

บทที่ 10

การวาวแสงและการเรืองแสงของโมเลกุล (Molecular Fluorescence and Phosphorescence)

การเปล่งแสง (luminescence) ของสารบางชนิดจัดว่าเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างพิเศษสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบหรือตรวจพิสูจน์ชนิดของสารนั้น ๆ ได้ โดยเฉพาะในปัจจุบันนี้ได้กลายเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีได้อย่างดี ผู้ที่พบปรากฏการณ์การเปล่งแสงนี้เป็นคนแรก คือ นักวิทยาศาสตร์ชาวสเปนชื่อ Nicholas Monardes ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1565 โดยเขาสังเกตเห็นว่า สิ่งสกัดได้จากไม้ชื่อ "lignum nephriticum" สามารถเปล่งแสงสีน้ำเงินได้ และ เมื่อปี ค.ศ. 1833 Sir David Brewster ได้เคยบันทึกไว้ว่า คลอโรฟิลล์เปล่งแสงสีแดงได้เช่นเดียวกัน ในปี ค.ศ. 1852 Sir G.G. Stokes นักฟิสิกส์ชาวอังกฤษ เป็นผู้อธิบายถึงกระบวนการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงที่จะนำไปใช้ในเคมีวิเคราะห์ อันถือได้ว่าเป็นการวางรากฐานทางความคิดที่สืบทอดมาจนถึงปัจจุบันนี้ นอกจากนี้ Stokes ยังเป็นผู้บัญญัติคำว่า ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ขึ้นมาใช้ เมื่อเขาพบว่าแร่ฟลูออไรต์สปาร์ (fluorspar) เปล่งแสงสีน้ำเงินขาวได้ คุณสมบัติเกี่ยวกับการเปล่งแสงของสารนี้ได้นำมาใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1864 รายละเอียดต่าง ๆ เกี่ยวกับประวัติของการเปล่งแสง T.C.O. Haver ได้เขียนไว้ใน J. Chem. Ed. 55, 423, 1987 สำหรับฟอสฟอเรสเซนซ์ (phosphorescence) เป็นคำที่ได้ตั้งขึ้นมาใช้ตั้งแต่ต้น ๆ ปี ค.ศ. 1500 หลังจากงานของชาวกรีกที่ได้นำเอาแสงมาใช้บอกทิศทาง (light bearing) ความจริงชื่อธาตุฟอสฟอรัสก็ตั้งขึ้นจากงานของชาวกรีกในปี ค.ศ. 1669 เช่นเดียวกัน เพราะฟอสฟอรัสสามารถทำให้เกิดแสงสว่างจ้าในห้องมืดได้

Luminescence spectroscopy ได้กลายมาเป็นเทคนิคที่สำคัญและใช้กันอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีสภาพไวสูง มีลักษณะเฉพาะ ดังจะเห็นได้จากจำนวนผลงานที่ตีพิมพ์ออกมาอย่างมาก แต่เมื่อเทียบกับเทคนิคทางยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปีแล้ว เทคนิคหลังใช้งานได้กว้างขวางและนิยมใช้มากกว่า

10.1 ชนิดของการเปล่งแสง (Types of Luminescence)

การเปล่งแสงมีด้วยกันหลายชนิด ทั้งนี้แล้วแต่แหล่งของพลังงานที่ทำให้โมเลกุลไปอยู่ที่สถานะกระตุ้น (excited state) เช่น โมเลกุลที่เกิดอันตรกิริยากับโฟตอนของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้เกิด luminescent molecules เรียกว่า photoluminescence ซึ่งยังแบ่งออกได้เป็นการวาวแสง (fluorescence) และการเรืองแสง (phosphorescence) ทั้งสองปรากฏการณ์นี้แตกต่างกันที่กระบวนการกลับมาสู่สถานะพื้นใหม่ ซึ่งจะได้

กล่าวต่อไป ถ้าโมเลกุลของสารนั้นใช้พลังงานที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีก็เรียกว่า chemical luminescence หรือ chemiluminescence และถ้าโมเลกุลได้รับพลังงานจากอนุภาคที่มีพลังงานสูงไปเป็นโมเลกุลที่สถานะกระตุ้นก็เรียกว่า radioluminescence นอกจากนี้ก็ยังมี bioluminescence หรือ thermoluminescence เป็นต้น เฉพาะ photoluminescence เท่านั้นที่นิยมใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์ทางเคมีอย่างกว้างขวาง ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีอื่นที่สภาพัวหรือเซนซิวิตี มีลักษณะเฉพาะ (selectivity) และวิเคราะห์ได้ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง

10.2 หลักการของโฟโตลูมิเนสเซนซ์ (Principles of Photoluminescence)

โฟโตลูมิเนสเซนซ์เป็นกระบวนการไปสู่สถานะกระตุ้นและการกลับสู่สถานะพื้น (excitation-deexcitation process) โดยมีโฟตอนเข้าไปเกี่ยวข้อง คือ มีการดูดกลืนโฟตอนและให้โฟตอนออกมา เนื่องจากกระบวนการที่เกิดขึ้นจะต้องแข่งกัน ดังนั้น อัตราการเกิดของกระบวนการเหล่านี้จึงมีความสำคัญ

10.2.1 กระบวนการกระตุ้น (Excitation)

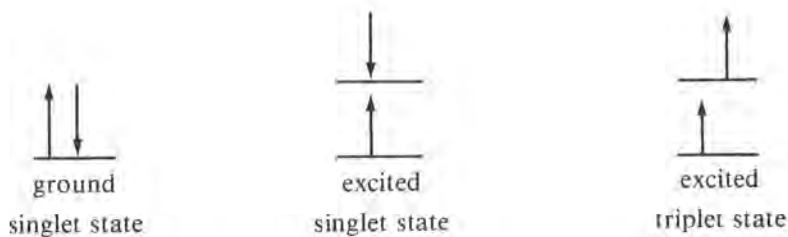
เมื่อโมเลกุลดูดกลืนรังสีจากการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าขึ้นไปอยู่ที่สถานะกระตุ้น (excited state) และจะต้องมีกลไกอะไรสักอย่างที่จะต้องลดพลังงานที่มากเกินไปลงมาสู่สถานะพื้น (deexcited state)

ถ้าให้มัลติพลิตี (multiplicity) ของโมเลกุลเป็น M ซึ่งแสดงถึง orbital angular momentum ของแต่ละสถานะ (state) และเกี่ยวข้องกับ spin ดังสมการ

$$M = 2S + 1 \quad \text{-----(10.1)}$$

S = spin quantum number ของโมเลกุล และเป็นผลรวมของ spin ของอิเล็กตรอนในโมเลกุล สำหรับโมเลกุลของสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ $S = 0$ เพราะโมเลกุลมีจำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคู่ ดังนั้น สถานะที่มีพลังงานต่ำที่สุด ซึ่งเรียกว่าสถานะพื้น อิเล็กตรอนจะต้องอยู่เป็นคู่ (pair) $S = (+\frac{1}{2} - \frac{1}{2}) = 0$

$M = 2(0) + 1 = 1$ เรียกว่า singlet state (singlet electronic state) และให้ singlet state พื้น (ground singlet state) เป็น S_0 ถ้าเป็น S_1 และ S_2 จะหมายถึง singlet state กระตุ้นที่หนึ่งและที่สอง ตามลำดับ (first and second excited singlet states)



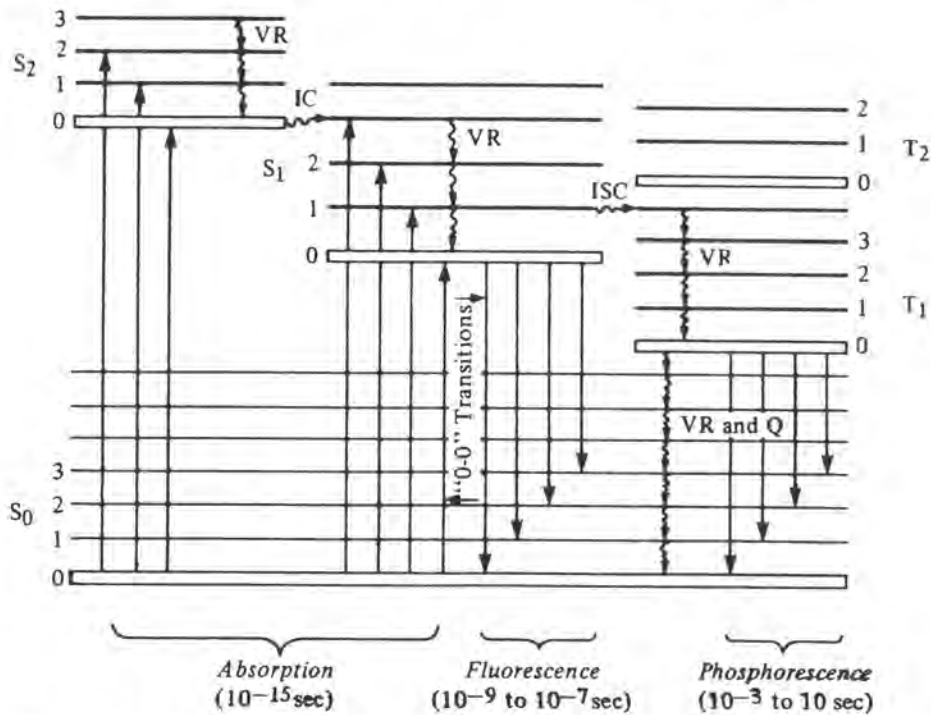
ขณะที่โมเลกุลอยู่ในสถานะกระตุ้น อิเล็กตรอนตัวหนึ่งมีโอกาสที่เปลี่ยน spin กลับทาง ดังนั้น

$$S = +\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$$

$$M = (2 \times 1) + 1 = 3 \text{ เรียก triplet state}$$

และ triplet state ที่มีพลังงานต่ำที่สุดให้เป็น T_1 ดังนั้น โมเลกุลใดที่มีจำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคู่ จึงไม่สามารถมี triplet state พื้น (ground triplet state) เพราะอิเล็กตรอนมีพลังงานต่ำที่สุดมี spin paired ดังนั้น โมเลกุลที่มีหนึ่ง unpair อิเล็กตรอน (จำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคี่) จึงมีสถานะเป็น doublet state เช่น พวก free radicals เป็นต้น แต่เรื่องที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นเรื่องของกระบวนการทำให้เกิดการกระตุ้นและการแผ่รังสีออกมาเป็น singlet และ triplet state ของโมเลกุลของสารอินทรีย์

เพื่อให้เห็นกระบวนการเกิดการกระตุ้นเนื่องจากดูดกลืนพลังงานและกระบวนการแผ่รังสีสามารถแสดงได้ง่าย ๆ โดยใช้แผนภาพแสดงระดับพลังงาน Jablonski ดังรูปที่ 10.1



รูปที่ 10.1 แผนภาพแสดงระดับพลังงาน Jablonski เกี่ยวกับการดูดกลืนและการแผ่รังสี

ในแผนภาพนี้แสดงระดับพลังงานให้เห็นเฉพาะ electronic และ vibrational energy levels เท่านั้น แต่ rotational energy level จะไม่มี เพราะไม่สามารถวัดและแยกออกได้ด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ธรรมดา ดังแสดงในตารางที่ 10.1 ซึ่งระดับพลังงานความยาวคลื่นแสงที่ให้ออกมาก็แตกต่างกันอย่างมาก และยังขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์ด้วย

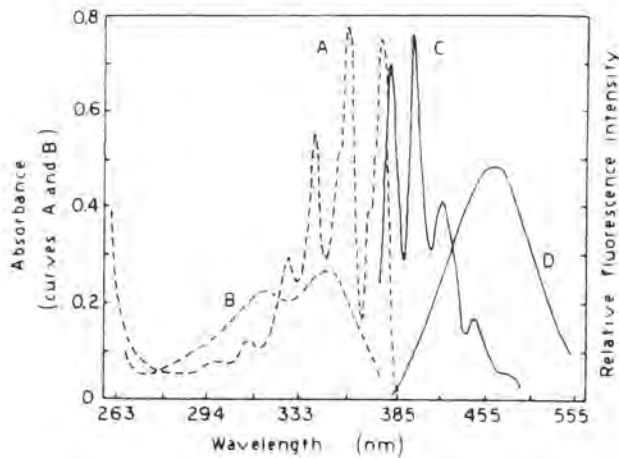
ตารางที่ 10.1 แสดงพลังงานและความยาวคลื่นโดยประมาณของการเกิดทรานซิชันต่าง ๆ

Transition	Approx. Energy (kJ/mole)	Approx. λ (nm)
Electronic (E_e)	400	3×10^2
Vibrational (E_v)	20	6×10^3
Rotational (E_R)	0.4	3×10^8

10.2.2 กระบวนการลดระดับพลังงาน (Deexcitation)

สมมุติว่าโมเลกุลถูกกระตุ้นไปสู่สถานะกระตุ้น (excited state) S_2 การที่โมเลกุลจะกลับลงมาสู่สถานะพื้นนั้นจะมีกลไกต่าง ๆ เกิดขึ้นหลายขั้นตอน ถ้าโมเลกุลนั้นอยู่ในสารละลาย โมเลกุลนั้นสามารถลด vibrational energy ที่เกินไปลงด้วยการชนกับโมเลกุลของตัวทำละลาย กลายเป็นความร้อนโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Vibrational Relaxation (VR) ในขณะเดียวกัน โมเลกุลที่อยู่ S_2 จะมีระดับพลังงานของ vibrational energy ลดต่ำลงมาอยู่ในระดับเดียวกันกับ vibrational energy ที่สูงของ excited singlet แรก S_1 นั่นคือ S_2 พลังงานต่ำกลายเป็น S_1 พลังงานสูง เรียกว่าเกิดกระบวนการ Internal Conversion (IC) กระบวนการลดพลังงานทั้งของ VR และ IC เกิดขึ้นรวดเร็ว (ประมาณ 10^{-12} วินาที) จนโมเลกุลลงมาสู่สถานะ S_1 โดยไม่มีการแผ่รังสี ดังนั้น จะเห็นว่าการ deexcited จาก state สูงกว่า S_1 มาสู่ vibrational energy ต่ำ ($V = 0$) โดยมีการแผ่รังสีจะพบน้อย มีเพียงไม่กี่โมเลกุลที่เกิดแบบนี้ เช่น azulene และอนุพันธ์ เมื่อโมเลกุลลงมาสู่ระดับพลังงาน S_1 ที่มีพลังงานต่ำแล้วก็จะเกิด deexcited ไปสู่ S_0 โดยมีการให้โฟตอนเรียกว่า เกิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ซึ่งเกิดรวดเร็วมาก (ประมาณ $10^{-9} - 10^{-7}$ วินาที) จะเห็นจากแผนภาพที่ 10.1 ว่ามีอยู่ระดับหนึ่งที่พลังงานที่สารดูดกลืนเข้าไปทำให้เกิดสถานะกระตุ้นเท่ากับพลังงานที่สารนั้นให้ออกมา เมื่อกลับสู่สถานะพื้น เรียกว่า “0-0” transitions แต่ในทางปฏิบัติ พลังงานอาจแตกต่างกันเล็กน้อยแบบต์ของสเปกตรัมอาจเคลื่อนที่บ้างเนื่องจาก solvent effects สำหรับในกรณีที่โมเลกุลกำลังอยู่ที่สถานะกระตุ้น อิเล็กตรอนตัวหนึ่งอาจเกิด spin กลับทาง (reverse spin) ทำให้ค่า multiplicity เป็น 3 ดังได้กล่าวมาแล้ว โมเลกุลนั้นจะถูกเปลี่ยนจาก singlet state ไปเป็น triplet state โดยที่กระบวนการเกิดนี้ไม่มีการให้รังสีออกมา (non-radiative transfer) เรียกว่า Intersystem crossing (ISC) Triplet state นั้นจะมีพลังงานต่ำกว่าของ single state เดิม ขอให้เข้าใจอีกครั้งหนึ่งว่า โมเลกุลของสารอินทรีย์นั้นมีจำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคู่ ทำให้โมเลกุลนั้นไม่มี ground triplet state (ดูรูปที่ 10.1) เนื่องจากอิเล็กตรอนที่อยู่ใน orbital มีพลังงานต่ำสุด และ spin paired ตามกฎของ Hund (Hund's rule) เกี่ยวกับ multiplicity หลังจากเปลี่ยนไปเป็น triplet state ที่มีพลังงานสูงแล้วก็จะเกิดกระบวนการ VR เพื่อลดพลังงานให้เป็น triplet state (T_1) ที่มีพลังงานต่ำ แล้วก็เกิดกระบวนการลดระดับพลังงานจาก T_1 ไปยัง S_0 โดยให้โฟตอนเกิดขึ้น เรียก ฟอสฟอเรสเซนซ์ (phosphorescence) ต้องไม่ลืมว่าการเกิดทรานซิชันระหว่าง state ที่มี multiplicity ต่างกันจะเกิดไม่ได้ กระบวนการเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์จะใช้เวลาหรือมีชีวิตยาวกว่า (ประมาณ $10^{-3} - 10$ วินาที) ฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นจึงทำให้เราสามารถเห็นการเรืองแสงของสารตัวอย่างได้หลังจากทำให้เกิดสถานะกระตุ้นแล้ว ทั้งนี้

