บทที่ 8

โมเลกูลาร์ฟลูออเรสเซนซ์, ฟอสฟอเรสเซนซ์ และ เคมิลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectroscopy

วิธีวิเคราะห์เชิงแสงในบทนี้ เรียกการวาวแสงเชิงโมเลกุล (molecular fluorescence,) การเรืองแสงเชิงโมเลกุล (molecular phosphorescence) และการเปล่งแสงทางเคมี (chemiluminescence) ทั้งสามวิธีเกิดจากโมเลกุลของสารที่สนใจถูกกระตุ้น เกิดสปีชีส์ที่ไม่เสถียรจึงให้สเปกตรัมเปล่งออก (emission spectrum) ข้อมูลนี้นำไปทำคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ได้ ทั้งสามวิธีนี้จัดเป็นวิธีการเปล่งแสง (luminescence)

การวาวแสงและการเปล่งแสงเกิดจากโมเลกุลของสารที่สนใจดูดกลืนโฟตอนแล้วเปลี่ยนจากสถานะพื้นไปสู่สถานะกระตุ้น ซึ่งไม่เสถียรพร้อมกับปล่อยรังสีที่มีความยาวคลื่นเท่าเดิมหรือความยาวคลื่นมากกว่าเดิม ปรากฏการณ์นี้เรียกว่าโฟโตลูมิเนสเซนซ์ ฟลูออเรสเซนซ์ก็ต่างจากฟอสฟอเรสเซนซ์เนื่องจากการแทรนซิชันของพลังงานอิเล็กทรอนิกของฟลูออเรสเซนซ์ไม่มีการเปลี่ยนการสปินของอิเล็กตรอนรังสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent radiation) จึงมีชีวิตสั้น การเปล่งฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้นอย่างเร็ว ($<10^{-6}$ วินาที) การเปล่งฟอสฟอเรสเซนซ์เกิดช้ากว่าใช้เวลาเป็นวินาทีหรือมากกว่า เนื่องจากมีการเปลี่ยนการสปินรังสีโฟโตลูมิเนสเซนซ์ (การวาวแสงและการเรืองแสง) จึงมีความยาวคลื่นมากกว่าความยาวคลื่นของรังสีที่ใช้กระตุ้น

การเปล่งแสงแบบที่สาม (การเปล่งแสงทางเคมี) สปีชีส์ที่ถูกกระตุ้นเกิดจากปฏิกิริยาเคมี เช่น อนุภาคที่ถูกกระตุ้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารที่วิเคราะห์กับสารอื่นที่เหมาะสม (ใช้ตัวออกซิไดส์ที่รุนแรง เช่น โอโซนหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) สเปกตรัมที่ได้เป็นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิไดส์มากกว่าสารที่สนใจ อีกตัวอย่าง

หนึ่งที่สนใจได้แก่ สารที่สนใจไม่เกิดปฏิกิริยาการเปล่งแสงทางเคมีโดยตรง แต่เป็นสารเร่งปฏิกิริยาหรือยับยั้งปฏิกิริยาการเปล่งแสงทางเคมี

ความเข้มโฟโตลูมิเนสเซนซ์หรือการเปล่งแสงทางเคมีที่วัดได้ใช้หาปริมาณสารอนินทรีย์และอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ การวิเคราะห์โดยวิธีการเปล่งแสงมีสภาพไวกว่าวิธีการดูดกลืนหนึ่งถึงสามเท่า ขีดจำกัดการตรวจหาอยู่ในช่วงส่วนในล้านส่วนถึงส่วนในพันล้านส่วน ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับความเข้มการวาวแสงที่วัดได้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นกว้างดีกว่าวิธีการดูดกลืน วิธีการเปล่งแสงมีความจำเพาะดีกว่าวิธีการดูดกลืน แต่สปีชีส์ที่ให้รังสีลูมิเนสเซนซ์มีจำกัด

ทฤษฎีการวาวแสงและการเรืองแสง Theory of Fluorescence and Phosphorescence

การวาวแสงเกิดจากระบบเคมีที่เป็นแก๊สของเหลว และของแข็ง เช่น ไอของอะตอมโซเดียม 3_s อิเล็กตรอนเมื่อได้รับรังสีที่เหมาะสม (5896 และ 5890 อังสตรอม) จะเปลี่ยนไปสู่สถานะกระตุ้น 3_p ซึ่งไม่เสถียร หลังจากเวลาผ่านไป 10^{-8} วินาที อิเล็กตรอนที่ 3_p จะกลับสู่สถานะพื้น 3_s โดยปล่อยรังสีที่มีความยาวคลื่นเท่าเดิม (5896 และ 5890 อังสตรอม) ออกมาทุกทิศทาง การวาวแสงแบบนี้ไม่มีการเปลี่ยนความยาวคลื่นเรียกรังสีเรโซแนนซ์ (resonance radiation) หรือการวาวแสงเรโซแนนซ์ (resonance fluorescence) โมเลกุลหรือไอออนที่มีหลายอะตอมให้เรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์และให้รังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนเรียก การวาวแสงนอร์แมล (normal fluorescence) ปรากฏการณ์นี้เรียกการเลื่อนสโต๊ก (stoke shift)

สถานะกระตุ้นของการวาวแสงและการเรืองแสง Fluorescent and Phosphorescent Excited states

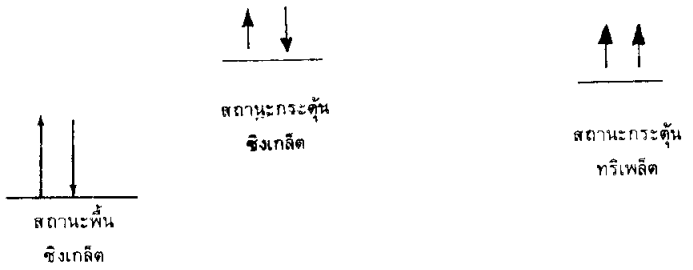
พันธะระหว่างสองอะตอมประกอบด้วยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่เกิดจากการซ้อนทับกันของออร์บิทัลเชิงอะตอมของคู่อิเล็กตรอน (electorn pair)ที่เกิดพันธะ เมื่อออร์บิทัลเชิงอะตอมสองออร์บิทัลรวมกันจะเกิดออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่สร้างพันธะและต้านการสร้างพันธะ ออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่สร้างพันธะ อิเล็กตรอนอยู่ในสถานะพื้น (มีพลังงานต่ำ) ระดับพลังงานอิเล็กทรอนิกของแต่ละออร์บิทัลเชิงโมเลกุลมีระดับพลังงานการสั่นใกล้กันมากจะเกิดการซ้อนทับกันได้ แถบดูดกลืนอิเล็กทรอนิกจะเกิดจากการแทรนซิชันจากสถานะพื้นไปสู่สถานะกระตุ้นที่มีหลายระดับพลังงานการสั่น

อิเล็กตรอนสปิน (Electron spin) เมื่อนำอะตอมและโมเลกุลมาวางในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงสูง อิเล็กตรอนที่อยู่รอบนอกอะตอมหรือโมเลกุลจะได้รับผลจากสนามแม่เหล็กชุด

สอง สนามแม่เหล็กนี้อาจมีทิศทางเดียวกันหรือสวนทางกับสนามแม่เหล็กชุดแรก (ที่มีความแรงสูง) ถ้าออร์บิทัลเชิงโมเลกุลมีอิเล็กตรอนสองตัว อิเล็กตรอนจะสปินสวนทางกันตามกฎกีดกันของเพาลี (Pauli Exclusion) การสปินของอิเล็กตรอนนี้เรียกการสปิน เข้าคู่ (spin pair) การสปินแบบนี้ไม่ให้สนามแม่เหล็กชุดสอง จึงไม่มีผลต่อสนามแม่เหล็กชุดแรก หรือกล่าวว่าเป็นไดอะแมกเนติก (diamagnetic) ถ้าเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) การสปินของอิเล็กตรอนเป็นแบบไม่เข้าคู่ (spin unpair) จึงให้สนามแม่เหล็กชุดสอง และมีผลต่อสนามแม่เหล็กชุดแรก หรือกล่าวว่าเป็นพาราแมกเนติก (paramagneFic)

สถานะกระตุ้นซิงเกล็ต/ทริเพล็ต (Singlet/Triplet Excited States) สถานะอิเล็กทรอนิกของโมเลกุลส่วนใหญ่อิเล็กตรอนจะมีการจัดตัวแบบเข้าคู่ ที่สถานะพื้นอิเล็กตรอนอยู่ที่สถานะซิงเกล็ต สถานะนี้ไม่มีการแยกระดับพลังงานเมื่อโมเลกุลนี้อยู่ในสนามแม่เหล็ก โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นเลขคี่หรืออนุมูลอิสระ ที่สถานะพื้นอิเล็กตรอนจะมีสองระดับพลังงาน (doublet) เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวมีการจัดตัวทิศทางเดียวกันหรือสวนทางกับสนามแม่เหล็ก

เมื่ออิเล็กตรอนหนึ่งในสองตัวที่อยู่ในโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่ถูกกระตุ้นไปยังระดับพลังงานสูงกว่า อิเล็กตรอนนี้จะอยู่ในสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตหรือทริเพล็ต ถ้าเป็นสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตอิเล็กตรอนจะสปินเข้าคู่ ถ้าเป็นสถานะกระตุ้นทริเพล็ตอิเล็กตรอน

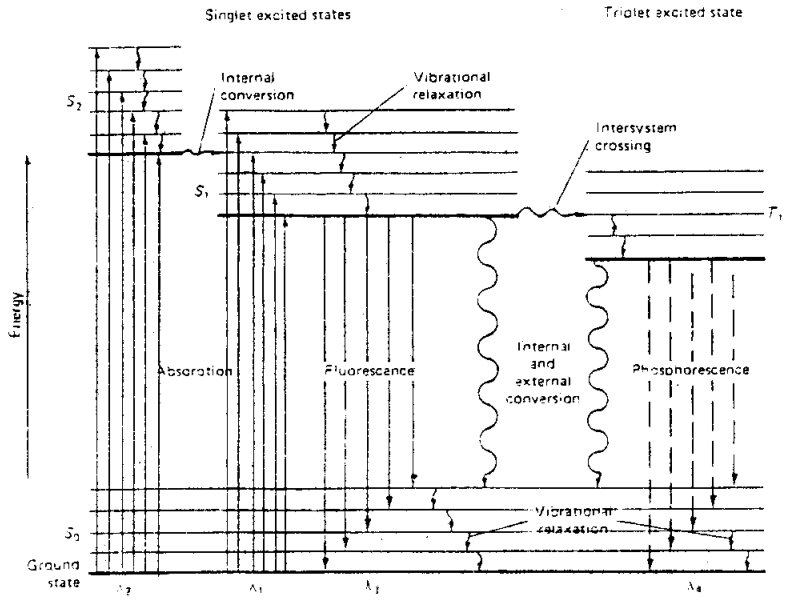


จะไม่สปินเข้าคู่ หรือสปินขนานกัน การตั้งชื่อ ซิงเกล็ต ดับเล็ต และทริเพล็ตได้จากการพิจารณามัลติพลิซิตี สถานะกระตุ้นทริเพล็ตมีพลังงานน้อยกว่าสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต

โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นทริเพล็ตมีสมบัติต่างจากสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต โดยโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นทริเพล็ตมีสมบัติพาราแมกเนติก โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตมีสมบัติไดอะแมกเนติก การแทรนซิชัน ซิงเกล็ต-ทริเพล็ตและทริเพล็ต-ซิงเกล็ตต้องการเปลี่ยนสถานะอิเล็กทรอนิก และมีช่วงชีวิต 10^{-4} ถึงหลายวินาที จึงมีโอกาสน้อยกว่าการแทรนซิชันซิงเกล็ต – ซิงเกล็ตซึ่งมีช่วงชีวิต 10^{-6} ถึง 10^{-8} วินาที การกระตุ้นโมเลกุลที่อยู่ที่สถานะพื้นซิงเกล็ตเป็นสถานะกระตุ้นทริเพล็ตโดยตรงจึงไม่เกิดขึ้น พิคดูดกลืนที่

เกิดจากการแทรนซิชัน ทริเพล็ต – ซิงเกล็ต มีความเข้มน้อยกว่าพีคดูดกลืนที่เกิดจากการแทรนซิชัน ซิงเกล็ต – ซิงเกล็ต โมเลกุลบางชนิดเท่านั้นให้การเรืองแสง

แผนภูมิระดับพลังงานของโมเลกุลโฟโตลูมิเนสเซนซ์ (Energy level Diagrams for Photoluminescence Molecules) รูป 8.1 ระดับพลังงานของโมเลกุลที่ให้โฟโตลูมิเนสเซนซ์ เส้นทึบตอนล่างแทนพลังงานของโมเลกุลที่สถานะพื้นซึ่งปกติเป็นสถานะซิงเกล็ตและแทนด้วย S_0 ที่อุณหภูมิปกติสถานะนี้แทนพลังงานของทุกโมเลกุลในสารละลาย เส้นทึบตอน



รูป 8-1 *ระดับพลังงานของระบบโฟโตลูมิเนสเซนซ์*

บนแทนพลังงานอิเล็กทรอนิกส์ของสามสถานะกระตุ้นที่มีระดับการสั่นเป็นศูนย์ เส้นหนาด้านข้างสองเส้นแทนสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต S_1 และ S_2 เส้นหนาด้านขวาแทนสถานะกระตุ้นทริเพล็ต T_1 ปกติแล้วพลังงานของสถานะกระตุ้นที่หนึ่งแบบทริเพล็ตมีค่าน้อยกว่าแบบซิงเกล็ต แต่ละระดับพลังงานอิเล็กทรอนิกส์จะมีระดับพลังงานการสั่นต่าง ๆ อยู่รวมกัน ระดับพลังงานการสั่นค่าต่าง ๆ นี้แทนด้วยเส้นบางในแนวราบ

เมื่อดูรูป 8-1 โมเลกุลดูดกลืนรังสีได้สองช่วงความยาวคลื่น ช่วงแรกที่ความยาวคลื่น λ_1 (เกิดการแทรนซิชันจาก SO ไป S_1) ช่วงสองที่ความยาวคลื่น λ_2 (เกิดการแทรนซิชันจาก S_0 ไป S_2) กระบวนการนี้เรียกการกระตุ้น การกระตุ้นเกิดจากการเปลี่ยนจากสถานะพื้นไปสู่สถานะกระตุ้นที่มีการสั่นหลายค่า การกระตุ้นโดยตรงเพื่อทำให้เกิดสถานะกระตุ้น

ทริเพล็ตเกิดยาก เนื่องจากกระบวนการนี้ต้องมีการเปลี่ยนสถานะจากซิงเกล็ตไปทริเพล็ต (เปลี่ยนมัลติพลิซิตี multiplicity)

กระบวนการกลับสู่สถานะพื้น Deactivation Process

โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นจะกลับสู่สถานะพื้นโดยกระบวนการต่าง ๆ ได้หลายแบบเมื่อดูรูป 8-1 การปล่อยโฟตอนมีสองแบบได้แก่การวาวแสงและการเรืองแสงแทนด้วยลูกศรในแนวดิ่ง ขั้นตอนการคาย (ปล่อย) พลังงานแบบอื่นแทนด้วยลูกศรแบบลูกคลื่น กระบวนการนี้ไม่มีการปล่อยรังสีออกมา การกลับสู่สถานะพื้นเป็นวิธีการหนึ่งที่ลดช่วงชีวิตของสถานะกระตุ้น ถ้าการกลับสู่สถานะพื้นโดยการปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์ (วาวแสง) เกิดขึ้นรวดเร็วกว่ากระบวนการคายพลังงานแบบไม่ให้รังสีจะมีการวาวแสงออกมา ถ้าการกลับสู่สถานะพื้นโดยกระบวนการไม่ปล่อยรังสีเกิดขึ้นเร็วกว่าจะไม่มีการวาวแสงออกมา

ระบบที่มีปรากฏการณ์การปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์มีไม่มาก ระบบนี้ขึ้นกับโครงสร้างและสภาพแวดล้อม ถ้าอัตราเร็วในการคายพลังงานโดยไม่ให้รังสีมีน้อยปฏิกิริยาการปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์จะเกิดขึ้นมาก ข้อมูลที่ได้จากกระบวนการปล่อยรังสีนำมาทำปริมาณวิเคราะห์ได้

