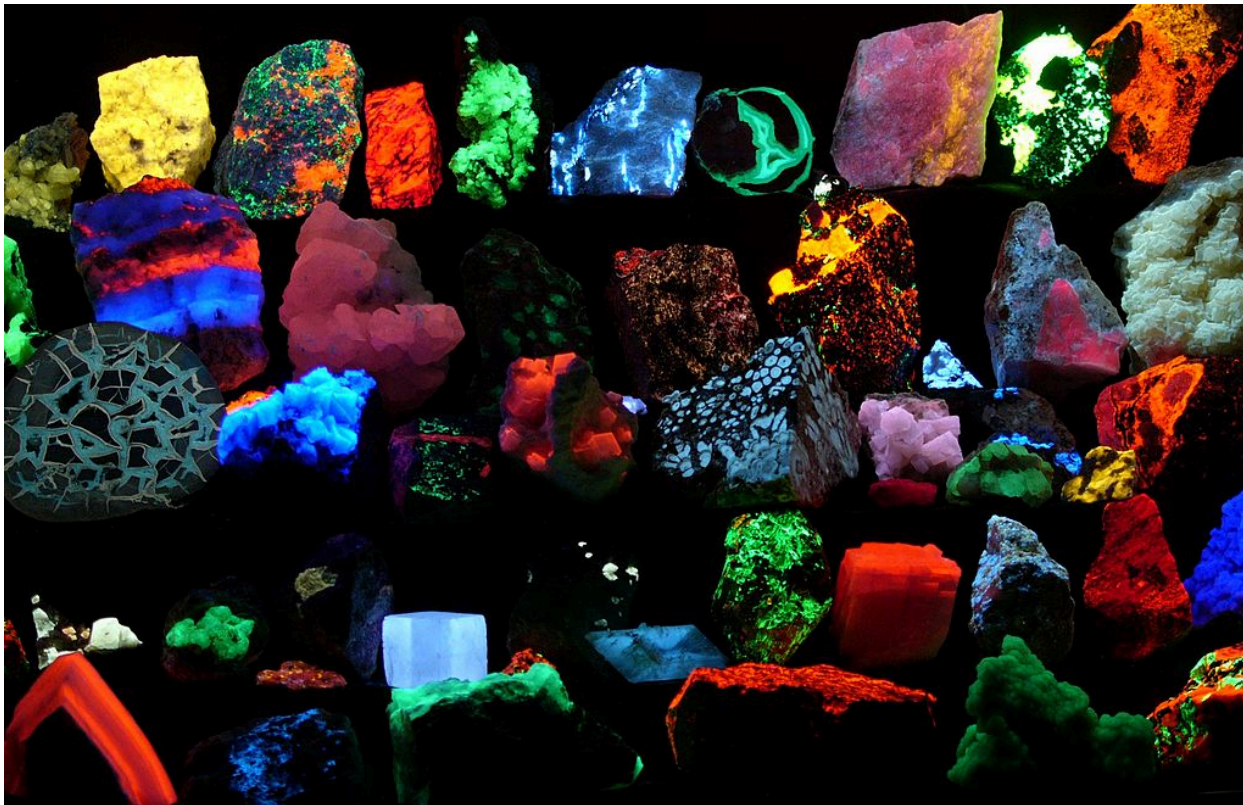


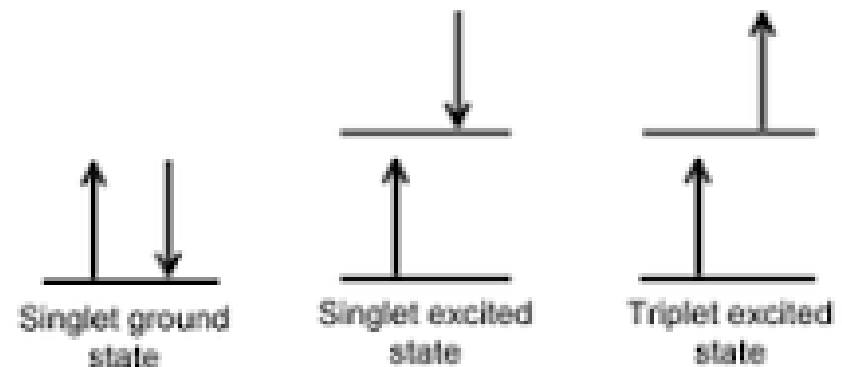
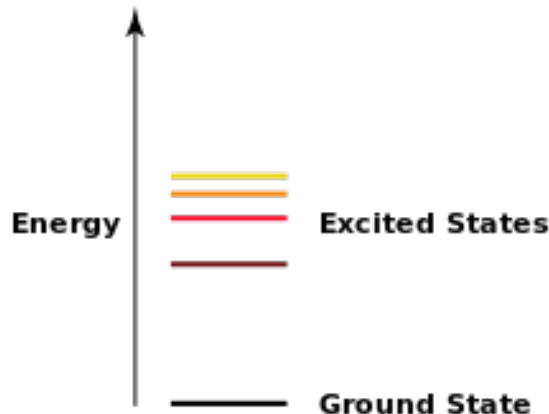
Φθορισμομετρικός προσδιορισμός κινίνης σε tonic water