จะต้องอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เท่านั้น รูปที่ 10.2 แสดงลักษณะของสเปกตรัมจากการดูดกลืนแสงและการให้ฟลูออเรสเซนซ์ของแอนทราซีนและควินิน จะเห็นได้ว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของแอนทราซีนมีถึง 4 พีกจากการเกิดทรานซิชัน $S_0 \rightarrow S_1$ ซึ่งมี vibrational level ต่างกัน ในขณะที่เดียวกันก็พบว่ามีการให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมา 4 พีกด้วย สำหรับของควินินนั้นปรากฏว่ามี excitation peaks 2 พีก คือที่ 250 nm จากกระบวนการ $S_0 \rightarrow S_2$ และที่ 350 nm เนื่องจาก $S_0 \rightarrow S_1$ ส่วนฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้นพีกเดียวที่ 450 nm เนื่องจาก $S_1 \rightarrow S_0$



รูปที่ 10.2 แสดงสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงและฟลูออเรสเซนซ์ของแอนทราซีน (ในเอทานอล) และควินิน (ใน 0.05 M H_2SO_4)
 curve A เป็น anthracene absorption;
 curve B เป็น quinine absorption;
 curve C เป็น anthracene fluorescence;
 curve D เป็น quinine fluorescence

10.3 แฟกเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์

ฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์จะเกิดขึ้นได้และดีหรือไม่นั้น โครงสร้างของโมเลกุล สภาพแวดล้อมทางเคมี และอื่น ๆ มีอิทธิพลอย่างมาก ดังจะได้กล่าวต่อไปนี้

10.3.1 ผลจากโครงสร้างของโมเลกุล (Structural Effects)

โครงสร้างของโมเลกุลที่จะให้ฟลูออเรสเซนซ์ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนซึ่งสามารถเกิดทรานซิชันได้ง่าย ๆ โดยใช้พลังงานต่ำและมีค่า ϵ_{max} สูง ๆ เนื่องจากเกิด $\pi \rightarrow \pi^*$ สารพวกนี้ได้แก่สารที่มี aromatic functional group
2. เป็นสารที่มี conjugated multiple double bonds ซึ่งจะเห็นว่าถ้าเป็นสารพวก aliphatic และ alicyclic carbonyl structures จะมีน้อยกว่าพวก aromatic system

3. พวก aromatic hydrocarbons ที่ไม่มี substituted groups จะให้ฟลูออเรสเซนซ์มากขึ้น ถ้าจำนวนวงแหวนเพิ่มขึ้น โดยจะทำให้ค่า quantum efficiency เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 10.2

ตารางที่ 10.2 แสดงฟลูออเรสเซนซ์และ quantum efficiency ของ linear aromatics

สารประกอบ	quantum eff. ϕ_F	ความยาวคลื่นของการเกิด excitation λ_{ex} (nm)	ความยาวคลื่นของฟลูออเรสเซนซ์ λ_{em} (nm)
Benzene	0.11	205	278
Naphthalene	0.29	286	321
Anthracene	0.46	365	400
Tetracene	0.60	390	480
Pentacene	0.52	580	640

จะเห็นได้ว่าจำนวน conjugation เพิ่มขึ้น ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย และฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมก็จะเคลื่อนไปในทางความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น นั่นคือ ใช้พลังงานในการทำให้เกิดแตรนซิชันต่ำลง ส่วนโครงสร้างของโมเลกุลอาจมีผลต่อการทำให้ฟลูออเรสเซนซ์ไม่เกิดหรือเกิดขึ้นน้อยลงได้

4. สารที่มีอิเล็กตรอนซึ่งจะเป็นตัวทำให้เกิดการกระตุ้นนั้นเกิดพันธะที่แข็งแรง จึงอาจทำให้สารนั้นเกิดการแตกตัวพร้อม ๆ กับการทำให้เกิดการกระตุ้น ฟลูออเรสเซนซ์อาจไม่เกิดได้

5. โมเลกุลที่มีฟังก์ชันัลกรุปที่เป็นส่วนส่งเสริมให้เกิดกระบวนการแตรนซิชันโดยไม่ให้รังสีเกิดขึ้น กรุปพวกนี้มีผลต่อความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์มาก

6. สารพวกที่เป็น heterocyclics ธรรมดา เช่น pyridine, furan, thiophene และ pyrrole ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ เพราะการเกิดแตรนซิชันจาก $n \rightarrow \pi^*$ แล้วเปลี่ยนเป็น triplet state อย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ แต่ถ้าเป็นพวก fused rings ที่มี heterocyclic nucleus จะให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ เช่น quinolin, isoquinolin และ indole เป็นต้น

7. กรุปที่เข้าไปแทนที่ใน benzene ring ก็มีอิทธิพลต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ ฟังก์ชันัลกรุปบางชนิดช่วยทำให้ฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น บางชนิดทำให้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 10.3

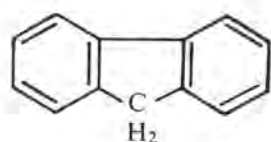
ตารางที่ 10.3 แสดงผลของ substitution ต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของ benzene ในสารละลาย ethanol

สารประกอบ	สูตร	ความยาวคลื่นของฟลูออเรสเซนซ์ (nm)	ความเข้มสัมพัทธ์ของฟลูออเรสเซนซ์
Benzene	C_6H_6	270 – 310	10
Toluene	$C_6H_5.CH_3$	270 – 320	17
Propylbenzene	$C_6H_5.C_3H_7$	270 – 320	17
Phenol	$C_6H_5.OH$	285 – 365	18
Phenolate ion	$C_6H_5O^-$	310 – 400	10
Anisole	$C_6H_5.OCH_3$	285 – 345	20
Aniline	$C_6H_5.NH_2$	310 – 405	20
Benzonitrile	$C_6H_5.CN$	280 – 360	20
Fluorobenzene	C_6H_5F	270 – 320	10
Chlorobenzene	C_6H_5Cl	275 – 345	7
Bromobenzene	C_6H_5Br	290 – 380	5
Iodobenzene	C_6H_5I	-	0
Aniliniumion	$C_6H_5NH_3^+$	-	0
Benzoic acid	C_6H_5COOH	310 – 390	3
Nitrobenzene	$C_6H_5.NO_2$	-	0

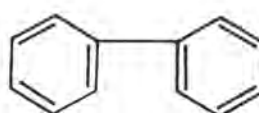
จากตารางที่ 10.3 นี้จะเห็นได้ว่า กรุปซึ่งเป็นตัวดึงคู่อิเล็กตรอน (electron withdraw) เป็นกรุปที่ปลดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ หรือเป็นตัวทำลายฟลูออเรสเซนซ์ แต่ถ้ากรุปที่เข้าเกาะกับเบนซีนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donating groups) จะช่วยทำให้ฟลูออเรสเซนซ์เกิดดีขึ้นและได้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นด้วย

10.3.2 ผลของโครงสร้างที่ยึดกันแน่น (Effect of Structural Rigidity)

จากการศึกษาได้พบว่า โมเลกุลที่มีโครงสร้างที่ยึดกันแน่น แข็ง ไม่โคลงเคลง มีโอกาสให้ฟลูออเรสเซนซ์ดีกว่า โดยมีค่า quantum efficiency สูง เช่น quantum efficiency ของ fluorene ใกล้เคียง 1.0 แต่ของ biphenyl มีค่า 0.2

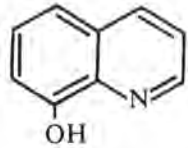


fluorene
 $\phi_F \sim 1.0$

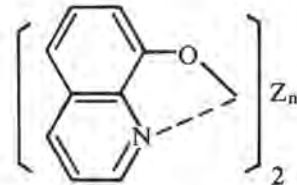


biphenyl
 $\phi_F \sim 0.2$

จากอิทธิพลในเรื่องของโครงสร้างที่ยึดกันแน่นทำให้การเกิดฟลูออเรสเซนซ์ดีขึ้นนี้เป็นแรงกระตุ้นให้มีการใช้ chelating agents ไปทำให้เกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะและใช้ในงานทางฟลูออโรเมตรีได้อย่างดี เช่น สารประกอบ 8-hydroxyquinoline ให้ฟลูออเรสเซนซ์น้อยกว่าเมื่อเกิดสารเชิงซ้อนกับ Zinc หลายเท่า



8-hydroxyquinoline



Zinc complex

โมเลกุลที่ไม่ rigid ช่วยทำให้ internal conversion เกิดได้ดียิ่งขึ้น นั่นคือ การเกิดทรานซิชันโดยไม่มีการแผ่รังสีเกิดขึ้น

10.3.3 ผลของ Quantum Yield หรือ Quantum Efficiency

ก่อนที่จะกล่าวถึง quantum efficiency ควรจะได้พิจารณา kinetics ของฟลูออเรสเซนซ์ และฟอสฟอเรสเซนซ์เสียก่อน

ถ้าให้โมเลกุลดูดกลืนแสงเป็น ΔI

$$\therefore \Delta I = I_0 - I_T \quad \text{-----}(10.2)$$

ΔI = อัตราการดูดกลืนแสง

I_0 = ความเข้มของแสงเดิม

I_T = ความเข้มของแสงที่ผ่านออกไป

ถ้าเรา excite สารตัวอย่างเป็นเวลาหนึ่งซึ่งนานพอถ้าจะเทียบกับกระบวนการ deexcitation ทั้งที่ให้รังสีและไม่ให้รังสี จำนวนโมเลกุลที่ S_1 state จะถึงจุด ready state นั่นคือ อัตราการเกิด S_1 state จะเท่ากับ อัตราของการ deexcitation ของ state นี้ เมื่อเขียนเป็นสมการทางคณิตศาสตร์จะได้เป็น

$$\Delta I = (k_{ic} + k_{isc} + k_r + k_Q[Q])[S_1] \quad \text{-----}(10.3)$$

k_{ic}, k_{isc}, k_r = const (ดูจากตารางที่ 10.4)

$[Q]$ = quencher concentration

k_Q = second-order quenching rate constant

ตารางที่ 10.4 สรุปของกระบวนการ excitation และ deexcitation

กระบวนการ	สมการ	First-Order Rate Const.
Absorption	$S_0 + h\nu_a \rightarrow S_2(\text{or } S_1)$	k_a
IC/VR	$S_2 \rightsquigarrow S_1$	k_{IC}
Fluorescence	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_f$	k_f
ISC	$S_1 \rightsquigarrow T_1$	k_{ISC}
Phosphorescence	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_p$	k_p
Collisional Quenching of S_1	$S_1 + Q \rightarrow S_0 + Q + \text{heat}$	$k_Q [Q]$ (pseudo 1 st order)

ถ้าจำนวนโฟตอนส่วนหนึ่งของจำนวนโฟตอนทั้งหมดถูกดูดกลืนเพื่อทำให้เกิด fluorescence emission เรียกว่า fraction ส่วนนี้เป็น ϕ_f

$$\phi_f = \frac{\text{จำนวนโฟตอนที่เกิดขึ้นทั้งหมด}}{\text{จำนวนโฟตอนที่ถูกดูดกลืน}} \quad \text{-----(10.4)}$$

ดังนั้น rate of fluorescence จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับ rate of absorption นั่นคือ

$$I_f = \phi_f \Delta I = k_f [S_1] \cong \phi_f (k_{IC} - k_{ISC} + k_f + k_Q [Q]) [S_1] \quad \text{-----(10.5)}$$

เมื่อจัดสมการใหม่จะได้เป็น

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_{IC} + k_{ISC} + k_f + k_Q [Q]} \quad \text{-----(10.6)}$$

ดังนั้น life time ของ S_1 state กำหนดให้เป็น

$$\tau = \frac{1}{k_{IC} + k_{ISC} + k_f + k_Q [Q]} \quad \text{-----(10.7)}$$

ถ้ากระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นไม่มีการแข่งกับกระบวนการฟลูออเรสเซนซ์ เราอาจกำหนดให้ life time ของการเกิดรังสี เป็น

$$\tau_f = \frac{1}{k_f} \quad \text{-----(10.8)}$$

จากการรวมสมการ 10.6–10.8 จะได้

$$\phi_f = \frac{\tau}{\tau_f} \quad \text{-----}(10.9)$$

สำหรับฟลูออเรสเซนซ์ก็หามาได้เหมือนกัน นั่นคือ

$$\tau_p = \frac{1}{k_p + k_{VR} + k_{QP}|Q_p|} \quad \text{-----}(10.10)$$

$$\frac{\phi_p}{\phi_f} = \frac{\tau_p}{\tau_{pR}} \quad \text{-----}(10.11)$$

- กำหนดให้
- k_p = first-order decay constant ของ T_1 ไปยัง S_0
 - k_{VR} = constant สำหรับกระบวนการ VR ของ T_1 state
 - $k_{QP}|Q_p|$ = pseudo first-order rate constant สำหรับการทำให้ไม่เกิด triplet state ด้วยสารเจือปน Quencher, Q_p
 - τ_p และ τ_{pR} = life times ของการมีและไม่มีกระบวนการที่ไม่ให้รังสีเข้าแข่งขัน
 - ϕ_f = efficiency ของการเกิด triplet state

จากสมการทั้งหมดที่ได้นี้ ได้ตัดทิ้งเกี่ยวกับกระบวนการจาก triplet state ไปยัง singlet state ซึ่งทำให้เกิด delayed fluorescence จากสมการ (10.6) สามารถนำมาใช้อธิบายเกี่ยวกับผลของโครงสร้างและสภาพแวดล้อมต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ ตัวแปรใดก็ตามที่มีส่วนทำให้ค่า k_f สูงขึ้น และทำให้ค่า k ของตัวอื่น ๆ ต่ำลง ย่อมทำให้การเกิดฟลูออเรสเซนซ์มากขึ้น

Quantum Efficiency กับการเกิดแทรนซิชัน

เป็นที่ปรากฏแล้วว่า พฤติกรรมของการเกิดฟลูออเรสเซนซ์นั้นมักจะเกิดกับสารประกอบที่มีค่าพลังงานกระตุ้นของการเกิด $\pi \rightarrow \pi^*$ ต่ำที่สุด มากกว่าสารประกอบที่มีค่าพลังงานกระตุ้นของการเกิด $n \rightarrow \pi^*$ ต่ำที่สุด นั่นคือ ค่า quantum efficiency ของการเกิดแทรนซิชันจาก $\pi^* \rightarrow \pi$ มีค่ามาก

การที่ quantum efficiency ของการเกิด $\pi^* \rightarrow \pi$ มีค่ามาก อาจเนื่องมาจาก 2 กรณีด้วยกัน คือ

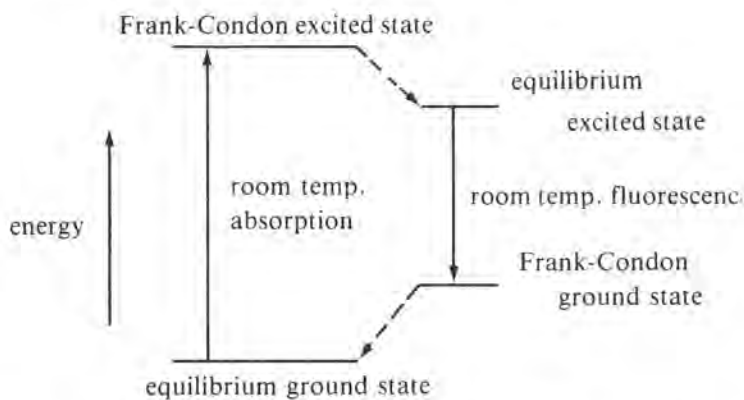
1. ค่า molar absorptivity ของการเกิดแทรนซิชันจาก $\pi \rightarrow \pi^*$ จะมากกว่าการเกิดกระบวนการ $n \rightarrow \pi^*$ ถึงประมาณ 100–1,000 เท่า และยังเกี่ยวข้องกับ life time โดยที่ life time ของการเกิดแทรนซิชัน $\pi \rightarrow \pi^*$ สั้นกว่า (10^{-7} – 10^{-9} วินาที) เมื่อเทียบกับกระบวนการ $n \rightarrow \pi^*$ ซึ่งมี life time 10^{-5} – 10^{-7} วินาที จึงทำให้ค่า k_f มากขึ้น

2. เชื่อว่าค่า k_{ISC} นั้นน้อยกว่าสำหรับ $\pi \rightarrow \pi^*$ excited state เพราะว่าค่าพลังงานที่แตกต่างกันระหว่าง singlet-triplet state มีค่ามากกว่า นั่นคือ ต้องใช้พลังงานมากกว่าในการทำให้ unpaired electron อยู่ที่สถานะกระตุ้น และเป็นผลให้ vibrational level ของ triplet state และ singlet state ต่างกันน้อย โอกาสที่จะเกิด inter-system crossing ก็จะมีได้น้อยด้วย

