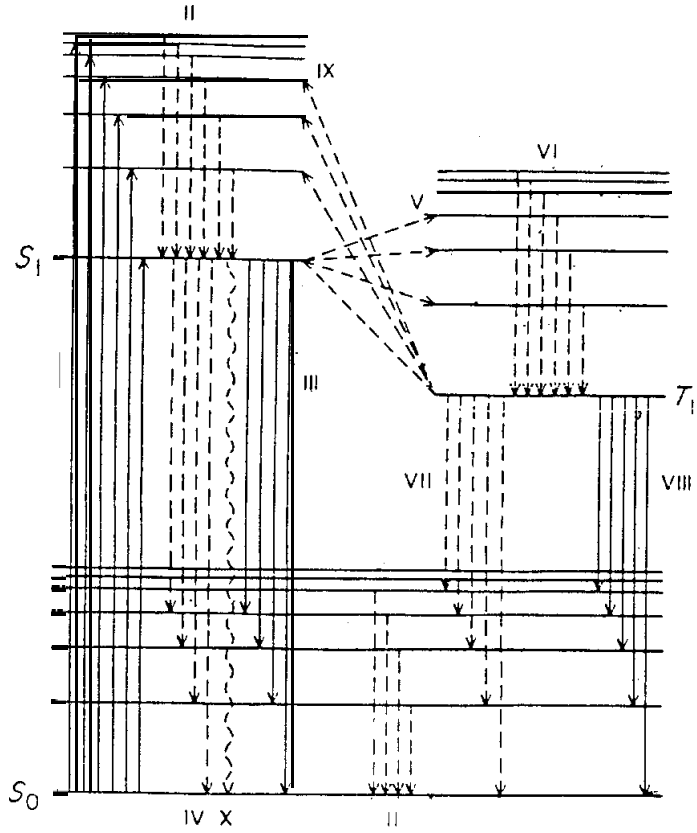
บทที่ 9
ฟลูออเรสซิเมตรี
FLUORESCIMETRY

ฟลูออเรสเซนซ์เป็นแสงที่ได้จากการที่โมเลกุลดูดกลืนแสงเข้าไป แล้วเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าความยาวคลื่นที่ดูด รูป 9-1 เป็นการแทรนซิชันที่เกิดจากสถานะพื้นไปสู่สถานะกระตุ้นที่มีระดับการสั่นต่าง ๆ

S_0 สถานะพื้นซิงเกล็ต (อิเล็กตรอนเข้าคู่ สถานะนี้ไม่มีการแยกระดับพลังงาน) S_1 แทนสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตที่มีค่าพลังงานน้อยสุด (สถานะนี้อิเล็กตรอนตัวหนึ่งมีพลังงานสูงกว่าอีกตัวหนึ่ง ถ้าสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตที่มีระดับการสั่นต่ำสุดมีพลังงานตรงกับสถานะกระตุ้นทริเพล็ต (ระดับการสั่นค่าหนึ่ง) จะเกิดการข้ามระหว่างระบบไปสู่สถานะกระตุ้นทริเพล็ต (สถานะนี้อิเล็กตรอนทั้งสองตัวมีพลังงานเท่ากัน)

อิเล็กตรอนที่อยู่ในสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต S_1 ที่มีระดับการสั่นสูง (มีช่วงชีวิต 10^{-8} วินาที) ไม่อยู่ตัวจะกลับไปสู่ระดับการสั่นต่ำสุดโดยการชนกับโมเลกุลอื่น กระบวนการนี้ไม่มีการคายแสงเรียกการผ่อนคลายโดยการสั่นอิเล็กตรอนที่อยู่ในสถานะกระตุ้นที่มีพลังงานต่ำสุดจะกลับสู่สถานะพื้นโดยกระบวนการการเปลี่ยนภายใน พร้อมกับให้ความร้อนออกมาโดยการผ่อนคลายโดยการสั่นอิเล็กตรอนที่อยู่ในสถานะกระตุ้นที่มีระดับการสั่นต่ำสุดอาจกลับสู่สถานะพื้นโดยเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นมากออกมา (ฟลูออเรสเซนซ์) ในสถานะทริเพล็ตที่มีระดับการสั่นสูงจะเกิดการผ่อนคลายโดยการสั่นกลับสู่สถานะกระตุ้นทริเพล็ตที่มีระดับการสั่นต่ำสุดอิเล็กตรอนที่สถานะนี้จะกลับสู่สถานะซิงเกล็ตที่มีระดับการสั่นต่ำสุด (V = 0) โดยการให้ฟอสฟอเรสเซนซ์ (ช่วงชีวิต 10 วินาที) หรือเกิดปรากฏการณ์การเปลี่ยนภายใน โดยคายพลังงานออกมาเป็นความร้อน แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมามีปริมาณน้อยลงเนื่องจากมีไอออนหรือโมเลกุลบางชนิด



รูป 9-1 *แผนภูมิระดับพลังงานของโมเลกุลสารอินทรีย์แสดงระดับพลังงานสถานะพื้นซิงเกล็ต สถานะกระตุ้นซิงเกล็ตที่หนึ่ง และสถานะกระตุ้นทริเพล็ตที่หนึ่ง เส้นทึบแทนการแทรนซิชันแบบให้แสง เส้นประแทนการแทรนซิแบบไม่ให้แสง* I *การดูดกลืน* II *การคายพลังงานโดยการสั่นกับโมเลกุลอื่น* vibrational – deactivation III *ฟลูออเรสเซนซ์* IV *การเควนของสถานะกระตุ้นที่อยู่ในสถานะซิงเกล็ต* V *การข้ามระหว่างระบบเปลี่ยนจากสถานะซิงเกล็ตเป็นทริเพล็ต* VI *การคายพลังงานโดยการชนกับโมเลกุลอื่น* (vibrational deactivation) *ในระบบทริเพล็ต* VII *การเควนของสถานะทริเพล็ต* VIII *ฟอสฟอเรสเซนซ์* IX *การข้ามระหว่างระบบไปยังสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต* X *การเปลี่ยนภายใน*

โครงสร้างและฟลูออเรสเซนซ์

โมเลกุลที่อิ่มตัวและโมเลกุลที่มีพันธะคู่เพียงหนึ่งพันธะ ไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ โมเลกุลที่มีวงอะโรมาติกหรือมีพันธะเดี่ยวและคู่สลับกัน มักจะให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ใน

ช่วงวิสิเบลหรืออัลตราไวโอเลต ถ้าหมู่ที่แทนที่เป็นหมู่ที่ให้อิเล็กตรอนสารนั้นจะมีความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น สารประกอบที่ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์สามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ สารที่ให้แสงฟอสฟอเรสเซนซ์เกิดจากการแทรนซิชันจากสถานะกระตุ้นทริเพล็ตสู่สถานะพื้นแบบซิงเกล็ต

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้น

ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ความเข้มข้นต่าง ๆ เขียนเป็นสมการได้

$$F = P_O(1 - 10^{-\in bc})\, Q_f k \qquad 9\text{-}1$$

$$F \cong P_O(2.303 \in bc)\, Q_f k$$ (สารละลายเจือจางและยอมให้แสงผ่านมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของ P_O)

F ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ สภาพดูดกลืนโมลาร์ b ทางเดินแสง c ความเข้มข้น P_o ความเข้มแสงที่ชน Q_f ประสิทธิภาพควอนตัม = โฟตอนที่เปล่งออก/โฟตอนที่ถูกดูด k โฟตอนที่วัดได้/โฟตอนที่ออกมา