อัตราเร็วการดูดกลืนและการปล่อยรังสี (Rates of Absorption and Emission Radiation) อัตราเร็วของโมเลกุลที่ดูดกลืนรังสีใช้เวลา 10^{-14} ถึง 10^{-15} วินาที อัตราเร็วการปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์เกิดช้ากว่า ช่วงชีวิตของสถานะกระตุ้นและสภาพดูดกลืนโมลาร์ของพีคดูดกลืนมีความสัมพันธ์ตรงข้ามกัน เช่นระบบที่มีสภาพดูดกลืนโมลาร์ $10^{3} - 10^{5}$ ลูกบาศก์เดซิเมตรต่อโมลต่อเซนติเมตร มีช่วงชีวิตของสถานะกระตุ้น 10^{-7} ถึง 10^{-9} วินาที ระบบที่มีสภาพดูดกลืนโมลาร์ต่ำ มีช่วงชีวิตของสถานะกระตุ้น 10^{-6}ถึง 10^{-5} วินาที (ยาวกว่า) ช่วงชีวิตเฉลี่ยของการแทรนซิชันทริเพล็ต-ซิงเกล็ต (การเรืองแสง) 10^{-4} ถึง 10 วินาทีหรือมากกว่า **มีค่ามากกว่าช่วงชีวิตของการแทรนซิชันซิงเกล็ต–ซิงเกล็ต** (การวาวแสง) 10^{-6} ถึง 10^{-8} **วินาที**

การผ่อนคลายโดยการสั่น (Vibrational Relaxation) รูป 8-1 เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากการกระตุ้นแบบอิเล็กทรอนิกส์ โมเลกุลนี้จะกระโดดไปสู่สถานะกระตุ้นซึ่งมีระดับพลังงานการสั่นหลายค่า ถ้าโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นนี้อยู่ในสารละลาย โมเลกุลนี้จะคายพลังงานโดยการชนกับตัวทำละลายมีผลทำให้ตัวทำละลายมีพลังงานมากขึ้น และมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแล้วตัวมันเอง (โมเลกุล) จะกลับสู่สถานะกระตุ้นที่มีพลังงานต่ำ

สุด การคายพลังงานแบบนี้เรียกว่า การผ่อนคลายโดยการสั่น ช่วงชีวิตของโมเลกุลที่เกิดปรากฏการณ์แบบนี้มีค่า 10^{-12} วินาทีหรือน้อยกว่านี้ โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นที่มีพลังงานในการสั่นต่ำสุดจะกลับสู่สถานะพื้นโดยการปล่อยรังสีนอร์แมลฟลูออเรสเซนซ์ ออกมานอร์แมลฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมาอาจมีหลายพีคเนื่องจากสถานะพื้น S_0 มีระดับพลังงานการสั่นอีกหลายค่า ดังนั้น โมเลกุลที่อยู่ที่สถานะพื้นแต่มีระดับพลังงานในการสั่นสูงจะกลับสู่ระดับพลังงานในการสั่นต่ำ โดยการผ่อนคลายโดยการสั่นออกมา

เมื่อเกิดปรากฏการณ์การผ่อนคลายโดยการสั่นจะมีผลทำให้รังสีนอร์แมลฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมามีความถี่ลดลงหรือความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น ส่วนเรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์จะเกิดจากการแทรนซิชันระหว่างสถานะพื้นที่มีระดับพลังงานในการสั่นต่ำสุดกับสถานะกระตุ้นที่เกิดการดูดกลืนรังสีเข้าไป ความถี่ของเรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์จะมีค่าเท่ากับความถี่รังสีที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีเข้าไป

การเปลี่ยนภายใน (Internal Conversion) ใช้อธิบายกระบวนการเปลี่ยนแปลงระหว่างโมเลกุล เมื่อโมเลกุลกลับสู่สถานะอิเล็กทรอนิกส์ชนิดเดิมที่มีพลังงานต่ำกว่าโดยไม่มีการปล่อยรังสี ปรากฏการณ์นี้เกิดจากโมเลกุลที่มีพลังงานอิเล็กทรอนิกส์สองชนิดที่มีค่าพลังงานต่างกันไม่มากนักหรือช่วงระดับพลังงานในการสั่นที่ซ้อนทับกันได้ รูป 8-1 สถานะกระตุ้นซิงเกล็ตมีสองสภาพ พลังงานศักย์ของสถานะทั้งสองตรงที่ซ้อนทับกันมีค่าเท่ากันจึงเกิดการแทรนซิชันแบบการเปลี่ยนภายใน โดยการซ้อนทับกันของระดับการสั่นมากกว่าการคาย (เปลี่ยนจาก S_2 ที่มีพลังงานการสั่นเท่ากับ 0 ไป S_1 ที่มีพลังงานการสั่นมากกว่า 0 และมีพลังงานตรงกัน) พลังงานรังสีฟลูออเรสเซนซ์จากสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตที่มีพลังงานสูง รูป 8-1 การกระตุ้นโดยรังสี λ_2 มักให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ความยาวคลื่น λ_3 และกันไม่ให้เกิดการแทรนซิชันระหว่าง S_2 และ S_0 โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้น S_1 ที่มีระดับพลังงานการสั่นสูงจะกลับสู่ระดับพลังงานการสั่นต่ำสุดโดยกระบวนการการผ่อนคลายโดยการสั่นออกมาและอาจเกิดกระบวนการการเปลี่ยนภายในโดยเปลี่ยนสถานะซิงเกล็ต S_1 ไป S_0 ที่มีพลังงานสูงสุดและเกิดการผ่อนคลายโดยการสั่น ปกติโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้น S_1 ที่มีระดับการสั่นต่ำสุดจะกลับสู่สถานะพื้น S_0 ที่ระดับการสั่นศูนย์หรือมากกว่าศูนย์ โดยให้รังสีนอร์แมลฟลูออเรสเซนซ์ λ_3 ออกมา อาจเป็นเส้นหรือเป็นแถบดังรูป 8-1

กระบวนการเปลี่ยนภายในจาก S_1 ไป S_0 และ T_1 ไป S_0 ดังรูป 8-1 ยังไม่เป็นที่เข้าใจ ถ้าระดับการสั่นของสถานะพื้นที่มีระดับพลังงานการสั่นสูงทับกันสนิทกับสถานะกระตุ้นที่มีระดับการสั่นต่ำจะเกิดการเปลี่ยนภายใน สารประกอบอะลิฟาติกส่วนใหญ่

เกิดแบบนี้จึงไม่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ สารประกอบอะโรมาติกไม่เกิดการเปลี่ยนภายใน

การเปลี่ยนภายใน อาจเกิดในปรากฏการณ์ก่อนการแตกตัว (predissociation) ปรากฏการณ์นี้เกิดจากอิเล็กตรอนเคลื่อนที่จากสถานะอิเล็กทรอนิกส์ที่มีพลังงานสูงกว่าไปสู่สถานะอิเล็กทรอนิกส์ต่ำกว่า แต่มีระดับพลังงานการสั่นที่มีค่าสูงกว่ามาก พลังงานในการสั่นแบบนี้มีค่ามากจนทำให้พันธะแตก โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่พันธะมีความแข็งแรงน้อยกว่าพลังงานอิเล็กทรอนิกส์ในการกระตุ้นของโครโมฟอร์ การแตกของพันธะนี้เกิดขึ้นภายหลังโครโมฟอร์ดูดกลืนรังสีตามด้วยการเปลี่ยนภายใน โดยอิเล็กตรอนในสถานะอิเล็กทรอนิกส์สูงเปลี่ยนไปสู่สถานะอิเล็กทรอนิกส์ต่ำที่มีระดับพลังงานการสั่นสูง จึงมีผลทำให้พันธะอ่อนแอ

ปรากฏการณ์ก่อนการแตกตัวต่างจากการแตกตัว (dissociation) เนื่องจากการแตกตัวจะมีการดูดกลืนรังสีทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่ในโครโมฟอร์ได้รับพลังงานสูงเพียงพอและมีค่ามากกว่าระดับพลังงานการสั่นที่มีค่ามาก (สูง) จนทำให้พันธะของโครโมฟอร์แตกจึงไม่มีการเปลี่ยนภายใน ปรากฏการณ์การแตกตัวมีผลทำให้กระบวนการให้ฟลูออเรสเซนซ์ลดลง

การเปลี่ยนภายนอก (External Conversion) การคายพลังงานการกระตุ้น (Deactivation) ของสถานะกระตุ้นทางอิเล็กทรอนิกส์เกี่ยวกับอันตรกิริยาและการถ่ายโอนพลังงานระหว่างโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นกับตัวทำละลายหรือตัวถูกละลายอื่น ๆ กระบวนการนี้เรียกการเปลี่ยนภายนอก การเปลี่ยนภายนอกมีผลต่อความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เช่นเดียวกับผลตัวทำละลาย นอกจากนี้สถานะที่ทำให้อนุภาคเกิดการชนกันน้อยลง (อุณหภูมิต่ำ ความหนืดสูง) จะทำให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมาเพิ่มขึ้น การแทรนซิชันโดยไม่มีการปล่อยรังสีเปลี่ยนจากสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตและสถานะกระตุ้นทริเพล็ตที่พลังงานต่ำสุดไปสู่สถานะพื้นซิงเกล็ตที่มีระดับพลังงานการสั่นสูง ดังรูป 8-1 เกิดจากการเปลี่ยนภายนอกและการเปลี่ยนภายใน กลไกการเปลี่ยนแปลงทั้งสองนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจ

การข้ามระหว่างระบบ (Intersystem Crossing) เกิดจากการสปินของอิเล็กตรอนที่อยู่ในสถานะกระตุ้นกลับไปกลับมาและมีผลทำให้มัลติพลิซิตีของโมเลกุลเปลี่ยน ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นดี ถ้าระดับการสั่นของสถานะซิงเกล็ตและทริเพล็ตตรงกัน (มีพลังงานเท่ากัน) รูป 8-1 การแทรนซิชันจากสถานะซิงเกล็ตที่มีระดับการสั่นต่ำสุดไปสู่สถานะกระตุ้นทริเพล็ตที่มีระดับการสั่นมาก การแทรนซิชันแบบนี้มีการเปลี่ยนสถานะการสปินจากสปินเข้าคู่เป็นสปินไม่เข้าคู่

การข้ามระหว่างระบบเกิดได้ดีกับโมเลกุลที่มีอะตอมขนาดใหญ่ เช่น ไอโอดีนหรือโบรมีน (ผลของอะตอมหนัก) ผลของอะตอมเหล่านี้ทำให้อันตรกิริยาระหว่างสปินและการเคลื่อนที่ออร์บิทัลมีค่ามาก การแทรนซิชันระหว่างสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตเป็นสถานะกระตุ้นทริเพล็ตเกิดง่าย สปีชีส์ที่มีสมบัติพาราแมกเนติกเช่นโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสารละลายจะช่วยเพิ่มการข้ามระหว่างระบบทำให้สารให้ฟลูออเรสเซนซ์ลดลง

ฟอสฟอเรสเซนซ์ (การเรืองแสง) การคายการกระตุ้น (Deactivation) จากระบบที่อยู่ในสถานะกระตุ้นโดยมีการข้ามระหว่างระบบและเกิดเป็นสถานะกระตุ้นแบบทริเพล็ตที่มีระดับพลังงานการสั่นซึ่งไม่เสถียรแล้วจึงคายพลังงานออกมาโดยการเปลี่ยนภายในหรือภายนอกหรือโดยการให้ฟอสฟอเรสเซนซ์ การแทรนซิชันทริเพล็ต-ซิงเกล็ตมีโอกาสน้อยกว่าการแทรนซิชันซิงเกล็ต-ซิงเกล็ต แต่ใช้เวลาเวลานานกว่า (ช่วงชีวิตยาว 10^{-4} ถึง 10 วินาทีหรือมากกว่า การเรืองแสงจึงเกิดช้าหลังจากการดูดกลืนรังสีไว้ช่วงเวลาหนึ่ง

ตัวแปรที่มีผลต่อการวาวแสงและการเรืองแสง

(Variable that Affect Fluorescence and Phosphorescence

โครงสร้างของโมเลกุลและสภาพแวดล้อมทางเคมีมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ที่ส่งออกมา ตัวแปรที่มีผลต่อฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์

1. ผลได้ควอนตัม (Quantum yield) หรือประสิทธิภาพควอนตัม (Quantum efficiency) ของกระบวนการฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์คือจำนวนโมเลกุลที่ให้รังสีฟลูออเรส-เซนซ์ออกมาหารด้วยจำนวนโมเลกุลทั้งหมดที่ถูกกระตุ้น สปีชีส์เคมีที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์มาก $\phi = 1$ สปีชีส์เคมีที่ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ $\phi = 0$

จากรูป 8-1 ϕ ของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์หาได้จากอัตราเร็วของสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตที่มีพลังงานต่ำสุดคายพลังงานออกมาโดยการให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ (kf) การข้ามระหว่างระบบ (ki) การเปลี่ยนภายใน (kic) การเปลี่ยนภายนอก (kec) ก่อนการแตกตัว (kpd) และการแตกตัว (kd) ความสัมพันธ์นี้เขียนเป็นสมการได้

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_d} \qquad .....(8.1)$$

k แต่ละเทอมแทนอัตราเร็วคงที่ของกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น สมการ 8-1 บอกถึงโครงสร้างและสภาพแวดล้อมของสารที่มีฟลูออเรสเซนซ์ สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์มากมีค่า k_f มาก ส่วนค่า k อื่น ๆ มีค่าน้อย k_f, k_{pd}, k_d ขึ้นกับโครงสร้างเคมีของสาร k_i, k_{ec}, k_{ic} ขึ้นกับสภาพแวดล้อม

ชนิดของการแทรนซิชันในฟลูออเรสเซนซ์ (Transition types in Fluorescence) สปีชีส์เคมีที่ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 250 นาโนเมตรไม่ค่อยให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์เนื่องจากสปีชีส์มีพลังงานมากพอและเกิดการคายพลังงานการกระตุ้นจากสถานะกระตุ้น โดยกระบวนการก่อนการแตกตัวหรือการแตกตัว เช่น รังสีที่มีความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร (มีพลังงาน 140 กิโลแคลอรีต่อโมล) ชนสปีชีส์จะทำให้พันธะของสปีชีส์แตก สปีชีส์ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์จะเปลี่ยนการแทรนซิชันจาก $\pi^* \rightarrow \pi$ และ $\pi^* \rightarrow n$ การแทรนซิชันจาก $\sigma^* \rightarrow \sigma$ จึงไม่มีรังสีฟลูออเรสเซนซ์ออกมา โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นและมีพลังงานสูงจะกลับสู่สถานะกระตุ้นที่มีพลังงานต่ำสุด โดยการผ่อนคลายโดยการสั่นและมีการเปลี่ยนภายใน ปรากฏการณ์นี้ไม่มีการปล่อยรังสีออกมา สปีชีส์ที่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์จะมีการแทรนซิชันจากสถานะกระตุ้นที่มีพลังงานต่ำสุดไปสู่สถานะพื้น รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จึงเกิดจากการแทรนซิชันจาก $\pi^* \rightarrow n$ หรือ $\pi^* \rightarrow \pi$ ขึ้นกับว่าการแทรนซิชันแบบใดมีพลังงานต่ำกว่ากัน

ประสิทธิภาพควอนตัมและชนิดของการแทรนซิชัน (Quantum Efficiency and Transition Type) สารประกอบที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์เกิดจากการคายพลังงานจากสถานะกระตุ้นที่มีพลังงานต่ำสุดไปสู่สถานะพื้น ดังนั้น สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์จึงเกิดจากการแทรนซิชันแบบ $\pi^* \rightarrow \pi$ มากที่สุด ส่วน $\pi^* \rightarrow n$ เป็นอันดับรอง ประสิทธิภาพควอนตัมของสถานะ $\pi \rightarrow \pi^*$ ดีกว่าสภาวะ $n \rightarrow \pi^*$ เนื่องจากสภาพดูดกลืนโมลาร์ของการแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ มีค่ามากกว่าการแทรนซิชันแบบ $n \rightarrow \pi^*$ 100 ถึง 1000 เท่า ค่าสภาพดูดกลืนโมลาร์ ยังใช้บอกโอกาสของการแทรนซิชันได้ด้วย ช่วงชีวิตของการแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ มีค่าน้อย (10^{-7} ถึง 10^{-9} วินาที) เมื่อเปรียบเทียบกับ $n \rightarrow \pi^*$ (10^{-5} ถึง 10^{-7} วินาที) k_f ในสมการ 8.1 จึงมีค่ามาก

