινόμενο είναι κατά βάση αποτέλεσμα της συνέλιξης (convolution) δύο ταυτόχρονα αυξανόμενων και/ή μειούμενων συναρτήσεων,
- ΓΤ *απλοποίηση του φάσματος εκπομπής*, ενώ στην κλασική φασματοφθορισμομετρία σε ένα συγκεκριμένο λ_{ex} , είναι δυνατό να αυξήσουμε την ένταση όλων των ζωνών εκπομπής την ίδια στιγμή, η τεχνική της σύγχρονης σάρωσης επιτρέπει την εκλεκτική αύξηση των εντονότερων κορυφών με τη χρήση κατάλληλου $\Delta\lambda$,
- ΓΤΤ *συστολή της φασματικής περιοχής*, από αναλυτικής πλευράς, ολόκληρο το φάσμα μπορεί να μην παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και πολλές από τις λεπτομέρειες μπορεί να προκαλούν σύγχυση λόγω της επικάλυψης με την εκπομπή άλλων συστατικών του μίγματος.

Φθορισμομετρία Σύγχρονης Σάρωσης και Παραγώγων του Φάσματος (Derivative Synchronous Fluorescence Spectrometry)

Η φθορισμομετρία σύγχρονης σάρωσης και παραγώγων προτάθηκε για πρώτη φορά από τους John και Soutar με σκοπό την αξιοποίηση μικρών φασματικών διαφοροποιήσεων (σχ.2.5).



Σχήμα 2.5.

Σχηματική σύγκριση μεταξύ κλασικής, σύγχρονης σάρωσης και παραγώγων συγχρόνου φάσματος φθορισμομετρίας δύο υποθετικών συστατικών A και B με ασθενή (a) και ισχυρή (b) επικάλυψη στο φάσμα εκπομπής.

Η τεχνική αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της σύγχρονης σάρωσης και της φασματοσκοπίας παραγώγων φάσματος.

Μέθοδοι Φθορισμομετρικής Ανάλυσης

Οι μέθοδοι φθορισμομετρικής ανάλυσης είναι άμεσες, όταν βασίζονται στον ενδογενή φθορισμό της προσδιοριζόμενης ουσίας και έμμεσες, όταν η προσδιοριζόμενη ουσία δε φθορίζει, οπότε απαιτείται μετατροπή της σε φθορίζον προϊόν. Οι έμμεσες φθορισμομετρικές μέθοδοι ανάλυσης είναι πολύ περισσότερες των άμεσων λόγω περιορισμένου αριθμού μορίων που έχουν την ικανότητα εκπομπής ενδογενούς φθορισμού.

Η μετατροπή της προσδιοριζόμενης ουσίας σε φθορίζον προϊόν μπορεί να γίνει ποικιλοτρόπως, όπως π.χ. με οξείδωση με διάφορα οξειδωτικά μέσα, με σχηματισμό ισχυρά φθορίζοντων παραγώγων ή με τη βοήθεια χημικών μετατροπών του μορίου.

Οι κυριότερες αντιδράσεις σχηματισμού φθορίζοντων παραγώγων περιλαμβάνουν :

- Σχηματισμό εκτεταμένου ππ-συζυγιακού συστήματος
- Αντιδράσεις τροποποίησης υποκαταστάτη
 - Φθορισμομετρικοί ιχνηθέτες
 - Φθορισμογόνα υποστρώματα ενζύμων
 - Αντικατάσταση υποκαταστάτη του αρωματικού δακτυλίου
- Αντιδράσεις σχηματισμού συμπλόκων με μεταλλοϊόντα
- Αντιδράσεις εισαγωγής ή απομάκρυνσης ατόμων βαρέων μετάλλων.

Στις έμμεσες φθορισμομετρικές μεθόδους ανάλυσης μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί η απόσβεση ή η ενίσχυση φθορισμού μιας ουσίας από το προσδιοριζόμενο συστατικό.