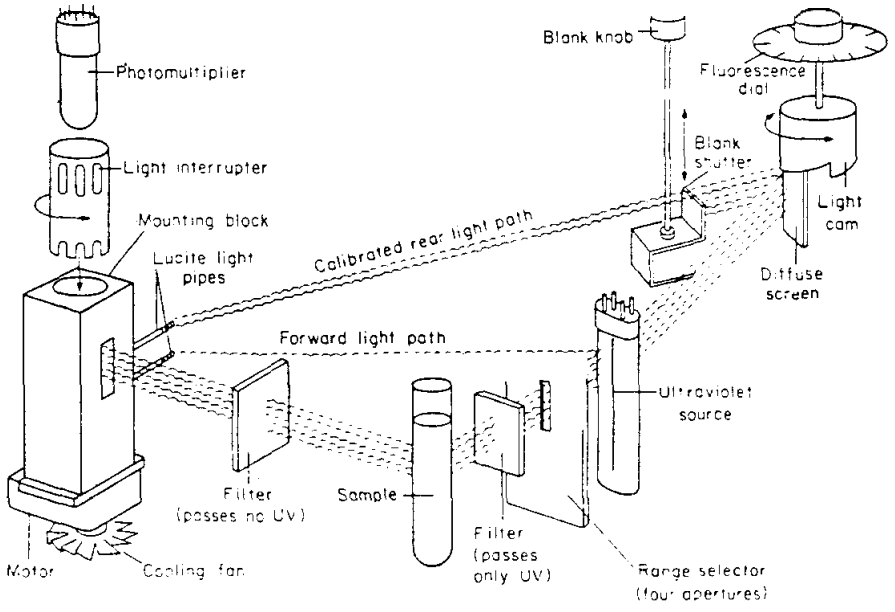
เคอร์ฟที่ได้จากการพล็อตความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นใช้เป็นเคอร์ฟสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ เคอร์ฟนี้จะเป็นเส้นตรงถ้าสารละลายที่วิเคราะห์มีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ถ้าเครื่องมือที่ใช้มีสภาพไวสูงจะวิเคราะห์สารละลายที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ ได้ ถ้าสภาพการวิเคราะห์ไม่เหมาะสมจะมีผลทำให้มีค่าแบล็คกราวน์หรือลดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จากสาร

เครื่องมือ

ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์วัดในแนวตั้งฉากกับความเข้มแสงที่ชนสาร เนื่องจากแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมาที่มุม 90 องศามีค่าสูงสุด

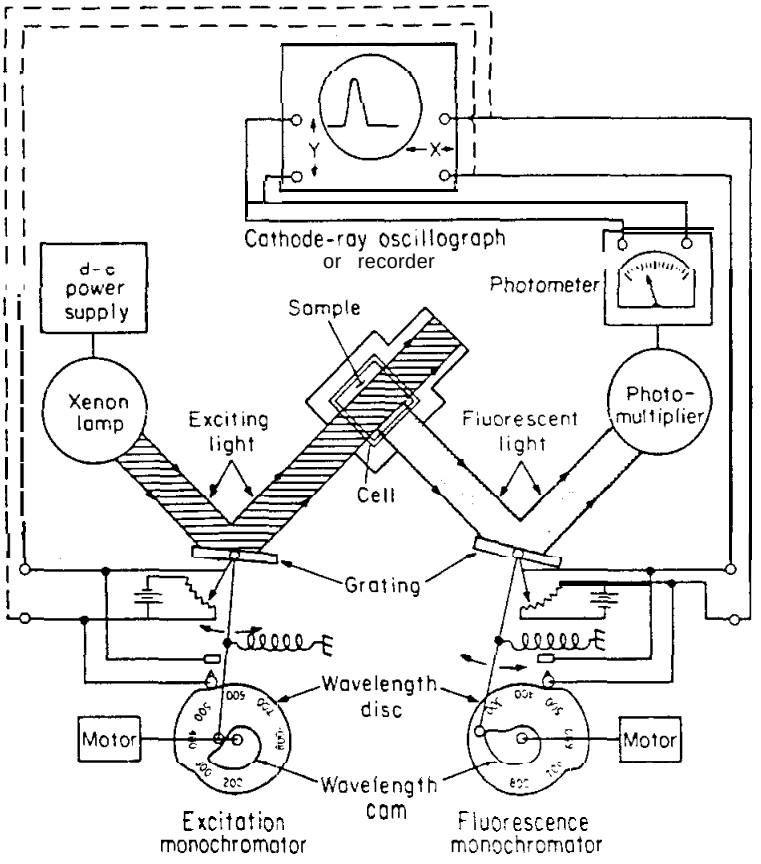
รูป 9-2 ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ แสงที่ใช้กระตุ้นสารได้จากแหล่งกำเนิดแสงหลอดอาร์กปรอท (หรืออาร์กซีนอน) แสงผ่านเข้าสู่ที่ควบคุมปริมาณแสง (ที่เลือก

ปริมาณแสงมีสี่ช่อง) แสงที่ออกมาผ่านเข้าสู่ฟิลเตอร์ชุดแรก (excitation filter) แสงที่ออกจากฟิลเตอร์จะมีเฉพาะแสงอัลตราไวโอเลตวิ่งเข้าชนสาร เซลล์ที่ใส่สารทำจากแก้วควอร์ตซ์หรือซิลิกาสังเคราะห์ ปกติใช้ควอร์ตซ์เพราะควอร์ตซ์ยอมให้แสงอัลตราไวโอเลตผ่าน แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากสาร (ในแนวตั้งฉาก) ให้ผ่านเข้าฟิลเตอร์ชุดที่สอง (emission filter) ฟิลเตอร์นี้ยอมให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ผ่านแต่ไม่ยอมให้แสงที่ถูกกระเจิงผ่าน ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมาวัดจากหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ หลอดนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนปริมาณแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้า สัญญาณนี้จะถูกขยายและส่งออกผ่านทางหน้าปัด

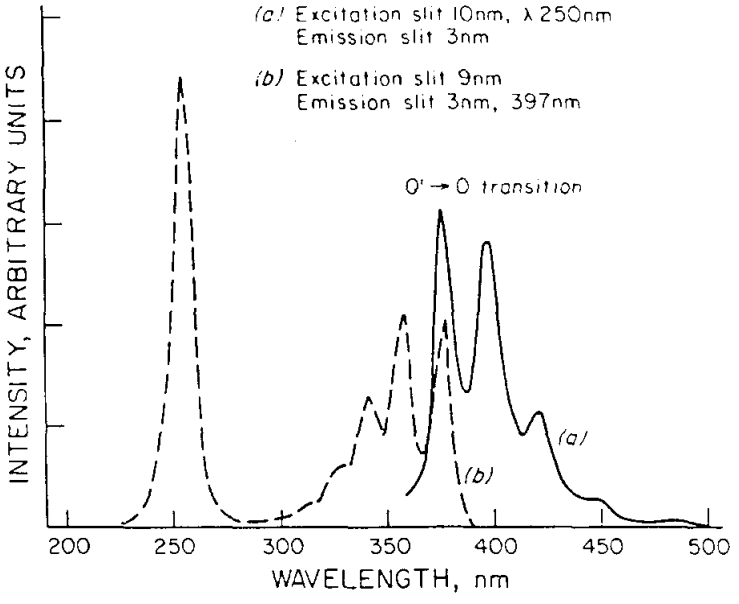


รูป 9-2 *ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์*

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ใช้ตัวทำแสงเอกรงค์ 2 อันแทนฟิลเตอร์ ดังรูป 9-3 แหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดอาร์กซีนอน ที่เปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 800 นาโนเมตร สเปกตราที่ได้จากการกระตุ้นแสง (excitation) และสเปกตราที่ได้จากการเปล่งแสงหาได้โดยใช้เครื่องนี้ รูป 9-4 เป็นสเปกตราที่ได้จากการกระตุ้นและสเปกตราการเปล่งแสงของแอนทราซีน



รูป 9-3 *สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์*



รูป 9-4 *สเปกตราฟลูออเรสเซนซ์ของแอนทราซีน*

การทดลอง 9 . 1

คุณสมบัติของควินินและการวิเคราะห์ควินิน

วัตถุประสงค์การทดลอง

ควินินเป็นสารประกอบที่ให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มากเมื่ออยู่ในสารละลายกรดเจือจาง ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นสารนี้มีสองค่า (250 และ 350 นาโนเมตร) สารนี้เปล่ง (คาย) แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 450 นาโนเมตร แฟกเตอร์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณควินิน (การเควนเนื่องจากความเข้มข้นและเคมี) จะศึกษาจากสเปกตราเปล่ง