ค่าคงที่ความเร็วของการข้ามระหว่างระบบ (k_{ic}) มีค่าน้อยสำหรับสถานะกระตุ้นของ $\pi \rightarrow \pi^*$ เพราะว่าผลต่างของพลังงานของสถานะซิงเกล็ตกับทริเพล็ตมีค่ามากกว่าจึงต้องใช้พลังงานสำหรับกระตุ้นอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ของสถานะกระตุ้น $\pi \rightarrow \pi^*$ สูงมาก ปกติระดับพลังงานการสั่นของทริเพล็ตไม่ตรงกับระดับพลังงานการสั่นซิงเกล็ต จึงมีผลทำให้ไม่ค่อยเกิด (k_{ic}) จึงมีค่าน้อย

สรุป ฟลูออเรสเซนซ์เกิดจากการแทรนซิชันของสถานะ $\pi \rightarrow \pi^*$ มากกว่าสถานะ $n \rightarrow \pi^*$ เพราะว่าการแทรนซิชัน $\pi \rightarrow \pi^*$ มีช่วงชีวิตเฉลี่ยสั้นกว่าการแทรนซิชัน $n \rightarrow \pi^*$ (k_f มีค่ามาก) กระบวนการคายพลังงานแบบอื่นก็มีน้อยกว่าฟลูออเรสเซนซ์

ฟลูออเรสเซนซ์และโครงสร้าง (Fluorescence and Structure) สารประกอบที่มีโครงสร้างแบบอะโรมาติกจะมีการแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ ซึ่งใช้พลังงานในการแทรนซิชันน้อย สารประกอบที่มีโครงสร้างแบบอะลิฟาติกและอะลิไซคลิกคาร์บอนิลหรือโครงสร้างแบบพันธะเดี่ยวและคู่สลับกันจำนวนมากจะให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์น้อยกว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างแบบอะโรมาติก

สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีการแทนที่ในสารละลายให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์น้อยกว่าสารประกอบอะโรมาติกที่มีจำนวนวง (ring) และการรวมตัวของวงมาก เช่น ไพริดีน ฟิวราน ไทโอฟีน และไพรอลไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์เนื่องจากการแทรนซิชันของสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเป็นแบบ $n \rightarrow \pi^*$ การแทรนซิชันแบบนี้จะเปลี่ยนสถานะซิงเกล็ตไปเป็นทริเพล็ตจึงไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมา แต่ถ้าหลอมวงเหล่านี้เข้าด้วยกันกับวงเบนซีนจะทำให้สภาพดูดกลืนโมลาร์ของพีคดูดกลืนเพิ่มเนื่องจากมีการแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ ช่วงชีวิตของสถานะกระตุ้นจึงสั้นลงสารประกอบนี้จึงให้ฟลูออเรสเซนซ์ เช่น ควิโนลีน ไอโซควิโนลีน และ อินโดล

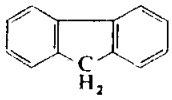
เมื่อแทนที่วงเบนซีนทำให้ความยาวคลื่นพีคดูดกลืนและพีคฟลูออเรสเซนซ์เปลี่ยน การแทนที่วงเบนซีนบางครั้งทำให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เปลี่ยนดังตาราง 8-1 เมื่อมีฮาโลเจนไปแทนที่วงเบนซีนจะมีผลทำให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง ถ้าฮาโลเจนที่เข้าไปแทนที่มีเลขอะตอมเพิ่มขึ้นความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ยิ่งลดลงเนื่องจากผลของอะตอมใหญ่เพิ่มการข้ามระหว่างระบบ (เปลี่ยนสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตไปเป็นทริเพล็ต) ไอโอโดเบนซินและไนโตรเบนซินชอบเกิดปรากฏการณ์ก่อนการแตกตัว เมื่อสารเหล่านี้ดูดกลืนพลังงานที่ใช้กระตุ้น พันธะของสารนี้จะแตกออกอย่างง่ายดาย แล้วเกิดการเปลี่ยนภายใน จึงไม่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ออกมา เมื่อมีหมู่คาร์บอซีลิกหรือคาร์บอนิลเข้าไปแทนที่วงเบนซีนจะทำให้สารนี้ให้ฟลูออเรสเซนซ์น้อยลง ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง เนื่องจากสารนี้เกิดการแทรนซิชันแบบ $n \rightarrow \pi^*$ มากกว่า $\pi \rightarrow \pi^*$

ตาราง 8-1 ผลของหมู่ที่มีการแทนที่ต่อความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของเบนซีน

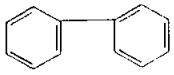
สารประกอบ	สูตร	ฟลูออเรสเซนซ์ (นาโนเมตร)	ความเข้มสัมพัทธ์ของฟลูออเรสเซนซ์
เบนซิน	C_6H_6	270 – 310	10
โทลูอีน	$C_6H_5CH_3$	270 – 320	17
โพรพิลเบนซิน	$C_6H_5C_3H_7$	270 320	17
ฟลูออโรเบนซิน	C_6H_5F	27 – 320	10
คลอโรเบนซิน	C_6H_5CL	275 345	7
โบรโมเบนซิน	C_6H_5Br	290 380	5
ไอโอโดเบนซิน	C_6H_5I		0
ฟีนอล	C_6H_5OH	2x5 – 365	18
ไอออนฟีนอเลต	$C_6H_5O^-$	310 – 400	10
อนิซอล	$C_6H_5OCH_3$	285 – 345	20
อนิลิเนียมไอออน	$C_6H_5NH_3^+$		0
อนิลีน	$C_6H_5NH_2$	310 – 405	20
กรดเบนโซอิก	C_6H_5COOH	310-390	3
เบนโซไนไตร	C_6H_5CN	280 360	20
ไนโตรเบนซีน	$C_6H_5NO_2$		0

ผลของโครงสร้างที่มีสภาพแข็งเกร็ง (Effect of Structural Rigidity) **โมเลกุลที่มีโครงสร้างแข็งเกร็ง** (เกาะกันอย่างเหนียวแน่น) เช่น ฟลูออรีน ไบฟลีนิล มีค่า ϕ 1.0 และ 0.2 ตามลำดับเมื่อทำการวัดในสภาพเดียวกัน สารทั้งสองมีความประพฤติต่างกันเนื่องจากฟลูออรีนมีโครงสร้างที่มีสภาพแข็งเกร็งโดยหมู่เมทิลีนทำหน้าที่เป็นสะพาน ตัวกระทำดีเลต-อินทรีย์เมื่อเกิดสารเชิงซ้อนกับโลหะจะมีโครงสร้างแบบแข็งเกร็งกว่าตัวกระทำดีเลตอินทรีย์เดี่ยว ๆ เช่น 8-ไฮดรอกซีควิโนลีนมีความเข้มฟลูออเรสเซนซ์น้อยกว่าสารเชิงซ้อนของสังกะสี 8-ไฮดรอกซีควิโนเลต สารประกอบที่มีโครงสร้างแบบแข็งเกร็งโอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนภายในมีน้อยจึงให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์มาก

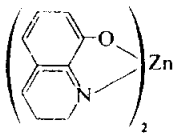
โมเลกุลที่เกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ จะเพิ่มอัตราเร็วการเปลี่ยนภายใน k_{ic} จึงคายพลังงานที่ถูกกระตุ้นแบบไม่ให้รังสี



ฟลูออรีน



ไบฟลีนิล

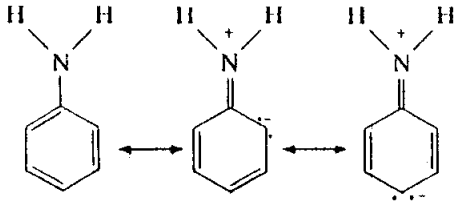


ผลของอุณหภูมิและตัวทำละลาย (Temperature and Solvent Effects) ประสิทธิภาพควอนตัม ϕ ของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มโอกาสของการชนเพิ่มทำให้มีการคายพลังงานการกระตุ้นโดยการเปลี่ยนภายนอก ถ้าลดความหนืดของตัวทำละลายโอกาสของการชนกันเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพควอนตัมจะมีค่าน้อยลง

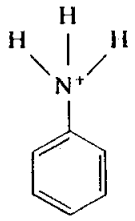
ตัวทำละลายที่มีขั้วทำให้พลังงานในการแทรนซิชัน แบบ $n \rightarrow \pi^*$ เพิ่ม ส่วนพลังงานในการแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ ลดลง ถ้าผลนี้มีมากจนทำให้พลังงานของการแทรนซิชัน $\pi \rightarrow \pi^*$ ต่ำกว่า $n \rightarrow \pi^*$ ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้น

ตัวทำละลายที่มีอะตอมขนาดใหญ่ เช่น คาร์บอนเทตราโบรไมด์และเอทิลไอโอไดด์ มีผลทำให้เกิดการข้ามระหว่างระบบได้สถานะกระตุ้นทริเพล็ตเพิ่มขึ้น ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จึงลดลง ถ้ามีอะตอมขนาดใหญ่แทนที่สารประกอบที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ จะมีผลทำให้เกิดการข้ามระหว่างระบบได้สถานะทริเพล็ต สารประกอบที่มีอะตอมขนาดใหญ่จึงให้รังสีฟอสฟอเรสเซนซ์ลดลง

ผลของพีเอช (Effect of pH on Fluorescence) ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารประกอบอะโรมาติกที่วงถูกแทนที่ทำให้เกิดสภาพเป็นกรดหรือเบสขึ้นกับค่า พีเอช (ความเป็นกรด เบส) ความเข้มและความยาวคลื่นของพีคฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นกับระบบของสารประกอบที่เกิดการแตกตัวเป็นไอออนหรือไม่ตาราง 8-1 ฟีนอล และอนิลีนให้พีคฟลูออเรสเซนซ์ต่างจากเบนซิน ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารประกอบที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นกับจำนวนสปีชีส์ที่มีการเรโซแนนซ์ในรูปกรด-เบส เช่นอนิลีนมีรูปเรโซแนนซ์หลายรูป ขณะที่อนิลิเนียมมีเพียงรูปเดียว สารที่มีเรโซแนนซ์หลายรูปจะช่วยให้สถานะกระตุ้นที่หนึ่งมีความเสถียรมากจึงให้ฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงอัลตราไวโอเลต



อนิลีนมีเรโซแนนซ์สามรูป



ไอออนอนิลิเนียมมีเพียงหนึ่งรูป

คุณสมบัตินี้คล้ายกับอินดิเคเตอร์ชนิดกรดเบสที่มีการดูดกลืนรังสีคนละความยาวคลื่น อินดิเคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์ใช้ในการไทเทรตกรดเบสในสารละลายที่มีสี เช่น ฟลูออรีนที่อยู่ในรูปฟีนอลิก 1-แนพทอล-4-ซัลฟอนิกแอซิดไม่มีสีเนื่องจากสารนี้ดูดกลืนรังสีช่วงอัลตราไวโอเลต จึงไม่สามารถดูจุดยุติได้ด้วยตา ถ้าสารนี้อยู่ในเบสจะอยู่ในรูปไอออนฟีนอเลตซึ่งให้พีคฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงวิสิเบิลจึงดูจุดยุติได้ด้วยตา การเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นกับการเปลี่ยนค่าพีเอชมากกว่าค่าคงที่การแตกตัวของสาร ปรากฏการณ์นี้เรียกการเควนทางเคมี (Chemical quenching) ค่าคงที่การแตกตัวของกรดสำหรับโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้นต่างจากโมเลกุลที่อยู่ในสถานะพื้น การวิเคราะห์โดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์จึงต้องควบคุมพีเอช สารต่าง ๆ ที่ไวต่อการเปลี่ยนพีเอชใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้เช่นเดียวกับอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการไทเทรต กรดเบส ดังตาราง 8-2

ตาราง 8-2 อินดิเคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์

อินดิเคเตอร์	ช่วงพีเอช	สีที่เปลี่ยน
3,6-ไดไฮดรอกซีพทาลิไมด์	0.0 – 2.5	ไม่มีสี-เหลืองเขียว
อีรีโทรซิน	2.5 – 4.0	ไม่มีสี-เขียว
กรดโครโมโทรปิก	3.0 – 4.5	ไม่มีสี-น้ำเงิน
ฟลูออเรสเซนซ์	4.0 – 6.0	ไม่มีสี-เขียว
เบตา-แนพโทควิโนลิน	4.4 – 6.3	น้ำเงิน-ไม่มีสี
อัลเบลลิเฟอโรน	6.5 – 8.0	น้ำเงินอ่อน-น้ำเงินเข้ม
โอโธ-คูมาริกแอซิด	7.2 – 9.0	ไม่มีสี-เขียว
แนพโทลเอเอส	8.2 – 10.3	ไม่มีสี-เหลืองเขียว

ผลของออกซิเจนที่ละลายปนอยู่ (Effect of Dissolved Oxygen) ทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลงเนื่องจากออกซิเจนไปออกซิไดส์สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้ยังเปลี่ยนโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นและอยู่ในสถานะกระตุ้นแบบซิงเกล็ตแล้วให้สถานะทริเพล็ต การเควนเกิดจากโมเลกุลออกซิเจนซึ่งมีการสปินของอิเล็กตรอนแบบไม่เข้าคู่ มีสมบัติพาราแมกเนติกทำให้โมเลกุลของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์และอยู่ในสถานะกระตุ้นซิงเกล็ตเกิดการข้ามระหว่างระบบเปลี่ยนเป็นสถานะกระตุ้นทริเพล็ต สปีชีส์อื่น ๆ ที่มีสมบัติพาราแมกเนติกจะทำการเควนสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ทำให้ได้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์น้อยลง

ผลของความเข้มข้นที่มีต่อความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ (Effect of Concentration on Fluorescent Intensity) ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์แปรโดยตรงกับความสามารถของสารที่ดูดความเข้มลำรังสีที่ใช้กระตุ้น

$$F = K'(P_o - P) \qquad \text{.....(8.2)}$$

P_o ความเข้มลำรังสีที่ตกสู่สารละลาย P ความเข้มลำรังสีที่ออกจากสารละลายหลังจากเดินทางในตัวกลางยาว b K′ ค่าคงที่ขึ้นกับประสิทธิภาพควอนตัมของกระบวนการฟลูออเรสเซนซ์จากกฎของเบียร์

$$\frac{P}{P_o} = 10^{-\in bc} \qquad \text{.....(8.3)}$$

$\in$ สภาพดูดกลืนโมลาร์ของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ A แทนความดูดกลืนหรือ $\in bc$ แทนค่าสมการ 8-3 ลงใน 8-2 ได้

$$F = K'P_o(1-10^{-\in bc}) \qquad \text{.....(8.4)}$$

$$= K'P_o\left[2.303 \in bc - \frac{(2.303 \in bc)^2}{2!} - \frac{(-2.303 \in bc)^3}{3!}\ldots\right] \qquad \text{.....(8.5)}$$

เมื่อความดูดกลืน A มีค่าน้อยกว่า 0.05 เทอมต่าง ๆ ที่อยู่ในวงเล็บมีค่าน้อยกว่าเทอมแรก จึงเขียนสมการได้เป็น

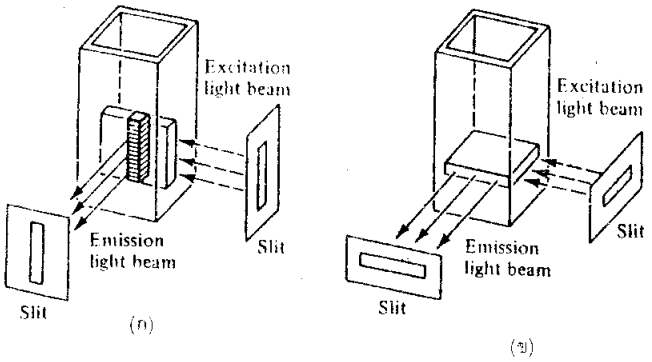
$$F = 2.303K' \in bc\, P_o \qquad \text{.....(8.6)}$$