Βασικές αρχές

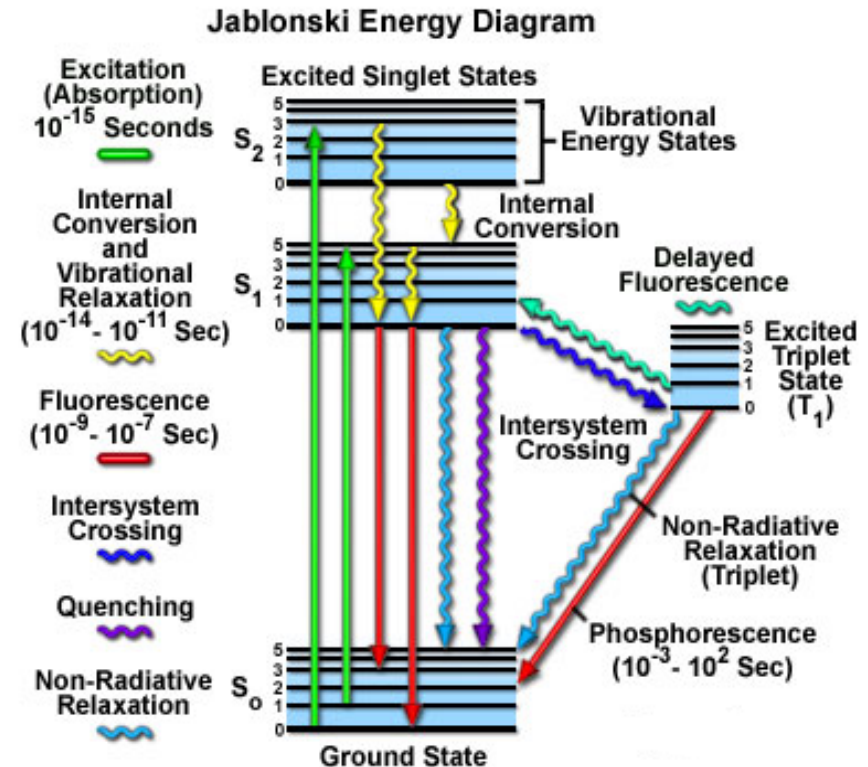
Οι ηλεκτρονιακές στάθμες:

- Διακρίνονται στη θεμελιώδη απλή S_0 και στις διεγερμένες (S και T)
- Χαρακτηρίζονται ως απλές S (διαμαγνητικές) ή τριπλές T (παραμαγνητικές). Οι τριπλές είναι φτωχότερες ενεργειακά.
- Η μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι επιτρεπτή ενώ η $S_0 \rightarrow T_1$ είναι «απαγορευμένη» λόγω της μικρής πιθανότητας αναστροφής spin στο διεγερμένο e^- .



Φωτοδιέγερση μορίου

- Απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα μόριο οδηγεί σε μετάπτωση e^- από n μη δεσμικά ή π δεσμικά τροχιακά σε π^* αντιδεσμικά.
- Έτσι το μόριο μεταβαίνει από την θεμελιώδη απλή κατάσταση S_0 στις απλές διεγερμένες S_1, S_2, \dots



Διαδικασία αποδιέγερσης

- Αρχικώς γίνεται μετάπτωση από S_2, S_3, \dots σε S_1 με δονητική ή θερμική επαναφορά και εσωτερική μετατροπή με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας.
- Με τη δονητική επαναφορά γίνεται μεταφορά θερμότητας στα μόρια του διαλύτη κατά τη σύγκρουση αυτών με τα διεγερμένα μόρια.
- Η περαιτέρω αποδιέγερση από $S_1 \rightarrow S_0$ γίνεται είτε με έκλυση θερμότητας ή με **εκπομπή φωταύγειας** δηλαδή δευτερογενούς ακτινοβολίας.
- Υπάρχουν 3 πιθανές διεργασίες, που εξαρτώνται από τη φύση του διεγερμένου μορίου.

Εσωτερική μετατροπή (IC)

- Μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_0$ με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.
- Η διεργασία αυτή παρατηρείται **κυρίως σε αλειφατικά μόρια** και γενικώς σε μόρια με υψηλό βαθμό δονητικής ελευθερίας.
- Αναμένεται σε 10^{-11} sec μετά τη διέγερση.

Εκπομπή φθορισμού (F)

- Μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_0$ με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας φθορισμού ενέργειας $h \cdot \nu_{\Phi}$.
- Η συχνότητα φθορισμού ν_{Φ} είναι μικρότερη από τη συχνότητα διεγέρσεως ν_{Δ} λόγω της απώλειας μέρους της απορροφημένης ενέργειας κατά τις διεργασίες δονητικής επαναφοράς και εσωτερικής μετατροπής.
- Φθορισμός συμβαίνει σε μόρια με περιορισμένη δονητική ελευθερία όπως αρωματικά ή μόρια με πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς κυρίως μετά από μετάπτωση e^- από π δεσμικά τροχιακά σε π^* αντιδεσμικά.
- Αναμένεται σε 10^{-9} sec μετά τη διέγερση.

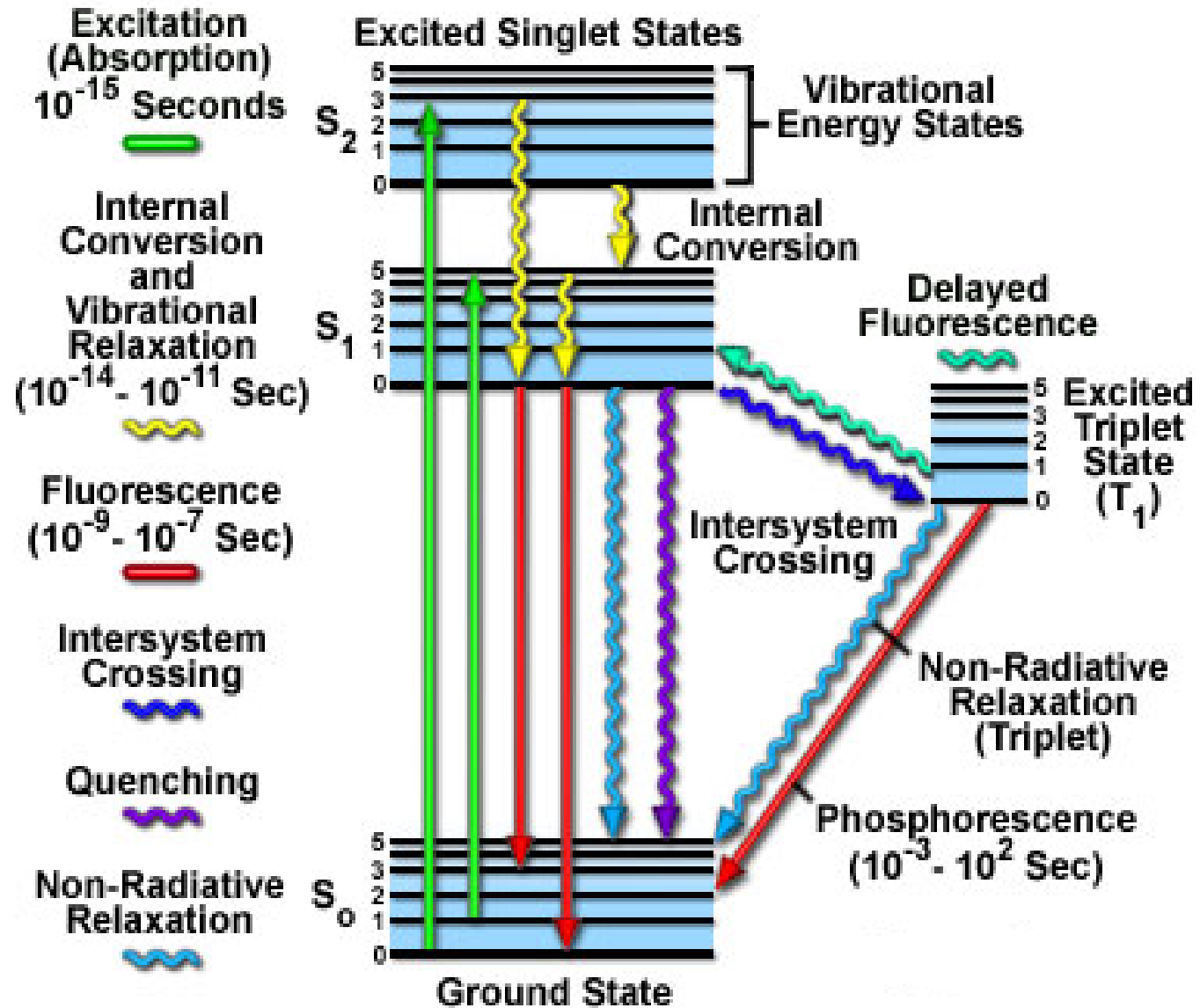
Απόσβεση (φθορισμού)