10.3.4 ผลจากสภาพแวดล้อม (Environmental Effects) สภาพแวดล้อมหลายอย่างจะมีผลอย่างมากต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของพวกพอลิอะตอมมิกโมเลกุล เช่น ตัวทำละลาย, pH, อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ หรือการเกิดพันธะไฮโดรเจน เป็นต้น

(ก) ผลของตัวทำละลายต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ (solvent effects)

โดยทั่วไปการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางฟลูออโรเมตรีนี้มักจะทำในสารละลาย และเกือบทุกกรณีตัวทำละลายจะทำให้ฟลูออเรสเซนซ์แบนด์กว้างขึ้น polarity ก็มีส่วนสำคัญในการบ่งบอกถึงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย การเกิด electro-static attraction ก็ช่วย stabilizes หรือลดระดับของพลังงานลง ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสถานะพื้นหรือสถานะกระตุ้นของสารที่จะวิเคราะห์หรือตัวถูกละลายจะถูก stabilized มากกว่ากัน เพื่อที่จะให้เข้าใจยิ่งขึ้นเกี่ยวกับผลกระทบของตัวทำละลายต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ ขอให้ดูรูปที่ 10.3



รูปที่ 10.3 แสดงแผนภูมิการเกิดผลกระทบของตัวทำละลายต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ เส้นประแสดงถึงการเกิดแทรนซิชันโดยไม่มีโพรงสี

ตาม Frank-Condon principle กล่าวคือ nuclear positions ในโมเลกุลจะไม่มีเวลาพอที่จะเปลี่ยนตำแหน่งในขณะที่อิเล็กตรอนเกิดแทรนซิชัน แต่ตามด้วยการดูดกลืนแสงเกิดขึ้นระหว่างอิเล็กตรอนเกิดแทรนซิชันจาก equilibrium ground state ไปยัง non-equilibrium excited singlet state (Frank-Condon state) ขณะอยู่ที่ excited state พันธะจะมีการเปลี่ยนแปลงในตัวของมันเองให้อยู่ตัวมากขึ้น (lower energy) ดังจุดประข้างบน ฟลูออเรสเซนซ์จะเกิดขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนที่อยู่ equilibrium excited state ลงมายัง Frank-Condon ground state การจัดพันธะในโมเลกุลจะเกิดขึ้น เพื่อไม่ให้โมเลกุลลงมาสู่สถานะที่มีพลังงานต่ำกว่าของ equilibrium ground state ดังเส้นจุดประข้างล่าง พลังงานที่ต่างกันระหว่าง Frank-Condon excited state กับ equilibrium excited state และระหว่าง Frank-Condon ground state กับ equilibrium ground state นั้น ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาระหว่างตัวทำละลายกับ excited state และ ground state ของโมเลกุลนั้น ถ้า excited state เป็น polar มากกว่า ground state คือ polarity ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น สถานะข้างบนซึ่งมีพลังงานสูงกว่าจะถูก stabilized มากกว่า ground state และพลังงานของ equilibrium excited state ลดลง

ขณะที่พลังงานของ ground state เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ทำให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นมีพลังงานลดลง และความยาวคลื่นของฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้น เมื่อตัวทำละลายมี polarity เพิ่มขึ้น ในทางตรงข้าม ถ้า ground state เป็น polar มากกว่า excited state, ground state ก็จะถูก stabilized เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ excited state เมื่อตัวทำละลายมี polarity เพิ่มขึ้น ดังนั้นพลังงานที่แตกต่างกันระหว่าง excited state กับ ground state จะเพิ่มขึ้น ทำให้ความยาวคลื่นของฟลูออเรสเซนซ์เคลื่อนที่ไปทางความยาวคลื่นที่สั้นลงเมื่อตัวทำละลายมี polarity เพิ่มขึ้น

สำหรับ $n \rightarrow \pi^*$ แทรนซิชัน ground state ของโมเลกุลจะเป็น polar มากกว่า excited state ดังนั้น ความยาวคลื่นของแสงที่ให้ออกมาจะสั้นลง ถ้า polarity ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น และสำหรับ $\pi \rightarrow \pi^*$ แทรนซิชัน excited state ของโมเลกุลจะเป็น polar มากกว่า ground state ดังนั้น ความยาวคลื่นของแสงที่ให้ออกมาจะยาวขึ้นเมื่อ polarity ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น

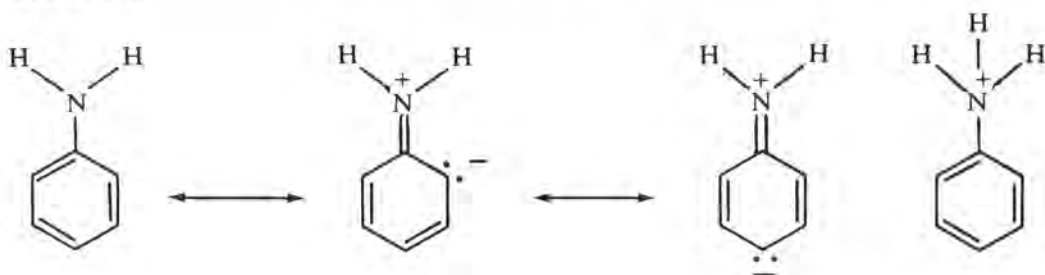
ตัวทำละลายที่ประกอบด้วยธาตุหนัก ๆ ก็จะมีผลต่อการเกิดโฟโตลูมิเนสเซนซ์ เมื่อมวลของอะตอมเพิ่มขึ้น ฟลูออเรสเซนซ์จะลดลง แต่ความเข้มของฟอสฟอเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้น ดังนั้น ในการศึกษาการเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์ของสารประกอบจึงมักจะเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีอะตอมของธาตุหนักอยู่ด้วย

(ข) ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ (temperature effect)

ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้ความเร็วเฉลี่ยของโมเลกุลเพิ่มขึ้น ทั้งที่อยู่สถานะพื้นและที่อยู่สถานะกระตุ้น การที่โมเลกุลมีความเร็วเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการชนกันมากขึ้นด้วย ดังนั้น โมเลกุลที่อยู่สถานะกระตุ้นจะชนกับโมเลกุลที่อยู่สถานะพื้น ทำให้เกิด internal conversion (IC) เพิ่มขึ้น เป็นเหตุให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลง นอกจากนี้ อุณหภูมิทำให้ค่า quantum efficiency ลดลงด้วย

(ค) ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ (effect of pH)

สารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยฟังก์ชันนัลกรุปที่เป็นกรดหรือเบส การเปลี่ยนแปลง pH จะมีผลอย่างมากต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ ทั้งความยาวคลื่นและความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์จะเปลี่ยนแปลงไป สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะสารประกอบนั้นอาจอยู่ในรูปของโมเลกุลหรืออยู่ในรูปของไอออนแตกต่างกัน ค่า pK_a ของสารพวกนี้จะขึ้นอยู่กับ pH อยู่แล้ว นอกจากนี้ pH ยังเข้าไปเกี่ยวข้องกับการเกิด resonance ซึ่งช่วย stabilize excited state อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 10.3 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า pH มีผลต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของ phenol และ aniline มาก สำหรับ aniline ยังมี resonance forms ได้หลายชนิดอีกด้วย



การเกิด resonance ของ aniline

anilinium ion

(ง) ผลจากการเกิดพันธะไฮโดรเจน (effect of hydrogen bonding)

การเกิดพันธะไฮโดรเจนของฟังก์ชันัลกรุปในโมเลกุลนั้นกับตัวทำละลายหรือกับสารอื่นที่ปนอยู่จะมีผลอย่างมากต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ เพราะไปทำให้ค่า quantum efficiency เปลี่ยนแปลงซึ่งมักจะทำให้ลดลง โดยทั่วไป โมเลกุลใดที่ละลายในตัวทำละลายที่เกิดพันธะไฮโดรเจนโดยเป็นพวกกรดแก่เมื่ออยู่ที่สถานะกระตุ้นมากกว่าที่สถานะพื้น จะมีผลทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์มีความยาวคลื่นสั้นลงมากกว่าโมเลกุลที่เป็นเบสแก่เมื่ออยู่ที่สถานะกระตุ้น ในบางกรณี พันธะไฮโดรเจนสามารถลดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ได้เนื่องจากไปเพิ่มการเกิด internal conversion ให้กับโมเลกุลที่เกิดพันธะไฮโดรเจน

(จ) ผลจากออกซิเจนที่ละลายอยู่ (effect of dissolved oxygen)

ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายนั้นมักจะไปลดความเข้มของทั้งฟอสฟอเรสเซนซ์และฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดออกซิเดชันกับสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์หรือฟอสฟอเรสเซนซ์ นอกจากนี้ ออกซิเจนยังช่วยส่งเสริมให้เกิด intersystem crossing (ISC) และการเปลี่ยนโมเลกุลที่สถานะกระตุ้นไปเป็น triplet state แล้วทำให้ไม่เกิดฟลูออเรสเซนซ์

(ฉ) ผลจากสารเคมีอื่น ๆ ที่เป็นสารเจือปน (effect of impurities)

ในกรณีที่มีสารอื่นปนอยู่ด้วยในสารละลายตัวอย่าง สารเหล่านั้นอาจมีผลกระทบต่อ การเกิดลูมิเนสเซนซ์กับสารที่จะวิเคราะห์ได้ ถ้าสารเหล่านั้นสามารถดูดกลืนหรือให้แสงออกมาที่ความยาวคลื่นเดียวกันกับความยาวคลื่นของแสงเพื่อทำให้เกิดการกระตุ้น หรือที่จะให้ออกมาจากสารตัวอย่าง คือถ้าสารเจือปนนั้นดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันกับของแสงที่ให้ออกมาจากสารตัวอย่าง ก็จะทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลงไปส่วนหนึ่ง การที่สารเจือปนนี้ดูดกลืนแสงที่จะทำให้เกิดการกระตุ้นหรือฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ออกมา เรียกว่าเกิด "Inner-Filter Effect"

(ช) ผลของความเข้มข้นที่มีต่อความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ (effect of concentration on fluorescent intensity)

ปริมาณของแสงที่เกิดจากโฟโตลูมิเนสเซนซ์นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนเพื่อทำให้เกิดสถานะกระตุ้น

$$\therefore I_f \propto \Delta I \propto (I_0 - I_T) \text{-----(10.12)}$$

$$I_f = \phi_f(I_0 - I_T) \text{-----(10.13)}$$

- I_f = ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์
- I_0 = ความเข้มของแสงเริ่มต้น
- I_T = ความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา
- ϕ_f = quantum efficiency ของกระบวนการเกิดฟลูออเรสเซนซ์

เพื่อที่จะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ I_f กับความเข้มข้นของสารที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ จึงขอ นำ Beer's law มาใช้

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon bc} = I_0 e^{-2.303\epsilon bc} \quad \text{-----}(10.14)$$

นำไปแทนค่าในสมการ (10.13) จะได้

$$\begin{aligned} I_f &= \phi_f (I_0 - I_0 e^{-2.303\epsilon bc}) \\ I_f &= \phi_f I_0 (1 - e^{-2.303\epsilon bc}) \end{aligned} \quad \text{-----}(10.15)$$

เมื่อกระจายสมการ (10.15) ออกไปเป็นแบบ

$$e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots + \frac{x^n}{n!} \quad \text{-----}(10.16)$$

∴ เมื่อกระจายสมการ (10.15) จะได้เป็น

$$\begin{aligned} I_f &= \phi_f I_0 \left[1 - 1 + 2.303\epsilon bc - \frac{(2.303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2.303\epsilon bc)^3}{3!} \dots \right] \\ I_f &= \phi_f I_0 \left[2.303\epsilon bc - \frac{(2.303\epsilon bc)^2}{2} + \frac{(2.303\epsilon bc)^3}{6} \dots \right] \end{aligned} \quad \text{-----}(10.17)$$

ถ้าสารละลายเจือจางค่าแอมซอร์เบ้นซ์ (ϵbc) จะมีค่าน้อย ถ้าค่าแอมซอร์เบ้นซ์ (A) ≤ 0.05 เทอมที่สองและเทอมต่อ ๆ ไปในสมการ (10.17) จะมีค่าน้อย ($\sim 2.5\%$ ของเทอมแรก)

$$\therefore I_f = \phi_f I_0 2.303\epsilon bc \quad \text{-----}(10.18)$$

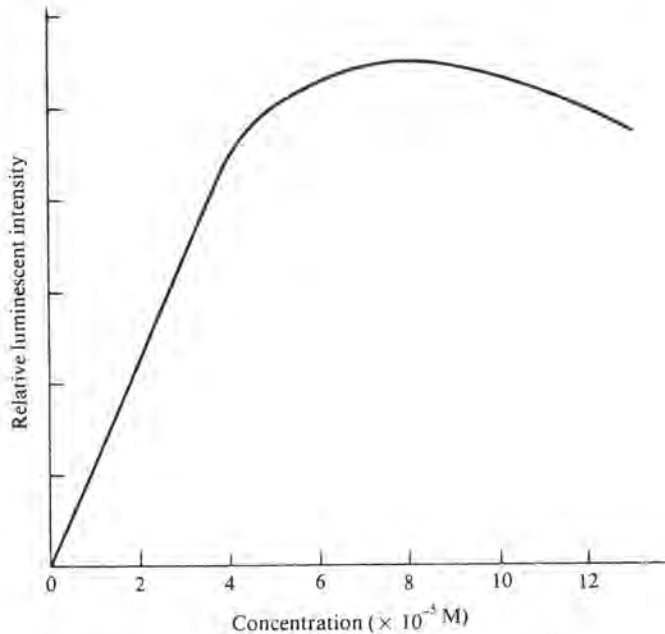
เมื่อเขียนสมการเสียใหม่ให้ง่ายขึ้นจะได้เป็น

$$I_f = KC \quad \text{-----}(10.19)$$

แสดงว่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเขียนกราฟระหว่าง I_f กับ C จะได้กราฟเป็นเส้นตรงเมื่อสารละลายเจือจาง แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 10.4 ซึ่งจะเห็นว่ากราฟเบี่ยงเบนไปจากเส้นตรงนั้นมีแพกเตอร์ใหญ่ที่เกี่ยวข้องคือ การเกิด self-quenching กับ self-absorption

สำหรับ self-quenching นั้นเป็นผลจากการชนกันระหว่างโมเลกุลที่สถานะกระตุ้น ทำให้เกิดการเสียพลังงานโดยไม่มีกรให้รังสีแก่ตัวทำละลาย ซึ่งจัดว่าเกิด external conversion ก็ได้ self-quenching นี้ยังความเข้มข้นสูงก็ยิ่งเกิดมากขึ้น เพราะเกิดการชนกันมากตามไปด้วย

Self-absorption เกิดขึ้นจากการที่โมเลกุลของสารนั้นดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกับฟลูออเรสเซนซ์ จึงทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลง



รูปที่ 10.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของการเปล่งแสงหรือฟลูออเรสเซนซ์ กับความเข้มข้นของสาร ($\epsilon = 4 \times 10^4$)

10.4 การใช้ฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ให้เป็นประโยชน์ (Applications of Fluorescence and Phosphorescence)

ในปัจจุบันนี้ฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์เทคนิคได้นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้อย่างดี และจัดได้ว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้สภาพไวสูง มีความเที่ยง ความแม่นยำ และจัดว่าเป็นวิธีที่เฉพาะ จึงได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในงานประจำทั่วไป และงานวิเคราะห์พวกมีปริมาณน้อย ๆ (trace analysis) สำหรับฟลูออเรสเซนซ์เทคนิคก็ให้สภาพไวสูงกว่าสเปกโทรโฟโตเมตริกเทคนิคประมาณ 1-3 เท่า แต่ฟอสฟอเรสเซนซ์เทคนิคให้สภาพไวต่ำกว่าประมาณ 2-5 เท่า ความแม่นยำน้อยกว่าด้วย สำหรับการทำความคุณภาพวิเคราะห์แล้วทั้ง 2 เทคนิคนี้ไม่นิยมใช้

10.5 เทคนิคต่าง ๆ ทางฟลูออโรเมตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารทางเคมี

อาจจำแนกออกได้เป็น 4 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. วิเคราะห์โดยตรง (Direct Method)
2. วิเคราะห์ทางอ้อม (Indirect Method)
3. วิธีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุล (Rearrangement Method)
4. วิธีทำให้เกิดสารเชิงซ้อนกับสารอื่น (Complexing Method)

เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่มีสภาพไวสูงมาก ๆ อย่างนี้ นักวิเคราะห์มักจะต้องตรวจสอบการทำงานของเครื่องมือให้อยู่ในสภาพที่ใช้งานได้ดีเสมอ เช่น ตรวจสอบอายุของหลอดซินออนซึ่งเป็นแหล่งกระตุ้นสารและความแตกต่างของความเข้มของแสงที่ให้ออกมา ตรวจเช็คสภาพไวของหลอด photomultiplier ความสะอาดของเซลล์ที่ใส่สารละลายตัวอย่าง เป็นต้น ดังนั้น นักวิเคราะห์จำเป็นต้องทำ standardization ให้เครื่องมือทำงานได้คงที่โดยใช้สารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ทางฟลูออเรสเซนซ์อย่างหนึ่ง คือ สารละลายควินินที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนในกรดซัลฟิวริก หรือใช้ quinine sulphate ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) $_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ ซึ่งมีมวลโมเลกุล 782.96 ทำเป็นสารละลายชั้น 10^{-5} M ใน 0.05 M H_2SO_4 (ความเข้มข้นอาจเลือกเตรียมเอาได้) และควรเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล ควินินมีค่า λ_{ex} ที่ 350 nm และ λ_{em} ที่ 450 nm อีกอย่างหนึ่งเป็นชุดของสารมาตรฐาน โดยทำเป็นแท่งพลาสติกใส เช่น มี Rhodamine B, ของผสม anthracene กับ naphthalene, p-terphenyl และ tetraphenyl butadiene เป็นต้น โดยเราเลือกใช้เพียงแท่งหนึ่งแท่งก็ได้

การหาสเปกตรัมทั้ง excitation และ emission (λ_{ex} และ λ_{em}) ของสารตัวอย่าง สามารถทำได้ดังนี้

1. เตรียมตัวอย่างและเครื่องมือให้พร้อม
2. เริ่มต้นตั้ง λ_{ex} ชั่วคราวไว้ที่ 250 nm แล้ว scan emission spectrum ของสารตัวอย่าง จะทำให้เราได้ λ_{em} ชั่วคราว

3. ตั้ง emission monochromator ไว้ที่ λ_{em} ที่หาได้จากข้อ 2 แล้ว scan หา excitation spectrum จะทำให้ทราบ λ_{ex} ของสารตัวอย่าง

4. ตั้ง excitation monochromator ไว้ที่ λ_{ex} ที่หาได้จากข้อ 4 แล้ว scan หา emission spectrum ของสารตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{em} ที่ถูกต้อง

ดังนั้น จากการทดลองนี้ก็จะได้หาสามารถหาสเปกตรัมของ excitation, emission, λ_{em} และ λ_{ex} ของสารตัวอย่างได้

5. ถ้าต้องการหาปริมาณ ก็สามารถนำสารตัวอย่างไปวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ได้เลย โดยตั้ง λ_{ex} และ λ_{em} (คือตั้ง monochromator) ให้ตรงตามที่ได้ในข้อ 4

6. สร้างกราฟมาตรฐานขึ้นก็จะหาปริมาณของสารตัวอย่างได้

10.5.1 วิธีหาปริมาณของสารโดยวิธีตรง (Direct Method)

วิธีนี้ใช้วัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์โดยตรงได้เลย เพราะสารที่นำไปวัดนั้นสามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้อยู่แล้ว โดยจะต้องเลือกตัวทำละลาย, pH, λ_{ex} , λ_{em} และความเข้มข้นให้เหมาะสมทั้งสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากสารตัวอย่างนำไปอ่านจากกราฟมาตรฐานอีกครั้งหนึ่ง หรืออาจใช้วิธีที่เรียกว่า standard addition ก็ได้

สารอินทรีย์หลายพันชนิดสามารถหาปริมาณได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ถึงระดับต่ำกว่า 1 ppm (1 $\mu g/mL$) และบางชนิดอาจหาได้ถึงระดับ ppt เป็นต้น ได้มีผู้รวบรวมผลงานของเทคนิคนี้ไว้หลายท่านด้วยกัน ซึ่งเป็นเอกสารอ้างอิงได้ (6-9) สารประกอบอินทรีย์ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ และสามารถนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ได้อย่างดี พอเป็นตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 10.5 และตัวอย่างแสดง

การวิเคราะห์สารต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี ดังแสดงในตารางที่ 10.11 ถึงตารางที่ 10.16

ตารางที่ 10.5 แสดงประเภทของสารอินทรีย์ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์และใช้เป็นประโยชน์ได้

ประเภทของสาร	ตัวอย่างของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ (ϕ_f)	ตัวอย่างที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์น้อยหรือไม่เกิด
Hydrocarbons		
1. Aryl-substituted olefins	trans-Stilbene	cis-Stilbene
2. Unsubstituted aromatic hydrocarbons	Anthracene (0.2), Pyrene (0.3)	Benzene (0.04), biphenyl (P)
3. Alkyl-substituted hydrocarbons	Toluene (0.1), mesitylene (0.2), 9-methylanthracene (0.3)	
Nitrogen Compounds		
4. Aromatic amines	Aniline (0.1), 2-naphthylamine (0.5)	Nitroanilines (P)
5. Amino acids	Tyrosine (0.2), tryptophan (0.2)	Phenylalanine (0.04)
6. "Phenylethylamines"	Amphetamine (0.02)	
7. Heterocyclics	Quinine (0.55)	Pyridine
Halogen Compounds		
8. Cl-substituted aromatic hydrocarbons	1-Chloronaphthalene (0.06), p-chlorotoluene (0.02)	Chlorobenzene (P)
9. F-substituted aromatic hydrocarbons	Fluorobenzene (0.1), 1-fluoronaphthalene (0.06)	
Oxygen Compounds		
10. Phenols	Phenol (0.2), 2-naphthol (0.3)	Nitrophenols (P)
11. Phenyl ethers	Anisole (0.3)	
12. Barbiturates	Phenobarbital (0.001)	5,5'-Dialkyl barbiturates
13. Aromatic acids	Acetylsalicylic acid (0.02)	Benzoic acid (P)

ค่าที่อยู่ในวงเล็บเป็นค่า quantum efficiency ϕ_f และ P หมายถึงฟอสฟอเรสเซนซ์

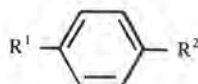
ตารางที่ 10.6 แสดงสารประกอบของเบนซีนและอนุพันธ์ที่สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้^a

Compound	Solvent ^b	Band Limits (nm)	Maxima (nm)
Benzene	A	255 – 300	260, 263, 264, 275, 283, 291
Toluene	A	261 – 300	262, 264, 265, 274, 280, 289
o-Xylene	A	260 – 320	260, 268, 271, 280, 290, 304, 313
m-Xylene	A	267 – 282	268, 271, 280
p-Xylene	A	265 – 290	268, 274, 280, 286
Mesitylene	A	265 – 300	270, 271, 275, 279, 286, 297
Durene	H	280 – 340	Continuous
Phenol	A	287 – 350	Continuous
o-Cresol	A	827 – 385	Continuous
m-Cresol	A	286 – 385	Continuous
p-Cresol	A	292 – 385	Continuous
o-Hydroxybenzoic acid	A	376 – 480	Continuous
m-Hydroxybenzoic acid	A	328 – 444	Continuous
p-Hydroxybenzoic acid	A	323 – 408	Continuous
Aniline	A	300 – 410	Continuous, weak maxima at 305, 336
o-Anisidine	A	313 – 429	Continuous
p-Anisidine	A	339 – 423	Continuous
o-Tolunitrile	A	287 – 376	Continuous
p-Tolunitrile	A	280 – 351	Continuous
Biphenyl	H	294 – 365	294, 305, 314, 319, 327, 340, 355
Diphenyl methane	H	272 – 320	275, 279, 285, 293, 301
Bibenzyl	H	270 – 320	275, 279, 284, 291, 304
Dibenzylethylene	H	270 – 320	278, 283, 296, 306, 314
Diphenyl ether	H	284 – 368	Continuous
Diphenylamine	H	326 – 415	Continuous

^aData from Ref. [10].

^bKey: A, alcohol; H, hexane.

ตารางที่ 10.7 แสดงอนุพันธ์ของเบนซีนในสารละลายเข้มข้น 1 ppm ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์^a



R ¹	R ²	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Quantum Efficiency ^b (%)
H	OH	270	330	3.2
H	OCH ₃	270	303	3.4
H	NH ₂	280	350	2.5
H	N(CH ₃) ₂	286	365	9.7
H	F	257	289	0.7

ตารางที่ 10.7 (ต่อ)



R ¹	R ²	(nm)	λ_{em} (nm)	Quantum Efficiency ^b (%)
H	Cl	N.F. ^c		
H	Br	N.F.		
H	I	N.F.		
H	NO ₂	N.F.		
H	NHCOCH ₃	N.F.		
H	COOH	N.F.		
NH ₂	F	289	362	12.3
NH ₂	SO ₃ H	254	352	5.0
NH ₂	OCH ₃	297	375	4.2
NH ₂	CH ₃	289	357	2.8
NH ₂	Cl	290	362	1.7
NH ₂	NHCOCH ₃	290	352	0.018
NH ₂	NO ₂	N.F.		
OH	CH ₃	278	313	8.8
OH	OCH ₃	289	328	5.9
OH	F	276	315	3.0
OH	Cl	280	317	0.89
OH	Br	N.F.		
OH	NO ₂	N.F.		
Quinine				55.0

^aData from Ref. [10].

^bRelated to quinine sulfate in 0.1 N H₂SO₄.

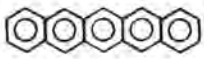
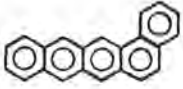
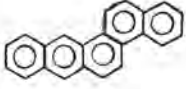
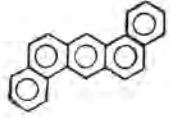



^cN.F. = nonfluorescent.

ตารางที่ 10.8 แสดงตัวอย่างของสารประกอบพอลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสารละลาย^aที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์

Hydrocarbon	Fluorescence Wavelength (nm)
Benzene	250 – 300
Naphthalene	300 – 365
Anthracene	372 – 460
Naphthacene	460 – 580 (468, 498, 533, 574)
Pentacene	Red
Rubrene	545 – 623 (maxima 560, 590)
Phenanthrene	348 – 407 (348, 366, 385, 407)
Chrysene	360 – 400
Pyrene	370 – 400
Perylene	Blue (440, 470)
Fluorene	302 – 370 (maxima 302, 325)
Cholanthrene	Blue-violet (400 – 500)
Decacyclene	477 – 600 (476, 510, 552, 595)
Fluorocyclene	410 – 540 (415, 440, 466, 504, 435)

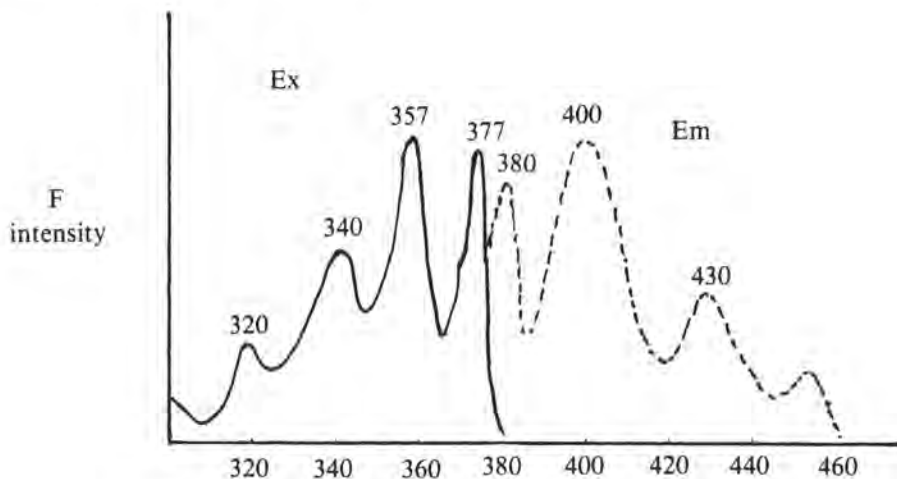
^aData from Ref. [10].

ตารางที่ 10.9 แสดงสารประกอบพวก Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ละลายในเฮกเซน สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้^a

Compound	Formula	Fluorescence Color
Pentacene		Red
1, 2-Benzotetracene		Yellow-green
8, 9-Benzochrysenes		Blue-green
1, 2, 5, 6-Dibenz-anthracene		Blue
1, 2-Benzopyrene		Blue-violet
Perylene		Blue
Coronene		Blue-violet

^aData from Ref. [10]

ตัวอย่างเช่น การหาปริมาณของ anthracene



รูปที่ 10.5 แสดง Ex และ Em สเปกตรัมของ anthracene

ในการหาปริมาณของ anthracene ใช้ excited wavelength 357 nm หรือที่ 377 nm แล้ววัดฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นอาจเป็น 380, 400 หรือ 430 nm ก็ได้

10.5.2 การหาปริมาณของสารโดยวิธีอ้อม (Indirect Method)

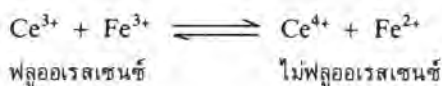
สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ สารที่จะทำการวิเคราะห์ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ แต่จะอาศัยคุณสมบัติของสารนี้ไปทำปฏิกิริยากับสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ แล้วทำให้ฟลูออเรสเซนซ์ลดลงไป ซึ่งเรียกว่า การเกิด Quenching ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่วิเคราะห์นั้นเติมลงไป และเราสามารถคำนวณหาปริมาณได้โดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) หรือในทางตรงข้าม สารที่จะทำการวิเคราะห์หรืออาจช่วยทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นก็ได้ ตัวอย่างเช่น

ในการหาปริมาณ Ce (III) ซึ่งให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ในกรด HCl

Ce (III) มีค่า λ_{ex} = 258 nm

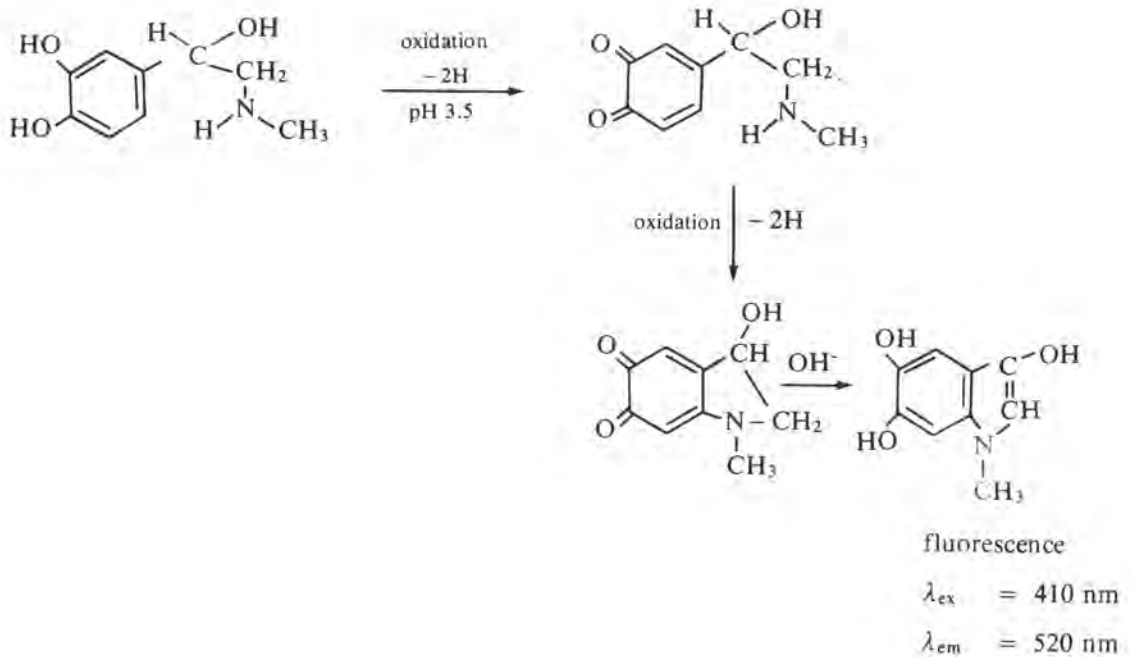
และให้ λ_{em} = 350 nm

Ce (III) สามารถหาปริมาณได้ถึงขนาด 1 ppm โดยอาศัย quenching effect ด้วย NO_3^- หรือ Fe^{3+} แม้จะมี La Yt และ Eu อยู่ด้วยก็จะไม่รบกวน



หรือเช่น Eosin จะถูก quenched (ทำลายฟลูออเรสเซนซ์) ได้ด้วย Ag^+ เมื่อมี 1, 10 phenanthroline อยู่ด้วย ที่ pH 3-8 วิธีการนี้สามารถนำไปหาปริมาณของ Ag^+ ได้ถึงขนาด 4 ppb โดยมีค่า precision $\pm 2.7\%$ แคตไอออนอื่นจะถูก masked ด้วย EDTA λ_{ex} ใช้ 300 nm และ λ_{em} ใช้ 545 nm มีเพียง Pd^{2+} และ CN^- เท่านั้นที่รบกวน