เมื่อ P_o มีค่าคงที่

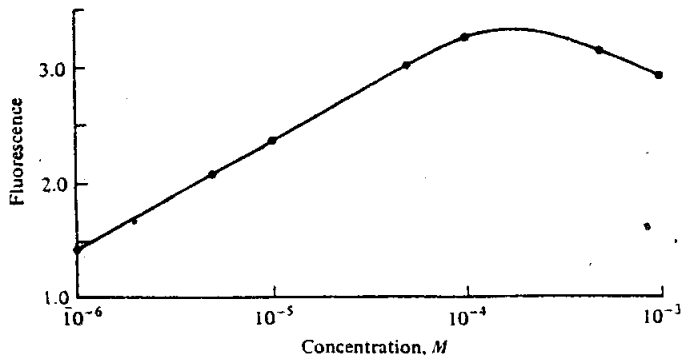
$$F = KC$$

เมื่อพล็อตความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนส์ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ หลายความเข้มข้น เคอร์ฟที่ได้จะเป็นเส้นตรง ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นมากและมีผลทำให้ความดูดกลืนรังสีมากกว่า 0.05 เคอร์ฟที่ได้จะไม่เป็นเส้นตรง

ความเข้มฟลูออเรสเซนส์ขึ้นกับความเข้มรังสีที่ใช้กระตุ้น สภาพไวในการวิเคราะห์โดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มรังสีในการกระตุ้นเพิ่มขึ้น เพื่อให้อัตราส่วนสัญญาณต่อการรบกวนเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มแหล่งกำเนิดรังสีไม่คงที่ ดังนั้น ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้เป็นความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ (ไม่ใช่ความเข้มฟลูออเรสเซนส์สัมบูรณ์) เคอร์ฟที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์กับความเข้มข้น ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ต้องแก้ค่าแบล็คกราวน์ฟลูออเรสเซนซ์ อุปกรณ์โฟโตลูมิเนสเซนซ์ปรับสภาพไวได้ หลังจากวัดความเข้มข้นสารมาตรฐานโดยปรับอุปกรณ์ให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์แปรโดยตรงกับความเข้มข้น b ในสมการ 8-5 และ 8-6 ไม่ใช่ทางเดินแสงของเซลล์ แต่เป็นปริมาตรของแข็ง (solid volume) หรือความกว้างช่องเล็กยาวในการกระตุ้น และการเปล่งรังสี สมการนี้จึงขึ้นกับความกว้างช่องเล็กยาวไม่ใช่ขนาดของเซลล์ ดังรูป 8-2



รูป 8-2 *ความกว้างช่องเล็กยาวที่ให้แสงผ่านเข้าสู่สารละลายตัวอย่าง*
(ก) การจัดช่องเล็กยาวแบบปกติ
(ข) การจัดช่องเล็กยาวให้ลำแสงในแนวราบขนสารตัวอย่าง ใช้ในกรณีที่สารตัวอย่างมีปริมาณน้อย (มีเพียง 0.6 ลูกบาศก์เซนติเมตรก็วัดได้)



รูป 8-3 *เคอร์ฟความเข้มฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของโคเอนไซม์* NADH *ในน้ำปราศจากไอออน เคอร์ฟนี้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น* 10^{-4} *ถึง* 10^{-8} *โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร*

เคอร์ฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มฟลูออเรสเซนซ์หรือฟอสฟอเรสเซนซ์กับความเข้มข้น แสดงในรูป 8-3 เคอร์ฟนี้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นต่างกันประมาณ 100 เท่า ช่วงเคอร์ฟที่เป็นเส้นตรงยังขึ้นกับค่าแบลงค์และการเควนฟลูออเรสเซนซ์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ขึ้นกับค่าแบลงค์ ตัวทำละลายที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์และการกระเจิงอาจรบกวนสัญญาณที่ได้จากการวัดฟลูออเรสเซนซ์ของสารตัวอย่าง ปกติสารละลายที่มีความเข้มข้นมาก ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้น้อยลง เนื่องจากปรากฏการณ์การเควนร่วมและการดูดกลืนร่วม การวิเคราะห์โดยการวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ต้องใช้ตัวทำละลายที่มีความบริสุทธิ์สูง

ตัวอย่าง การวิเคราะห์ไทโรซีนในโปรตีนโดยทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร และมีรังสีปล่อยออกมาที่ 303 นาโนเมตร เมื่อใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้แปรโดยตรงกับความเข้มข้นไทโรซีนในช่วง 0.5 ถึง 5.0 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากการวิเคราะห์นี้ไม่มีการรบกวน เมื่อใช้สารมาตรฐานไทโรซีน 1.00 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร วัดความเข้มของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างได้ 73 และ 62 หน่วย ตามลำดับ

จงคำนวณความเข้มข้นไทโรซีนในสารตัวอย่าง

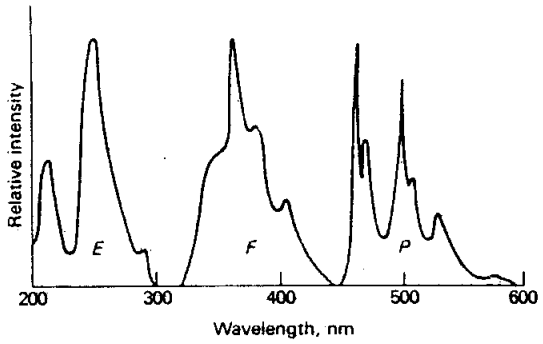
$$\text{ความเข้มข้นสารตัวอย่าง} = \frac{62}{73} \times 1.00$$

$$= 0.85 \text{ ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร}$$

สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงสุดจะเกิดปรากฏการณ์การเควนร่วม (self quenching) และการดูดกลืนร่วม (self absorption) ทำให้เคอร์ฟที่ได้จากการพล็อตไม่เป็นเส้นตรง การเควนร่วมเกิดจากการชนกันของโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้น โมเลกุลนี้ไม่เสถียรจะถ่ายโอนพลังงานให้แก่กันและกันและคายพลังงานในสถานะกระตุ้นโดยไม่ให้รังสี บางครั้งโมเลกุลของตัวถูกละลายถ่ายโอนพลังงานให้แก่ตัวทำละลาย ปรากฏการณ์นี้เกิดเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น การดูดกลืนร่วมเกิดเมื่อรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ให้ออกมามีความยาวคลื่นเท่ากับความยาวคลื่นของโมเลกุลที่มีการดูดกลืนรังสี ปรากฏการณ์นี้ทำให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ลดลง

สเปกตรัมเปล่งออกและกระตุ้น Emission and Excitation Spectrum

รูป 8-4 สเปกตราของฟีแนนทรอลีนที่ให้โฟโตลูมิเนสเซนซ์สามแบบ สเปกตรัมกระตุ้นได้จากการตรึงความยาวคลื่นรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากสารตัวอย่าง (โดยเลือกตรงความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด) บันทึกสเปกตรัมจากการแปรความยาวคลื่นรังสีที่ใช้กระตุ้น สเปกตราฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์



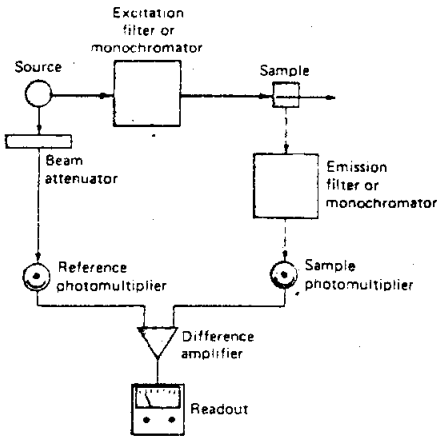
รูป 8-4 *สเปกตราฟีแนนทรอลีน* E *การกระตุ้น* F *ฟลูออเรสเซนซ์* P *ฟอสฟอเรสเซนซ์*

ได้จากการตรึงความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (โดยเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนรังสีสูงสุด) บันทึกสเปกตราจากการแปรความยาวคลื่นรังสีฟลูออเรสเซนซ์หรือฟอสฟอเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกมา

ปรากฏการณ์โฟโตลูมิเนสเซนซ์ให้รังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่าความยาวคลื่นรังสีที่ใช้กระตุ้น แถบฟอสฟอเรสเซนซ์ยังพบที่ความยาวคลื่นมากกว่าแถบฟลูออเรสเซนซ์ เพราะว่าสถานะกระตุ้นทริเพล็ตมีพลังงานน้อยกว่าสถานะกระตุ้นซิงเกล็ต ผลต่างของความยาวคลื่นทั้งสองใช้หาผลต่างของพลังงานระหว่างสถานะทริเพล็ตและซิงเกล็ตได้

อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์การวาวแสง Instruments for Fluorescence Analysis

ฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ส่วนใหญ่เป็นแบบลำรังสีคู่ ดังรูป 8-5 เป็นองค์ประกอบของอุปกรณ์ลำรังสีคู่ อุปกรณ์แบบนี้ลดปัญหาเกี่ยวกับความเข้มของแหล่งกำเนิดรังสีที่ไม่สม่ำเสมอ รังสีที่ออกจากแหล่งกำเนิดรังสีชุดแรกผ่านฟิลเตอร์หรือตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่หนึ่ง ซึ่งทำหน้าที่ให้รังสีที่มีความยาวคลื่นเฉพาะตามต้องการไปชนสารตัวอย่าง เมื่อสารตัวอย่างดูดกลืนพลังงาน สารตัวอย่างจะปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์ออกมาทุกทิศทาง แต่การวัดปริมาณรังสีนี้ในทิศทางตั้งฉากกับลำรังสีที่ชนสารตัวอย่างให้ผลดีที่สุด ที่มุมอื่นการกระเจิงเนื่องจากสารละลายและผนังเซลล์ที่ใส่สารตัวอย่างมีค่ามากทำให้การวัดไม่ถูกต้อง รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากสารตัวอย่างให้ผ่านเข้าสู่ฟิลเตอร์หรือตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สองซึ่งทำหน้าที่แยกความยาวคลื่นรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ต้องการวัดให้เข้าสู่เครื่องตรวจหา



รูป 8-5 *องค์ประกอบของฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์*

รังสีชุดที่สองผ่านเข้าสู่ตัวลด (attenuator) ซึ่งทำหน้าที่ลดความเข้มรังสีให้มีความเข้มรังสีเท่า ๆ กับความเข้มรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากสารตัวอย่างแล้วเข้าสู่เครื่องตรวจหาลำรังสีอ้างอิงและลำรังสีสารตัวอย่าง เครื่องขยายจะทำหน้าที่ขยายสัญญาณที่มาจากเครื่องตรวจหารังสีอ้างอิงกับเครื่องตรวจหารังสีจากสารตัวอย่างแล้วส่งสัญญาณออกมาสู่ระบบอ่านสัญญาณ อุปกรณ์ที่วัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์ส่วนใหญ่เป็นแบบปรับสัญญาณให้เท่ากัน โดยใช้ตัวลดแบบแสงหรือไฟฟ้า

อุปกรณ์ที่ใช้วัดฟลูออเรสเซนซ์มีสองแบบ ฟลูออโรมิเตอร์และสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ฟลูออโรมิเตอร์ใช้ฟิลเตอร์แยกความยาวคลื่นลำรังสีที่ต้องการกระตุ้นสารและแยกความยาวคลื่นลำรังสีที่ปล่อยจากสารตัวอย่างตามต้องการ สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์มีสองแบบ เครื่องสเปกโทรแบบธรรมดาใช้ฟิลเตอร์แยกความยาวคลื่นลำรังสีที่ต้องการกระตุ้นสารตัวอย่างและใช้ตัวทำแสงเอกรงค์แบบเกรตติงหรือปริซึมแยกแถบความยาวคลื่นฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกจากสารตัวอย่าง เครื่องสเปกโทรอย่างดีใช้ตัวทำแสงเอกรงค์สองชุด ชุดแรกทำหน้าที่แยกความยาวคลื่นเป็นแถบแคบ ๆ เพื่อให้กระตุ้นสารตัวอย่าง ตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สองทำหน้าที่แยกความยาวคลื่นฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกจากสารตัวอย่าง อุปกรณ์นี้วัดสเปกตราฟลูออเรสเซนซ์ วัดการดูดกลืนรังสีและรังสีที่ใช้กระตุ้นสารตัวอย่าง

องค์ประกอบของฟลูออโรมิเตอร์และสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ Components of Fluorometers and Spectrofluorometers

อุปกรณ์ที่ใช้วัดฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดรังสี ฟิลเตอร์และตัวทำแสงเอกรงค์ เครื่องตรวจหา เซลล์ที่ใช้ใส่สารตัวอย่างและช่องใส่เซลล์

แหล่งกำเนิดรังสี (Radiation Source) ต้องให้รังสีที่มีความเข้มสูงมากกว่าหลอดทังสเตนหรือหลอดไฮโดรเจนที่ใช้ในการวัดการดูดกลืน จากสมการ 8-6 ขนาดของสัญญาณที่ได้และสภาพไวขึ้นกับความเข้มแหล่งกำเนิดรังสี P_o จึงต้องใช้แหล่งกำเนิดรังสี หลอดซีนอนหรือหลอดปรอท หลอดอาร์กซีนอนให้รังสีที่มีความเข้มสูง เมื่อผ่านกระแสเข้าไปในบรรยากาศซีนอน สเปกตรัมของรังสีที่ได้อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 250 ถึง 600 นาโนเมตร โดยมีความเข้มสูงสุดที่ 470 นาโนเมตร ดังรูป 8-6 ให้กระแสผ่านตัวเก็บประจุ (capacitor) แล้วจึงป้อนกระแสที่มีปริมาณมากและหยุดป้อนให้กับหลอดซีนอน หลอดแบบนี้ให้รังสีที่มีความเข้มสูงและเป็นแบบกระแสสลับ สัญญาณที่ได้จากเครื่องตรวจหาเป็นแบบกระแสสลับ

หลอดอาร์กเมอคิวรีให้เส้นสเปกตรัมที่มีความเข้มสูง ภายในหลอดนี้มีความดันปรอทประมาณ 8 บรรยากาศ หลอดนี้ให้รังสีแบบเส้นที่มีความยาวคลื่น 366, 405, 436, 546, 577, 691 773 นาโนเมตร หลอดที่มีความดันปรอทต่ำและมีหน้าต่างเป็นซิลิกา ให้รังสีแบบเส้นที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ปัจจุบันอุปกรณ์ที่ต้องการแหล่งกำเนิดรังสีที่มีความเข้มสูงใช้เลเซอร์เป็นแหล่งกำเนิดรังสี แหล่งกำเนิดรังสีแบบนี้ให้รังสีที่มีความเข้มสูงในช่วงความยาวคลื่น 360 และ 650 นาโนเมตร แหล่งกำเนิดรังสีแบบนี้ไม่ต้องใช้ตัวทำแสงเอกรงค์ด้านที่กระตุ้นสารตัวอย่าง

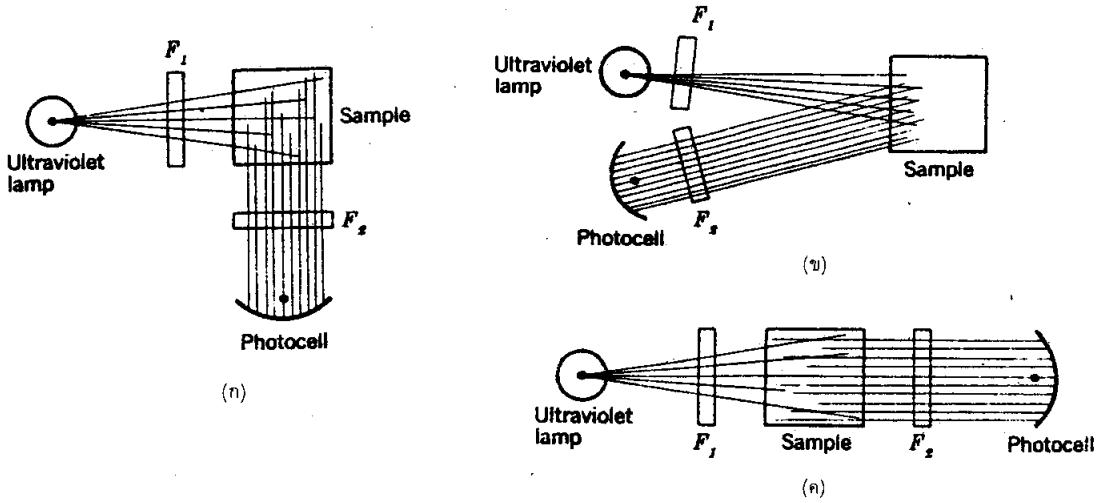
ฟิลเตอร์และตัวทำแสงเอกรงค์ (Filter and Monochromators) ฟลูออโรมิเตอร์ใช้อินเทอร์เฟอเรนซ์ฟิลเตอร์และแอบซอร์ปชันฟิลเตอร์ ส่วนสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ใช้เกรตติง

