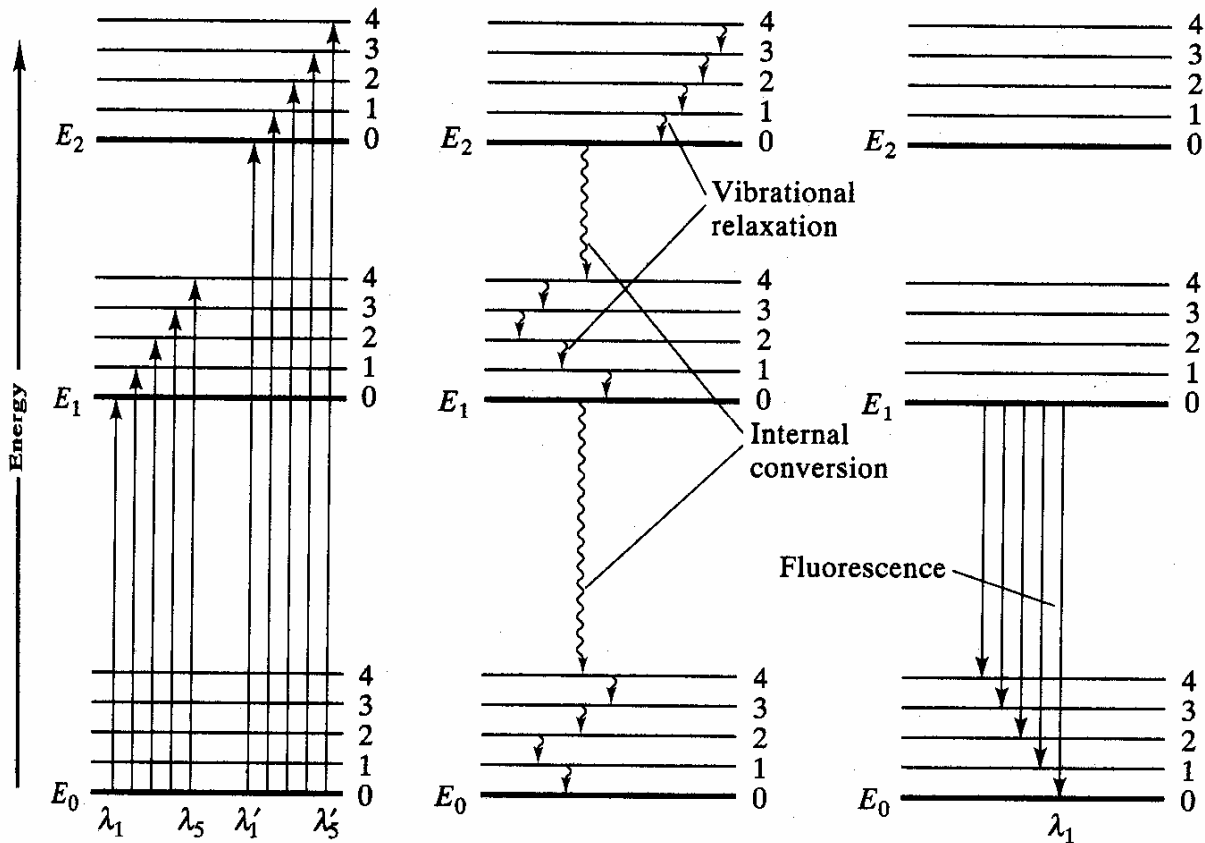


ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

Διεγείρεται το μόριο σε ένα μήκος κύματος απορρόφησης και μετρείται η εκπομπή σε ένα άλλο μήκος κύματος που καλείται φθορισμού.

Π.χ. Το δι-νυκλεοτίδιο της Νικοτιναμίδης- Αδενίνης (NADH), απορροφά στα 340nm και εκπέμπει ενέργεια φθορισμού στα 465nm.



E_0 = Βασική Ενεργειακή Κατάσταση

E_1 και E_2 = Κατάσταση Υψηλότερης Ενέργειας.