หรือในการหาปริมาณของ catecholamines ซึ่งได้จาก biosynthesis ดังเช่น



ลำดับต่อไปนี้เป็นตัวอย่างของการนำฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี มาใช้เพื่อการวิเคราะห์สารต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 10.10

ตารางที่ 10.10 แสดงการวิเคราะห์สารอนินทรีย์ด้วยการใช้วิธีการต่าง ๆ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
Ag	Butylrhodamine S	C	0.01
	Eosin + 1, 10-phenanthroline	Q	0.004
	8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid	C	0.013
	Lucigenin + H ₂ O	Cat	0.08
	1H-Naphtho[2,3-d] triazole	Q	0.1
	Resorufin	C	0.01
Al	Acid Alizarin Garnet R	C	0.007
	Coumarin derivatives	C	0.20
	Flazo Orange	C	0.001
	3-Hydroxy-2-naphthoic acid	C	0.01
	8-Hydroxyquinoline	C	0.10
	Lumogallion	C	0.014
	Mordant Blue 9	C	0.0005
	Morin	C	0.05

ตารางที่ 10.10 ต่อ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
	Pontachrome BBR	C	0.02
	Pontachrome VSW	C	0.02
	Quercetin	C	0.05
	N-Salicylidene--2-amino-3-hydroxyfluorene	C	0.001
	Salicylidene-o-aminophenol	C	0.0003
As	Gutzzeit test	Ch	1.0
	Uranyl nitrate	C	100
Au	Butylrhodamine B	C	0.1
	Kojic acid	C	0.1
	Rhodamine B	C	0.02
B	Acetylsalicylic acid	C	0.01
	Alizarin Red S	C	1.0
	1-Amino-4-hydroxy-anthraquinone	C	1.0
	Benzoin	C	0.04
	Cochineal Red	C	1.0
	Dibenzoylmethane	C	0.0005
	Flavonol	C	1.0
	Morin	C	1.0
	Phenylfluorone	C	1.0
	Quercetin	C	1.0
	Quinalizarin	C	0.01
	Resacetophenone	C	1.0
	Rhodamine 6G + salicylic acid	C	0.001
	Thoron I	C	0.005
Ba	Curcumin (Turmeric Yellow)	I	20
	Fluorexone	C	80.0
Be	1-Amino-4-hydroxy anthraquinone	C	0.2
	Benzoin	C	0.1
	1,4-Dihydroxyanthraquinone	C	0.2
	2-(2'-Hydroxyphenyl) benzothiazole	C	0.1
	8-Hydroxyquinaldine	C	0.001
	Morin	C	0.01
	Substituted 2-hydroxy-3-naphthoic acid	C	0.09
	Tetracycline + 5,5-diethyl-2-thiobarbituric acid	C	0.10
Br	Fluorescein	Ch	1.0
	Uranyl nitrate	Q	1.0
Ca	Calcein	C	0.2
	Curcumin	I	2.0

ตารางที่ 10.10 ต่อ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
	Fluorexone	C	1.0
	8-Hydroxyquinoline	C	1.0
	8-Quinolyldiazotone	C	0.2
Cd	2-(2'-Hydroxyphenyl)-benzoxazole	C	2
	8-Hydroxyquinoline	C	2
	Morin	C	2
	p-Tosyl-8-aminoquinoline	C	0.02
Ce	Sulfonaphtholazoresorcinol	C	0.05
Cl ⁻	Uranyl nitrate	Q	1.0
CN ⁻	Chloramine T + nicotinamide	C	0.3
	Pd complex of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid	Q	0.02
	Quinone	C	0.01
	Pyridoxal	Cat	0.02
Co	Al-Pontachrome BBR	Q	0.001
Cr	Triazinylstilbexone	Q	0.004
Cu	Cochineal Red	C	2.0
	2-(2'-Hydroxyphenyl) benzoxazole	Q	0.1
	1-(2-Hydroxypropyl) anabasin	Q	0.05
	Luminocupferron	C	0.1
	Rose Bengal Extra + 1,10-phenanthroline	C	0.1
	Salicylalazine	C	0.05
	Thiamine	C	0.1
	1,1,3-Tricyano-2-amino-1-propene	C	0.1
Cs	8-Hydroxyquinoline	C	0.1
Eu	Benzoyltrifluoroacetone	C	0.003
	Hexafluoroacetone-trioctyl phosphine oxide	C	0.0001
	Hexafluoro-2,4-pentanedione	C	0.001
	Tetradentate complex with 2-theonyltrifluoroacetone, collidine, and diphenyl-guanidine	C	1.0
	2-Theonyltrifluoroacetone	C	0.0001
F ⁻	Al-Acid Alizarin Garnet R complex	Q	0.001
	Al-morin complex	Q	0.2
	Mg-8-hydroxyquinoline complex	Q	0.01
	Ternary complex with Zr + Calcein Blue	C	0.01
	Zr-3-hydroxyflavone complex	Q	0.1
Fe	Cochineal Red	Q	1.0
	α -naphthoflavone	Q	1.0

ตารางที่ 10.10 ต่อ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
	Rhodamine S	Q	1.0
	2,2',6',2"-Terpyridyl	Q	0.01
Ga	5,7-Dibromo-8-hydroxyquinoline	C	0.1
	1-(2,4-Dihydroxyphenylazo)-2-naphthol-4-sulfonic acid	C	0.01
	8-Hydroxyquinaldine	C	0.02
	8-Hydroxyquinoline	C	0.05
	Lumogallion	C	0.1
	Morin	C	0.1
	2-(2'-Pyridyl) benzimidazole	C	0.07
	Rhodamine B	C	0.01
	Rhodamine 6G	C	0.1
	Salicylidene-o-aminophenol	C	0.1
	Solochrome Red ERS, Black AS, or 6BFA	C	0.01
	Sulfonaphtholazoresorcinol	C	0.001
	2,2',4'-Trihydroxy-5-chloro-1,1'-azobenzene-3-sulfonic acid	C	0.001
Ge	Benzoin	C	2.0
	Resacetophenone	C	100
	Trihydroxyanthraquinone	C	2.0
Hf	Flavonol	C	0.1
	Quercetin	C	1.0
Hg	Rhodamine B	Q	0.1
I	Luminol	Q	1.0
	α -Naphthoflavone	Q	1.0
	Uranyl nitrate	Q	1.0
In	8-Hydroxyquinaldine	C	0.2
	8-Hydroxyquinoline	C	0.04
	Morin	C	0.2
	2-(2'-Pyridyl) benzimidazole	C	0.1
	Pyronine Y	C	5.0
Ir	2,2',6',2"-Terpyridyl	C	2.0
K	8-Hydroxyquinoline	C	1.0
	Zinc uranyl acetate	C	1.0
Li	Dibenzothiazolylmethane	C	0.5
	8-Hydroxyquinoline	C	0.1
	Quercetin	C	1.0
	Uranyl nitrate	C	1.0
Mg	Fluoran	C	0.01
	8-Hydroxyquinoline	C	0.01

ตารางที่ 10.10 ต่อ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
	1-(8-hydroxyquinoline-7-azo)-2-naphthol-4-sulfonic acid	C	0.01
	1-(2-Hydroxy-3-sulfo-5-chlorophenylazo)-2'-hydroxynaphthalene	C	0.020
	Lumomagneson	C	0.004
	Bis(salicylideneamino)benzofuran	C	0.010
	Bissalicylideneethylene-diamine	C	0.0002
Mn	8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid	C	0.005
Mo	Carminic acid	C	0.9
	8-Hydroxyquinoline sodiumtetraphenylborate	C	0.2
	Primuline	C	20
NH ₄ ⁺	Hantzsch reaction	C	0.01
	NADH	E	0.01
NO ₃ ⁻	2,3-Diaminonaphthalene	C	0.01
Na	8-Hydroxyquinoline	C	1.0
	Zinc uranyl acetate	Q	1.0
Ni	Al-1-(2-pyridylazo)-2-naphthol	Q	0.00003
O ₂	Acriflavine	Ox	0.01
	9,10-Dihydroacridine	Ox	0.01
	Epinephrine	Ox	2.0
	Fluorescein	Ox	0.01
O ₃	9,10-Dihydroacridine	Ox	0.01
	2-Diphenylacetyl-1, 3-indandione-1-hydrazone	C	0.02
H ₂ O ₂	Diacetyl-2',7'-dichlorofluorescein	Ox	0.001
	p-Hydroxyphenylacetic acid	Ox	0.001
	Scopoletin	Ox	0.001
PO ₄ ³⁻	Al-morin	Q	0.05
	Molybdophosphate-Rhodamine B	C	0.04
	NADPH	E	0.01
Pb	Morin	C	5.0
Rb	8-Hydroxyquinoline	C	5.0
Ru	5-Methyl-1, 10-phenanthroline	C	1.0
S ²⁻	Fluorescein mercuriacetate	C	0.00005
	Pd complex with 8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid	Q	0.2
SO ₄ ²⁻	Th-morin	Q	24

ตารางที่ 10.10 ต่อ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
Sb	Luminol	C	0.05
	Rhodamine 6G	C	0.1
	2,4',7-Trihydroxyflavone	C	0.04
Sc	5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline	C	0.1
	Morin + phenazone	C	0.01
	Salicylsemicarbazide	C	1.0
Se	3,3'-Diaminobenzidine	C	0.02
	2,3-Diaminonaphthalene	C	0.02
Si	Ammonium molybdate	C	0.003
Sm	Hexafluoroacetone-trioctylphosphine oxide	C	0.1
	1,10-Phenanthroline + 2-phenylcinchoninic acid ternary complex	C	0.5
	2-Theonyltrifluoroacetone	C	0.0001
	2-Theonyltrifluoroacetone ternary complex	C	10.0
Sn	Flavonol	C	0.1
	8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid	C	0.005
	Morin	C	0.2
Sr	Fluorexone	C	80.0
Tb	Antipyrine + salicylate	C	0.1
	EDTA-sulfosalicylic acid	C	0.006
	Hexafluoroacetone-trioctylphosphine oxide	C	0.1
	4,4'-Methylenedi-[3-methyl-1-(2-pyridyl) pyrazol-5-ol]	C	0.025
	Phenyl salicylate	C	0.1
Th	1-Amino-4-hydroxyanthraquinone	C	8
	Flavonol	C	0.01
	Morin	C	0.02
	Quercetin	C	0.02
Ti	Salicylic acid	C	1.0
Tl	Cochineal Red	Q	1.0
	Rhodamine B	C	0.1
	Uranyl sulfate	Q	1.0
U	Morin	Q	0.05
V	Resorcinol	C	2.5
W	Carminic acid	C	0.3
	3-Hydroxyflavone	C	1.0
	Rhodamine B	Q	1.0

ตารางที่ 10.10 ต่อ

Ion	Reagent	Method ^a	Sensitivity (ppm)
Y	5,7-Dibromo-8-hydroxyquinoline	C	0.1
	8-Hydroxyquinoline	C	0.02
Zn	Benzoin	C	0.5
	8-Hydroxyquinoline	C	1.0
	Luminocupferron	C	0.2
	2,2'-Methylenedibenzo thiazole	C	2.0
	Picolinaldehyde-2-quinolyldiazone	C	0.026
	p-Tosyl-8-aminoquinoline	C	0.02
Zr	Flavonol	C	0.1
	Morin	C	0.02
	2,4',7-Trihydroxyflavone	C	0.05

^aKey: C, chelate; Cat, catalytic; Ch, chemical; E, enzymatic; I, indicator; Ox, oxidation; Q, quenching.

ตารางที่ 10.11 แสดงการหาปริมาณของสารโดยใช้เทคนิคทางฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี

Compound-solvent ^a	λ_{ex} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	τ (sec) ^c	Limit of detection ($\mu\text{g/mL}$)
Acenaphthene-E	300	515	—	0.2
Acetaldehyde 4-nitrophenylhydrazone-EPA	395	525	0.50	0.6
Acetone 4-nitrophenylhydrazone-EPA	392	525	0.48	0.1
p-Aminobenzoic acid-E	310	430	3.2	0.04
2-Aminofluorene-E	380	590	4.6	0.01
2-Amino-5-nitrobiphenyl-EPA	380	520	0.56	0.05
2-Amino-6-nitrobenzothiazole-EPA	375	515	0.41	0.08
2-Amino-7-nitrofluorene-EPA	340	520	0.38	4.5
Anabasine-E	270	390	6.2	0.010
Anthracene-E	300	462	—	0.05
Apomorphine HCl-E	320	470	3.1	0.001
Aramite-E	285	400	3.3	0.034
L-Arterol bitartrate-E	260	455	0.5	1.0
Atropine-E	w ^d	410	1.4	0.10
Aspirin-EPA	240	380	2.1	0.10
Azosulfamide-E	290	440	0.9	N.A.,U. ^e
Bayer 44646 ^f -EPA	290	460	0.6	0.12
Bayer 37344 ^f -EPA	275	435	< 0.2 ^g	0.10
Benzaldehyde-E	254	433	3.4	0.004
1,2-Benzanthracene-E	310	510	2.2	0.03

ตารางที่ 10.11 (ต่อ)

Compound-solvent ^a	λ_{ex} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	τ (sec) ^c	Limit of detection ($\mu\text{g/mL}$)
1,2-Benzfluorene-E	315	502	—	0.2
2,3-Benzfluorene-E	325	502	—	0.2
Benzocaine-E	310	430	3.4	0.007
Benzoic acid-E	240	400	2.4	0.005
Benzophenone 4-nitrophenylhydrazone-EPA	365	515	—	2.0
4-Benzoylbiphenyl 4-nitrophenylhydrazone-EPA	370	520	0.38	0.4
3,4-Benzpyrene-E	325	508	—	3.0
Benzyl alcohol-E	219	393	—	0.04
Biphenyl-E	270	385	1.0	0.004
Brucine-E	305	435	0.9	0.10
Butacaine sulfate-E	310	430	5.7	0.05
Caffeine-E	285	440	2.0	0.2
Caffeine-EPA	w ^d	410	—	1.0
Chlorobenzilate-E	275	415	< 0.2 ^g	0.01
4-Chlorophenol ^f -E	290	505	< 0.2 ^g	0.23
Chlorpromazine HCl-E	320	490	0.3	0.03
Chlortetracycline-E	280	410	2.7	0.05
Cinchophen-E	350	520	0.8	0.02
Cocaine HCl-E	240	400	2.7	0.01
Codeine-E	275	505	0.3	0.01
Co-Ral ^l -E	360	510	< 0.2 ^g	0.004
Cyclaine HCl-E	240	400	2.4	0.006
DDD ^f -E	265	415	< 0.2 ^g	0.01
DDE-E	270	425	0.2	0.001
DDT-E	270	420	0.2	0.0007
Diacetylsulfanilamide-E	280	405	1.3	0.001
Diazinon-E	275	395	5.0	0.03
1,2,5,6-Dibenzanthracene-E	340	550	1.3	0.03
2,6-Dichloro-4-nitroaniline-EPA	368	525	0.47	0.04
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-E	290	495	< 0.2 ^g	0.04
2,6-Diethyl-4-nitroaniline-EPA	388	525	0.66	0.19
Dicumarol-E	305	475	0.6	0.001
5,7-Dimethyl 1,2-benzacridine-E	310	555	0.6	0.03
N,N-Dimethyl-4-nitroaniline-EPA	398	525	0.54	0.05
Diphenadione-E	260	440	0.6	1.0
Dopamine-E	270	420	0.4	1.0
Ephedrine-E	225	390	3.6	0.20
L-Epinephrine bitartrate-E	270	410	0.4	1.0
Guthion-E	325	420	0.6	0.6
Hippuric acid-EPA	311	450	4.9	0.004
5-Hydroxy indoleacetic acid	w ^d	410	—	0.1

ตารางที่ 10.11 (ต่อ)