- Είναι αποτέλεσμα συγκρούσεως των διεγερμένων μορίων με μόρια άλλων ουσιών που υπάρχουν στο διάλυμα.
- Προκαλεί εξασθένιση ή πλήρη εξαφάνιση του φθορισμού.

Διασυστηματική διασταύρωση και φωσφορισμός

- Γίνεται αρχικώς διασυστηματική διασταύρωση δηλαδή μετάπτωση $S_1 \rightarrow T_1$ με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας.
- Στη συνέχεια γίνεται μετάπτωση $T_1 \rightarrow S_0$ με εκπομπή **ακτινοβολίας φωσφορισμού** ενέργειας $h \cdot \nu_{\Phi\omega}$.
- Η T_1 έχει μικρότερη ενέργεια από την S_1 και $\nu_{\Phi\omega} < \nu_{\Phi}$ οπότε ο φωσφορισμός είναι πολύ ασθενής φωταύγεια.
- Φωσφορισμός συμβαίνει κυρίως μετά από μετάπτωση e^- από η μη δεσμικά τροχιακά σε π^* αντιδεσμικά.
- Αναμένεται σε $>10^{-4}$ sec μετά τη διέγερση.

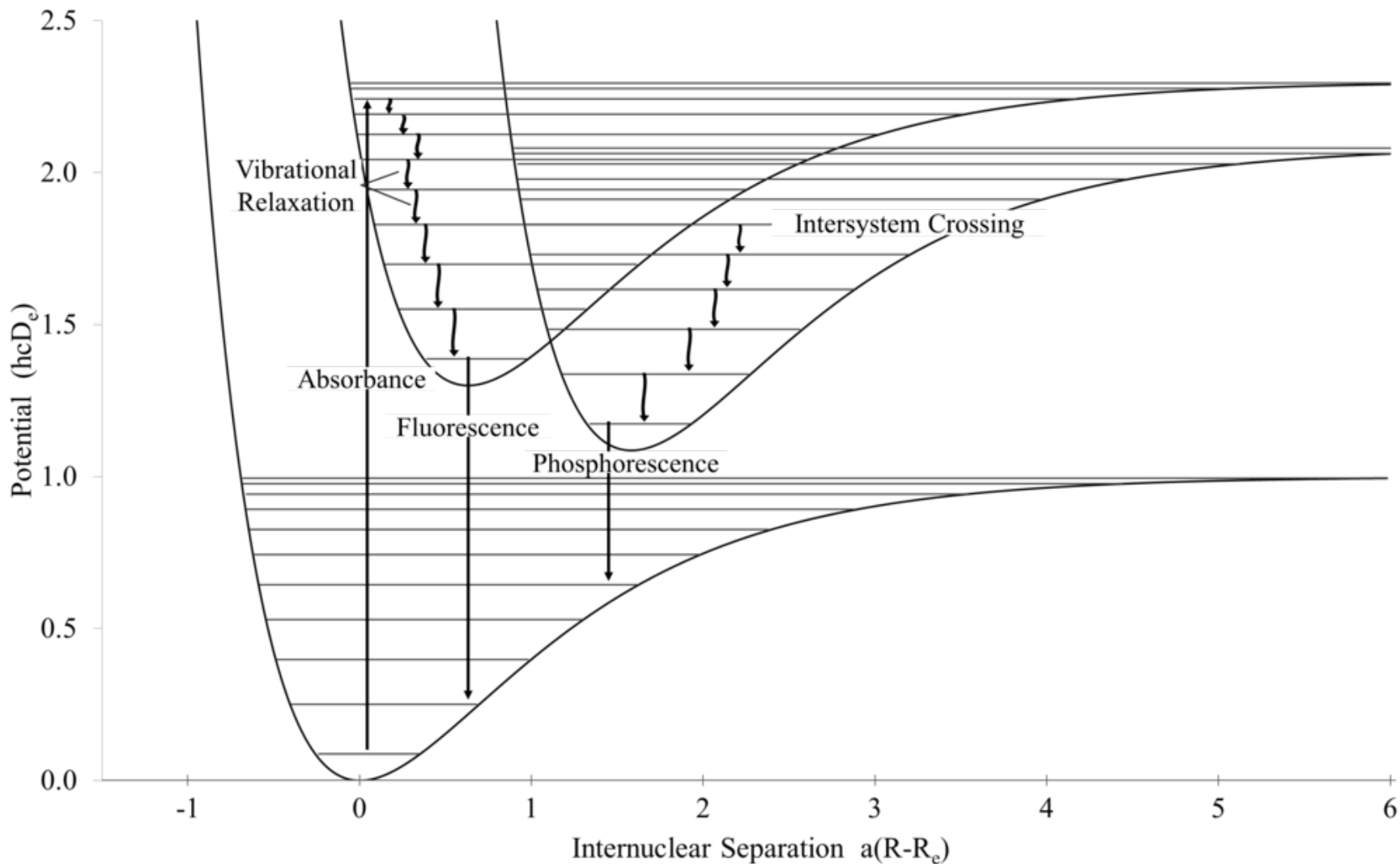
Jablonski Energy Diagram



Στον φθορισμό έχουμε:

Φωτοδιέγερση -- Αποδιέγερση

Διασυστηματική διασταύρωση



Φαινόμενα:	Χρόνος (sec)
A Απορρόφηση	10^{-15}
IC Εσωτερική μετατροπή	10^{-11}
F Φθορισμός	10^{-9}
ISC Διασυστηματική διασταύρωση	10^{-6}
P Φωσφορισμός	$>10^{-4}$

- DF Στιβάδα φθορισμού
- S, T απλές και τριπλές καταστάσεις

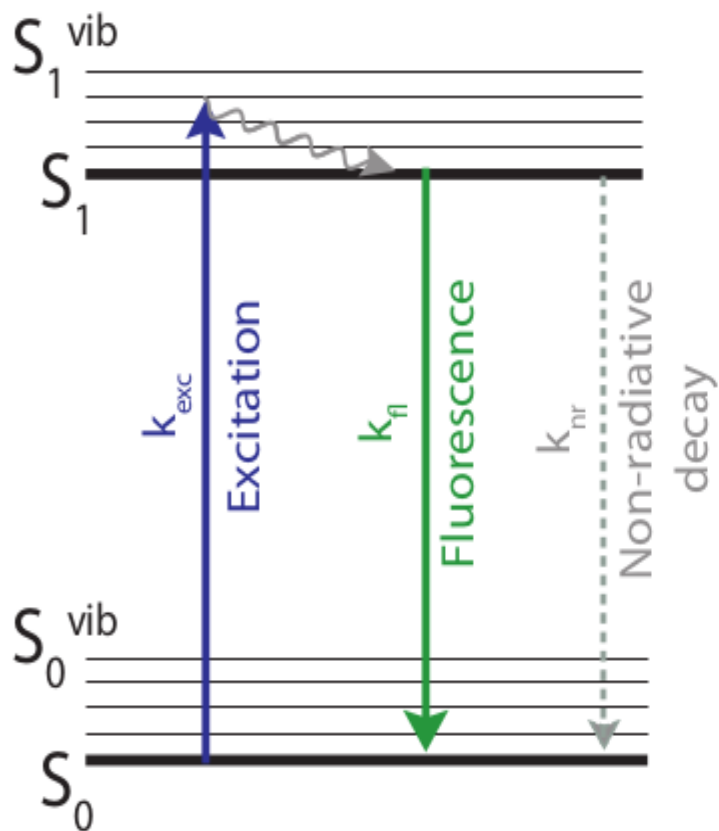
Φάσματα διεγέρσεως και φθορισμού

Για τα φάσματα διεγέρσεως και φθορισμού ισχύει:

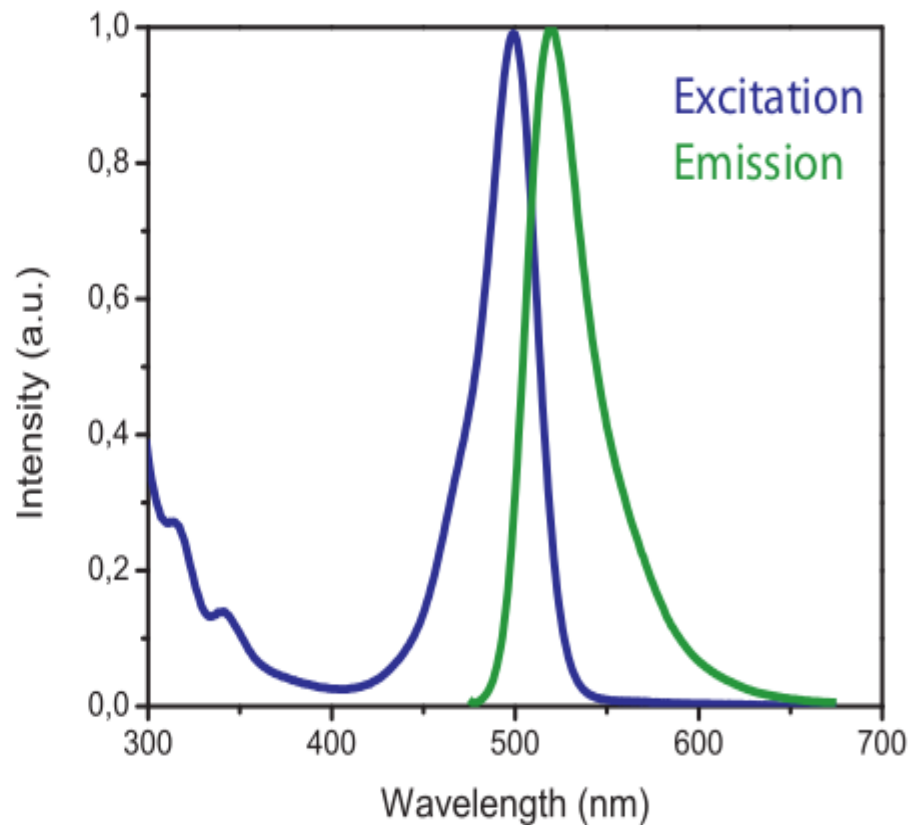
- Σχέση ειδώλου – αντικειμένου
- Το φάσμα φθορισμού είναι μετατοπισμένο σε υψηλότερα μήκη κύματος.
- Η εμφάνιση μόνο μία ζώνης στο φάσμα φθορισμού έναντι περισσότερων στο φάσμα διεγέρσεως.