Οι έμμεσες φθορισμομετρικές μέθοδοι βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στις χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης, στην ενζυμική ανάλυση, στη φθορισμομετρία

πολωμένου φωτός, στη μικροσκοπία φθορισμού, στις ανοσοφθορισμομετρικές μεθόδους ανάλυσης κ.ά.

Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Φθορισμομετρικής Ανάλυσης

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της φθορισμομετρίας συνοψίζονται στον πίνακα 2.1.

Η υψηλή ευαισθησία οφείλεται στο ότι ο φθορισμός μετρείται έναντι μηδενικού υποβάθρου. Η ευαισθησία των φθορισμομετρικών μετρήσεων είναι συνήθως της τάξης του 10^{-9} - 10^{-14} Μ.

Πίνακας 2.1.
Πλεονεκτήματα φθορισμομετρικής ανάλυσης

Υψηλή ευαισθησία
(Zero background technique)

Μεγάλη εκλεκτικότητα
(Multiparameter technique)
παράμετροι εκλεκτικότητας
 λ_{ex} , λ_{em} , τ (decay time), λphosph., P (βαθμός πόλωσης),
μη ειδικές παράμετροι

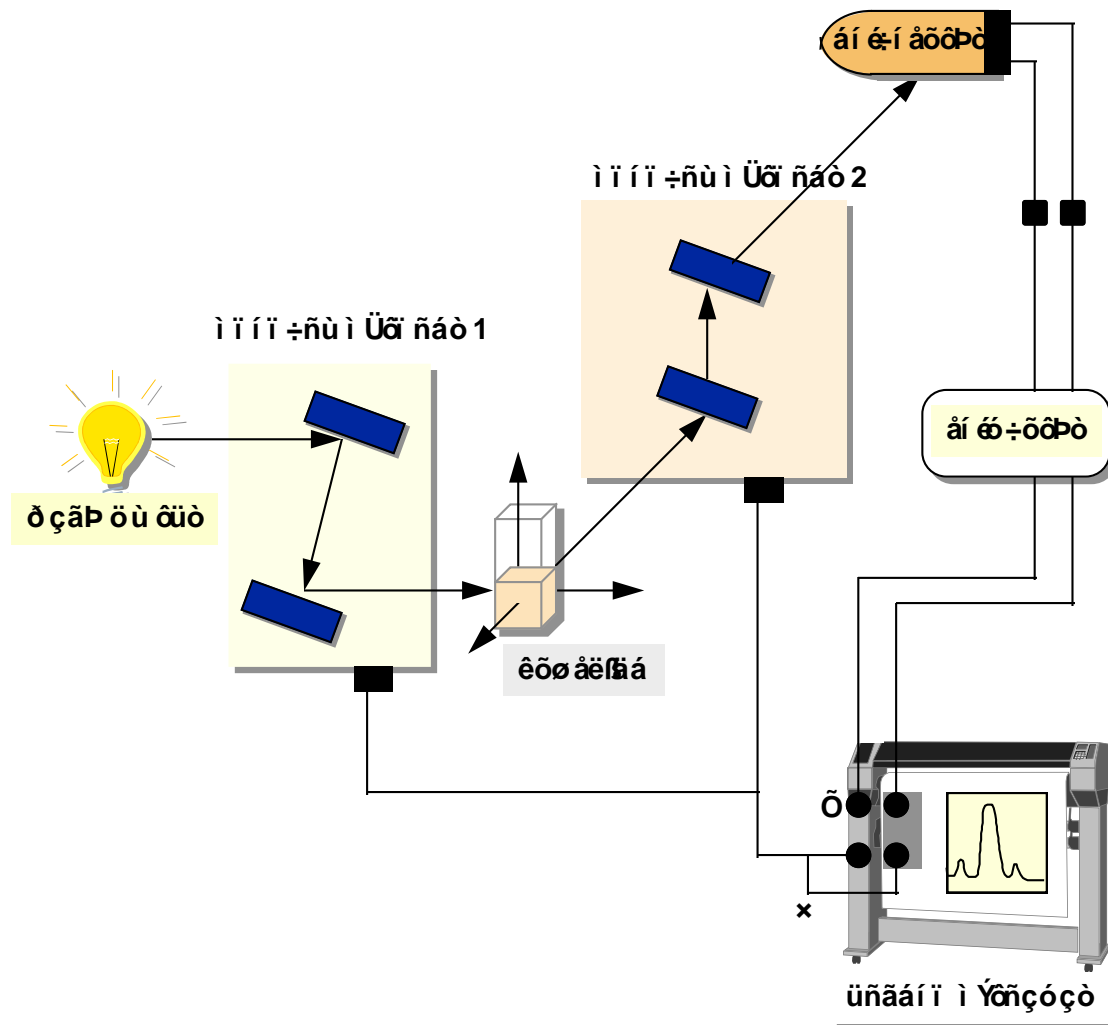
Απλή και σχετικά χαμηλού κόστους οργανολογία