Compound-solvent ^a	λ_{es} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	τ (sec) ^c	Limit of detection ($\mu\text{g/mL}$)
DL-5-Hydroxytryptophan-E	315	435	6.3	0.1
Imidan ^f -E	305	440	0.8	0.006
Indoleacetic Acid-E	300	440	7.1	0.004
Indoleacetonitrile-E	285	438	7.1	0.005
Indolebutyric Acid-E	295	446	6.4	0.004
Indolecarboxylic Acid-E	290	429	5.5	0.0006
Indolepropionic Acid-E	292	445	6.5	0.004
Isolan ^f -E	285	395	1.6	2.0
Kelthane ^f -E	285	515	< 0.2 ^d	0.006
Kepone ^f -E	260	410	1.2	10.0
Lidocaine-E	265	400	1.1	1.2
Mebaral-E	240	380	2.2	0.01
Methoxychlor-E	275	380	0.7	0.005
N-Methyl-4-nitroaniline-EPA	390	522	0.5	0.05
Methycaine HCl-E	240	400	2.7	0.006
Morphine-E	285	500	0.3	0.01
Morphine sulfate-E	265	460	0.8	10.0
Naphthacene-E	300	518	--	0.001
Naphthalene-EPA	310	475	1.8	0.7
Naphthalene-E	290	505	--	0.06
β -Naphthylamine-E	270	505	2.3	0.03
α -Naphthol-E	320	475	1.2	0.003
Narceine-E	290	440	0.5	0.1
NIA 10242-E	285	400	1.6	0.007
Nicotine-E	270	390	5.2	0.01
5-Nitroacenaphthene-EPA	380	540	--	0.5
4-Nitroaniline-EPA	380	510	0.6	0.02
9-Nitroanthracene-EPA	248	488	--	0.13
1-Nitroanthraquinone-EPA	250	490	0.28	0.25
4-Nitrobiphenyl-EPA	330	480	--	0.2
2-Nitrofluorene-EPA	340	517	0.40	0.04
6-Nitroindole-EPA	372	520	0.41	0.08
1-Nitronaphthalene-EPA	340	520	--	1.5
2-Nitronaphthalene-EPA	260	500	0.36	0.15
4-Nitro-1-naphthylamine-EPA	400	578	--	60
3-Nitro-N-ethylcarbazole-EPA	315	475	0.37	0.01
2-Nitro-N-methylcarbazole-EPA	345	530	--	2.8
3-Nitro-N-methylcarbazole-EPA	--	--	0.39	0.2
4-Nitro-2-toluidine-EPA	375	520	0.53	0.1
4-Nitrophenylhydrazine-EPA	390	520	0.48	0.03
4-Nitrophenol-E	355	520	< 0.2 ^d	0.0002

ตารางที่ 10.11 (ต่อ)

Compound-solvent ^a	λ_{ex} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	τ (sec) ^c	Limit of detection ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
DL-Normetanephring-E	275	440	0.6	0.1
Nornicotine-E	270	390	5.3	0.01
Orthotran-E	260	395	< 0.2 ^d	0.02
Papaverine HCl-E	260	480	1.5	0.0005
Parathion-E	360	515	< 0.2 ^d	0.08
Phenacetin-EPA	w ^d	410	--	0.2
Phenanthrene-E	300	499	--	0.002
Phenanthrene-EPA	340	465	2.6	1.0
Phenindione-E	235	395	< 0.2 ^d	1.0
Phenobarbital	240	380	1.8	0.10
Phenylalanine-E	270	385	--	0.4
Phenylephrine HCl-E	290	390	2.4	0.01
Phthalylsulfacetamide-E	290	415	0.6	0.001
Phthalylsulfathiazole-E	305	405	0.9	1.0
Procaine HCl-E	310	430	3.5	0.01
Propionaldehyde 4-nitrophenylhydrazone-EPA	395	525	0.50	0.06
Pyridine-E	310	440	1.4	0.0001
Pyrene-E	329	515	--	0.2
Quinidine sulfate-E	340	500	1.3	0.04
Quinine HCl-E	340	500	1.3	0.04
Retene-E	265	510	--	0.001
Ronnel ^f -E	300	475	< 0.2 ^d	0.006
Rutonal-E	240	380	2.5	0.2
Serotonin-E	w ^d	410	--	50
Salicylic acid-E	430	315	6.2	0.05
Sevin ^f -E	300	510	2.0	0.004
Strychnine phosphate-E	290	440	1.2	0.050
Sodium sulfathiazole-E	315	410	1.4	1.0
Succinyl sulfathiazole-E	310	420	1.3	N.A.U. ^e
Sulfabenzamide-E	305	405	0.7	0.001
Sulfacetamide-E	280	410	1.3	0.0001
Sulfadiazine-E	275	410	0.7	0.001
Sulfaguanidine-E	305	405	0.7	0.01
Sulfamerazine-E	280	405	0.7	0.0001
Sulfamethazine-E	280	410	0.8	0.0001
Sulfanilamide-E	270	405	1.3	0.001
Sulfapyridine-E	310	440	1.4	0.0001
Sulfathiazole-E	310	420	0.9	1.0
Sulfenone-E	275	391	< 0.2 ^d	0.0005
Tedion ^f -E	295	410	< 0.2 ^d	0.002
1,2,4,5-Tetramethylbenzene-EPA	275	392	4.5	1.8

ตารางที่ 10.11 (ต่อ)

Compound-solvent ^a	λ_{ex} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	τ (sec) ^c	Limit of detection ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Thebaine-E	315	500	1.0	1.0
2-Tolidine-E	310	510	2.2	0.02
Toxaphene ^f -E	240	390	1.9	0.20
Triphenylene-E	291	461	15	0.0002
Trithion ^f -E	305	430	< 0.2 ^g	0.003
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid-E	300	480	< 0.2 ^g	0.005
2,4,5-Trichlorophenol-E	305	485	< 0.2 ^g	0.03
Tromexan-E	295	460	0.6	0.01
Tronothane HCl-E	300	410	1.2	0.02
Tryptophan-E	295	440	1.5	0.002
Tyrosine-E	300	405	5.3	0.01
N-Acetyl-L-tyrosine ethyl ester-H	250	395	—	0.1
U.C. 10854 ^f -E	270	385	3.9	1.9
Warfarin-E	305	460	0.8	0.01
Yohimbine HCl-E	290	410	7.4	0.01
Zechtran ^f -E	285	440	0.5	0.006

^aSolvents: E = ethanol; EPA = 5:5:2 volume ratio of diethyl ether, isopentane, ethanol; H = 5:11:4 volume ratio of water, methanol, and ethanol; O = octane.

^bOnly the most intense wavelength peaks (uncorrected for instrumental response) are given.

^cDecay times τ are given for the peak wavelengths.

^dNo monochromator or filter was used on the exciting radiation.

^eNot analytically useful.

^fThese compounds are pesticides.

^gDecay times τ shorter than 0.2 sec cannot be measured by using an ordinary time-base recorder.

ตารางที่ 10.12 แสดงการวิเคราะห์สารพวก Pesticides และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง โดยใช้เทคนิคทางฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี^a

Compound	Excitation Wavelength (nm)	Bands ^c (nm)	Lifetime (sec)	Detection Limit (g/mL)	Linear Range of Calibration Curve (moles/liter)
DDT (p,p')	270	420	0.2	7×10^{-10}	$1.9 \times 10^{-9} - 7.4 \times 10^{-4}$
DDD (p,p')	265	415	0.2	1×10^{-9}	$4.0 \times 10^{-9} - 1.3 \times 10^{-3}$
DDE (p,p')	270	425	0.2	2×10^{-10}	$1.0 \times 10^{19} - 8.8 \times 10^{-4}$
Kelthane	285	515	0.2	6×10^{-10}	$1.5 \times 10^{-9} - 7.1 \times 10^{-4}$
Methoxychlor	275	380,395,360	0.7	4×10^{-10}	$1.3 \times 10^{-9} - 9.6 \times 10^{-5}$
Chlorobenzilate	275	415,425,445, 400,480	0.2	1×10^{-9}	$3.0 \times 10^{-9} - 1.2 \times 10^{-3}$
Toxaphene	240	390	1.9	2×10^{-8}	$4.5 \times 10^{-8} - 7.5 \times 10^{-3}$
Kepone	260	410	1.25	1×10^{-6}	$2.0 \times 10^{-6} - 9.2 \times 10^{-3}$
Sulfenone	275	390,375	0.2	5×10^{-10}	$2.0 \times 10^{-9} - 9.1 \times 10^{-5}$
Tedion	295	410	0.2	2×10^{-10}	$5.0 \times 10^{-8} - 6.3 \times 10^{-5}$
Orthotran	260	395,375	< 0.2	2×10^{-9}	$8.0 \times 10^{-9} - 7.5 \times 10^{-4}$
Parathion	360	515,490	< 0.2	8×10^{-9}	$3.0 \times 10^{-8} - 9.0 \times 10^{-4}$
Ronnel	300	475	< 0.2	6×10^{-10}	$2.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-3}$
Co-Ral	335	510,490	< 0.2	4×10^{-11}	$1.0 \times 10^{-10} - 8.3 \times 10^{-6}$
Diazinon	275	395,375	5.0	3×10^{-9}	$1.0 \times 10^{-8} - 1.1 \times 10^{-3}$
Guthion	325	420,400	0.6	6×10^{-8}	$2.0 \times 10^{-7} - 7.5 \times 10^{-3}$
Trithion	305	430	< 0.2	3×10^{-10}	$8.0 \times 10^{-10} - 8.5 \times 10^{-5}$
Aramite	285	400	3.3	3×10^{-10}	$1.0 \times 10^{-9} - 1.1 \times 10^{-4}$
Isolan	285	395	1.6	2×10^{-7}	$1.0 \times 10^{-6} - 1.3 \times 10^{-2}$
Sevin	300	510,475,485, 550	2.0	4×10^{-9}	$2.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-3}$
Zectran	285	440	0.45	5×10^{-9}	$2.5 \times 10^{-8} - 7.6 \times 10^{-4}$
Bayer 44646	290	460	0.60	1×10^{-8}	$6.0 \times 10^{-8} - 6.3 \times 10^{-4}$
Bayer 37344	275	435	< 0.2	1×10^{-8}	$5.0 \times 10^{-8} - 7.4 \times 10^{-3}$
NIA 10242	285	400	1.6	7×10^{-10}	$3.0 \times 10^{-9} - 7.3 \times 10^{-4}$
U.C. 10854	270	385	2.9	2×10^{-9}	$1.0 \times 10^{-8} - 1.2 \times 10^{-3}$
Imidan	305	440, 420	0.75	6×10^{-10}	$2.0 \times 10^{-9} - 8.5 \times 10^{-5}$
2,4,5-Trichloro-phenoxiacetic acid	300	480	< 0.2	5×10^{-10}	$2.0 \times 10^9 - 9.5 \times 10^{-4}$
2,4-Dichloro-phenoxiacetic acid	290	495	< 0.2	4×10^{-9}	$2.0 \times 10^{-8} - 8.6 \times 10^{-4}$
p-Chlorophenol	290	505	< 0.2	2×10^{-8}	$1.8 \times 10^{-7} - 1.1 \times 10^{-2}$
2,4,5-Trichlorophenol	305	485	< 0.2	3×10^{-9}	$1.5 \times 10^{-8} - 6.7 \times 10^{-4}$
p-Nitrophenol	355	520,495	< 0.2	2×10^{-11}	$1.7 \times 10^{-10} - 5.0 \times 10^{-4}$
1-Naphthol	320	475,495,520	1.15	1.7×10^{-9}	$- 8.4 \times 10^{-4}$

^aData from Ref. 10.

^bAll measurements were made in absolute alcohol.

^cThe bands quoted first are suitable for use as key bands.

ตารางที่ 10.13 แสดงการวิเคราะห์ยาและสารที่ใช้ทางยาโดยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

Substance	Conditions	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Sensitivity (ppm)
Actinomycin D	H ₂ O ₂ -OH ¹	370	420	0.10
5-Alkyl-2-thiohydantoin	2,6-Dichloroquinone chlorimide	365	520	0.5
N-Allylnormorphine	pH 1	285	355	0.1
Aminopyrterin	pH 7	280,370	460	0.02
p-Aminosalicylic acid	pH 11	300	405	0.004
Amobarbital	pH 13	265	410	0.1
Ampicillin	Hydrolysis	346	422	0.05
Antimycin	pH 7-9	350	420	0.1
Aspirin	HOAc-CHCl ₃	280	335	0.01
Atabrine	Caffein-0.05M H ₂ SO ₄	365	540	0.01
Atropine	Eosin Y	365	556	1.0
Berberine	DMF	380	510	0.20
Bromolysergic acid diethylamide	pH 1	315	460	0.10
Chlorpromazine	pH 11	350	480	0.01
Clortetracycline	pH 11	355	445	0.02
Cinchonidine	pH 1	315	420	0.01
Cinchonine	pH 1	320	420	0.01
Codeine	pH 1	245,285	350	0.1
Desmethylimipramine	pH 14	295	415	0.1
Diethylstilbestrol	Ethanol	360	435	0.2
Digitalis	HCl-glycerol	350	465	0.1
Diphenhydramine	Tinopal GS	365	450	0.20
Dipyridamole	CHCl ₃	438	540	0.1
Emetine	pH 1	290	320	0.05
Epinephrine	Ferricyanide	365	Yellow-green	0.002
Eserine	pH 1-7	265,315	350	0.04
Estrogens	pH 13	490	546	0.1
Harmine	pH 1	300,365	400	0.002
Hydroxyamphetamine	pH 1	275	300	0.05

ตารางที่ 10.14 แสดงการวิเคราะห์ยาชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์^a สเปกโทรสโกปี

Compound ^b	Excitation wavelength (nm)	Bands ^c (nm)	Lifetime (sec)	Detection limit (g/mL)
Mebaral	240	380	2.2	1×10^{-8}
Rutonal	240	380	2.5	2×10^{-8}
Benzocaine	310	430,420,440	5.3	7×10^{-9}
p-Aminobenzoic acid	310	430,420,440	3.2	4×10^{-9}
Butacaine sulfate	310	430,420,440	5.7	5×10^{-8}
Cyclaine hydrochloride	240,290	400,410,370	2.4	6×10^{-9}
Metycaine hydrochloride	240,290	400,410,370	2.7	6×10^{-9}
Benzoic acid	240,290	400,410,370	2.3	5×10^{-9}
Quinidine sulfate	340,250	500,470	1.3	5×10^{-8}
Quinine hydrochloride	340,250	500,470	1.3	4×10^{-8}
Lidacaine	265, 340	400	1.1	1.2×10^{-6}
Caffeine	285,245	440	2.0	2×10^{-7}
Ephedrine	225,401	390	3.6	2×10^{-7}
Phenylephrine hydrochloride	290,240	390	2.4	1×10^{-8}
Tronothane hydrochloride	300,240	410	1.2	2×10^{-8}
Cinchophen	350,270	520,490	0.8	2×10^{-8}
Physostigmine sulfate	315,260	420	3.6	3×10^{-8}
Chlortetracycline	280	410	2.7	5×10^{-8}

^aData from Ref. [10]

^bThe compounds are arranged according to their structural similarities and the relationships between their spectral characteristics.

^cThe first band given is suitable for use as key band, and the phosphorescent lifetime and limits of detection have been determined for this.

ตารางที่ 10.15 แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณของสารพวก steroids โดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี

Substance	Reagent	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Sensitivity (ppm)
Aldosterone	Conc. H ₂ SO ₄	365	Blue	0.1
Bile acids	H ₃ PO ₄	365	430	1.0
	H ₂ SO ₄	436	500	0.1
Cholesterol	Trichloromethane- H ₂ SO ₄	546	600	0.1
Corticosterone	H ₂ SO ₄	436	525	0.01
Cortisone	t-BuOK	380	580	0.01
11-Dehydrocorticosterone	t-BuOK	380	580	0.01
Equilenin	EtOH	290,340	370	0.001
Estradiol-17 β	POCl ₃ - H ₂ SO ₄	440	490	0.001
Estriol	POCl ₃ - H ₂ SO ₄	440	480	0.001
Estrone	POCl ₃ - H ₂ SO ₄	440	480	0.001
Hydrocortisone	H ₂ SO ₄	436	530	0.10
	t-BuOK	380	580	0.01
	Periodate	475	530	0.01
	H ₂ SO ₄	468	524	0.1
17-Hydroxycorticosterone	H ₂ SO ₄ -EtOH	420	570	0.05
17-Hydroxy-11-deoxycorticosterone	t-BuOK	380	580	0.01
Methyl testosterone	H ₃ PO ₄	365	430	0.10
Prednisolone	H ₂ SO ₄ -EtOH	420	570	0.50
Progesterone	t-BuOK	380	580	0.01
Testosterone	t-BuOK	380	580	0.01
	Enzyme	450	540	0.001
Tetrahydrocortisone	H ₂ SO ₄	436	525	0.2

ตารางที่ 10.16 แสดงการวิเคราะห์หิวิตามินต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี

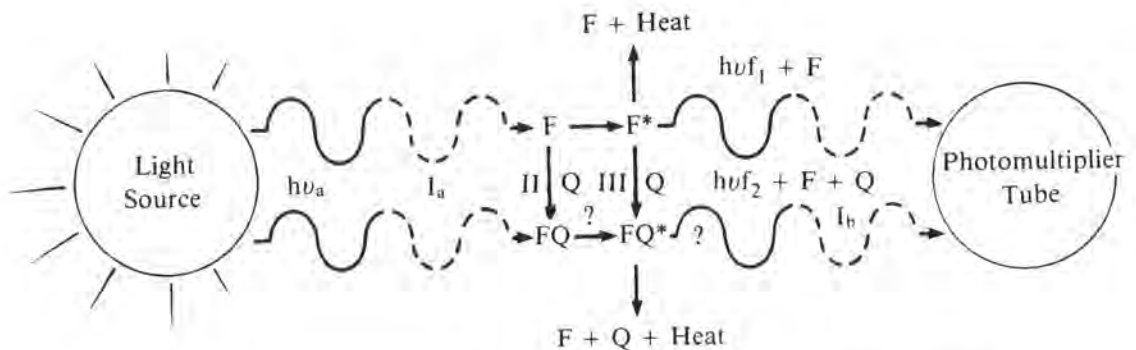
สารประกอบ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Sensitivity ($\mu\text{g/mL}$)
วิตามิน A	345	490	0.3
วิตามิน B ₁	—	—	non fluorescence
วิตามิน B ₂	370,440	565	0.0012
วิตามิน B ₆	340	400	—
วิตามิน B ₁₂	275	305	0.003
วิตามิน C	350	430	0.15
วิตามิน D	390	480	—
วิตามิน E	295	340	0.6
วิตามิน K	—	—	non fluorescence

นอกจากนี้ เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี ยังใช้เป็นประโยชน์ในการศึกษาเอนไซม์ พวกคาร์โบไฮเดรต พวก inhibitors และอื่น ๆ ซึ่งอาจจะนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ เช่น นำไปเป็นวิธีวัดทางเทคนิคโครมาโทกราฟี เช่น ใช้เป็นวิธีวัดใน TLC (thin layer chromatography) หรือ HPLC (high performance liquid chromatography) เป็นต้น

10.6 ข้อจำกัดของเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ และฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี (Limitations of Fluorescence and Phosphorescence)

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า สัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์หรือฟอสฟอเรสเซนซ์ที่วัดได้นั้นเป็นความเข้มของแสงที่เกิดขึ้นสูงกว่า background แต่ค่าความเข้มของแสงที่วัดได้มิได้หมายความว่ามีการหักล้าง background ออกแล้ว ดังนั้น background จึงเป็นปัญหาใหญ่ของเทคนิคนี้ เพราะจะเป็นส่วนที่ทำให้ค่า detection limit ผิดพลาดได้ แพลกเตอร์ที่สำคัญที่ทำให้ค่า luminescence blank สูงขึ้นมีดังนี้ คือ

1. จาก Raman Scattering ที่เกิดจากตัวทำละลาย
2. ลูมิเนสเซนซ์ที่เกิดจากเซลล์ที่ใส่สาร
3. แสงที่กระเจิงจาก Tyndall และ Rayleigh effects
4. ฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากสารเจือปนในตัวทำละลาย
5. สารตัวอย่างเกิดการสลายตัวด้วยแสง



รูปที่ 10.6 แสดงกระบวนการเกิด inner-filter และ quenching ฟลูออเรสเซนซ์

F = สารประกอบที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์

Q = เป็น quencher

I_a = การดูดกลืนแสงที่ใช้กระตุ้น

I_b = การดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น

II = static quenching

III = dynamic quenching

? = เป็นกระบวนการอย่างหนึ่งซึ่งไม่จำเป็นจะต้องเกิดขึ้น

6. ฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง

7. สารเจือปนอยู่ทั้งในสารตัวอย่างและในตัวทำละลาย อาจไปทำให้เกิด quenching แบ่งออกได้เป็น static quenching (II) ซึ่งเป็นการเกิดอันตรกิริยาของสารที่เป็นตัวเกิดฟลูออเรสเซนซ์ที่สถานะพื้นกับ λ_{ex} และ λ_{em} แล้วทำให้สเปกตรัมเปลี่ยนไป อีกอย่างหนึ่งเรียกว่า Dynamic quenching (III) ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ที่อยู่ในสถานะกระตุ้น ซึ่งจะทำให้ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ ฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงเนื่องจากเกิด "inner-filter" effect (I_a) ซึ่งเป็นผลจากสารตัวอย่างและโมเลกุลของสารอื่น ๆ ที่มากเกินไปดูดกลืนแสงที่จะใช้กระตุ้นหรือจำนวนโฟตอนที่ใช้กระตุ้น และถ้าฟลูออเรสเซนซ์ถูกดูดกลืนด้วยเป็น I_b ก็จะทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 10.6

กระบวนการ inner-filter effect กับ quenching effect นั้นแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เพราะการเกิด quenching นั้นเป็นการลด quantum efficiency แต่ inner-filter effect เป็นเพียงกระบวนการลดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์โดยการลดจำนวนโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นหรือลดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลง

ในการเกิด quenching ของสารฟลูออเรสเซนซ์อาจเกิดขึ้นโดยเฉพาะกับสารอย่างหนึ่ง แต่อาจจะไม่เกิดกับสารอีกชนิดหนึ่ง เช่น โบรมีน จะทำลายฟลูออเรสเซนซ์เฉพาะที่เกิดกับ Benzopyrene ในของผสมระหว่าง Benzopyrene กับ Benzofluoranthene ซึ่งสามารถนำไปใช้หาปริมาณของสารแต่ละชนิดในของผสมได้ ด้วยเหตุนี้ ถ้าการเกิด quenching มีได้เฉพาะสารแล้วก็สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางเคมีได้ด้วย Stern-Volmer ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของ quencher ซึ่งเขียนเป็นสมการได้เป็น

$$\frac{I_f^0}{I_f} = k_{sv} [Q] + 1$$

I_f^0 = fluorescence intensity เมื่อไม่มี quencher Q

I_f = fluorescence intensity เมื่อมี quencher Q

k_{sv} = Stern-Volmer constant

ดังนั้น เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{I_f^0}{I_f}$ กับความเข้มข้นของ quencher จะได้กราฟเป็นเส้นตรง โดยมีค่า slope = k_{sv} และมีจุดตัดเป็น +1 ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ในการนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอ้อม

8. ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการศึกษาทางฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ได้แก่ เรื่องการสลายตัวของโมเลกุลด้วยแสงยูวี จึงทำให้ฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นลดลงเรื่อย ๆ เมื่อถูกกับแสงนาน ๆ เข้า เช่น การศึกษาการสลายตัวของควิโนน ดังแสดงในตารางที่ 10.17

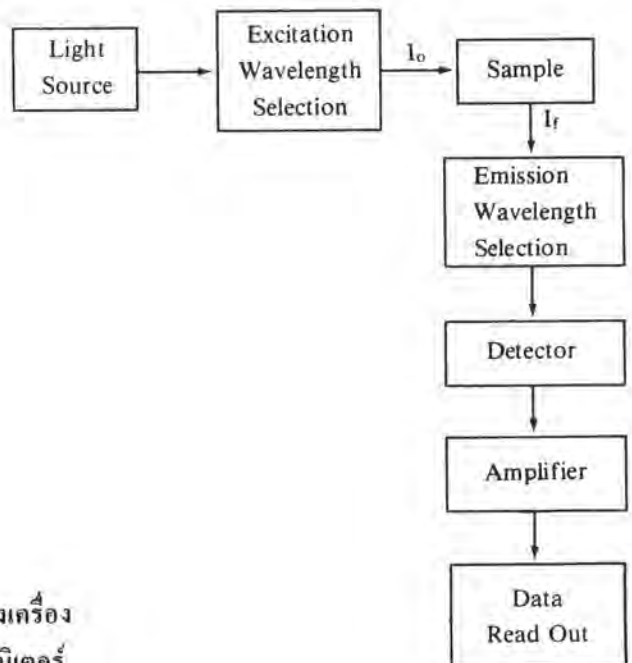
ตารางที่ 10.17 แสดงผลของแสงยูวีที่มีต่อการสลายตัวของ 0.01 $\mu\text{g/mL}$ สารละลายควินิน

เวลาของการถูกแสงยูวี (min)	ฟลูออเรสเซนซ์ (% of initial)
0	100
2	99.4
21	92.9
38	88.1
86	74.3
97	69.2
100	68.0

ดังนั้น ในทางปฏิบัติ ให้อ่านค่าฟลูออเรสเซนซ์ 3 ครั้ง (นำมาเฉลี่ย) เพื่อลดการสลายตัว

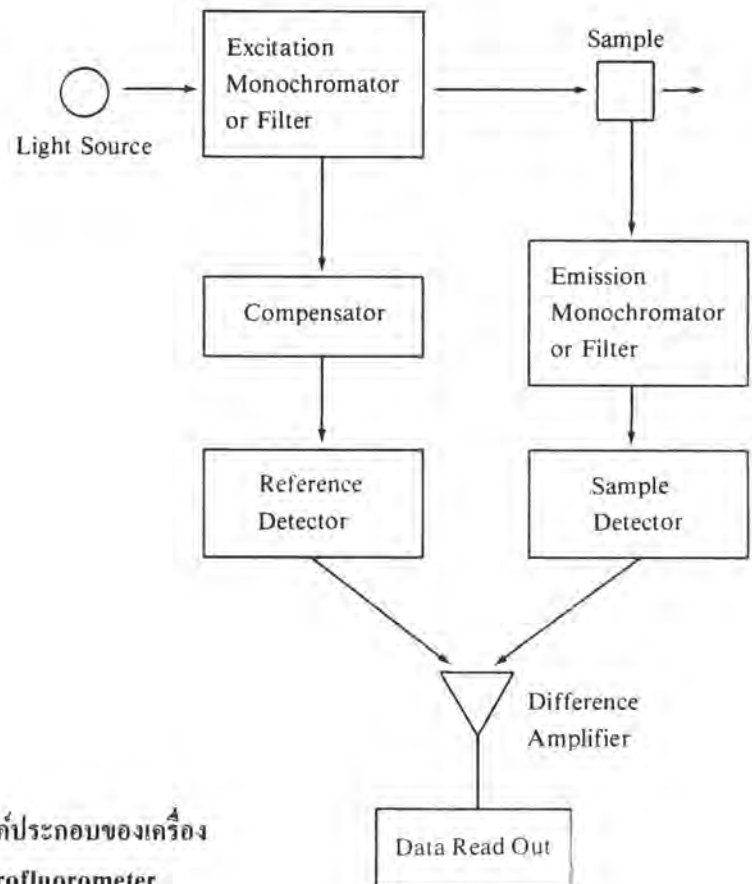
10.7 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์นั้นก็คล้าย ๆ กับเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ บางอย่างก็เหมือนกัน ส่วนประกอบของเครื่องดังแสดงในรูปที่ 10.7



รูปที่ 10.7 แสดงแผนภาพองค์ประกอบของเครื่องฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

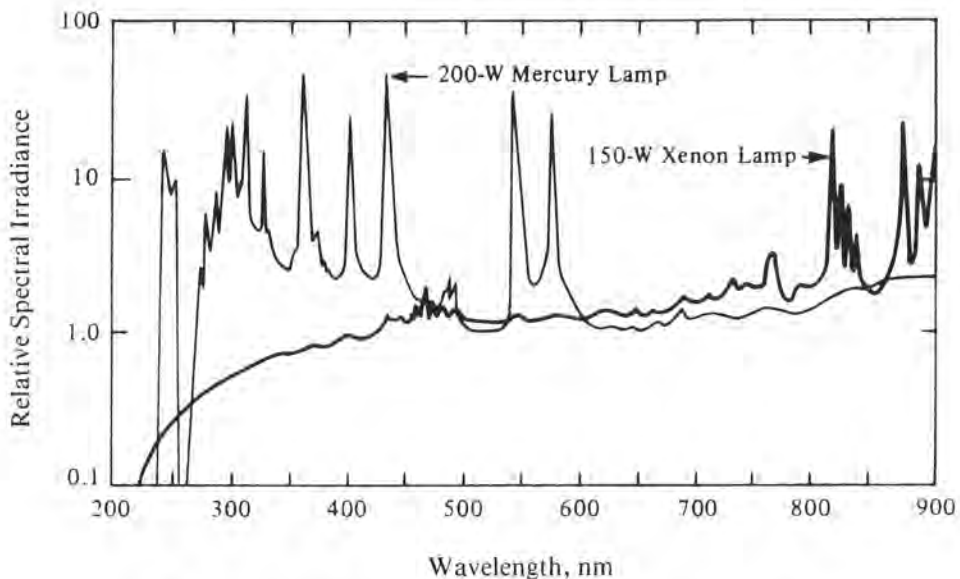
เครื่องฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์เกือบทั้งหมดมักจะเป็น double beam เพื่อใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับความไม่คงที่ของแหล่งกำเนิดแสง (source) และ background ดังได้กล่าวมาแล้ว และองค์ประกอบของเครื่องมือดังแสดงในรูปที่ 10.8



รูปที่ 10.8 แสดงแผนภาพขององค์ประกอบของเครื่อง Double Beam Spectrofluorometer

10.7.1 แหล่งกำเนิดแสง (Light Source) เนื่องจากเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ต้องการแสงที่ค่อนข้างมีความเข้มสูงกว่าหลอดทังสเตน หรือไฮโดรเจน เพราะสภาพไวของเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสง หรือกำลังของแสงที่จะใช้ทำให้สารเกิดการกระตุ้น ดังนั้น หลอดกำเนิดแสงที่นิยมใช้กันก็มี Xenon-arc lamp และ Mercury-arc lamp

Xenon-arc lamp เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มของแสงสูงในช่วงความยาวคลื่น 250–600 nm ซึ่งเป็น continuum radiation และให้พิคที่ประมาณ 470 nm ดังแสดงในรูปที่ 10.9 Xenon lamp โดยทั่วไปใช้ประมาณ 150 W Xenon lamp จำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องที่ควบคุมกำลังไฟฟ้าให้คงที่อย่างดี เพราะมีผลต่อเสถียรภาพและอายุของหลอดมาก ถ้ากำลังไฟฟ้าที่ผ่านเข้าไปไม่คงที่ จะเกิดอาร์กเคลื่อนตำแหน่งไปทำให้เกิดปัญหาขึ้นกับสเปกตรัมที่เปลี่ยนไป



รูปที่ 10.9 แสดงสเปกตรัมของ Xenon และ Mercury lamps

Mercury-arc lamp หลอดที่ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงชนิดนี้มักจะใช้กับเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ที่ใช้ filter เพราะแสงที่ให้ออกมาก่อนข้างคงที่และมีความเข้มสูง Mercury-arc lamp ให้ resonance lines ของสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่น 365–366 nm แต่ยังมีเส้นสเปกตรัมอื่น ๆ ที่ใช้ประโยชน์ได้ คือ ที่ 254, 302, 313, 405, 436, 546, 577 และ 579 nm ตารางที่ 10.18 แสดง relative intensities ของแต่ละเส้นสเปกตรัม

ตารางที่ 10.18 แสดง Relative Intensity ของ Spectral Lines ของ Mercury-arc lamp

Line (nm)	Relative Intensity	Lines (nm)	Relative Intensity
253.7	1	366.3	1.4×10^{-3}
296.5	6.0×10^{-3}	404.7	8.9×10^{-3}
302.2	1.1×10^{-2}	435.8	1.7×10^{-2}
312.2	7.1×10^{-3}	546.1	1.2×10^{-2}
313.2	1.1×10^{-2}	577.0	1.7×10^{-3}
365.0	8.9×10^{-3}	579.0	1.8×10^{-3}
365.5	2.1×10^{-3}		

แม้บางส่วนของสเปกตรัมที่ได้จาก Mercury-arc lamp จะสูงกว่า Xenon lamp หลายเท่าก็ตาม Mercury-arc lamp ไม่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงในเครื่อง Scanning Spectrofluorometer ได้ เพราะ excitation spectrum ของ Mercury ไปซ้อนพอดีกับ excitation spectrum ของสารตัวอย่าง

สำหรับการพัฒนาใหม่ ๆ ได้มีการใช้เลเซอร์เข้ามาเป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งสามารถให้ monochromatic radiation ในช่วง 360–650 nm

10.7.2 ฟิลเตอร์และโมนโครเมเตอร์ (Filter and Monochromator)

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า ถ้าเป็นเครื่องฟลูออโรมิเตอร์โดยทั่วไปจะใช้ชุดฟิลเตอร์ หรือใช้ interference filter สำหรับตัดแสงบางช่วงที่ไม่ต้องการออกไป แต่ถ้าเป็นสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ โดยทั่วไปจะใช้เกรตติง (grating) เป็นโมนโครเมเตอร์ ซึ่งสามารถเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการสำหรับทำให้เกิดการกระตุ้น และเลือกใช้ความยาวคลื่นของฟลูออเรสเซนซ์ที่จะวัดได้ ลักษณะของฟิลเตอร์และเกรตติงก็เป็นแบบเดียวกันกับที่ใช้ในเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังได้กล่าวมาแล้ว เพียงแต่ต่างกันที่มีสองโมนโครเมเตอร์ คือ เป็น excitation monochromator และ emission monochromator ซึ่งจะต้องอยู่ในตำแหน่ง 90° ของกันและกัน

10.7.3 เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (Sample Cell หรือ Cuvette)