- $E_{\text{φθορισμού}} < E_{\text{διεγέρσεως}}$ ---
 $\lambda_{\text{φθορισμού}} > \lambda_{\text{διεγέρσεως}}$
- Ο φθορισμός γίνεται σε χρόνο 10^{-9} s μετά τη διέγερση--- άμεση μέτρηση κατά τη διέγερση

Εκπομπή φθορισμού

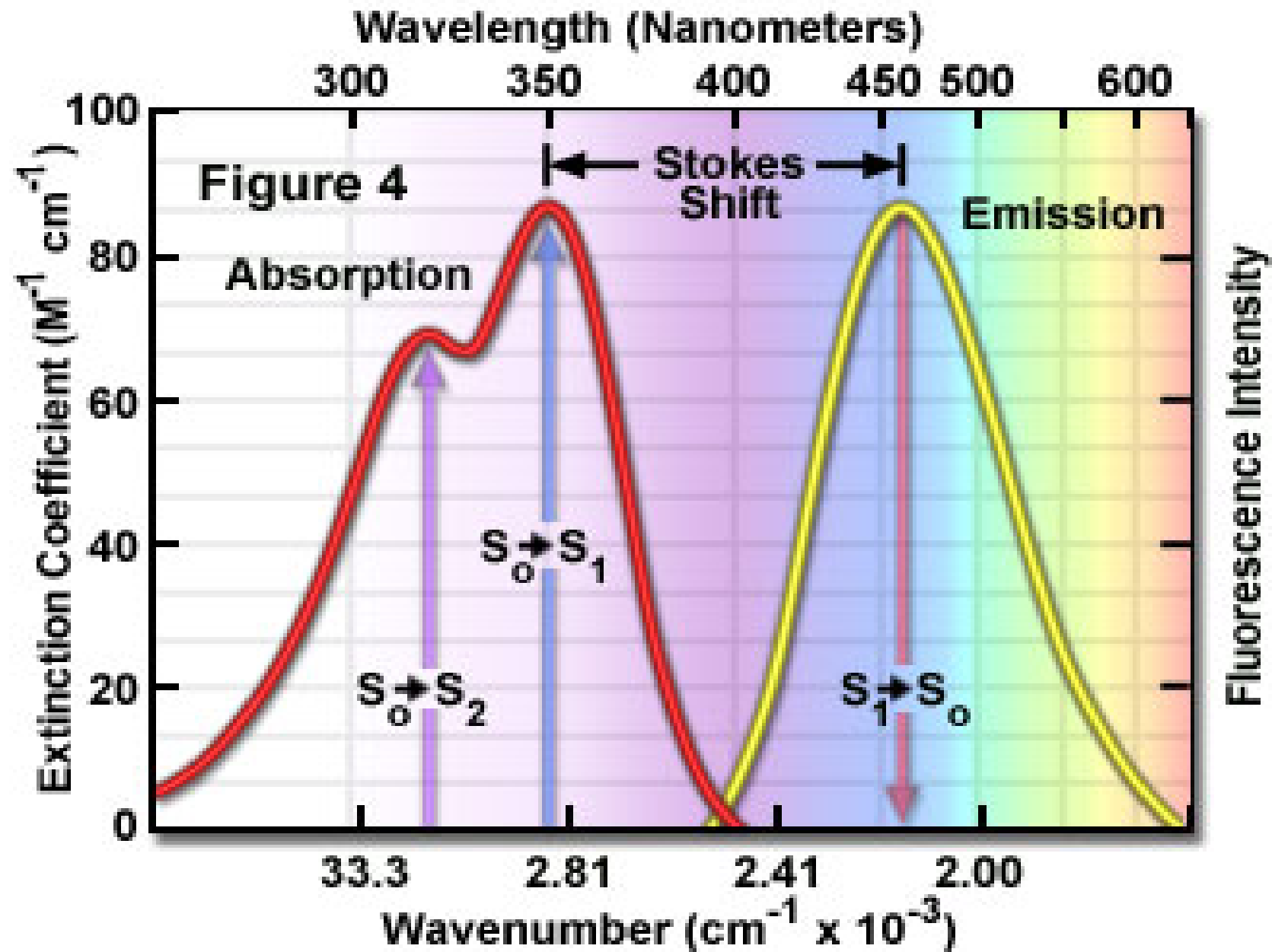


(a)

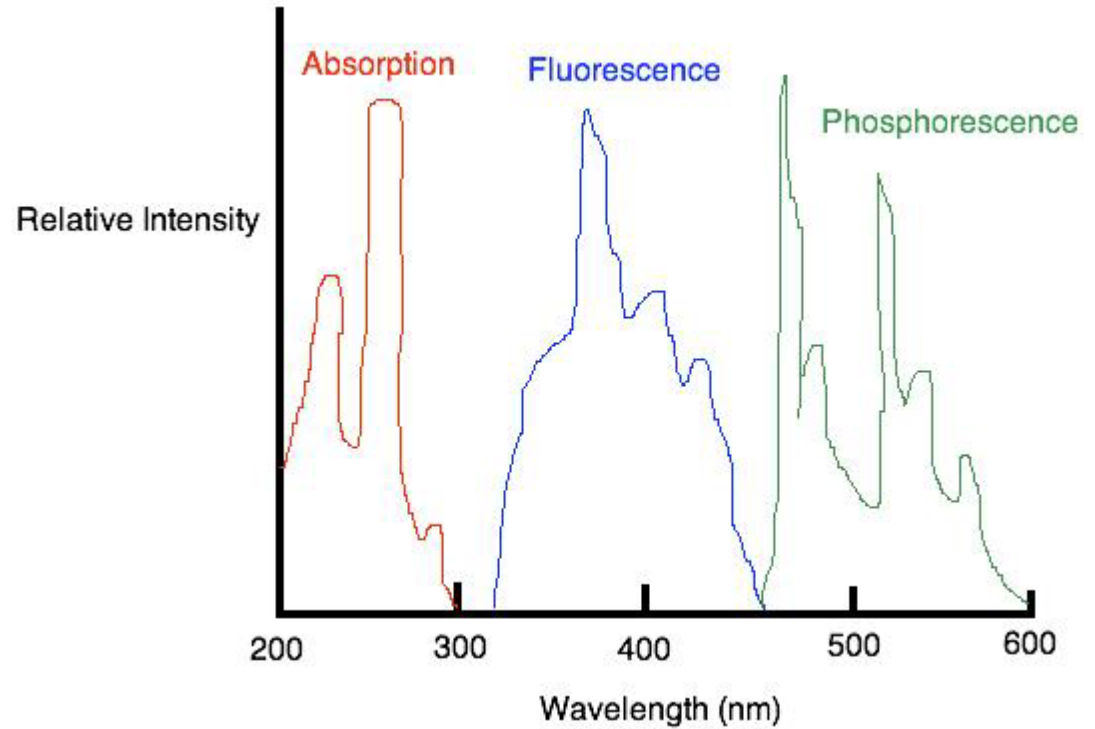
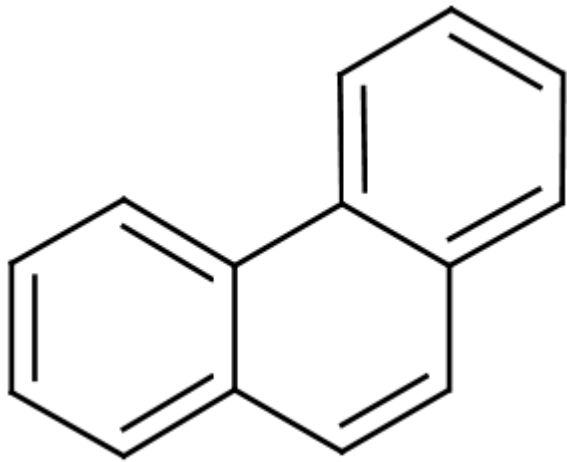