1, 2...4 = Ενεργειακά επίπεδα δόνησης.

- Υπάρχουν 4 τρόποι απόδιέγερσης (εκπομπής) ακτινοβολίας
 - Απόσβεση δια συγκρούσεως με μόρια άλλων ουσιών ($4 \rightarrow 3 \rightarrow 2 \rightarrow 1 \rightarrow 0$)
 - Εσωτερικής Μετατροπής ($E_1 \rightarrow E_0 + \text{θερμότητα}$) η οποία παρατηρείται σε μόρια με υψηλό βαθμό δόνησης (αλειφατικά), και η εκπομπή λαμβάνει χώρα σε 10^{-10} sec.
 - Εκπομπή φθορισμού ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{φθορ}}$) με $\nu_{\text{φθορ}} < \nu_{\text{ακτ}}$. Παρατηρείται σε μόρια με περιορισμένο βαθμό δονητικής ελευθερίας (αρωματικά και με πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς).
 - Διασυστηματική διασταύρωση ($T_1 \rightarrow E_0 + h\nu_{\text{φωσ}}$).

- Επειδή το αποδιεγειρόμενο άτομο μπορεί να καταλήξει σε οποιαδήποτε από τις στάθμες δόνησεως της E_0 , το φάσμα φθορισμού συνίσταται από πλήθος γραμμών οι οποίες παρουσία διαλύτη πλατύνονται και αλληλοκαλύπτονται.
- Επειδή η εμφάνιση φθορισμού προέρχεται μόνο από τη μετάπτωση $E_1 \rightarrow E_0$ έχουμε μόνο μια ζώνη φθορισμού.

Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής

Έχουμε 2 είδη φασμάτων τα διεγέρσεως και εκπομπής.

- Φάσμα Διέγερσης

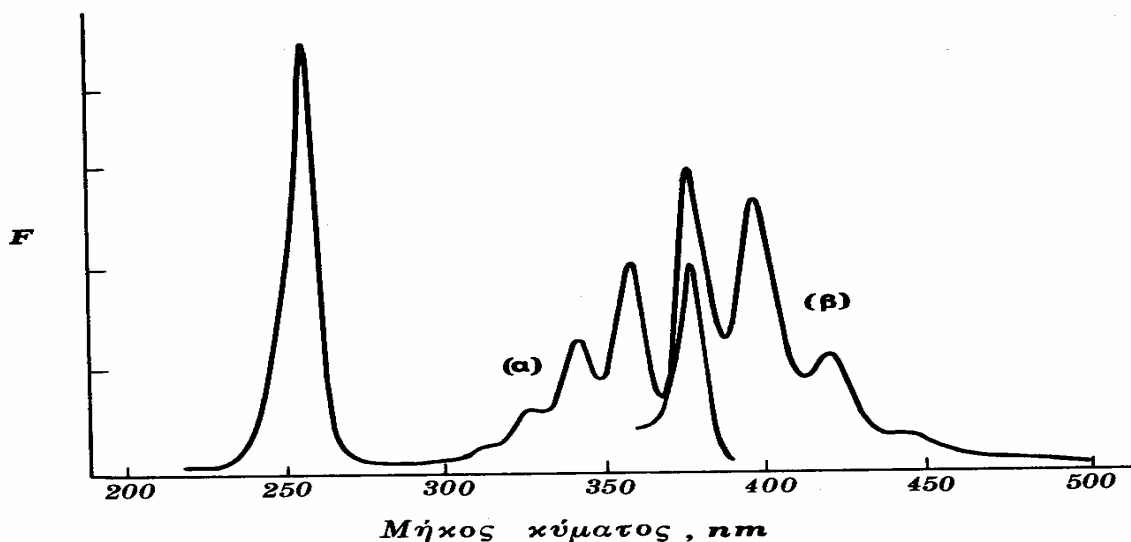
Απεικόνιση της ακτινοβολίας φθορισμού F σε συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως

Το φάσμα διέγερσης λαμβάνεται επιλέγοντας το λ_{\max} εκπομπής σταθερό και μεταβάλλοντας το μήκος κύματος της διέγερσης.