เครื่องตรวจหา (Detectors) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้มีความเข้มต่ำ ต้องใช้เครื่องขยายที่มีประสิทธิภาพสูง ปกติใช้หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์

เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่างและช่องใส่เซลล์ (Cells and Cell Compartments) เซลล์ที่ใช้ใส่สารเป็นรูปทรงกระบอกและเซลล์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ทำจากแก้วหรือซิลิกา ห้องใส่เซลล์นี้ต้องมีสมบัติไม่กระเจิงรังสีเข้าสู่เครื่องตรวจหาหรือกระเจิงได้น้อยมาก ดังนั้น ด้านหลังเซลล์จึงทาสีดำด้าน เพื่อให้รังสีที่ถูกกระเจิงออกจากเซลล์และรังสีที่ไม่ถูกดูดโดยสารตัวอย่างถูกดูดด้วยสีดำ ปริมาณรังสีที่ใช้กระตุ้นสารตัวอย่างเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ของรังสีทั้งหมด

การออกแบบอุปกรณ์ (Instrument Designs)

ฟลูออโรมิเตอร์ รูป 8-6 เป็นแบบลำรังสีเดี่ยว ฟิลเตอร์ชุดแรกให้รังสีอัลตราไวโอเลตผ่าน แต่ไม่ยอมให้รังสีวิสิเบิลที่ออกจากแหล่งกำเนิดผ่าน ฟิลเตอร์ชุดที่สอง (F_2) ยอมให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงวิสิเบิลผ่าน และทำหน้าที่ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตไม่ให้เข้าสู่เครื่องตรวจหา



รูป 8-6 *ฟลูออโรมิเตอร์*

(ก) วัดรังสีที่มุม 90 องศา

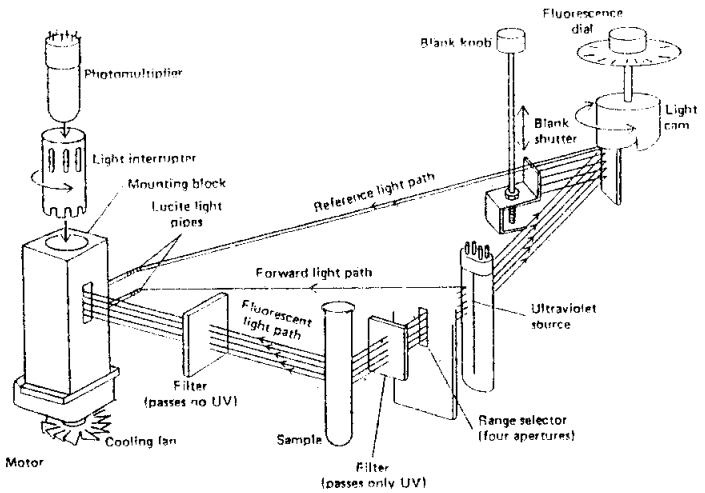
(ข) มุมต่ำกว่า 90 องศา

(ค) วัดรังสีในแนวเส้นตรง F_1 *และ* F_2 F_1 *เป็นฟิลเตอร์หรือตัวทำแสงเอกรงค์ รังสีอัลตราไวโอเลตผ่าน แต่ไม่ยอมให้รังสีวิสิเบิลที่ออกจากแหล่งกำเนิดรังสีผ่าน ฟิลเตอร์ชุดที่สอง* F_2 *ยอมให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงวิสิเบิลผ่านและทำหน้าที่ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตไม่ให้เข้าสู่เครื่องตรวจหา*

รูป 8-7 เป็นฟลูออโรมิเตอร์แบบลำรังสีคู่ แบบแรกเครื่องตรวจหาวัดลำรังสีอ้างอิงเป็นรังสีอัลตราไวโอเลต แหล่งกำเนิดรังสีเป็นหลอดปรอท หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ใช้เป็นเครื่องตรวจหา รังสีจากแหล่งกำเนิดรังสีส่วนหนึ่งผ่านฟิลเตอร์ชุดแรกแล้วชนสารตัวอย่าง รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากสารตัวอย่างผ่านฟิลเตอร์ชุดที่สองแล้วเข้าสู่เครื่องตรวจหา ลำรังสีอ้างอิงถูกสะท้อนโดยผิวกระจกเงาที่ปรับเพิ่มลดปริมาณรังสีได้แล้วผ่านเข้าสู่ท่อแสง ภายในท่อแสงมีเส้นใยนำแสงที่ทำหน้าที่ส่งลำรังสีเข้าสู่หลอดโฟโตมัลติพลาย-เออร์ ชุดตัดแสงที่หมุนได้ทำหน้าที่ส่งรังสีอ้างอิงและรังสีฟลูออเรสเซนซ์จากสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่องตรวจหาสลับกัน เครื่องตรวจหาให้สัญญาณกระแสสลับ ถ้าความเข้มจากลำรังสีทั้งสองต่างกัน เฟสของสัญญาณกระแสสลับขึ้นกับว่าลำรังสีใดมีความเข้มมากกว่ากัน สัญญาณที่ต่างกันจะปรากฏบนเข็มวัด ถ้าต้องการเพิ่มหรือลดปริมาณรังสีทางด้านลำรังสีอ้างอิงทำโดยปรับผิวกระจกที่สะท้อนรังสีปุ่มนี้ปรับปริมาณรังสีเป็นแบบเชิงเส้น

การปรับเครื่องตรวจหาให้วัดได้ถูกต้องทำได้โดย ใช้ลำรังสีชุดที่สามที่มีความเข้มคงที่ให้ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจหา โดยลำรังสีนี้อยู่ในเฟสเดียวกันกับลำรังสีฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์จะรับรังสีตลอดเวลา การแก้ผลของลำรังสีชุดที่สามที่มีต่อการวัดฟลูออเรสเซนซ์ทำโดยปรับเข็มวัดฟลูออเรสเซนซ์ให้ชี้ที่ศูนย์ด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีรังสีฟลูออเรสเซนซ์หรือเซลล์ทึบแสง (มืด) ใส่ในช่องใส่สารตัวอย่าง ความเข้มแสงทางด้านลำรังสีอ้างอิงปรับโดยใช้ชัตเตอร์แบล็งค์จนไม่มีแสงผ่าน (เข็มวัดบนหน้าปัดชี้ที่ศูนย์) การปรับเช่นนี้ควรทำระหว่างการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

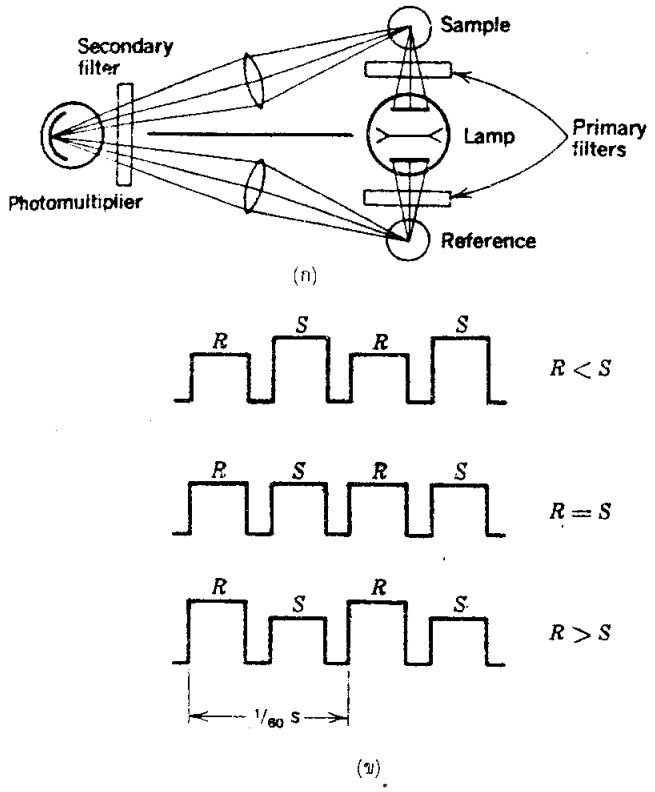
ฟลูออโรมิเตอร์แบบลำรังสีคู่ที่ใช้เครื่องตรวจหาเพียงอันเดียว เครื่องตรวจหาต้องรีโพรดิวซ์ เพื่อป้องกันไม่ให้ผลวิเคราะห์ผิดพลาด ต้องตรวจสอบเคอร์ฟมาตรฐานบ่อย ๆ



รูป 8-7 *ระบบทางเดินแสงของฟลูออโรมิเตอร์เทอร์เนอร์รุ่น* 1100

แบบที่สอง เครื่องตรวจหารังสีฟลูออเรสเซนซ์จากสารมาตรฐานและสารอ้างอิง ดังรูป 8-8 เรียกตัวก่อกำเนิดฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent Generator) ความเข้มของแหล่งกำเนิดรังสีที่เปลี่ยนไปไม่ค่อยมีผลต่อการวิเคราะห์ สารละลายมาตรฐานฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ช่วยลดผลของอุณหภูมิที่มีต่อสารตัวอย่างและสารอ้างอิงและสภาพไวของเครื่องตรวจหาที่เปลี่ยนไป สารอ้างอิงที่ใช้คือสารมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์

ตัวอย่าง เบคแมนเรโซฟลูออโรมิเตอร์ออกแบบให้หลอดปรอทที่ใช้ปรอทเป็นแอโนดสองขั้วได้รับกระแสสลับ ขั้วแอโนดอยู่ด้านนอกและอยู่ตรงข้ามกัน แต่ละขั้วเกิดการอาร์กดิสชาร์จด้วยกระแสสลับ ภายในหลอดปรอทเคลือบด้วยสารฟอสฟอร์เพื่อทำหน้าที่เปลี่ยนความเข้มรังสีปรอทที่ 184 และ 253 นาโนเมตร เป็นพีคต่อเนื่องในช่วงอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล 254, 310, 320 และ 450 นาโนเมตร หลอดจะมืดช่วงเวลาสั้น ๆ แต่ละครั้งที่มีการเปล่งรังสี



รูป 8-8 *เบคแมนเรโซฟลูออโรมิเตอร์*

(ก) แผนภูมิทางเดินแสง

(ข) ปริมาณรังสีที่ออกจากสารตัวอย่างและเครื่องตรวจหา

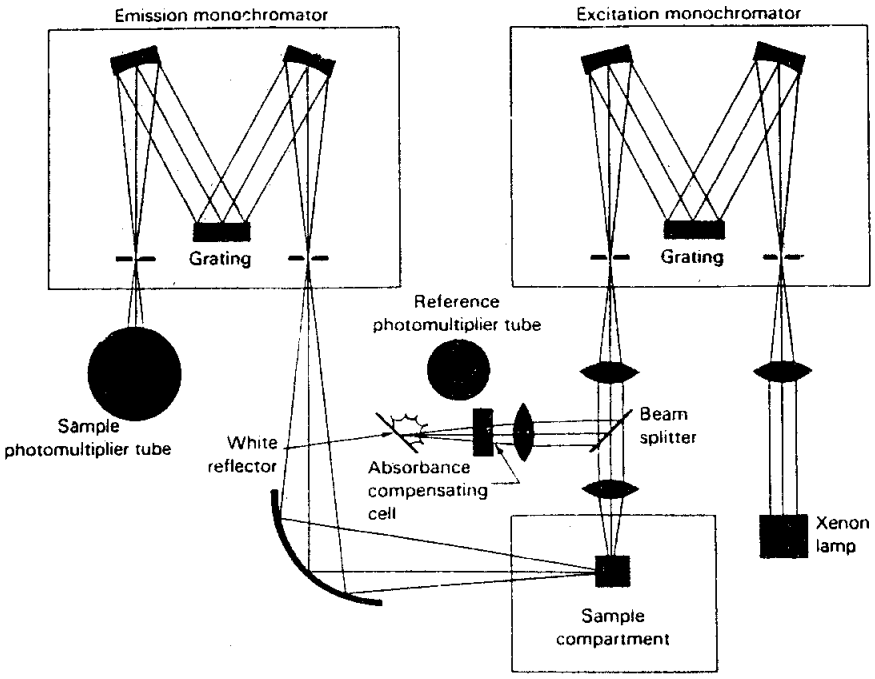
รังสีอัลตราไวโอเลตที่ได้จากหลอดจะสลับกันออกมาทั้งสองด้าน (ขั้วปรอทสองขั้ว) ผ่านสู่ฟิลเตอร์สองอัน (ฟิลเตอร์ชุดแรก) ดังนั้น รังสีที่ออกจากฟิลเตอร์จึงเป็นรังสีที่ใช้กระตุ้น ลำรังสีหนึ่งให้ผ่านสู่สารตัวอย่าง ลำสองให้ผ่านสู่สารอ้างอิง (ส่วนใหญ่เป็นสารตัวอย่างหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นสูงสุด) รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากสารตัวอย่างและมีมุม 75 องศา กับลำรังสีที่ตกผ่านสู่ระบบเลนส์รวมแสงลำรังสีที่ออกจากเลนส์รวมแสงผ่านสู่ฟิลเตอร์ชุดที่สองก่อนที่ลำรังสีจะเข้าสู่เครื่องตรวจหา ฟิลเตอร์ชุดที่สองทำหน้าที่กั้นรังสีอัลตราไวโอเลตโดยการกระเจิง เพื่อไม่ให้เข้าสู่เครื่องตรวจหา ส่วนเลนส์ทางด้านสารอ้างอิงทำหน้าที่เช่นเดียวกับสารตัวอย่าง ลำรังสีจากสารอ้างอิงผ่านเข้าสู่ฟิลเตอร์และเครื่องตรวจหาชุดเดียวกับสารตัวอย่าง ดังรูป 8-8 (ก) สัญญาณจากลำรังสีอ้างอิงและลำรังสีสารตัวอย่างจะสลับกันเข้าสู่เครื่องตรวจหาอุปกรณ์แบบนี้จึงทำงานคล้ายกับอุปกรณ์ลำรังสีคู่

ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ทางด้านสารอ้างอิงปรับให้มีค่าคงที่ โดยแปรศักย์ที่ให้กับไดโนดของหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์และปรับให้อ่านเข็มวัดได้สูงสุด (เต็มสเกล) สัญญาณความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ สารตัวอย่างที่ได้จากหลอดวัดเป็นสัญญาณความเข้มที่เปรียบเทียบกับสารอ้างอิง ดังรูป 8-8 (ข)

ฟลูออโรมิเตอร์แบบลำรังสีคู่ของเบคแมน ดังรูป 8-8 ใช้สารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสารมาตรฐาน สารนี้ต้องบริสุทธิ์ไม่มีสิ่งแปลกปลอมที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ สารที่มีคุณสมบัติเช่นนี้หาได้ยาก จึงต้องใช้สารมาตรฐานทุติยภูมิ (Secondary standard) เช่น แก้วยูเรเนียม (Uranium glass) และควินินซัลเฟต

ฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์แบบลำรังสีคู่ของเบคแมน ดังรูป 8-8 (ก) ใช้หลอดไอปรอทเป็นแหล่งกำเนิดรังสีโดยมีแอโนดอยู่ที่ปลายทั้งสองของหลอดและมีแคโทดตรงกลางเมื่อมีกระแสสลับป้อนให้กับแอโนด จะเกิดการปล่อยประจุและให้รังสีแบบกระแสสลับหรือพัลส์ (pulse) ออกมา ดังรูป 8-8 (ข) ลำรังสีทั้งสองนี้จะชนฟิลเตอร์ชุดแรกแล้ววิ่งเข้าสู่เซลล์ใส่สารตัวอย่างและสารอ้างอิง รังสีฟลูออเรสเซนซ์แบบพัลส์ที่ออกจากเซลล์ทั้งสองผ่านเข้าสู่ฟิลเตอร์ชุดที่สองแล้วเข้าหลอดสู่โฟโตมัลติพลายเออร์ วงจรอิเล็กทรอนิกส์ทำหน้าที่เลือกพัลส์เหล่านี้ และใช้ขนาดของพัลส์อ้างอิงปรับศักย์ที่ให้กับไดโนดของหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ เพื่อให้สัญญาณที่ได้จากสารอ้างอิงเท่ากับร้อยละ 100 พัลส์ที่ได้จากสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้เข็มวัดเบี่ยงเบนไป ค่าที่อ่านได้จากเข็มวัดแทนความเข้มข้นที่ได้ในช่วงที่ความสัมพันธ์ทั้งสองนี้เป็นเส้นตรง