(b)

Quinine Absorption and Emission Spectra



Δομή και Φάσματα Φαινανθρενίου



Προϋποθέσεις φθορισμού

- Ύπαρξη κατάλληλης μοριακής δομής ώστε να απορροφά στο UV ή Vis.
- Ακαμψία μορίου που **αποτρέπει** τη διαδικασία της εσωτερικής μετατροπής προς όφελος του φθορισμού.
- Ύπαρξη αρωματικού δακτυλίου στο μόριο ή πολλαπλών συζυγιακών διπλών δεσμών ώστε να γίνονται διεγέρσεις $\pi \rightarrow \pi^*$.
- Ο φθορισμός των αρωματικών ενώσεων αυξάνεται με την επιπεδότητα του μορίου που αυξάνει την ακαμψία του.
- Σχηματισμός χηλικών ενώσεων με μεταλλοϊόντα

Ύπαρξη πυρηνόφιλων υποκαταστατών ευνοούν το φθορισμό

- Ηλεκτρονιοδότες ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) αυξάνουν το φθορισμό. Διευκολύνουν τη μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_0$
- Ηλεκτρονιόφιλες ομάδες ($-\text{COOH}$, $-\text{NO}_2$, αλογονοϊόντα) μειώνουν ή εξαλείφουν το φθορισμό

Παράγοντες που επιδρούν στον φθορισμό

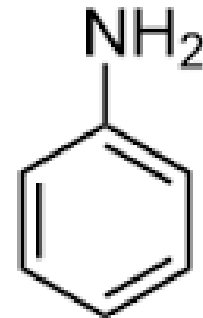
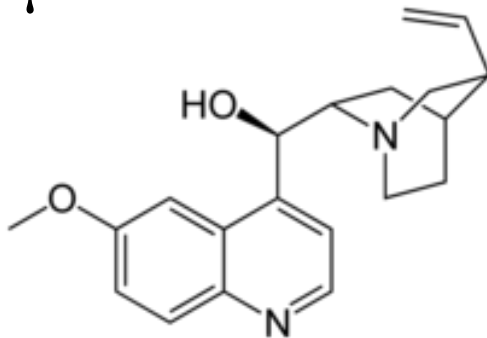
- pH
- Διαλύτης
- Θερμοκρασία
- Παρουσία ξένων μορίων
- Παρουσία οξυγόνου
- Φωτοδιάσπαση
- Συγκέντρωση

pH

- Σε πολλές ουσίες που ιοντίζονται φθορίζει μόνο η μία δομή μοριακή ή ιοντισμένη οπότε απαιτείται κατάλληλη ρύθμιση του pH.

Π.χ.

- Η κινίνη φθορίζει σε ισχυρώς όξινα διαλύματά της
- Η ανιλίνη φθορίζει σε ουδέτερα και αλκαλικά της διαλύματα.



Διαλύτης

- Ο φθορισμός ευνοείται με την αύξηση της πολικότητας και του ιξώδους του διαλύτη.
- Ο διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά ακτινοβολία διεγέρσεως και κυρίως φθορισμού.
- Πρέπει να είναι χημικά αδρανής και να μην επηρεάζει τη χημική δομή της φθορίζουσας ουσίας.
- Να ευνοεί φαινόμενα ιοντισμού

Θερμοκρασία

- Αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί φαινόμενα αποσβέσεως οπότε τον κίνδυνο αναστολής του φθορισμού.
- Η θερμοκρασία μεταβαλλόμενη μεταβάλλει και την ισχύ του φθορισμού οπότε όλα τα διαλύματα (πρότυπα και δείγματα) πρέπει να αναλύονται στην ίδια θερμοκρασία.
- Απαιτείται ταχεία ανάγνωση ένδειξης φθορισμού για αποφυγή θέρμανσης δείγματος

Παρουσία ξένων ενώσεων

- Μπορούν να αλλοιώσουν την φθορισμομετρική ανάλυση οπότε πρέπει να απομακρύνονται.
- Μπορεί να απορροφούν ακτινοβολία διεγέρσεως και κυρίως φθορισμού.
- Μπορεί να φθορίζουν.
- Μπορεί να αλληλεπιδρούν με τη φθορίζουσα ουσία επηρεάζοντας την ικανότητά της να φθορίζει.
- Μπορεί να προκαλούν φαινόμενα αποσβέσεως.

Απόσβεση φθορισμού κινίνης λόγω της παρουσίας
χλωριούχων στο αριστερό ποτήρι



Παρουσία οξυγόνου

- Μπορεί να οξειδώσει τη φθορίζουσα ουσία προς μη φθορίζον προϊόν
- Μπορεί να προκαλέσει φαινόμενα αποσβέσεως.
- Απομακρύνεται με απαέρωση των δειγμάτων πριν την ανάλυση.

Φωτοδιάσπαση

- Αν η ακτινοβολία διεγέρσεως είναι υψηλής ισχύος υπάρχει κίνδυνος φωτοδιασπάσεως της φθορίζουσας ουσίας.
- Απαιτείται επίσπευση των μετρήσεων
- Εναλλακτικά ακτινοβολία διεγέρσεως όπου η ουσία δεν απορροφά ισχυρώς.