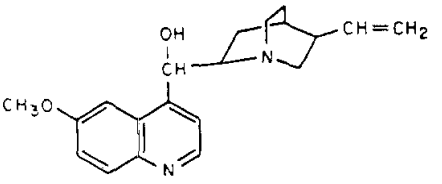
อุปกรณ์

- สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์
- เซลล์ (ควอร์ตซ์) ใสสี่หน้า 2 เซลล์
- ขวดปริมาตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร 1 ใบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร 6 ใบ 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร 12 ใบ
- ปิเปตต์ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร 6 อัน 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร 12 อัน

สารเคมี

- สารละลายมาตรฐานควินิน 100 ส่วนในล้านส่วน เตรียมได้จากการชั่งควินินซัลเฟตไดไฮเดรต 120.7 มิลลิกรัม หรือชั่งควินิน 100.0 มิลลิกรัม ถ่ายใส่ขวดปริมาตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร เติมกรดซัลฟิวริก 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางสารละลายในขวดด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดปริมาตร (สารละลายนี้เก็บไว้ใช้เกินหนึ่งวันไม่ได้ และต้องเก็บสารละลายไว้โดยไม่ถูกแสง)
- สารละลายตัวอย่างควินิน สารละลายควินินในกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
- สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร
- สารละลายมาตรฐานควินิน 10 ส่วนในล้านส่วน เตรียมจากสารละลายควินิน 1000 ส่วนในล้านส่วน (โดยเจือจางสารนี้เป็น 100 ส่วนในล้านส่วนก่อน)
- สารละลายโซเดียมโบรไมด์ 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

- สารละลายบัฟเฟอร์ (pH 1, 2, 3, 4, 5 และ 6)
- สเปกตราฟลูออเรสเซนซ์ควินินจากขั้นตอน จ



QUININE

ทฤษฎี

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เป็นเส้นตรงเมื่อสารละลายที่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์มีความเข้มข้นน้อย ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมายังขึ้นกับความเข้มแสงที่ชนสาร สมการ $F = P_O(2.303 \in bc)\ Q_f\ k$ ใช้ได้กับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงถึงสองสามไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้อาจมีค่าน้อยกว่าปกติ เนื่องจากผลขององค์ประกอบที่มีในสารละลาย ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้น้อยลงอธิบายได้โดยคำว่า การเควน, การเควนมีสองแบบเช่นการเควนเนื่องจากความเข้มข้น (ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลงต่อหน่วยความเข้มข้นขณะที่ความเข้มข้นเพิ่ม) ผลนี้เหมือนกับผลของการกรองภายใน (inner filter) และการเควนทางเคมี การเควนเนื่องจากความเข้มข้น เกิดจากสารละลายที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ดูดกลืนแสงที่ใช้กระตุ้นหรือแสงฟลูออเรสเซนซ์ การเควนเนื่องจากการชน (collisional quenching) เกิดจากโมเลกุลที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่อยู่ในสถานะกระตุ้นต่ำสุดและมีพลังงานการสั่นเป็นศูนย์ชนกับโมเลกุลอื่น จึงถ่ายโอนพลังงานให้กับโมเลกุลโดยตัวเองไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา โมเลกุลที่รับพลังงาน (ทำให้เกิดการเควน) เป็นพวกออกซิเจน โมเลกุลนี้จะช่วยเปลี่ยนโมเลกุลที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งอยู่ในสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตที่มีพลังงานการสั่นต่ำสุดไปเป็นสถานะกระตุ้นทริเพล็ตที่มีพลังงานตรงกับสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต การเควนทางเคมีเกิดเนื่องจากโมเลกุลที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์มีโครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนไป สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์และมีสมบัติเป็นกรดอ่อนในสารละลายที่มีพีเอชต่ำเมื่อเพิ่มความเป็นเบสกรดอ่อนจะเปลี่ยนเป็นแอนไอออน ตัวอย่าง อนิลีนให้แสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อสารละลายมี pH ระหว่าง 5 ถึง 13 สารละลายอนิลีนที่มี pH ต่ำกว่า 5 จะอยู่ในรูป อนิลิเนียมแคทไอออน สารละลายอนิลีนที่มี pH สูงกว่า 13 จะอยู่ในรูปแอนไอออน สารละลายที่มี pH นอกช่วง 5-13 จะไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์

สเปกตรากระตุ้นและสเปกตราเปล่ง Excitation and Emission Spectra

สเปกตรัมเปล่งของสารอินทรีย์ คล้ายกับสเปกตรัมกระตุ้น เนื่องจากระดับการสั่นในสถานะพื้นและสถานะกระตุ้นห่างเกือบเท่ากันดังรูป 9-1 โครงสร้างของโมเลกุลและออร์บิทัลไม่เปลี่ยน (ที่สถานะทั้งสอง) เช่น โมเลกุลอยู่ในสถานะพื้นก่อนที่จะมีการกระตุ้น พลังงานน้อยสุดที่ถูกดูดกลืนในกระบวนการการกระตุ้น (ความยาวคลื่นมากสุด) เท่ากับพลังงานสูงสุดในการแทรนซิชันในกระบวนการฟลูออเรสเซนซ์ (ความยาวคลื่นต่ำสุด) รูป 9-4 สเปกตราดูดกลืนและสเปกตราเปล่งของแอนทราซีน ถ้าโมเลกุลที่ทำหน้าที่ดูดกลืนแสง (สถานะพื้น) และมีบางส่วนอยู่ในสถานะกระตุ้นที่มีการสั่นต่ำสุดจะไม่ดูดกลืนแสง ผลนี้ทำให้สเปกตราดูดกลืนและเปล่งซ้อนทับกัน ดังนั้น พลังงานที่ใช้ในการกระตุ้นจึงมีค่าน้อยกว่าปกติ (กระตุ้นไปที่สถานะกระตุ้น (S_1)

สารที่ให้ฟลูออเรสเซนต์จะมีการแทรนซิชันจาก $\pi^* \rightarrow \pi$ และ $\pi^* \rightarrow n$ เป็นส่วนใหญ่ ส่วนการแทรนซิชันจาก $\sigma^* \rightarrow \sigma$ ไม่ค่อยพบ เนื่องจากสเปกตราฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 250 นาโนเมตรไม่ค่อยเกิด เนื่องจากพลังงานที่ใช้ในการกระตุ้นสูงมีผลทำให้สถานะกระตุ้นกลับสู่สถานะพื้นโดยเกิดปรากฏการณ์ก่อนการแตกตัว (predissociation) หรือการแตกตัว (dissociation) จึงไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร (พลังงาน 140 กิโลแคลอรีต่อโมล) พันธะมักจะแตก การแทรนซิชันจาก $\pi \rightarrow \pi^*$ มีค่าสภาพดูดกลืนโมลาร์สูงกว่าการแทรนซิชันจาก $n \rightarrow \pi^*$ 100 ถึง 1000 เท่า เวลาที่ใช้ในการแทรนซิชัน $\pi^* \rightarrow \pi$ 10^{-7} ถึง 10^{-9} วินาทีเวลาที่ใช้ในการแทรนซิชัน $\pi^* \rightarrow n$ 10^{-5} ถึง 10^{-7} วินาที

ภายใต้สภาพปกติควินินที่มีความเข้มข้น 2 ส่วนในล้านส่วน มีพีคกระตุ้นสองพีค (250 และ 350 นาโนเมตร) พีคเปล่งหนึ่งพีค (450 นาโนเมตร) ถ้าคุมสภาพการทดลองอย่างดีอาจมีพีคอื่นปรากฏเนื่องจากตัวทำแสงเอกรงค์ชนิดเกรตติงมีการกระเจิงชนิดเรย์ลี ทินดอลล์ และการกระเจิงของรามัน การกระจิงเรย์ลีเกิดจากแสงที่ถูกกระเจิงทุกทิศทางโดยการชนแบบอิลาสติก (แสงที่ชนและแสงที่ออกมามีความยาวคลื่นเท่ากัน แสงที่ออกมาจะออกมาทุกทิศทาง) การกระเจิงรามันเป็นการชนแบบนอนอิลาสติก แสงที่ชนมีพลังงานหลายค่าอยู่ด้วยกัน (พลังงานการสั่นและการหมุน) แสงที่ออกมามีความยาวคลื่นต่างจากคลื่นที่ชน