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์รูป 8-9 มีตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สองเป็นแบบเกรตติง แหล่งกำเนิดรังสีเป็นหลอดซีนอน รังสีจากตัวทำแสงเอกรงค์ชุดแรกถูกแยกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งผ่านหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์อ้างอิง ส่วนที่สองผ่านสารตัวอย่าง เมื่อสารตัวอย่างได้รับรังสีจะให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ผ่านตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สอง เข้าสู่หลอดโฟโตมัลติ-พลายเออร์ชุดที่สอง



รูป 8-9 *สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์*

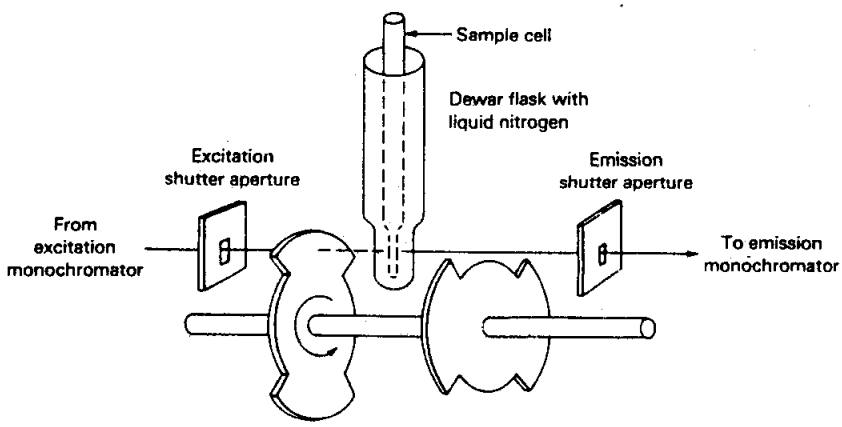
การใช้งานของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เริ่มแรกสังเกตความยาวคลื่นที่เหมาะสมของสเปกตรัมที่เปล่งออกของรังสีฟลูออเรนเซนซ์เป็นสิ่งแรก และเลือกให้ตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สองอยู่ที่ความยาวคลื่นนี้ สเปกตรัมที่ใช้ในการกระตุ้นสารตัวอย่างหาได้จากการหมุนตัวทำแสงเอกรงค์ชุดแรก (เปลี่ยนความยาวคลื่นของแหล่งกำเนิดรังสี) ขณะที่ปรับให้ตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สองคงที่ สเปกตรัมที่ได้จากการเปล่งรังสีได้จากการหมุนตัวทำแสงเอกรงค์ชุดที่สอง (เปลี่ยนความยาวคลื่นรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมา) โดยเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมจากแหล่งกำเนิดรังสี สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์เมื่อทำการวัดที่ที่มีสภาพไวสูงสุด สเปกตรัมที่ได้จากการเปลี่ยนความยาวคลื่นของตัวทำแสงเอกรงค์ชุดใด ๆ ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง

สเปกตราที่ได้จากเครื่องหนึ่งไม่เหมือนกับสเปกตราที่ได้จากอีกเครื่องหนึ่ง เนื่องจากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ขึ้นกับแหล่งกำเนิดรังสี เครื่องตรวจหาและตัวทำแสงเอกรงค์ คุณสมบัติของอุปกรณ์เหล่านี้เปลี่ยนไปกับความยาวคลื่นของเครื่องที่ใช้

ฟลูออโรมิเตอร์และสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ทั่ว ๆ ไป เป็นแบบให้ข้อมูลไม่ถูกต้อง (uncorrected) **เรียก** (uncorrected spectrofluorometer) **สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์แบบนี้มักใช้แหล่งกำเนิดรังสีเป็นหลอดอาร์กซีนอนซึ่งให้รังสีช่วงความยาวคลื่น 200-700นาโนเมตร แหล่งกำเนิดรังสีนี้ให้ทั้งสเปกตราการกระตุ้นสารตัวอย่างและสเปกตราเปล่งออก อุปกรณ์นี้ใช้แหล่งกำเนิดรังสีเป็นหลอดอาร์กซีนอน ความเข้มที่ได้จากแหล่งกำเนิดรังสีเปลี่ยนไปกับความยาวคลื่น เครื่องตรวจหาใช้หลอดใช้โฟโตมัลติพลายเออร์ที่มีอัตราการขยายสูง และไม่มีอุปกรณ์ควบคุมปริมาณรังสีที่เปลี่ยนไปเมื่อเปลี่ยนความยาวคลื่น ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เครื่องตรวจหาวัดได้จึงไม่ถูกต้องเท่ากับค่าจริง**

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบแก้ไข (Corrected Spectrofluorometer) อุปกรณ์นี้ให้สเปกตราแบบสัมบูรณ์ (absolute spectra) สเปกตราที่ได้จากสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ที่ไม่แก้ไขต้องแก้ไขพารามิเตอร์ของเครื่องตรวจหาที่วัดได้จุดต่อจุดที่เปลี่ยนความยาวคลื่น การแก้ไขแบบนี้เสียเวลา อุปกรณ์ที่มีระบบแก้ไขต้องมีอุปกรณ์แก้ไขความเข้มแหล่งกำเนิดรังสีจากหลอดซีนอนที่เปลี่ยนไปให้คงที่ สารตัวอย่างจะได้รับพลังงานคงที่ทุกช่วงความยาวคลื่น และยังมีอุปกรณ์ปรับให้หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ทำงานคงที่ทุกช่วงความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไป สเปกตราเปล่งออกแปรโดยตรงกับปริมาณรังสีต่อหน่วยแถบความกว้างช่องเล็กยาว

ฟอสฟอริมิเตอร์ (Phosphorimeter) อุปกรณ์ที่ใช้วัดรังสีฟอสฟอเรสเซนซ์คล้ายกับฟลูออโรมิเตอร์และสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ เว้นแต่ฟอสฟอริมิเตอร์ต้องมีองค์ประกอบเพิ่มอีกสองชุด ชุดแรกทำหน้าที่ตัดรังสีที่ใช้กระตุ้นให้เป็นแบบสลับก่อนที่จะชนสารตัวอย่าง วัดความเข้มการเรืองแสงหลังจากเวลาผ่านไประยะหนึ่ง เครื่องตรวจหาวัดความเข้มการเรืองแสงจึงต้องใช้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และเชิงกลมากกว่าฟลูออโรมิเตอร์ ดังรูป 8-10



รูป 8-10 *แผนภูมิของอุปกรณ์ที่ใช้ทำให้รังสีที่ใช้กระตุ้นและฟอสฟอเรสเซนซ์เป็นแบบกระแสสลับ*

การวัดรังสีฟอสฟอเรสเซนซ์มักทำในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิต่ำมาก) เพื่อป้องกันไม่ให้สปีซีส์ที่ให้ฟอสฟอเรสเซนซ์เกิดการชนกันและลดปริมาณรังสีที่เปล่งออกมา ขวดเดวาร์และหน้าต่างควอร์ตซ์จึงเป็นชิ้นส่วนสำคัญสำหรับฟอสฟอริมิเตอร์ เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้วัดต่ำจึงใช้สารตัวอย่างที่อยู่ในรูปของแข็งที่ละลายในตัวทำละลายแก้ว (ตัวทำละลายนี้เป็นของผสมระหว่าง ไดเอทิลอีเทอร์, เพนเทนและเอทานอล)

การแก้ไขสเปกตราอาจใช้ตัวทำละลายวัดประสิทธิภาพควอนตัมสัมพัทธ์ ϕ_f ที่ได้จากสเปกตราเปล่งออก (ฟลูออเรสเซนซ์) วิธีการนี้ใช้สารมาตรฐานที่ทราบประสิทธิภาพควอนตัมเช่น ควินินซัลเฟต (ϕ = 0.55) ฟลูออเรสซีน (ϕ = 0.85) และ 5 – ไดเมทิลอมิโน-แนพทาลีน 1 – ซัลโฟนิกแอซิด หรือกรดดีเอเอนเอส (ϕ = 0.36 ใน 0.1 โมลต่อลูกบาศก์-เดซิเมตร (N_aHCO_3)

การประยุกต์การใช้หลักการฟอสฟอเรสเซนซ์และฟลูออเรสเซนซ์

(Application of Phosphorescence and Fluorescence)

วิธีนี้ใช้วิเคราะห์สารละลายที่มีความเข้มข้นน้อย ๆได้ การเพิ่มสภาพไวของวิธีฟลูออโรทำได้โดยการเพิ่มความเข้มแหล่งกำเนิดรังสีหรือกำลังการขยายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนวิธีสเปกโทรโฟโตทำเช่นนี้ไม่ได้ เพราะเมื่อเพิ่ม P_o P จะเปลี่ยนไปด้วย ค่า A จึงไม่เพิ่มตามต้องการ การขยายสัญญาณของเครื่องตรวจหามีผลกับ P และ P_O จึงไม่เพิ่ม A เท่าที่ควร ปกติวิธีฟลูออโรไวกว่าวิธีสเปกโทรหนึ่งถึงสามเท่า ส่วนวิธีฟอสฟอโรมีความเที่ยงน้อยกว่าวิธีฟลูออโร

การวิเคราะห์สารอินทรีย์ (Organic Analysis) ที่มีโครงสร้างเป็นแบบแผ่นหรือแบนราบ (planar) โมเลกุลที่มีพันธะเดี่ยวและคู่สลับกันและต่อกับวงอะโรมาติก ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ โอลิฟีนที่มีพันธะเดี่ยวและคู่สลับกัน เช่น 1, 3, 5 – เฮกซาไตรอีน ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนโอลิฟีนที่ต่อกับวงอะโรมาติก อาจให้ฟลูออเรสเซนซ์ ถ้าสารนี้มีโครงสร้างแบบแบนราบ เช่น แทรนสติลล์บีน (stillbene) มีโครงสร้างแบนราบ ส่วนซิส-สติลล์บีนไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ เพราะโครงสร้างไม่เป็นแบบแบนราบ

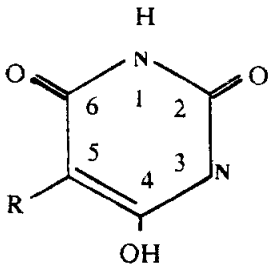
สารประกอบที่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์แสดงในตาราง 8-3 ตามหมู่ฟังก์ชันสารประกอบที่มีสองหรือมากกว่าสองหมู่มักให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ เช่น 8 – ไฮดรอกซีควิโนลีน เป็นทั้งฟีนอลและสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก

ตาราง 8-3 หมู่ของสารประกอบอินทรีย์ที่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์

หมู่	ตัวอย่าง	ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ น้อยหรือไม่ให้
ไฮโดรคาร์บอน		
1. โอลีฟินที่แทนที่เบนซิน	แทรน-สติลล์บีน	-สติลล์บีน
2. อะโรมาติกที่ถูกแทนที่	แอนทราซีล (0.2)	เบนซิน (0.04)
	ไพรีน (60.3)	ไบฟลีนิล
3. แอลคิลแทนที่วงอะโรมาติก	โทลูอีน (0.1)	
	เมซิทิลลีน (0.2)	
	9 – เมทิลแอนทราซิน (0.3)	
สารประกอบไนโตรเจน		
4. อะโรมาติกเอมีน	อนิลีน (0.1)	ไนโตรอนิลีน (P)
	2 – แนพทิลลามีน (0.5)	
5. กรดอมิโน	ไทโรซีน (0.2)	ฟีนิลอลานีน (0.04)
	ทริพโทฟาน (0.2)	
6. ฟีนิลเอทิลามีน	แอมเฟตามีน (0.02)	
7. เฮเทอโรไซคลิก	ควินิน (0.55)	ไพริดีน
สารประกอบฮาโลเจน		
8. คลอไรด์ที่มาแทนที่วงอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	1 – คลอโรแนพทาลีน (0.06)	คลอโรเบนซิน (P)

หมู่	ตัวอย่าง	ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ น้อยหรือไม่ให้
9. ฟลูออไรด์แทนที่วงอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	ฟลูออโรเบนซิน (0.1) 1 – ฟลูออโรแนพทาลีน (0.06)	
สารประกอบออกซิเจน		
10. ฟีนอล	ฟีนอล (0.2) 2 – แนพทอล (0.3)	ไนโตรฟีนอล
11. ฟีนิลอีเทอร์	อนิซอล (0.3)	
12. บาร์บิทูเลต	ฟีนอลบาร์บิทัล (0.001)	5, 5′ – ไดแอลคิลบาร์บิทูเลต
13. กรดอะโรมาติก	กรดแอซิติลซาลิไซลิก (0.02)	กรดเบนโซอิก

ยาบางชนิดให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence of Selected Drugs) จึงวิเคราะห์ได้ โดยใช้หลักการฟลูออเรสเซนซ์ เช่น ฟีนิลเอทิลามีนบาร์บิทูเลต แอสไพรินและแอมเฟตามีน (2 – อะมิโน – 1 – ฟีนิลโพรเพน) สารประกอบส่วนใหญ่ถ้ามีปริมาณมากกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 260-270 นาโนเมตร จะปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 280 – 300 นาโนเมตรออกมา บาร์บิทูเลตให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ในเบส 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร เนื่องจากเบสดึงโปรตอนออกจากหมู่ 4-ไฮดรอกซิล และไฮโดรเจนที่ตำแหน่งที่หนึ่งเกิดแอนไอออนคู่ ฟลูออเรสเซนซ์บาร์บิทูเลตจึงถูกกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 255 นาโนเมตร และให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่ 304 – 420 นาโนเมตร



แอสไพริน (กรดแอซีติลซาลิไซลิก) ที่อยู่ในคลอโรฟอร์ม และกรดแอซีติกร้อยละ 1 เมื่อได้รับพลังงานจากรังสีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร กรดซาลิไซลิกเมื่อได้รับรังสีที่มีความยาวคลื่น 308 นาโนเมตร ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การวิเคราะห์อนินทรีย์ (Inorganic Analysis) โดยการวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มีสามแบบ แบบแรกเป็นไอออนที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ แบบที่สองเกิดสารคีเลต (chelate) ที่

ให้ฟลูออเรสเซนซ์ แบบที่สามความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง เนื่องจากสารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการเควน

ไอออนที่เกิดลูมิเนสเซนซ์ (Simple Luminescent Ions) ไอออนที่ให้ลูมิเนสเซนซ์ในสารละลาย ได้แก่ ไอออนยูเรนิล (UO_2^{2+}) และไอออนซีเรียม (III) ในน้ำ ไอออนซีเรียม (III) เมื่อได้รับพลังงานที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ออร์บิทัลเชิงอิเล็กตรอน 4f จะกระโดดไปสู่ออร์บิทัล 5d สถานะนี้ไม่เสถียร จะคายพลังงานจาก 5d ไป 4f พร้อมกับเปล่งรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตรออกมา ไอออนนี้เมื่ออยู่ในของเหลวให้แถบดูดกลืนห้าแถบ เนื่องจากการแทรนซิชันจาก 4f→5d (200, 211, 221.5, 239.5 และ 252.5 นาโนเมตร) ไอออนซีเรียม (IV) ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ จึงใช้วิเคราะห์ไอออนซีเรียม (III) และ (IV) ที่ปนกันได้

แลนทาไนด์ ยูโรเพียม (III) คลอไรด์ ไอออน f^6 และเทอร์เบียม (III) คลอไรด์ ไอออน f^8ให้ฟลูออเรสเซนซ์อ่อน ๆ ในสารละลายเมทิลฟอร์มาไมด์ ส่วนซามาเรียม (III) ไอออน f^5 แกโดลิเนียม ไอออน f^7 และดิสโพรเซียม ไอออน f^9 ให้ฟลูออเรสเซนซ์อ่อนเนื่องจากการแทรนซิชัน f → f