- Φάσμα Εκπομπής

Απεικόνιση της ακτινοβολίας φθορισμού F σε συνάρτηση του μήκους(φθορισμού) κύματος της ακτινοβολίας εκπομπής (φθορισμού).

Το φάσμα διέγερσης λαμβάνεται επιλέγοντας το λ_{\max} της διέγερσης σταθερό και μεταβάλλοντας το μήκος κύματος της εκπομπής (φθορισμού).



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 ($\lambda = 250 \text{ nm}$).

Η ακτινοβολία F είναι ανάλογη της ισχύος της απορροφούμενης ακτινοβολίας

$$F = \Phi(P_0 - P)$$

Φ = ικανότητα φθορισμού της ουσίας ($= \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια}}$)

και επειδή $P/P_0 = 10^{-\epsilon bc} = e^{-2,3\epsilon bc}$ (νόμος του Beer)

$$F = \Phi P_0 (1 - e^{-2,3\epsilon bc})$$

$$e^x = 1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots$$

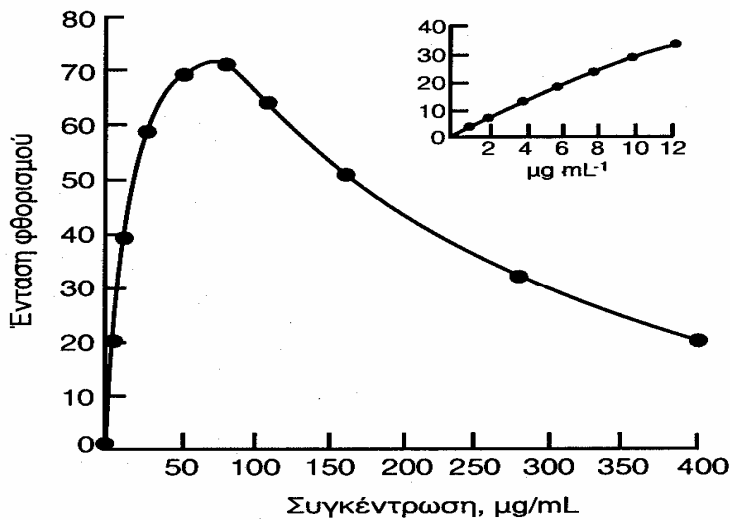
$$F = \Phi P_0 (2,3\epsilon bc - \frac{(2,3\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,3\epsilon bc)^3}{3!} \dots)$$

Για $\epsilon cb < 0,05$ ($c < 10^{-5}$)

$$F = 2,3\Phi P_0 \epsilon bc = kc$$

e = μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας στο λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας διεγέρσεως.

- Η γραφική απεικόνιση $F = f(c)$, δίδει καμπύλη αναφοράς η οποία είναι ευθεία μέχρι μια μέγιστη συγκέντρωση c_{\max} η οποία ορίζεται από τη σχέση $c_{\max} = 0,05/\epsilon b$.



Ένταση φθορισμού της φαινόλης στο νερό σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση. Διέγερση 296 nm, φθορισμός 330 nm, pH=6.5.