Συγκέντρωση – Τυπολόγιο φθορισμομετρίας

- Η ισχύς F του φθορισμού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας.
- Επειδή συνήθως μέρος της απορροφούμενης ισχύος ($P_0 - P$) χάνεται η ισχύς του φθορισμού είναι ανάλογη με το γινόμενο της ($P_0 - P$) επί τον συντελεστή κβαντικής αποδόσεως Φ που εκφράζει το κλάσμα των εκπεμπομένων φωτονίων προς τα απορροφούμενα και λαμβάνει τιμές $0 < \Phi < 1$.
- Ισχύει: $F = \Phi \cdot (P_0 - P)$
- Για να συσχετίσουμε την ισχύ F φθορισμού με τη συγκέντρωση φθορίζουσας ουσίας λαμβάνουμε τον νόμο Beer.

$$A = \log(P_0/P) = \epsilon bc \text{ οπότε } P/P_0 = 10^{-\epsilon bc} = e^{-2,3\epsilon bc}$$

Με χρήση ιδιοτήτων αναλογιών ισχύει:

$$1 - P/P_0 = 1 - e^{-2,3\epsilon bc} \text{ και } (P_0 - P)/P_0 = 1 - e^{-2,3\epsilon bc}$$

$$\text{οπότε } (P_0 - P) = P_0 (1 - e^{-2,3\epsilon bc})$$

Αντικαθιστώντας στην $F = \Phi \cdot (P_0 - P)$ προκύπτει:

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

Για πολύ αραιά διαλύματα εφ' όσον $\epsilon bc < 0,05$

η εκθετική συνάρτηση γίνεται γραμμική, δηλαδή

$$F = 2,3 \cdot \Phi \cdot P_0 \cdot \epsilon bc \text{ ή τελικώς } \mathbf{F = \kappa \cdot c}$$

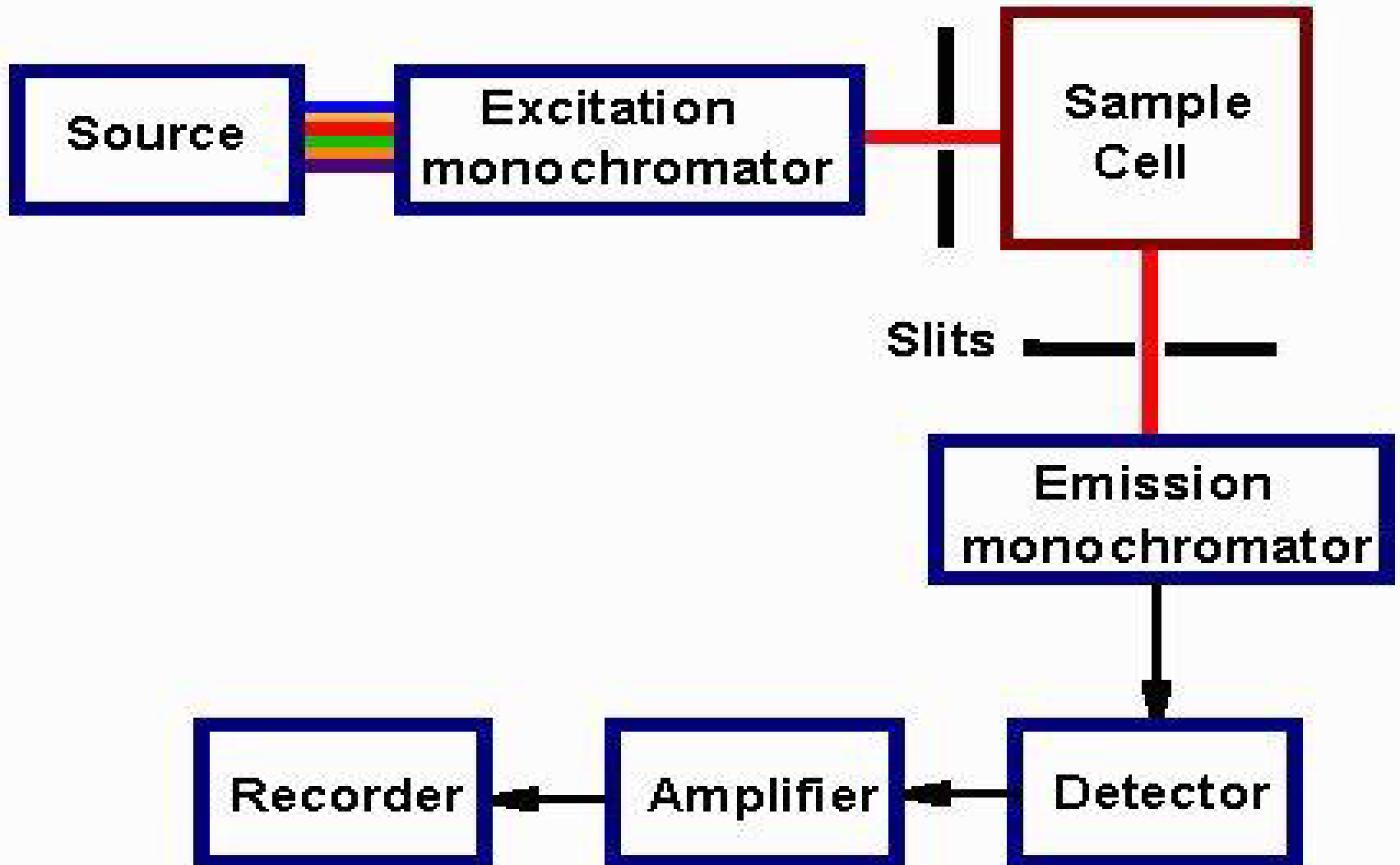
Χαρακτηριστικά φθορισμομέτρων

- Διακρίνονται δύο τύποι, τα φθορισμόμετρα και τα φασματοφθορισμόμετρα, αναλόγως αν τα οπτικά τους συστήματα αποτελούνται από φίλτρα η από μονοχρωμάτορες.
- Μέτρηση εντάσεως φθορισμού υπό γωνία 90° ως προς την ακτινοβολία διέγερσης
- Ελαχιστοποίηση ανίχνευσης ακτινοβολίας διέγερσης και παράσιτης ακτινοβολίας
- Έχουν δύο επιλογείς μήκους κύματος