คีเลตของไอออนโลหะนอนแทรนซิชัน (Chelates of Non Transition Metal Ions) ไอออนของโลหะนอนแทรนซิชัน กลุ่ม IA, IIA, IIB, IIIA และ IIIB รวมทั้ง Zn^{4+} วิเคราะห์ได้โดยให้ไอออนเหล่านี้เกิดสารเชิงซ้อนกับลิแกนด์อินทรีย์พวกอะโรมาติก คีเลตที่เกิดขึ้นจะดูดกลืนรังสีเนื่องจากมีการแทรนซิชันแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ จึงให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ออกมา เช่น ไอออนกลุ่ม (III)A อะลูมิเนียม (III) แกลเลียม (III) อินเดียม (III) และแทลเลียม (III) เมื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนกับ 8 – ไฮดรอกซีควิโนลีน, 2, 2 – ไบไพริดีน, อนุพันธ์ของซาลิซิลแอนดีไฮด์และเอโซเบนซีนให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มสูงตัวลิแกนด์เองให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มต่ำ

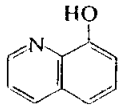
คีเลตของโลหะแทรนซิชัน (Chelates of Transition Metals) ไอออนโลหะแทรนซิชันหลายตัวเกิดสารเชิงซ้อนกับลิแกนด์อินทรีย์พวกอะโรมาติกให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ส่วนไอออนโลหะแทรนซิชันพวกพาราแมกเนติก (สปินไม่เข้าคู่กัน) เกิดสารเชิงซ้อนกับลิแกนด์อินทรีย์พวกอะโรมาติก ไม่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากผลของอิเล็กตรอนที่สปินไม่เข้าคู่ ทำให้อิเล็กตรอนของลิแกนด์เกิดการข้ามระหว่างระบบจากสถานะซิงเกล็ตไปเป็นทริเพล็ต ในสารละลายสถานะทริเพล็ตคายพลังงานออกมาโดยการชนหรือเปลี่ยนเป็น So อย่างรวดเร็ว โดยไม่ให้รังสีออกมา ไอออนโลหะพวกพาราแมกเนติก เช่น Fe^{3+},

Co^{2+}, Ni^{2+} และ Cu^{2+} จะเควนฟลูออเรสเซนซ์ของสารเชิงซ้อน ทำให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง

สารเชิงซ้อนที่เกิดจากไอออนโลหะที่ไม่มีสมบัติแม่เหล็ก (สปินเข้าคู่) และมีขนาดใหญ่ Hg^{2+}, Au^{2+} และ Tl^{3+} เพิ่มอัตราการสปินของออร์บิทัล ทำให้อัตราเร็วในการเกิดการข้ามระหว่างระบบเพิ่มขึ้น ไอออนโลหะแทรนซิชันหมู่ VIII d^6 ให้ลูมิเนสเซนซ์ เมื่อเกิดสารเชิงซ้อนกับลิแกนด์พวกที่มีความแรงมาก (strong field) เช่น 1, 10 – ฟีแนนทรอลีน 2, 2 – ไบไพริดีน และ 2, 2, 2 – เทอร์ไพริดีน ให้ฟลูออเรสเซนซ์ลดลง อิริเดียม (III) รูทีเนียม (II) ออสเมียม (II)และโรเดียม (III) เกิดสารเชิงซ้อนกับโลหะที่ไม่มีสมบัติแม่เหล็ก คีเลตพวกนี้จะดูดกลืนรังสีเนื่องจากการถ่ายโอนประจุจาก $d \rightarrow \pi^*$ และให้รังสีเนื่องจาก $\pi^* \rightarrow d$

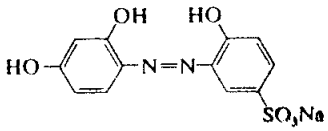
รีเอเจนต์ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent Reagents) มีโครงสร้างอะโรมาติกที่มีหมู่ที่ทำหน้าที่ให้สองหรือมากกว่าสองหมู่ ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนต่อกับไอออนโลหะเช่น

8 – ไฮดรอกซีควิโนลินใช้วิเคราะห์
Al, Be และโลหะอื่น ๆ



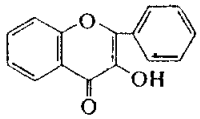
8-Hydroxyquinoline

อลิซารินกราเนตอาร์ใช้วิเคราะห์
Al, F^-



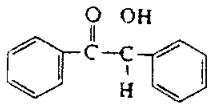
Alizarin garnet R

ฟลาวานอลใช้วิเคราะห์
Zr และ Zn



Flavanol

เบนโซอินใช้วิเคราะห์
B, Zn, Ge และ Si



Benzoin

ข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ไอออนต่าง ๆ มีอยู่ในตาราง 8 – 4

ตาราง 8-4 รีเอเจนต์ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารอนินทรีย์

ไอออน	รีเอเจนต์	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร) การดูดกลืนรัง	สีฟลูออเรส-เซนซ์	ความไว (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	สารรบกวน
Al^{3+}	Alizarin Garnet R	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F^-, NO_3^- Ni, PO_4^{3-}, Th, Zr
F^-	Al complex of Alizarin Garnet R (quench)	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-}, Th, Zr
$B_4O_7^{2-}$	Benzoin	370	450	0.04	Be, Sb
Cd^{2+}	2-(0-Hydroxphenyl benzooxazole)	365	blue	2	NH_3
Li^+	8-Hydroxyquinoline	370	580	0.2	Mg
Sn^{4+}	Flavanol	400	470	0.1	F^-, PO_4^{3-}, Zr
Zn^{2+}	Benzoin	–	Green	10	B, Be, Sb ไอออนที่มีสี

วิธีฟอสฟอริ Phosphorimetric Methods

วิธีฟอสฟอริใช้หาสปีชีส์อินทรีย์และชีวเคมี เช่น กรดนิวคลีอิก กรดอมิโนไพริดีนและไพริมิดีน เอนไซม์ ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และยาฆ่าแมลง ตัวอย่างเหล่านี้ต้องทำการวิเคราะห์ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ

เคมิลูมิเนสเซนซ์ Chemiluminescence

สปีชีส์ที่เกิดปฏิกิริยาเคมีและให้เคมิลูมิเนสเซนซ์มีน้อย เคมิลูมิเนสเซนซ์เกิดจากปฏิกิริยาเคมีแล้วเปลี่ยนจากสถานะพื้นเป็นสถานะกระตุ้น สปีชีส์จะปล่อยรังสีฟลูออเรส-เซนซ์แล้วกลับสู่สถานะพื้น สปีชีส์ชีวะที่เกิดปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนซ์เรียก ไบโอลูมิเนสเซนซ์ สปีชีส์เหล่านี้ได้แก่ แมงกะพรุนบางชนิด แบคทีเรียโปรโตซัว กุ้ง

ปฏิกิริยาที่ให้เคมิลูมิเนสเซนซ์เขียนแทนด้วย

$$A + B \rightarrow C^* + D$$

$$c^* = C + h\nu$$

c* แทนสถานะกระตุ้นของสปีชีส์ C สปีชีส์ C ให้สเปกตราลูมิเนสเซนซ์ ที่จริงปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนซ์ซับซ้อนกว่าสมการที่เขียน

การวัดการเปล่งแสงทางเคมี Measurement of Chemiluminescence

อุปกรณ์ที่ใช้วัดเคมิลูมิเนสเซนซ์มีภาชนะที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ อุปกรณ์นี้ต้องใช้ชุดแยกความยาวคลื่นรังสีจากแหล่งกำเนิดรังสีสัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์ขึ้นกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีกับสารที่วิเคราะห์

การประยุกต์เคมิลูมิเนสเซนซ์เชิงวิเคราะห์ Analytical Applications of Chemiluminescence

วิธีเคมิลูมิเนสเซนซ์มีสภาพไวสูงและไม่มีการรบกวน ขีดจำกัดในการตรวจหาขึ้นกับความบริสุทธิ์ของสารเคมีแต่ไม่ขึ้นกับเครื่องตรวจหา วิธีนี้วิเคราะห์สารได้ถึงส่วนในล้านส่วนถึงส่วนในล้านล้านส่วน

การวิเคราะห์แก๊ส วิธีเคมิลูมิเนสเซนซ์ใช้หาองค์ประกอบของแก๊สเช่น การหาปริมาณโอโซนในบรรยากาศ ออกไซด์ของไนโตรเจน และสารประกอบกำมะถัน ตัวอย่างการหาปริมาณไนตริกออกไซด์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

$$NO + O_3 \rightarrow NO_2^* + O_2$$

$$NO^*_2 \rightarrow NO_2 + h\nu \ (\lambda\ 600 \text{ ถึง } 2800 \text{ นาโนเมตร})$$

ผ่านแก๊สโอโซนจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าหรือสารตัวอย่างเข้าไปในภาชนะที่ใช้ให้เกิดปฏิกิริยารังสีลูมิเนสเซนซ์ผ่านเข้าสู่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ วิธีนี้ใช้หาปริมาณไนตรัสออกไซด์ได้น้อยถึง 1 ส่วนในพันล้านส่วน ถึง 1000 ส่วนในล้านส่วน วิธีนี้ใช้หาตัวอย่างโอโซนที่อยู่ระดับผิวดินถึงที่สูงถึง 20 กิโลเมตร

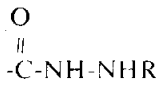
ปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์กับโอโซนใช้ประยุกต์หาปริมาณออกไซด์ที่เกาะกับไนโตรเจน เช่น การหาปริมาณไนโตรเจนไดออกไซด์จากไอเสียรถยนต์ ทำโดยการเผาตัวอย่างแก๊สในท่อเหล็กกล้าที่อุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส

$$NO_2 \rightleftharpoons NO + O$$

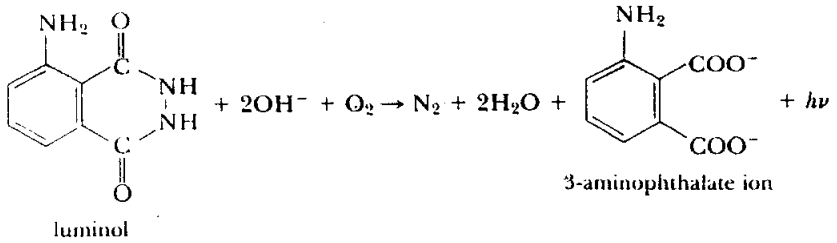
การหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างของแข็งหรือของเหลวที่มีไนโตรเจนร้อยละ 1 ถึง 30 ทำโดยการเผาตัวอย่างในบรรยากาศออกซิเจน เพื่อเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนตริกออกไซด์ จากนั้นหาปริมาณไนตริกออกไซด์ดังปฏิกิริยาข้างบน

การหาปริมาณโอโซนอีกวิธีหนึ่ง ให้โอโซนทำปฏิกิริยากับสีโรดามีนที่ถูกดูดซับบนผิวซิลิกาเจล (เฟสของแข็ง) วิธีนี้ใช้หาโอโซนที่มีปริมาณน้อยได้ถึง 1 ส่วนในพันล้านส่วน ช่วงความเข้มข้นให้เคอร์ฟเป็นเส้นตรงถึง 400 ส่วนในพันล้านส่วน หรือให้โอโซนทำปฏิกิริยากับเอทิลีน (เฟสแก๊ส) แล้ววัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมา

การวิเคราะห์สปีชีส์อนินทรีย์ในเฟสของเหลว (Analysis for Inorganic Species in the liquid Phase) การวิเคราะห์ตัวอย่างอนินทรีย์ในเฟสของเหลวโดยใช้สารอินทรีย์เคมิลูมิเนสเซนซ์ และมีหมู่นี้อยู่



เมื่อให้สารนี้ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และตัวออกซิไดส์ที่แรงให้ผลิตภัณฑ์เคมิลูมิเนสเซนซ์ สารนี้ได้แก่ลูมินอล ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเขียนแทนด้วยสมการข้าง – ล่างผลิตภัณฑ์ที่ได้ไอออน 3-อะมิโนพลาเลต เคมิลูมิเนสเซนซ์ให้สีน้ำเงิน



ไอออนหลายตัวเพิ่มความเข้มเคมิลูมิเนสเซนซ์ ยกเว้นไอออนบางตัวที่ลดความเข้มลูมิเนสเซนซ์ ไอออนโลหะเหล่านี้จึงมีสมบัติเป็นตัวเร่งหรือตัวยับยั้งความเข้มลูมิเนสเซนซ์ วิธีนี้วิเคราะห์สารได้ต่ำถึง 1 ส่วนในล้านส่วน

การวิเคราะห์สปีชีส์อินทรีย์ (Analysis of organic species) สปีชีส์อินทรีย์หลายตัวเป็นตัวเร่งหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างลูมินอลกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือออกซิเจน สปีชีส์เหล่านี้ได้แก่กรดอมิโน แก๊สที่ใช้เป็นยาสลบ ยาฆ่าแมลงบางชนิด ฮีมาทิน แนพทอล และอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ $-NO_2$, $-NH_2$ และหมู่ OH

เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ของผสม Techniques Useful for Analysis of Mixtures

การวิเคราะห์ของผสมสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์โดยไม่ต้องแยกสารแต่ละชนิดออกจากกัน โดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์ เช่น การวิเคราะห์สาร A ที่มีสาร B ปนใช้หลักการ

1 ถ้าสาร A ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตขณะที่สาร B ไม่ดูดกลืน ให้เลือกฟิลเตอร์ชุดแรกให้รังสีที่ออกจากแหล่งกำเนิด มีเฉพาะรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อกระตุ้น A ดังนั้น A เปล่งรังสีฟลูออเรสเซนซ์ และเครื่องตรวจหาวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกจาก A เท่านั้น

2 ถ้า B ดูดกลืนรังสีความยาวคลื่นเดียวกับ A แต่ $k\epsilon bcP_o$ ดังสมการ 8-6 ของ B $\leq$ 0.01 A ดังนั้น รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยจาก B มีเพียงร้อยละ 1 ของ A แต่ไม่มีผลต่อการวัด

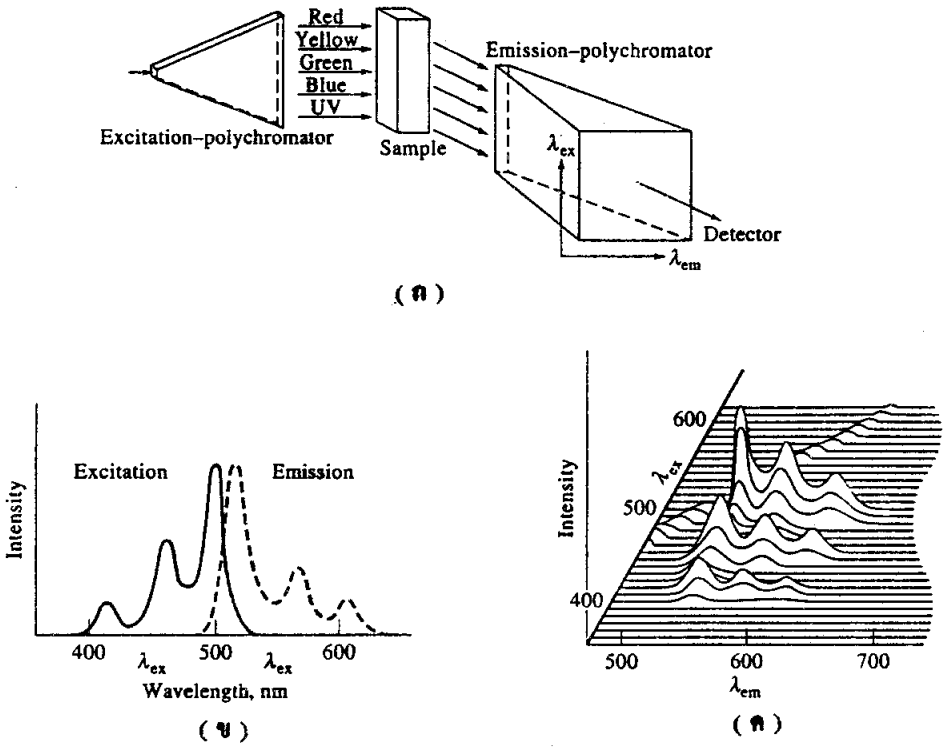
3 ถ้า B ดูดกลืนรังสีที่ความยาวคลื่นเดียวกับ A แต่ A ปล่อยรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ช่วงความยาวคลื่นต่างจาก B ดังนั้น ปรับฟิลเตอร์ชุดสองให้มีเฉพาะรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อย A ผ่านเข้าเครื่องตรวจหา

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ที่ใช้แทรนซ์ดิวเซอร์แบบขบวน Spectrofluorometers Based on Array Transducers