วิธีการทดลอง

ก. การเตรียมเคอร์ฟมาตรฐาน การหาปริมาณควินินในสารตัวอย่างและขีดจำกัดในการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายมาตรฐานควินินชุดหนึ่ง จากสารละลายมาตรฐานควินินที่มีความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน เจือจางสารละลายนี้ด้วยกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร สารละลายมาตรฐานควินินควรมีความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ส่วนในล้านส่วน เตรียมสารละลายมาตรฐานควินินที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ และให้ค่าฟลูออเรสเซนซ์พอ ๆ กับค่าแบลงค์ (กรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร)

อ่านคู่มือการใช้เครื่องก่อนที่จะใช้เครื่อง บันทึกสเปกตราดูดกลืนและสเปกตราเปล่งโดยใช้สารละลายควินิน 2 ส่วนในล้านส่วน

ถ้าใช้ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ หาความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ของสารละลายควินินที่เตรียมโดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตรเป็นแบลงค์ เลือกฟิลเตอร์ที่ใช้กับกระบวนการการกระตุ้น (ความยาวคลื่น 250 หรือ 350 นาโนเมตร) กระบวนการการเปล่ง 450 นาโนเมตร หาความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จากสารตัวอย่างควินิน ถ้าสารตัวอย่างเข้มข้นไปให้เจือจางด้วยกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จนมีความเข้มข้นเหมาะสม วัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างน้ำโทนิก ปิเปตต์สารตัวอย่างน้ำโทนิกมา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ขวดปริมาตร 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางสารนี้ด้วยกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างนี้มา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางสารละลายด้วยกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตรจนถึงขีดปริมาตร เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน วัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ สำหรับการหาปริมาณควินินในปัสสาวะหลังจากการกินน้ำโทนิก ดูจาก J.E.O'Reilly J.Chem Ed., 52 610 (1975)

การวิเคราะห์ข้อมูล

พล็อตความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์กับความเข้มข้นควินินบนกระดาษกราฟล็อก-ล็อก ถ้าวัดข้อมูลโดยใช้น้ำปราศจากไอออนปรับเครื่อง ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดจากแบลงค์ต้องลบจากน้ำปราศจากไอออนก่อนที่จะพล็อต

หาเหตุผลอธิบายว่า เคอร์ฟที่ได้จากการพล็อตไม่เป็นเส้นตรง หาความเข้มข้นควินินในสารตัวอย่างและยาย้อมผมจากเคอร์ฟ

สมมติว่าขีดจำกัดในการตรวจหา คือ ความเข้มข้นของสารที่ให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มากว่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดจากแบลงค์ 10 เปอร์เซ็นต์ เช่น แบลงค์น้ำปราศจากไอออนให้ฟลูออเรสเซนซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นต่ำสุดของควินินควรให้ฟลูออเรสเซนซ์ 22 เปอร์เซ็นต์หรือขีดจำกัดในการตรวจหา ถ้าปรับเครื่องโดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้ทำการปรับเครื่องซ้ำโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นแบลงค์ เพื่อหาว่าขีดจำกัดของเครื่องสำหรับควินินมีค่าเท่าใด และใช้ค่านี้คำนวณขีดจำกัดการตรวจหาควินิน

ผลของพีเอชที่มีต่อความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของควินินซัลเฟต

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานควินิน 10 ส่วนในล้านส่วน 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร 6 ใบ เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ในขวดแต่ละขวดจนถึงขีด เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน วัดค่าพีเอชของสารละลายทั้ง 6 ใบจากเครื่องวัดพีเอช วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ของสารละลายทั้ง 6 ใบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

พล็อตความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับพีเอชของสารละลายควินินทั้ง 6 ใบ จากเคอร์ฟนี้ให้สรุปว่าที่พีเอชช่วงใดไม่มีผลต่อความเข้มฟลูออเรสเซนซ์

ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของควินินซัลเฟตลดลงเมื่อมีแอไลด์ปน

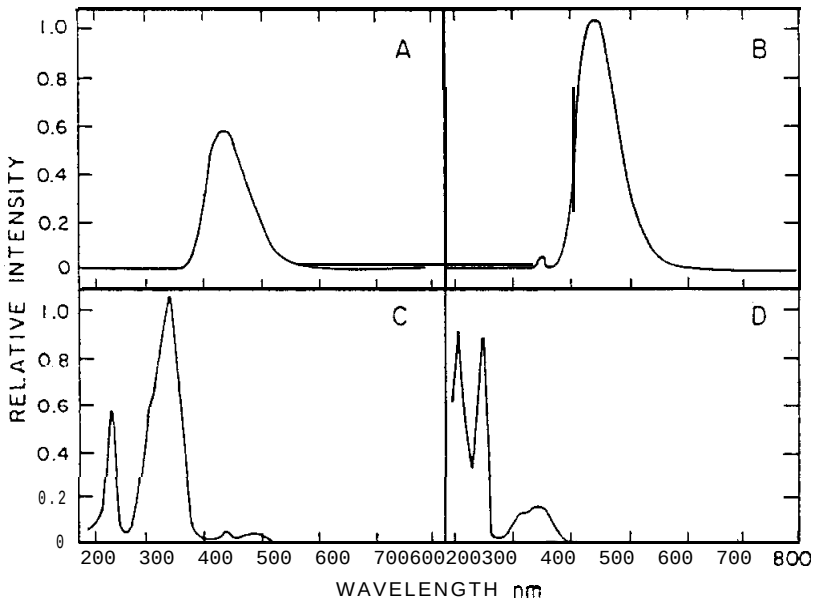
ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานควินิน 10 ส่วนในล้านส่วน 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร 5 ใบ เติมโซเดียมโบรไมด์ 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 1, 2, 4, 8 และ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงในขวดทั้ง 5 ใบ เจือจางสารละลายในขวดทั้งห้าด้วยกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตรจนถึงขีด เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากันวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายทั้งห้า

การวิเคราะห์ข้อมูล

พล็อตความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นไอออนโบรไมด์ ให้เหตุผลว่า การเจือจางสารละลายจนถึงขีดปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกได้หรือไม่

ข. จากข้อมูลของสเปกตราฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากควินินซัลเฟต ให้บอกคุณสมบัติของสารนี้

ควินินที่อยู่ในสารละลายกรดเจือจางพบพีคกระตุ้นที่ 250 และ 350 นาโนเมตร พีคเปล่งที่ 450 นาโนเมตร เคอร์ฟที่ได้จากการพล็อตความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความยาวคลื่นของสารละลายควินิน 2 ส่วนในล้านส่วนในกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร อยู่ในรูป 9-5 พบที่ 250, 350 และ 450 นาโนเมตร



รูป 9-5 *สเปกตราของสารละลายควินินในกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร*