Φθορισμόμετρα

- Λάμπα - Πολυχρωματική ακτινοβολία
- Φίλτρο διέγερσης (αντί μονοχρωμάτορα) για επιλογή $\lambda_{\text{διεγέρσεως}}$ (από φάσμα απορρόφησης).
- Η πηγή του φθορισμού είναι η κυψελίδα. Φθορίζει προς όλες τις κατευθύνσεις. Ο ανιχνευτής τοποθετείται σε διάταξη 90° σε σχέση με το φίλτρο διέγερσης.
- Ανιχνευτής καθορισμένος στο $\lambda_{\text{φθορισμού}}$

Διάγραμμα Φασματοφθορισμομέτρου



Πηγές Φωτός

- Τα χαρακτηριστικά ποιότητας πηγής φωτός είναι η σταθερότητα και η έντασή της.
- Απαιτείται ισχυρότερη πηγή από τη λυχνία βολφραμίου η υδρογόνου.
- Τόξου υδραργύρου υψηλής πίεσεως με εντονότερη γραμμή στα 366 nm.
- Τόξου υδραργύρου χαμηλής πίεσεως με εντονότερη γραμμή στα 254 nm
- Τόξου υδραργύρου υψηλής πίεσεως με επικάλυψη φωσφόρου με φάσμα εκπομπής από 300-400 nm και μέγιστο στα 365nm
- Τόξου αερίου ξένου με φάσμα εκπομπής από 250-600 nm και μέγιστο στα 470 nm.
- Lasers

Εφαρμογές Φθορισμομετρίας

- Ποσοτική ανάλυση ενώσεων σε πολύ αραιά διαλύματα (10^{-4} – 10^{-9} M)
- Εφαρμογές:
 - Φαρμακευτική ανάλυση
 - Τοξικολογία
 - Κλινική χημεία
 - Εγκληματολογία
 - Βιοχημεία
 - Ιατρική
 - Χημεία τροφίμων
 - Χημεία φυσικών προϊόντων
 - Περιβαλλοντική χημεία (μελέτη μόλυνσης ατμόσφαιρας)

Σύγκριση με προηγούμενες ασκήσεις

- Ποσοτικός προσδιορισμός μέσω απορρόφησης ακτινοβολίας λόγω χρωμοφόρων ομάδων πe^- και μεταπτώσεων.
 - Μετά την ακτινοβόληση και διέγερση, έχουμε εκπομπή ενέργειας κατά την αποδιέγερση ως εκπομπή φωτός (φωταύγεια).
- Συγκεκριμένες δομές δίνουν φωταύγεια.

Σύγκριση με φασματοφωτομετρία

- Ταχεία
- Εξειδικευμένη
- Μεγαλύτερη ευαισθησία (10.000 φορές)

Φάσμα απορρόφησης vs φάσμα φθορισμού

- Φάσμα απορρόφησης μπορεί να δώσει πολλές ταινίες ---πολλές μεταπτώσεις
- Φάσμα φθορισμού --μία μετάπτωση S_1-S_0 – μία ταινία

Ελέγχω

- 1. Φθορίζει;** Δομή (δ.δ. αρωματικοί δακτύλιοι, υποκαταστάτες ηλεκτρονιόφιλοι/πυρηνόφιλοι)
- 2. Φθορίζουσα ουσία μοριακά σταθερή** (ιοντισμός, υδρόλυση,.). Αν δεν είναι εξετάζω ποια μορφή της φθορίζει ισχυρότερα και επιλέγω κατάλληλα τις φυσικοχημικές συνθήκες ώστε να ευνοηθεί η παραγωγή της μορφής αυτής.
- 3. Επιλογή διαλύτη:**
 - ❖ Χημικά αδρανής
 - ❖ Να μη φθορίζει (--τυφλό)
 - ❖ Πολική ουσία ή ιοντίζουσα --- πολικός διαλύτης.
 - ❖ Με μεγάλο ιξώδες (μείωση του φαινομένου απώλειας ενέργειας μέσω απόσβεσης -- συγκρούσεις)

4. **Θερμοκρασία.** Θέλω χαμηλή και σταθερή θ για να μην έχω αποσβέσεις
5. **Πλήρης απομάκρυνση προσμίξεων** (ενεργών στο φθορισμό και μη – για να μην έχω απόσβεση).
6. **Απομάκρυνση αέρα (O_2)** γιατί πιθανό να έχω αναγωγικά συστατικά που κατά την οξειδωσή τους δεν φθορίζουν.

Άσκηση

- Προσδιορισμός Κινίνης σε τόνικ.
- Τονωτικό πρόσθετο στη βιομηχανία ποτών.
- Μεγάλη προκατεργασία για απομάκρυνση προσμίξεων (εκχύλιση,.. Απόσταξη..).
- Ποσοτικός προσδιορισμός αγνώστων δειγμάτων κινίνης

Στη σημερινή άσκηση

- Η κινίνη φθορίζει περισσότερο όταν είναι δις πρωτονιωμένη --- ρύθμιση οξύτητας έτσι ώστε η ισορροπία ιοντισμού να μετατοπιστεί προς αυτή τη μορφή.
- Διαλύω απευθείας στο διάλυμα οξέος για να έχω το ίδιο pH σε όλα τα διαλύματα.

Φθορισμόμετρο Perkin Elmer LS-2

- Θ λειτουργίας 10-35 °C
- Max σχετική υγρασία 75%
- Προσδιορισμό ορισμένων ενζύμων (π.χ. φωσφατάση), οργανικών ενώσεων (π.χ. χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, κινίνη, βιταμίνες, αφλατοξίνες), και ορισμένων μετάλλων και αμετάλλων (π.χ. Al, Mg, As).
- Ευαισθησία στη θειική κινίνη = 0,01 ppb

Άσκηση

- 5 mL δείγμα σε δοκ. σωλήνα --- αραίωση με ποσοτική μεταφορά στα 25 mL
- Πρότυπα διαλύματα: 0,8 , 1,20 , 1,60 , 2,00 mg/L με $V_{\text{τελ}} = 25\text{mL}$ από αρχικό διάλυμα κινίνης 100mg/L
- Όλες οι αραιώσεις σε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 0,05M (με χωνί και σιφώνιο).

Μετρήσεις

- Διέγερση στα 365 nm και μέτρηση σχετικής έντασης φθορισμού στα 460 nm.