ช่วงยี่สิบปีที่ผ่านมาแทรนซ์ดิวเซอร์ที่ใช้ในสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์เป็นแบบขบวนไดโอด (diode array) และอุปกรณ์ถ่ายโอนประจุ (charge transfer device) หลักการนี้แทนด้วยรูป 8-11 ก ลำรังสีหลายความยาวคลื่นจากแหล่งกำเนิดชนตัวทำแสงเอกรงค์กระตุ้น แล้วให้รังสีระนาบ xy ชนเซลล์ใส่สารตัวอย่าง รังสีเปล่งเข้าสู่ตัวทำแสงเอกรงค์เปล่ง ซึ่งจัดไว้ตั้งฉากกับลำรังสีที่ชน แล้วเข้าสู่แทรนซ์ดิวเซอร์ แทรนซ์ดิวเซอร์เป็นแบบควบคู่ประจุทำงานได้สองมิติ แทรนซ์ดิวเซอร์จะวัด (เห็น) รังสีเปล่งจากตัวทำแสงเอกรงค์เปล่งความยาวคลื่นต่างๆ ในระนาบ yz รูป 8-11 ข แสดงสเปกตรากระตุ้นและสเปกตราเปล่งจากสปีซีส์ในโมเลกุลสารตัวอย่าง รูป 8-11 ค สเปกตรัมลูมิเนสเซนซ์ทั้งหมดของสารประกอบนี้ เคอร์ฟนี้เรียก การพล็อต stack (ยอดพีคจำนวนมาก) สเปกตรัมนี้ใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 2 ถึง 3 วินาที หรือ น้อยกว่านี้ เทคนิคนี้นิยมใช้วิเคราะห์ตัวอย่างของผสมที่มีสปีซีส์ให้ฟลูออเรสเซนซ์

เซนเซอร์เส้นใยนำแสงรังสีฟลูออเรสเซนซ์ Fiber Optic Fluorescence Sensors

เส้นใยนำแสงใช้พารังสีจากแหล่งกำเนิดและรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากตัวอย่างเข้าสู่เครื่องตรวจหา เช่น รังสีจากแหล่งกำเนิดเลเซอร์ผ่านเข้าเส้นใยนำแสง รังสีนี้กระตุ้นสารตัวอย่าง ตัวอย่างเปล่งรังสีฟลูออเรสเซนซ์ รังสีนี้เดินทางเข้าสู่เส้นใยนำแสงชุดเดิมเข้า



รูป 8-11 (ก) แผนภูมิระบบแสงของสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ที่ใช้แทรนซ์ดิวเซอร์แบบควบคู่ประจุสองมิติ (ข) สเปกตรากระตุ้นและเปล่งของสารประกอบ (ค) สเปกตรัมลูมิเนสเซนซ์ของสารประกอบในรูป ข (รวมทั้งกระตุ้นและเปล่ง)

สู่เครื่องตรวจหาเพื่อวัดสัญญาณ วิธีการนี้นำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างที่ไม่ให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ได้ โดยตรึงอินดิเคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์ (ตัวให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์) ไว้ที่ปลายสุดของเส้นใยนำแสงที่สัมผัสกับตัวอย่าง เพื่อให้ตัวอย่างทำปฏิกิริยากับอินดิเคเตอร์ แล้ววัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิด

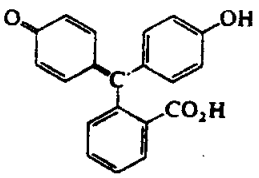
แบบฝึกหัด

8 – 1. อธิบายความหมายต่อไปนี้

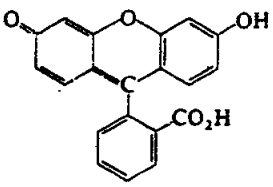
ก. ฟลูออเรสเซนซ์
ข. ฟอสฟอเรสเซนซ์
ค. เรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์
ง. สถานะซิงเกล็ต
จ. สถานะทริเพล็ต
ฉ. การผ่อนคลายโดยการสั่น
ช. การเปลี่ยนภายใน
ซ. การเปลี่ยนภายนอก
ฌ. การข้ามระหว่างระบบ
ญ. ก่อนการแตกตัว
ฎ. การแตกตัว
ฏ. ประสิทธิภาพควอนตัม

8 – 2. อธิบายความแตกต่างระหว่างสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์เปล่งออกมากับสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้กระตุ้น สเปกตรัมแบบใดคล้ายกับสเปกตรัมดูดกลืนรังสีมากที่สุด

8 – 3. ทำไมวิธีสเปกโทรฟลูออโรจึงมีศักย์ที่ไวกว่าวิธีสเปกโทรโฟโต



Phenolphthalein



Fluorescein

8 – 4. สารประกอบตัวใดมีค่าประสิทธิภาพควอนตัมฟลูออเรสเซนซ์มากกว่ากัน อธิบาย

8 – 5. ตัวทำละลายตัวใดที่ทำให้แนพทาลีนให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมามากที่สุด 1 – คลอโรโพรเพน 1 – โบรโมโพรเพน, 1 – ไอโอโดโพรเพน อธิบายพร้อมให้เหตุผล

8 – 6. อนิลีน ($C_6H_5NH_2$) ให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่พีเอชใดมากกว่ากัน พีเอช 3 หรือ 10 อธิบาย

8 – 7. ฟีนอลให้รังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่พีเอช 3 หรือพีเอชน้อยกว่า 10 ให้เหตุผล

8 – 8. ก. สมมติว่าอัตราเร็วคงที่ของกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์ของโมเลกุลมีค่า k (ฟลูออเรสเซนซ์) $k_f = 2\times10^8$ ต่อวินาที k (การเปลี่ยนภายใน) $k_{ic}S_1 \rightarrow S_O = 5\times10^7$ ต่อวินาที k (การเปลี่ยนภายนอก) $k_{ec}S_1 \rightarrow S_O = 5\times10^7$ ต่อวินาที k (การแตกตัว) $k_d = 3\times10^7$ ต่อวินาที k (ก่อนการแตกตัว) $k_{pd} = 1\times10^5$ ต่อวินาที จงคำนวณหาประสิทธิภาพควอนตัม

ข. สมมติมีกระบวนการนี้ร่วมกับกระบวนการ ก. อัตราเร็วคงที่ของกระบวนการนี้

k (การข้ามระหว่างระบบ) $k_i S_i \rightarrow 2\times10^8$ ต่อวินาที k (การเปลี่ยนภายใน) k_{ic}, $T_1 \rightarrow S_O = 0.1$ ต่อวินาที k (การเปลี่ยนภายนอก) k_{ec}, $T_1 \rightarrow S_O = 0.2$ ต่อวินาที k (ฟอสฟอเรสเซนซ์) 0.7 ต่อวินาที จงคำนวณประสิทธิภาพควอนตัมฟลูออเรสเซนซ์และประสิทธิภาพฟอสฟอเรสเซนซ์ จงหาจำนวนโมเลกุลฟอสฟอเรสเซนซ์ที่สภาวะ T_1

8 – 9. นิโคตินามีดอดินันไดนิวคลีไอไทด์ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์เป็นโคเอนไซม์สำคัญที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ สารนี้ดูดกลืนรังสีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และให้รังสีออกมามากสุดที่ 465 นาโนเมตร สารละลายมาตรฐาน NADH ให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ดังนี้

ความเข้มข้น NADH ไมโครโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร	ความเข้มสัมพัทธ์	ความเข้มข้น NADH ไมโครโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร	ความเข้มสัมพัทธ์
0.100	2.24	0.500	10.94
0.200	4.52	0.600	13.71
0.300	6.63	0.700	15.49
0.400	9.01	0.800	17.91

จงเขียนเคอร์ฟและหาความเข้มข้นของ NADH ในสารตัวอย่างที่วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ได้ 12.16 หน่วย

8 – 10. ถ้าไม่มีการดูดกลืนร่วม ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สารตัวอย่างแปรโดยตรงกับความเข้มข้นเมื่อสารละลายที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำ จงคำนวณความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ของสารละลายที่มีความเข้มข้น 2.5×10^{-5}, 2.5×10^{-4} และ 1.0×10^{-3} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร และมีค่าสภาพดูดกลืนโมลาร์ 4.0×10^3 ลูกบาศก์เดซิเมตรต่อโมลต่อเซนติเมตร ถ้า b = 0.2 เซนติเมตร ถ้าปรับเครื่องโดยใช้สารละลาย 2.5×10^{-5} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร สัญญาณที่วัดได้เป็นเส้นตรง จงหาร้อยละของความผิดพลาดเมื่อวิเคราะห์สารละลาย 2.5×10^{-4} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

8 – 11. ปริมาตรของสารละลายต่อไปนี้มี Zn^{2+} 1.10 ส่วนในล้านส่วน ข้อมูลข้างล่างได้จากการปิเปตสารละลายที่มี Zn^{2+} 1.0 ส่วนในล้านส่วน 0.00, 4.00, 8.00 และ 12.00 ใส่กรวยแยกสี่ใบ แต่ละใบมีสารตัวอย่าง 5.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายในกรวย

แยกทั้งห้าใบมาสกัดด้วยสารละลาย 8 – ไฮดรอกซีควิโนลีนที่ละลายใน CCl_4 สามครั้ง ครั้งละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายที่สกัดได้มาเจือจางจนมีปริมาตร 25.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายนี้ไปวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์

ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน Zn^{2+} (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้
0.00	6.12
4.00	11.16
8.00	15.68
12.00	20.68

จงเขียนเคอร์ฟ และหาความเข้มข้นสังกะสีในสารตัวอย่าง

8 – 12. มีสารตัวอย่างน้ำอยู่สี่ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างมีปริมาตร 10.0 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่สารละลายมาตรฐานโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีฟลูออไรด์ 10.0 ส่วนในพันล้านส่วนลงไป 0.00, 1.00, 2.00, 3.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ตัวกระทำเชิงซ้อนอะลูมิเนียมแอซิดอะลิซารินการ์เน็ตอาร์ ลงไปตัวอย่างละ 5.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นให้การวาวแสง เจือจางสารละลายจนมีปริมาตร 50.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารตัวอย่างทั้งสี่กับแบล็งค์ ได้ข้อมูล

ปริมาตรสารตัวอย่าง ลูกบาศก์เซนติเมตร	ปริมาตรสารละลายฟลูออไรด์ ลูกบาศก์เซนติเมตร	ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้
5.00	0.00	68.2
5.00	1.00	55.3
5.00	2.00	41.3
5.00	3.00	28.8

ใช้หลักทางเคมีอธิบาย พล็อตข้อมูล และหาปริมาณฟลูออไรด์ในสารตัวอย่างเป็นส่วนในพันล้านส่วน

8 – 13. แซคารีนทำปฏิกิริยากับรีซอร์คินัลในกรดซัลฟิวริกให้สารผลิตภัณฑ์ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใช้แซคารีนที่มีความเข้มข้นแน่นอน วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์โดยฟิลเตอร์ฟลูออโรมิเตอร์ ได้ข้อมูลดังนี้

ความเข้มข้นแซคารีน (ส่วนในล้านส่วน)	1.0	5.0	10.0	15.5	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0
ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์	2.4	12.0	25.0	36.0	49.0	61.0	68.5	66.0	63.4

ก. จงหาช่วงความเข้มข้นที่สารให้ฟลูออเรสเซนซ์เป็นเส้นตรง

ข. ช่วงความเข้มข้นน้อยกว่า 1.0 ส่วนต่อล้านส่วน เป็นเส้นตรงหรือไม่

8 – 14. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอเรสเตอรอลในเลือดโดยวิธีฟลูออโรสารตัวอย่างมาตรฐาน 20.0 มิลลิกรัมต่อ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ให้ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ยังไม่แก้ไข 78.8 หน่วย ค่าแบล็งค์ 2.0 หน่วย

ก. จงหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ไม่แก้ได้ 63.5 หน่วย สมมติว่าค่าแบล็งค์เท่ากับ 2.0 หน่วย

8 – 15. การวิเคราะห์ยาฟีแนนไทอาซีนโดยวิธีฟลูออโร ข้อมูลข้างล่างแทนความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟีแนนไทอาซีนกับความเข้มฟลูออเรสเซนซ์

ความเข้มข้นฟีแนนไทอาซีน (ส่วนในล้านส่วน)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์	0.00	7.50	14.8	22.6	30.3	37.7

จงคำนวณความเข้มข้นของยานี้ในสารละลายที่วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ได้ 18.7 แบล็งค์ 2.4

8 – 16. การวิเคราะห์โดยใช้หลักการเควนสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าโลหะ X ที่ทำหน้าที่เควนลิแกนด์ L ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ ให้ข้อมูลดังต่อไปนี้

สารละลายเข้มข้น (โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร)		**ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ (หน่วย)**
แบล็งค์	โลหะ	0
L 5.0×10^{-6}	O	84.0
L 5.0×10^{-6}	+X 1.0×10^{-6}	67.2
L 5.0×10^{-6}	+X 2.0×10^{-6}	50.5
L 5.0×10^{-6}	+X 3.0×10^{-6}	33.6
L 5.0×10^{-6}	+X 4.0×10^{-6}	16.9
L 5.0×10^{-6}	+X 5.0×10^{-6}	0.50
L 5.0×10^{-6}	+X 6.0×10^{-6}	0.00

จงหา

ก. อัตราส่วนโมลของสารเชิงซ้อนระหว่าง X และ L

ข. ความเข้มข้นของโลหะในสารละลายที่วิเคราะห์โดยหลักการนี้ และวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ได้ 26.8 หน่วย

8 – 17. มอร์ฟีนเปลี่ยนพสูโดมอร์ฟีนโดยการออกซิไดส์ด้วยแอลคาไลน์ เมื่อวิธีวิเคราะห์มอร์ฟีนโดยวิธีฟลูออโรโดยกระตุ้นสารตัวอย่างที่มีความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร และวัดรังสีที่เปล่งออกมาที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ขีดจำกัดในการตรวจหาพลาสมา (tissue) มีค่า 0.02 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อนำพลาสติกมา 1.00 กรัม แล้วสกัดตามวิธีเดิมและทำให้สารละลายมีปริมาตร 10.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร วิเคราะห์สารโดยวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ วัดได้ 67.5 หน่วย วัดแบล็งค์ได้ 3.40 หน่วย เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างมาตรฐานโดยนำสารมา 1.40 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์-เซนติเมตร วัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ได้ 55.5 หน่วย วัดค่าแบล็งค์ได้ 3.20 หน่วย จงคำนวณร้อยละของพลาสมา

8 – 18. ไอออนเหล็ก (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของลูมินอลด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออก-ไซด์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดให้เคมิลูมิเนสเซนซ์เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นเหล็ก (II) อยู่ในช่วง 10^{-10} ถึง 10^{-8} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

นำสารตัวอย่างน้ำ 1.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเติมสารตัวอย่างเหล็ก (II) 2.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เจือจาง 200 ลูกบาศก์เซนติ-เมตรใส่สารละลายลูมินอลที่เป็นด่างลงไป 1.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร วัดสัญญาณฟลู-ออเรสเซนซ์โดยวิธีรวมสัญญาณนาน 10.0 วินาทีได้ 16.1

นำสารตัวอย่างน้ำเดิมมาอีก 2.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่สารละลายเหล็ก (II) 5.15×10^{-5} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 1.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลูมินอลลงไปเท่ากับตัวอย่างแรก วัดสัญญาณเหมือนกับตัวอย่างแรกได้ 29.6 จงหาความเข้มข้นเหล็ก (II) ในสารตัวอย่างเป็นโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

8 – 19. วิธีการหาปริมาณกำมะถันซึ่งเป็นมลพิษ เช่นใน SO_2, H_2S และ CH_3SH ในบรรยากาศโดยการเผาสารตัวอย่างในเปลวไฟที่มีไฮโดรเจนมาก หลังจากเกิดปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนซ์ วัดความเข้มลูมิเนสเซนซ์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

$$4H_2 + 2SO_2 \rightarrow S_2^* + 4H_2O$$

$$S_2^* \rightarrow S_2 + h\nu \text{ (300 ถึง 425 นาโนเมตร)}$$

ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ขึ้นกับความเข้มข้นกำมะถันไดเมอร์ในสถานะกระตุ้น

จงหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น SO_2 ในสารตัวอย่าง ความเข้มลูมิเนสเซนซ์และค่าคงที่ของปฏิกิริยาแรก