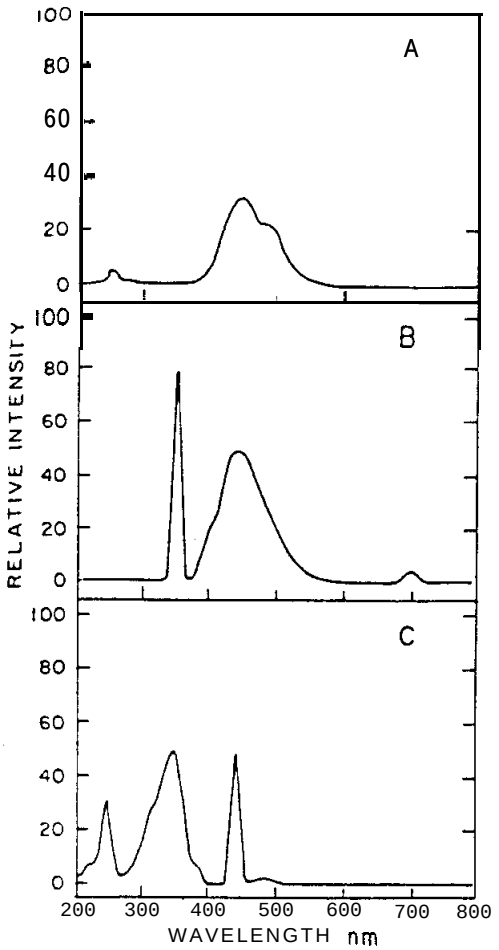
A *สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของควินิน 2 ส่วนในล้านส่วน เมื่อใช้คลื่น 250 นาโนเมตรกระตุ้น*

B *สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของควินิน 2 ส่วนในล้านส่วนเมื่อใช้คลื่น 350 นาโนเมตรกระตุ้น*

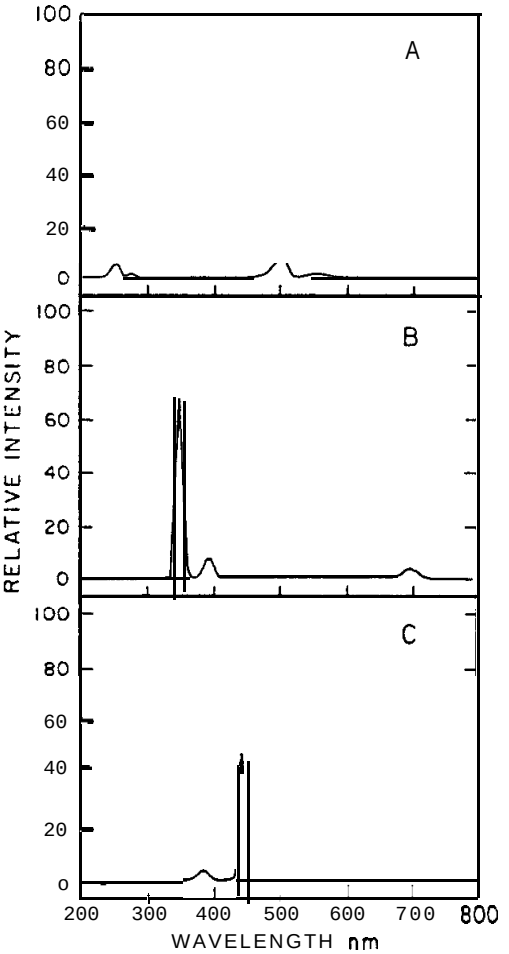
C *สเปกตรัมกระตุ้นของควินิน 2 ส่วนในล้านส่วน เมื่อตั้งคลื่นที่เปล่งที่ 450 นาโนเมตร*

D *สเปกตรัมดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของควินิน 10 ส่วนในล้านส่วน*

แกน Y *แทนหน่วยค่า**ความดูดกลืน***



รูป 9-6



รูป 9-7

รูป 9-6 ***สเปกตรัมความกระตุ้นและความเปล่งของควินิน*** *0.03 ส่วนในล้านส่วนในกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร*

A *สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใช้คลื่น 250 นาโนเมตรกระตุ้น*

B *สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใช้คลื่น 350 นาโนเมตรกระตุ้น*

C *สเปกตรัมการกระตุ้นเมื่อวัดที่ความยาวคลื่นที่เปล่ง 450 นาโนเมตร*

รูป 9-7 *สเปกตรัมของแบล็คกราวน์หรือแบลงค์ กรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร*

A *สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใช้คลื่น 250 นาโนเมตรกระตุ้น*

B *สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใช้คลื่น 350 นาโนเมตรกระตุ้น*

C *สเปกตรัมกระตุ้นเมื่อวัดที่ความยาวคลื่นเปล่ง 450 นาโนเมตร*

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. จากสเปกตรัมรูป 9-6 A และ 9-7 A พีคที่ 250 นาโนเมตร เกิดจากอะไร จากสเปกตรัมรูป 9-6B และ 9-7B พีคที่ 350 นาโนเมตร เกิดจากอะไร

2. จากสเปกตรัมรูป 9-6A และ 9-7A พีคที่ 275 นาโนเมตร เกิดจากอะไร พีคเล็กที่ 395 นาโนเมตรในรูป 9-1B เกิดจากอะไร พีคที่ 395 นาโนเมตรมีผลต่อพีคควินินที่เปล่งออกมาที่ 450 นาโนเมตรในรูป 9-6B อย่างไร ผลนี้จะเป็นอย่างไรถ้าความเข้มข้นควินินมีค่าน้อยกว่า 0.01 ส่วนในล้านส่วน

3. พีคที่ 500 นาโนเมตรในรูป 9-6A และ 9-7B เกิดจากอะไร พีคที่ 700 นาโนเมตรในรูป 9-6A และ 9-7B เกิดจากอะไร

4. พีคกระตุ้นที่ 225, 385 และ 450 นาโนเมตร ของสารละลายอ้างอิงในรูป 9-7C เกิดจากอะไร พีคเหล่านี้มีผลต่อพีคควินินในรูป 9-6C อย่างไร

5. เปรียบเทียบสเปกตรัมกระตุ้นในรูป 9-5C กับสเปกตรัมดูดกลืนโดยเครื่องยูวี ในรูป 9-5D วิจารณ์ความแตกต่างของความสูงสัมพัทธ์ของพีค ประสิทธิภาพควอนตัมของควินินที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใช้ความยาวคลื่น 250 หรือ 350 นาโนเมตรมีค่าประมาณ 0.55 ประสิทธิภาพที่สองความยาวคลื่นมีค่าพอ ๆ กัน แต่ทำไมความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการกระตุ้นที่ 350 นาโนเมตร ให้ความเข้มมากกว่า 250 นาโนเมตร (รูป 9-5B กับรูป 9-5A)

6. **พีคเล็กเหล่านี้มีผลต่อสภาพไวในการวิเคราะห์และขีดจำกัดในการตรวจหาควินิน** อย่างไรเมื่อใช้ ก) ตัวทำแสงเอกรงค์เกรตติงที่ใช้แถบความกว้าง 10 นาโนเมตร และคลื่นที่ใช้กระตุ้น 350 นาโนเมตร ข) ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ที่ใช้หลอดปรอท ฟิลเตอร์ชุดแรกแยกเส้นปรอท 365 นาโนเมตร และฟิลเตอร์ชุดสองเป็นแบบไม่ยอมให้แสงที่มีความยาวคลื่นสั้นผ่าน (ให้แสงความยาวคลื่นมากกว่า 400 นาโนเมตร)

คำถาม

1. ทำไมถึงต้องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มุม 90 องศากับคลื่นที่ใช้กระตุ้น
2. **อธิบายกระบวนการคายพลังงานที่ไม่ให้แสงที่แก่งแย่งกับแสงฟลูออเรสเซนซ์**
3. อธิบายการวัดสเปกตรากระตุ้น

การทดลอง 9.2

การหาปริมาณฟลูออเรสเซนซ์โดยวิธีฟลูออโร

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณโดยการวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่เปล่งจากสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์โดยฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

อุปกรณ์

ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ พร้อมฟิลเตอร์

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

เซลล์บอโรซิลิเกตใสสี่ด้าน

บิวเรตต์ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 อัน หรือใช้ปิเปตต์แทน

ขวดรูปกรวย 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร 9 ใบ

สารเคมี

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ชั่ง $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 13.4 กรัมละลายในน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร

ฟลูออเรสเซนซ์ในรูปเกลือไดโซเดียม (ยูรานิน)

สารละลายมาตรฐาน

1. ไดโซเดียมฟลูออเรสเซนซ์ 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ใน Na_2HPO_4 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