Η πολυπαραμετρικότητα του φθορισμού επιτρέπει την αυξημένη εκλεκτικότητα των φθορισμομετρικών μεθόδων από την αξιοποίηση περισσότερων της μίας παραμέτρων.

Ο περιορισμένος αριθμός ουσιών που έχει την ικανότητα εκπομπής φθορισμού να αποτελεί μειονέκτημα αλλά και πλεονέκτημα εφόσον μία φθορίζουσα ένωση μπορεί να προσδιοριστεί χωρίς προκαταρκτικό διαχωρισμό από άλλες ενώσεις που δεν εκπέμπουν φωταύγεια, ή εκπέμπουν φωταύγεια σε διαφορετικές φασματικές περιοχές. Ιδιαίτερη σπουδαιότητα έχουν οι εφαρμογές της φθορισμομετρίας στη Φαρμακευτική Ανάλυση, την Τοξικολογία, την Κλινική Χημεία, την Εγκληματολογία, τη Βιοχημεία, Περιβαλλοντική Χημεία, κλπ.

Οργανολογία

Για τη μέτρηση της ισχύος της ακτινοβολίας φθορισμού υπάρχουν δύο τύποι οργάνων, τα φθορισμόμετρα και τα φασματοφθορισμόμετρα, ανάλογα με το αν τα οπτικά τους συστήματα περιέχουν φίλτρα ή μονοχρωμάτορες. Οι βασικές μονάδες των οργάνων αυτών απεικονίζονται στο σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1

Σχηματικό διάγραμμα φασματοφθορισμομέτρου

Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή φωτός, διέρχεται από ένα πρωτογενές φίλτρο ή μονοχρωμάτορα, το οποίο επιτρέπει τη διέγερση μόνο εκείνου του τμήματος του φάσματος, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση των μορίων (το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας διέγερσης, συνήθως 95-98% διέρχεται από την κυψελίδα του δείγματος, χωρίς να απορροφηθεί από αυτό). Η ακτινοβολία

φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις (ο φθορισμός είναι μια ιστροπική ιδιότητα), συνήθως όμως μετρείται υπό γωνία 90° ως προς τη διεγείρουσα ακτινοβολία, για ελαχιστοποίηση της ανίχνευσης της δέσμης διέγερσης και της παράσιτης ακτινοβολίας (ευθυγράμμιση πηγής φωτός-δείγματος-ανιχνευτή καθιστά προβληματική τη διάκριση της ασθενούς ακτινοβολίας φθορισμού από την ισχυρή ακτινοβολία διέγερσης).

Η ακτινοβολία φθορισμού διέρχεται από ένα δευτερογενές φίλτρο ή μονοχρωμάτορα, το οποίο επιτρέπει τη δίοδο μικρού φασματικού εύρους (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 μέτρησης (αναλογικό ή ψηφιακό μετρητή, καταγραφέα ή παλμογράφο). Για την ίδια πηγή φωτός, τα φίλτρα επιτρέπουν τη δίοδο δέσμης φωτός μεγαλύτερου φασματικού εύρους από ότι οι μονοχρωμάτορες, επομένως και μεγαλύτερης ισχύος P_0 , καθιστώντας έτσι τα φθορισμόμετρα περισσότερο ευαίσθητα από τα φασματοφθορισμόμετρα.