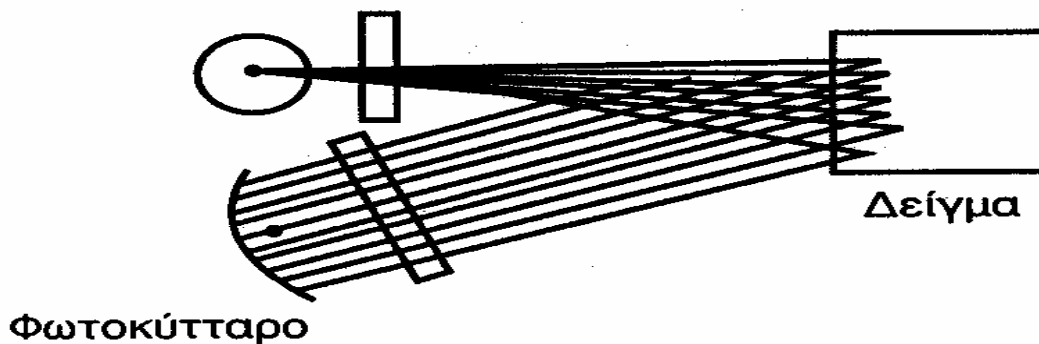
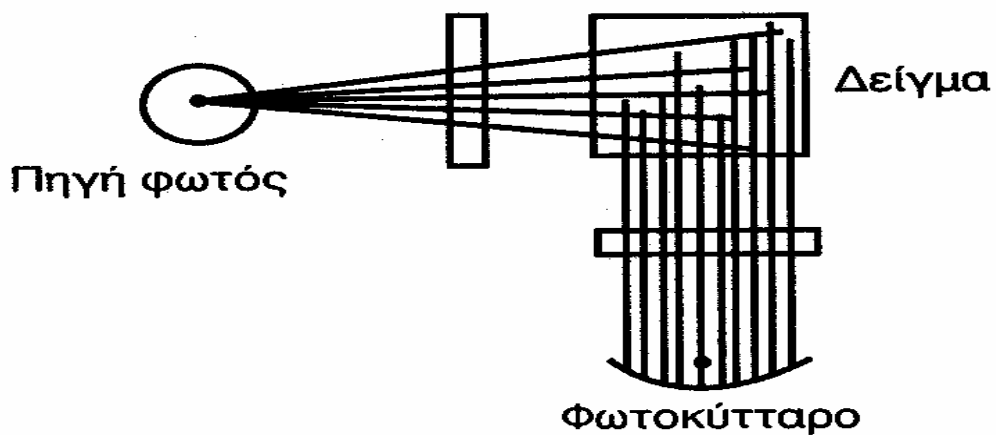
Παράγοντες που επιδρούν στον φθορισμό

- Συγκέντρωση
- Ξένα μόρια
- Διαλύτης
- pH
- Θερμοκρασία
- Οξυγόνο
- Φωτοδιάσπαση

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

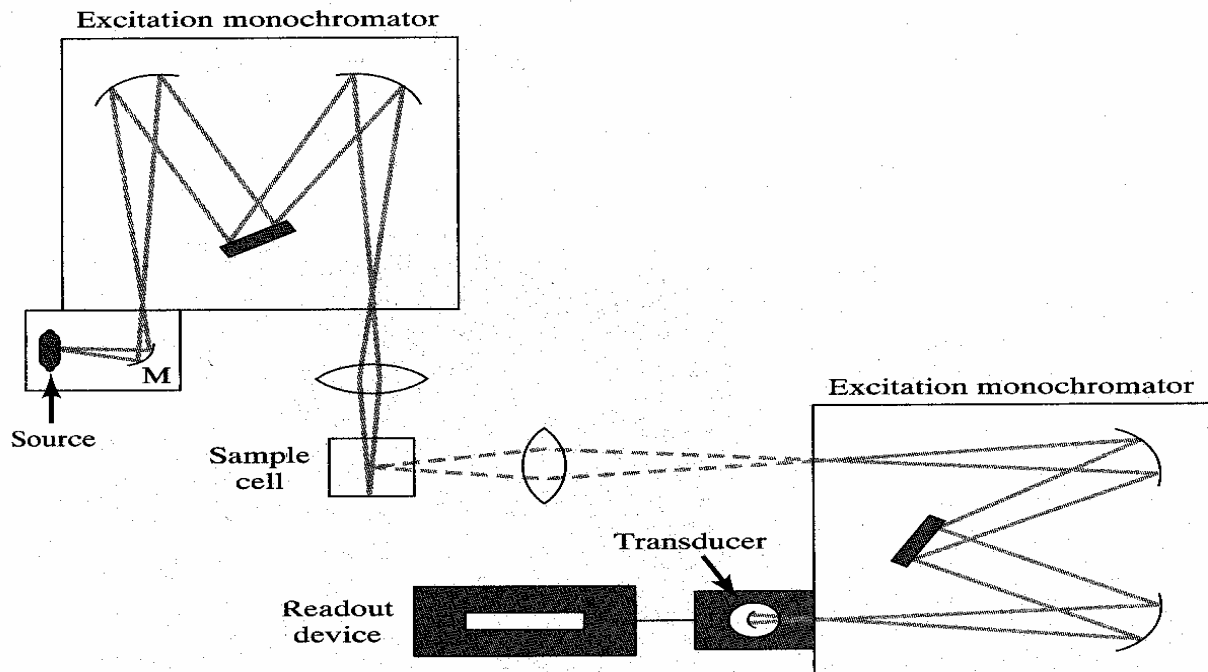
Οι βασικές μονάδες είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες των φωτόμετρων και φασματοφωτομέτρων.