2. ไดโซเดียมฟลูออเรสเซนซ์ 10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (เตรียมจากการเจือจางสารละลายที่หนึ่ง 100 เท่า) และเจือจางด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

3. ไดโซเดียมฟลูออเรสเซนซ์ 0.1 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (เตรียมจากการเจือจางสารละลายที่สอง 100 เท่า) และเจือจางด้วยไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

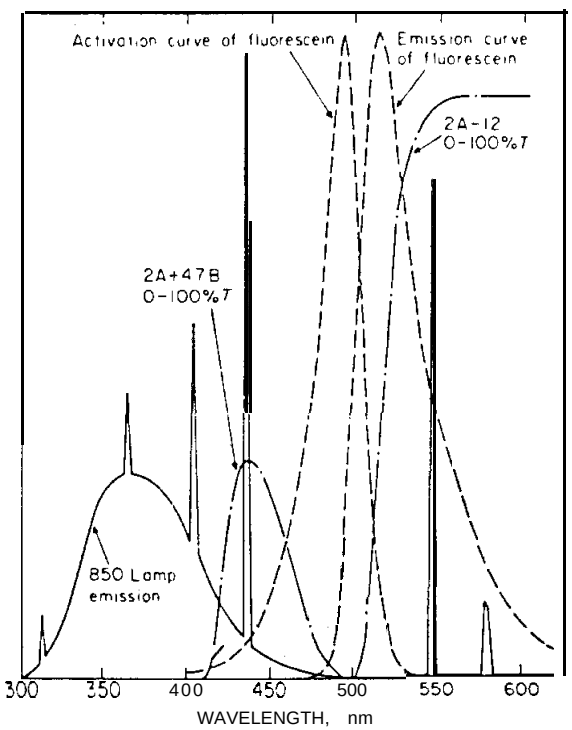
สารละลายมาตรฐานทั้งสามความเข้มข้นต้องเก็บไว้ในตู้เย็น ส่วนสารละลายที่สามไม่ค่อยเสถียรเก็บไว้ใช้ได้นานเพียง 1 สัปดาห์

เมื่อนักศึกษาเจือจางสารละลายนี้เสร็จต้องวัดให้เสร็จหลังจากเตรียมไม่เกิน 10 ชั่วโมง สารละลายที่เตรียมเสร็จต้องเก็บไว้ในที่มืดเพราะสารนี้ไวต่อแสง

ทฤษฎี

ประสิทธิภาพควอนตัมของฟลูออเรสเซนซ์มีค่า 0.85 (ค่าสูง) ดังนั้น การวิเคราะห์สารนี้จึงวิเคราะห์ได้แม้ว่าสารนี้มีความเข้มข้นน้อย สารละลายนี้เสถียร

ถ้าใช้ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดปรอท สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์จะเหมือนกับรูป 9-8 นักศึกษาจะต้องเลือกฟิลเตอร์สองอัน ฟิลเตอร์อันแรกทำหน้าที่แยกคลื่นที่ใช้กระตุ้นฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ซึ่งปรากฏพีคในช่วง 425 ถึง 525 นาโนเมตร คลื่นจากหลอดปรอทในช่วง 425 ถึง 525 นาโนเมตร มีเส้นปรอทที่ 436 นาโนเมตร ดังนั้น ต้องใช้ฟิลเตอร์ 2 A และ 47B รวมกันเพื่อแยกเส้นนี้ออกจากแถบความยาวคลื่นต่อเนื่อง แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่สารเปล่งออกมา มียอดพีคที่ 516 นาโนเมตร ซึ่งปรากฏพีคในช่วง 475 ถึง 650 นาโนเมตร ฟิลเตอร์ที่สองควรเป็นแบบ sharp cut filter เพราะฟิลเตอร์นี้ให้แสงที่มีความยาวคลื่นมากผ่านออกมา ฟิลเตอร์ 2A-12 ให้แสงที่มีความยาวคลื่นมากผ่านออกมา (โดยเฉพาะครึ่งหนึ่งของแถบแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นมากเปล่งออกมา



รูป 9-8 *สเปกตรา ฟลูออเรสเซนซ์ที่สัมพันธ์กับคลื่นที่ใช้กระตุ้นและฟิลเตอร์ชนิดต่าง ๆ*

วิธีการทดลอง

ก. การเตรียมเคอร์ฟสำหรับหาฟลูออเรสเซนซ์

อ่านรายละเอียดการใช้เครื่องให้เข้าใจก่อน เตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ใส่ขวดรูปกรวย 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในช่วงพีเอช 5 ถึง 11 สารละลายนี้จึงเตรียมให้อยู่ในตัวกลางไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ (พีเอช 9)

วิธีการทดลอง

ก. เตรียมเคอร์ฟที่ใช้สำหรับฟลูออเรสเซนซ์

ก่อนใช้เครื่องให้ศึกษาวิธีการใช้เครื่องก่อน เตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ใส่ขวดรูปกรวย 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร

	ความเข้มข้น ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร										
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
ปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ 0.1 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
ปริมาณบัฟเฟอร์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	10.0	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0.0

สารละลายนี้เตรียมโดย ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ไว้ในบิวเรตต์หนึ่ง อีกบิวเรตต์หนึ่งใส่ฟลูออเรสเซนซ์ ใส่สารละลายทั้งสองลงในขวดรูปกรวย 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน

เก็บสารละลายเหล่านี้ไว้ในที่มืด สารละลายที่จะรินใส่เซลล์ไม่ควรใส่สารละลายเกิน 75 เปอร์-เซ็นต์ของความสูงเซลล์

ใส่ฟิลเตอร์ชุดที่หนึ่งและสองลงในเครื่อง ใช้วัตถุดำวางขวางทางเดินแสงปรับเครื่องให้อ่านศูนย์ ปรับสภาพไวด้วยสารละลายฟลูออเรสเซนซ์มาตรฐาน 0.10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรโดยใช้ปุ่มเลือกช่วงสภาพไวและนิวตรัลฟิลเตอร์ (1 และ 10 เปอร์เซ็นต์) จนเครื่องให้สภาพไวสูงสุด (นิวตรัลฟิลเตอร์วางคู่กับฟิลเตอร์ชุดที่สอง ฟิลเตอร์นี้ใช้ลดความเข้มแสงและลดสภาพไวของเครื่อง

วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายทั้ง 11 ขวด วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารตัวอย่าง

ทำการวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายทั้ง 11 ขวด โดยเพิ่มค่าปุ่มเลือกช่วงสภาพไว (สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงวัดไม่ได้) ลดค่าปุ่มเลือกช่วงสภาพไว วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายทั้ง 11 ขวด

การวิเคราะห์ข้อมูล

พล็อตเคอร์ฟระหว่างความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้น หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากเคอร์ฟแรก หาความชันของเคอร์ฟทั้งสาม

คำถาม

1. สารละลายในช่วงความเข้มข้นใดที่เคอร์ฟยังเป็นเส้นตรง การวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ต้องเลื่อนปุ่มเลือกช่วงสภาพไวหรือไม่
2. ทำไมความชันของเคอร์ฟที่ใช้ปุ่มเลือกสภาพไวต่างกันจึงไม่เท่ากัน
3. ถ้าใช้คลื่นที่ใช้กระตุ้นที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร เคอร์ฟนี้จะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นสูงขึ้นหรือไม่
4. ท่านคิดว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นที่ 492 นาโนเมตร จะมีค่ามากกว่าที่ 436 นาโนเมตรหรือไม่ ถ้าปริมาณแสงที่ใช้กระตุ้นมีค่าเท่ากัน

ข. ขีดจำกัดในการตรวจหา

ปิเปตต์สารละลายฟลูออเรสเซนซ์ 0.1 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 9 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน เพิ่มสภาพไวของเครื่องโดยเลือกปุ่มสภาพไวจนเครื่องอ่านค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ต่างจากสารละลายฟลูออเรสเซนซ์หรือไม่ (ข้อมูลนี้ดูจากการหาขีดจำกัดในการตรวจหาโดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์ปชัน) ถ้าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากสารละลายฟลูออเรสเซนซ์มากไป ให้เตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ 0.001 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์นี้กับสารละลายบัฟเฟอร์ ถ้าสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ยังเข้มข้นให้เจือจางสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ลงอีก