เซลล์ที่ใช้โดยทั่วไปเป็นเซลล์สี่เหลี่ยมด้านเท่า ทำด้วยควอร์ตซ์ เพื่อให้แสงยูวีผ่านได้ มีขนาด 1 ซม. ในทั้ง 4 ด้าน เซลล์ชนิดนี้ค่อนข้างราคาแพง จำเป็นต้องใช้ด้วยความระมัดระวังและรักษาความสะอาดให้ดีด้วย

10.7.4 เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Detector) เนื่องจากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่จะวัดโดยทั่วไปมีความเข้มต่ำ จำเป็นต้องมีการขยายสัญญาณที่วัดได้ด้วยหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์มาก ๆ หรืออาจใช้ diode array detectors ก็ได้ ฟลูออเรสเซนซ์โดยทั่วไปก็อยู่ในช่วงของยูวี-วิสิเบิลอยู่แล้ว ดังนั้น detectors จึงใช้เหมือนกับเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ได้เลย

สำหรับเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์จะต่างไปจากเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์อีกอย่างหนึ่งก็คือ จะมี detectors 2 ตัว ตัวหนึ่งวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากสารตัวอย่าง อีกตัวหนึ่งเรียก reference detector เพื่อใช้สำหรับทำ spectral correction อันเนื่องมาจากข้อบกพร่องหรือขีดจำกัดต่าง ๆ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น และรูปเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 10.10 และ 10.11

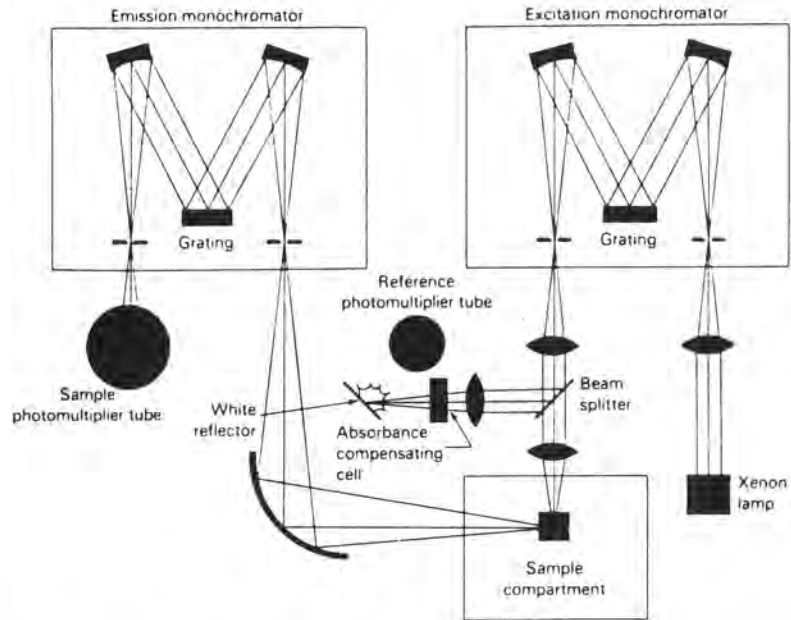
10.7.5 เครื่องบันทึกสัญญาณและเครื่องประมวลผล (Signal Processors and Data Read Out)

สัญญาณที่ได้จากเครื่องวัดจะผ่านเข้ากระบวนการอิเล็กทรอนิกส์แล้วแสดงผลออกมา อาจเป็นอย่างไรอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างก็ได้ต่อไปนี้

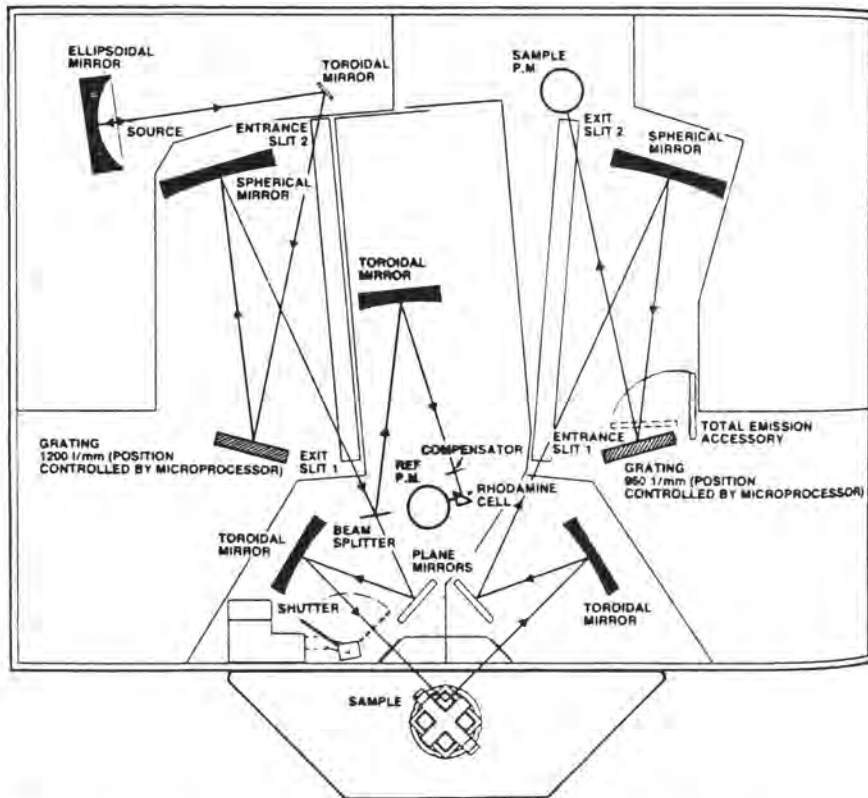
- ก. มิเตอร์หรือดิจิตัลมิเตอร์
- ข. เรคอร์ดเตอร์ หรือพรินเตอร์
- ค. คอมพิวเตอร์ หรือไมโครโปรเซสเซอร์

ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3

สำหรับฟอสฟอริมิเตอร์ (phosphorimeter) ซึ่งเป็นเครื่องที่จะใช้วัดฟอสฟอเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นกับสารตัวอย่างนั้น จะมีลักษณะคล้ายกันอย่างมากกับเครื่องฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ มีอยู่เพียง 2 ส่วนที่ต่างกัน คือ



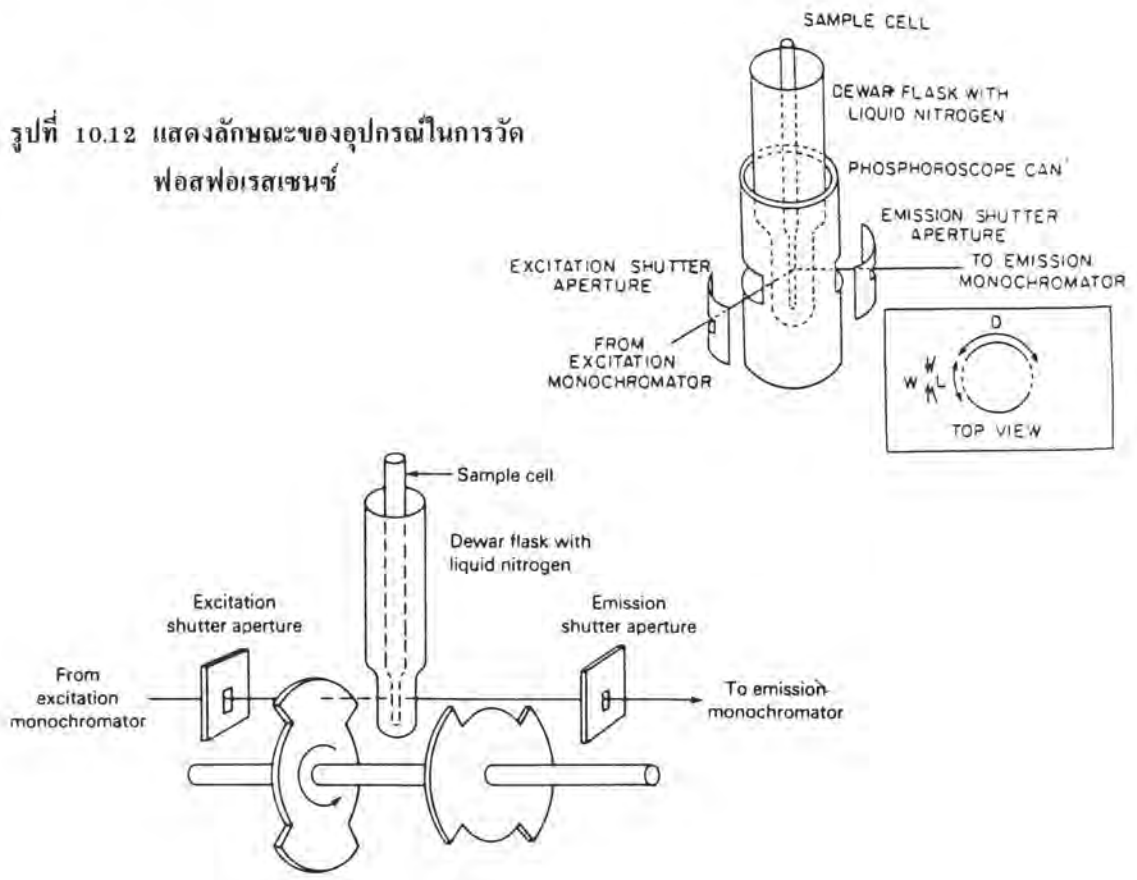
รูปที่ 10.10 แสดงลักษณะการออกแบบของเครื่อง Double-Beam Spectro-Fluorometer



รูปที่ 10.11 แสดงลักษณะการออกแบบของเครื่อง Double-Beam Spectro-Fluorometer

1. ตามปกติการวัดฟอสฟอเรสเซนซ์จะต้องวัดที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ เช่น วัดที่อุณหภูมิต่ำของไนโตรเจนเหลว (77 K) เพื่อป้องกันการเกิดหรือทำให้เกิด quenching น้อยที่สุด ซึ่งสารตัวอย่างจะใส่ในหลอดแค้ในไนโตรเจนเหลว ดังรูปที่ 10.12 จนสารตัวอย่างและตัวทำละลายกลายเป็นแก๊วไอ ตัวทำละลายที่ดีที่สุดคือ EPA (ether, isopentane และ ethyl alcohol ผสมกันด้วยอัตราส่วน 5:5:2)

รูปที่ 10.12 แสดงลักษณะของอุปกรณ์ในการวัดฟอสฟอเรสเซนซ์

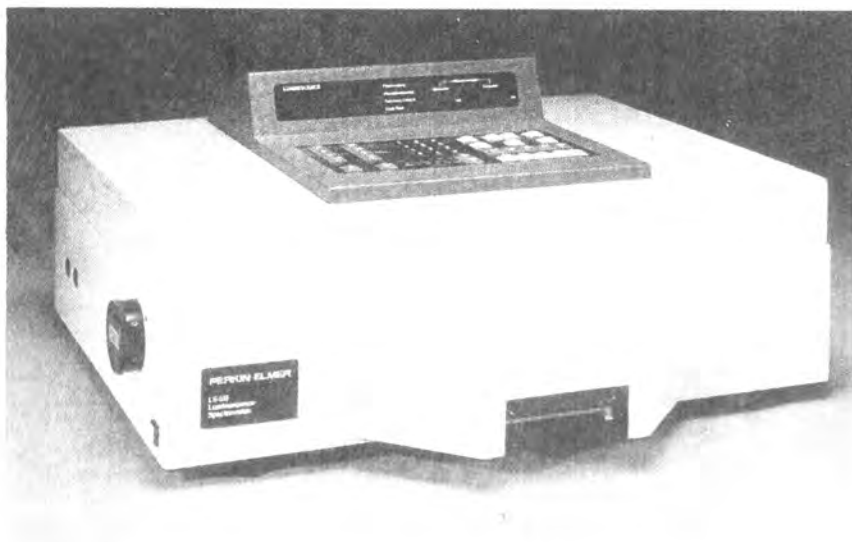


2. ต้องมีเครื่องสำหรับกั้นแสง (gate) จาก source ที่ทำให้เกิดการกระตุ้นและทิ้งไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (delay time) ก่อนที่จะทำการวัดฟอสฟอเรสเซนซ์ ซึ่งการควบคุมระบบนี้อาจใช้ระบบอิเล็กทรอนิกส์หรือเครื่องกลก็ได้ อุปกรณ์ส่วนนี้มักจะเป็นอุปกรณ์เพิ่มเติมเข้ามาในส่วนของเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์เพื่อให้เครื่องสามารถทำงานได้ทั้งฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์

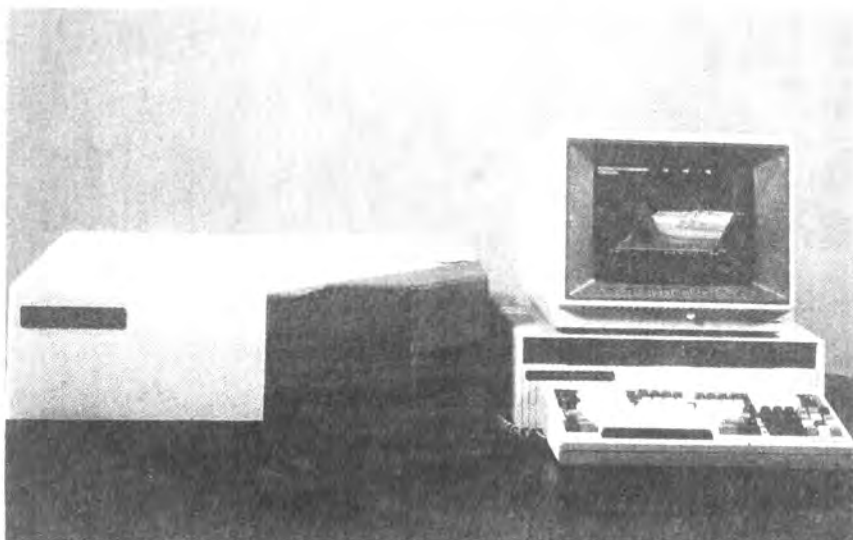
อีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้โดยแทนที่จะใช้เครื่องกั้นแสง อาจใช้วิธีการกระตุ้นสารตัวอย่างเป็นช่วง ๆ (pulsed excitation source) แทน สัญญาณที่ได้จาก detector ที่วัดเป็นช่วง ๆ จะถูกเก็บรวบรวมไว้ด้วยเครื่องไมโครโปรเซสเซอร์หรือคอมพิวเตอร์อีกครั้งหนึ่ง

เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ที่ผลิตจำหน่ายในปัจจุบันเพื่อใช้ในงานวิเคราะห์ทั้งในด้านการศึกษาและการวิจัยทั่วไปมีดังต่อไปนี้

เครื่อง Fluorescence และ Phosphorescence Spectrometer ที่ผลิตโดยบริษัท Perkin-Elmer Corp. U.S.A.



เครื่อง Scanning Luminescence Spectrometer model LS-5 B ซึ่งสามารถใช้วัดได้ทั้งฟลูออเรสเซนซ์และฟอสฟอเรสเซนซ์ โดยใช้ stroboscopic xenon source ที่ให้ความเข้มของแสงสูง มี software ที่สามารถทำ prescan, wavelength programming & subtraction, corrected emission และ recorder formatting



เครื่อง Fluorescence Spectrophotometer model MPF-66 เป็นเครื่องมือวิจัยชนิดเยี่ยม ซึ่งให้ sensitivity และ resolution ที่ดีมาก ควบคุมและประมวลผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ Perkin-Elmer Series 7000 Professional Computer.

บรรณานุกรม

1. G.D. Christian and J.E. O'Reilly, "Instrumental Analysis" 2nd edition. Allyn and Bacon, Inc., 1986.
2. R.D. Braun, "Introduction to Instrumental Analysis" 1st edition. Mc Graw-Hill, Inc., 1987.
3. D.A. Skoog, "Principles of Instrumental Analysis" 3rd edition. Holt-Saunders International Editions, 1985.
4. H.H. Willard, L.L. Muritt Jr. and J.A. Dean, "Instrumental Methods of Analysis" 6th edition. 1981.
5. G.D. Christian and J.B. Callis, "Trace Analysis Spectroscopic Methods of Molecules" 1st edition. John Wiley & Sons, Inc., 1986.
6. G.W. Ewing, "Instrumental Methods of Chemical Analysis" 3rd edition. Mc Graw-Hill, Inc. 1969.
7. C.E. White and A. Weissler, "Handbook of Analytical Chem." Mc Graw-Hill, 1963.
8. C.E. White and A. Weissler, "Standard Methods of Chemical Analysis. Vol. III A, Van Nostrand, 1966.
9. R.A. Passater, "Guide to Fluorescence Literature", Plenum Press New York, 1967.
10. G.G. Guilbault, "Practical Fluorescence" 1st edition. Marcel Dekker, Inc., 1973.
11. J.D. Winefordner, "Trace Analysis" Spectroscopic Methods for Elements. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, N.Y., 1976.