Διακρίνονται δύο τύποι, τα **φθορισμόμετρα** και τα **φασματοφθορισμόμετρα**, αναλόγως αν τα οπτικά τους συστήματα αποτελούνται από φίλτρα ή από **μονοχρωμάτορες**.



- Η ακτινοβολία εκπέμπεται από την πηγή φωτός
- Διέρχεται από ένα φίλτρο διεγέρσεως το οποίο επιτρέπει τη δίοδο της δέσμης που θα χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση των μορίων
- Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις (συνήθως μετρείται υπό γωνία 90°)
- Διέρχεται από το φίλτρο φθορισμού το οποίο επιτρέπει μόνο την ταινία φθορισμού
- Προσπίπτει στο Φωτοκύτταρο.

Τα φασματοφθορισμόμετρα περιέχουν δυο μονοχρωμάτορες για την απομόνωση του επιθυμητού μήκους κύματος διεγέρσεως και φθορισμού.



Πηγές Φωτός

Τα κυριότερα ποιότητας μιας πηγής φωτός είναι η σταθερότητα και η έντασή της.

Απαιτείται πιο ισχυρότερη πηγή από τη λυχνία βολφραμίου ή υδρογόνου του UV.

- Τόξου υδραργύρου υψηλής πίεσεως με εντονότερη γραμμή στα 366nm.
- Τόξου υδραργύρου χαμηλής πίεσεως με εντονότερη γραμμή στα 254nm
- Τόξου υδραργύρου υψηλής πίεσεως με επικάλυψη φωσφόρου με φάσμα εκπομπής από 300-400nm και μέγιστο στα 365nm
- Τόξου αερίου ξένου με φάσμα εκπομπής από 250-600nm και μέγιστο στα 470nm.
- Lasers

Επιλογείς μήκους κύματος

χρησιμοποιούνται φίλτρα υάλου στα φθορισμόμετρα και φράγματα στα φασματοφθορισμόμετρα.

Κατά τη λήψη φάσματος διεγέρσεως πρέπει το εύρος των σχισμών του μονοχρωμάτορα διεγέρσεως να είναι μικρό(καλή διαχωριστικότητα) του δε μονοχρωμάτορα εκπομπής μεγάλο(υψηλή αναισθησία).

Ανιχνευτές

Φωτοπολλαπλασιαστές.

Κυψελίδες

Από ύαλο η χαλαζία. Ο θάλαμος είναι επιμελώς μαυρισμένος εσωτερικά ώστε να απορροφά οποιαδήποτε άλλη ακτινοβολία.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ.

Με τη φθορισμομετρία είναι δυνατό να κάνουμε:

- Ποσοτική Ανάλυση(μέτρηση της έντασης φθορισμού)
- Ποιοτική ανάλυση (το φάσμα είναι χαρακτηριστικό των μορίων)

Πλεονεκτεί ως προς την ευαισθησία και εκλεκτικότητα.

Ευαισθησία

Έως 10^{-12} Μ (Φασματοσκοπία το πολύ έως 10^{-9} Μ)

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Πίνακας 3.1. Πεδία Εφαρμογών της 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, σαλυκυλικά, 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.	