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณขีดจำกัดในการตรวจหาสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ของเครื่องฟลูออเรสเซนซ์เช่นเดียวกับวิธีอะตอมมิกแอบซอร์ปชัน

การทดลอง 9.3

การหาปริมาณกรดแอซีติลซาลิไซลิกและซาลิไซลิกในยาโดยวิธีฟลูออโร

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

กรดแอซีติลซาลิไซลิก (แอสไพริน) เมื่อถูกแยกสลายด้วยน้ำได้กรดซาลิไซลิก สารทั้งสองนี้วิเคราะห์ได้โดยวิธีฟลูออโร

อุปกรณ์

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

ขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร 8 ใบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร 4 ใบ

ปิเปตต์ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 อัน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร 4 อัน 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 อัน 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 อัน

กระดาษกรอง วัตแมนเลข 1

สารเคมี

กรดแอซิติลซาลิไซลิก (แอสไพริน)

กรดซาลิไซลิก

ยาเม็ดแอสไพริน

คลอโรฟอร์มบริสุทธิ์ เกรดสเปกโทร

กรดแอซีติก (1 เปอร์เซ็นต์ กรดในคลอโรฟอร์ม ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรดเบนโซอิก

สารละลายมาตรฐานแอสไพริน 2.22×10^{-3} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ชั่งแอสไพริน 0.40 กรัมละลายในกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์มจนครบ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร

สารละลายมาตรฐานกรดซาลิไซลิก 5.43×10^{-3} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ชั่งกรดซาลิไซลิก 0.75 กรัม ละลายในกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์มจนครบ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร

สารละลายมาตรฐานแอสไพริน 2.22×10^{-5} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (4.0 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ในกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์ม

สารละลายมาตรฐานกรดซาลิไซลิก 5.43×10^{-5} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ในกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์ม

ทฤษฎี

เมื่อเติมกรดแอซีติกลงในสารละลายกรดแอซีติลซาลิไซลิกและซาลิไซลิกจะมีผลทำให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารทั้งสองเพิ่มขึ้น (ประสิทธิภาพควอนตัมเพิ่มขึ้น) เคอร์ฟระหว่างความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของกรดแอซีติลซาลิไซลิกเป็นเส้นตรง ถ้าความเข้มข้นของสารนี้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร กรดซาลิไซลิกวัดได้ถึงความเข้มข้น 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรในสารละลายกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์ม ถ้าใช้ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสองในยาควรใช้ยาหลายเม็ดบดให้เข้ากัน แบ่งมาวิเคราะห์จะได้ตัวแทนของตัวอย่างที่ดี

วิธีการทดลอง

สเปกตรากระตุ้นและสเปกตราเปล่งฟลูออเรสเซนซ์ของสารหาได้จากสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ รูป 9-9 และ 9-10 เป็นสเปกตราของกรดแอซีติลซาลิไซลิกและกรด

ซาลิไซลิก รูป 9-11 เป็นสเปกตรัมของสารละลายผสมกรดซาลิไซลิกและกรดแอซีติลซาลิไซลิก

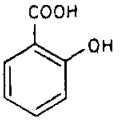
ก. เคอร์ฟมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์

เคอร์ฟมาตรฐานสำหรับกรดแอซีติลซาลิไซลิก ปิเปตต์สารละลายกรดแอซีติลซัลโฟซาลิไซลิก 4.0 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 5, 10, 15 และ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร 4 ใบ เจือจางสารละลายในขวดด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดแอซีติกในคลอโรฟอร์มจนถึงขีดปริมาตร ใช้สารละลายกรดแอซีติลซัลโฟซาลิไซลิก 4.0 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร หาความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นและความยาวคลื่นที่เปล่งออกมา เมื่อได้ความยาวคลื่นแสงทั้งสองแล้ว หาความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายทั้ง 4 ขวดที่ความยาวคลื่นนี้ โดยใช้สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดแอซีติกในคลอโรฟอร์มเป็นสารอ้างอิง

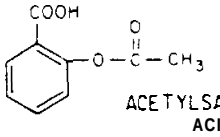
เคอร์ฟมาตรฐานสำหรับกรดซาลิไซลิก ปิเปตต์สารละลายกรดซาลิไซลิก 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 5, 10, 15 และ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางสารละลายในขวดด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดแอซีติกในคลอโรฟอร์มจนถึงขีดปริมาตร ใช้สารละลายกรดซาลิไซลิก 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร หาความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นและความยาวคลื่นที่เปล่งออกมา เมื่อได้ความยาวคลื่นทั้งสอง หาความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายทั้ง 4 ขวดโดยใช้สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดแอซีติกในคลอโรฟอร์มเป็นการอ้างอิง

ข. การหาปริมาณกรดแอซีติลซาลิไซลิก และกรดซาลิไซลิกในยาเม็ดแอสไพริน

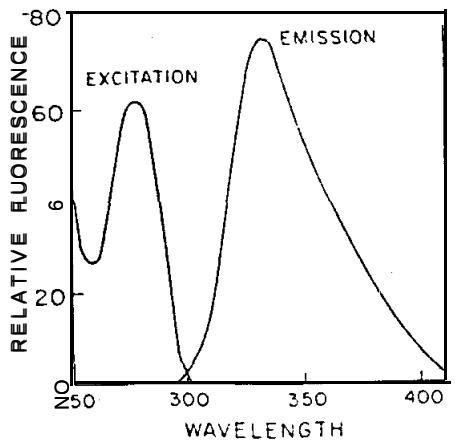
บดยาเม็ด 3 ถึง 5 เม็ดให้ละเอียด ชั่งยา 400 มิลลิกรัม (1 เม็ดหนักประมาณ 400 มิลลิกรัม) ถ่ายใส่ขวดปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ละลายในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์

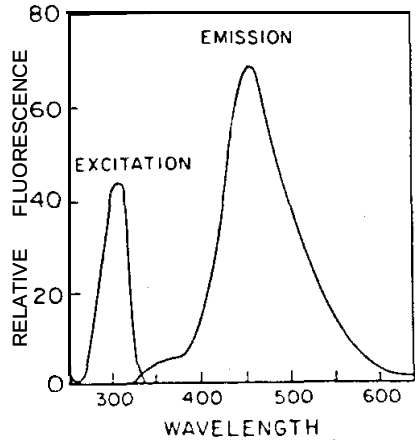


SALYCYLIC ACID
MW. 138.12



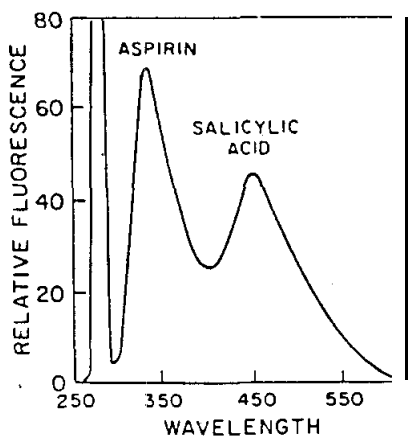
ACETYLSALICYLIC ACID
MW. 180.17





รูป 9-9 *สเปกตรากระตุ้นและเปล่งของกรดแอซิทิลซาลิไซลิก* 1.0×10^{-4} *โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ในสารละลายกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์ม สภาพไวที่ใช้* x 3 x

รูป 9-10 *สเปกตรากระตุ้นและเปล่งของกรดซาลิไซลิก* 2.23×10^{-5} *โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตรในสารละลายกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ในคลอโรฟอร์ม สภาพไว* x 3 x



รูป 9-11 *กรดซาลิไซลิกในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดแอซิติก นาโนเมตร*

กรดแอซีติกในคลอโรฟอร์ม แล้วเจือจางด้วยสารละลายนี้จนถึงขีดปริมาตร กรองอย่างรวดเร็วผ่านกระดาษกรองวาตแมน เลข 1 หาเปอร์เซ็นต์ฟลูออเรสเซนซ์ของกรดซาลิไซลิกจากเคอร์ฟมาตรฐาน น้ำใสเก็บไว้ใช้หากรดแอซีติลซาลิไซลิก

การหาปริมาณกรดแอซีติลซาลิไซลิก ให้เจือจางสารละลายที่กรองได้ให้มีความเข้มข้น 1:1000 ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์กรดแอซีติกในคลอโรฟอร์ม ให้ลดความเข้มข้นลงสามครั้งโดยปิเปตต์มา 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรเจือจางจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร หาเปอร์เซ็นต์ฟลูออเรสเซนซ์ของกรดแอซีติลซาลิไซลิกจากเคอร์ฟมาตรฐาน การทดลองนี้ต้องทำให้เสร็จภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากละลายเม็ดยา

การวิเคราะห์ข้อมูล

สร้างเคอร์ฟมาตรฐานระหว่างความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสารละลายกรดแอซีติลซาลิไซลิกและกรดซาลิไซลิกในกระดาษกราฟแผ่นเดียวกัน หาความเข้มข้นของกรดทั้งสองนี้จากเคอร์ฟ รายงานปริมาณกรดแอซีติลซาลิไซลิกและกรดซาลิไซลิกเป็นมิลลิกรัมในยา 1 เม็ด เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่ติดบนสลาก

คำถาม

1. เคอร์ฟมาตรฐานของสารละลายทั้งสองเป็นเส้นตรงหรือไม่ ถ้าไม่เป็นเส้นตรงให้เหตุผลประกอบ
2. อะไรเป็นสาเหตุให้มีปริมาณกรดซาลิไซลิกในเม็ดยา
3. ทำไมค่าฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จึงไม่คงที่เมื่อตั้งสารละลายทิ้งไว้นาน

การทดลอง 9.4

การหาปริมาณปรอท (II) โดยการออกซิไดซ์ด้วยไทอามีนให้เป็นไทโอโครม

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

ใช้วิธีฟลูออเรสเซนซ์หาปริมาณปรอท (II) โดยการออกซิไดซ์ไทอามีนด้วยปรอท (II) ให้ไทโอโครมที่มีความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูง

อุปกรณ์

ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

ฟิลเตอร์ชุดแรก 7-60 ชุดที่สอง 2 A

ขวดปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร 8 ใบ

ปิเปตต์ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 อัน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 อัน 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 อัน 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 อัน 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 อัน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 อัน

สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์บอเรต (พีเอช 7.7)

สารละลายไทอามีน 3×10^{-5} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (ต้องเตรียมใหม่ ๆ)

สารละลายตัวอย่างปรอท (1 นาโนกรัมปรอทต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) (พีเอช 7.0) สารตัวอย่างปรอทที่อยู่ในสารอินทรีย์ต้องทำการย่อยด้วยกรด และมีปริมาณปรอท 10 ถึง 500 นาโนกรัม สารละลายนี้ต้องมีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า 0.02 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

สารละลายมาตรฐานปรอท (II) คลอไรด์ 200 นาโนกรัมปรอทต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เซนติเมตร

ทฤษฎี

สารประกอบปรอท (II) ไม่ให้คลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์ การหาปริมาณปรอททำได้โดยการหาปริมาณไทโอโครมก่อนและหลังการออกซิไดซ์ไทอามีนให้เป็นไทโอโครม การหาปริมาณปรอท (II) ถ้ามีแคทไอออนที่ต่อกับไซยาไนด์ ไอโอไดด์, ซัลไฟด์ และอีดีทีเอ รวมทั้งสารประกอบเหล่านี้ที่อยู่ในรูปแอนไอออนจะลดปริมาณความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ สารละลายปรอทที่อยู่ในสารอินทรีย์วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้เช่นกัน เคอร์ฟที่ได้จากการวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสารละลายปรอท 10 ถึง 200 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรเป็นเส้นตรง

หมายเหตุ การหาปริมาณไทอามีนทำได้โดยการออกซิไดซ์ไทอามีนด้วยปรอท (II) คลอไรด์

วิธีการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐานปรอท โดยปิเปตต์สารละลายปรอท 10 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มา 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ขวดปริมาตร

10 ลูกบาศก์เซนติเมตร 6 ใบ ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างปรอท 5 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ขวดปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิเปตต์สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.7 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในขวดปริมาตรทั้ง 8 ใบ ใบที่ 8 ไม่มีปรอทใช้น้ำปราศจากไอออนแทน ใบที่ 8 เป็นสารละลายอ้างอิงปิเปตต์สารละลายไทอามีน 3×10^{-5} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ใส่ลงในขวดปริมาตรทั้ง 8 ใบ ใบละ 1 ลูกบาศก์เซนติมตร เจือจางสารละลายในขวดทั้ง 8 ใบด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดปริมาตร ทิ้งสารละลายไว้ 2 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิห้อง) แช่ในน้ำร้อน 90 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ทิ้งสารละลายไว้ให้เย็นวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายนี้ ความยาวคลื่นกระตุ้น 375 นาโนเมตร (ฟิลเตอร์ 7-60) ความยาวคลื่นแสงเปล่ง 440 นาโนเมตร (ฟิลเตอร์ 2A)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เตรียมเคอร์ฟมาตรฐานระหว่างความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของปรอท (นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) หาปริมาณปรอทในสารละลายตัวอย่าง

คำถาม

1. เขียนปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ไทอามีนให้เป็นไทโอโครมด้วยปรอท (II)
2. โครงสร้างส่วนใดของไทโอโครมที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์

การทดลอง 9.5

การหาปริมาณไรโบฟลาวิน (ไทอามีน) อย่างง่าย

วิธีการทดลอง

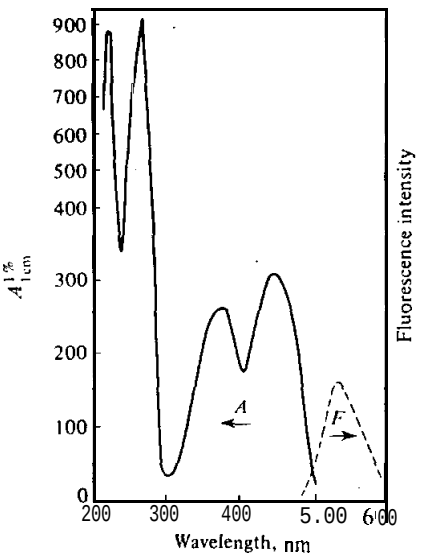
1. สารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน ชั่งไรโบฟลาวิน 10.0 มิลลิกรัม ละลายด้วยกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ ถ่ายใส่ขวดปริมาตร 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร เจือจางสารละลายนี้ด้วยกรดแอซีติก 1 เปอร์เซ็นต์จนถึงขีดปริมาตร เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน สารละลายนี้เข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร) เก็บสารละลายนี้ไว้ในที่เย็นและมืด

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16 ส่วนในล้านส่วนในขวดปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากสารละลายข้อ 1 เจือจางสารด้วยน้ำปราศจากไอออน

3. นำเอาสารละลายไรโบฟลาวินที่มีความเข้มข้น 0.10 ส่วนในล้านส่วนมาหาสเปกตรากระตุ้นและสเปกตราเปล่งจะได้สเปกตรา ดังรูป 9-12

4. นำเอาสารละลายที่เตรียมในข้อ 2 มาหาเคอร์ฟมาตรฐานโดยใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในข้อ 3 โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นแบล็งค์

5. นำเอาสารตัวอย่างมาวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ หาปริมาณสารตัวอย่าง



รูป 9-12 *สเปกตราดูดกลืนและเปล่งของไรโบฟลาวินในน้ำปราศจากไอออน*