ภาคผนวก

Molecular fluorescence and Phosphorescence

1 ประวัติของ Luminescence (33)

Luminescence analysis เป็นวิธีการทางเคมีวิเคราะห์วิธีหนึ่งที่ใช้กันมานานแล้ว ในปี ค.ศ. 1565 Monards ได้พบปรากฏการณ์ luminescence จากการสะกัด Ligirium nephiticiem ซึ่งพบว่ามีแสงเรืองออกมา ปี ค.ศ. 1833 Sir David Brewster พบว่าคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เมื่อถูกกับแสงอาทิตย์จะเรืองแสงสีแดง ต่อมาในปี ค.ศ. 1852 Sir G.G. Stokes ได้อธิบายถึงกลไกของกระบวนการเกิดการดูดกลืนและคายพลังงานแสงของสารบางชนิด และเรียกการเรืองแสงแบบนี้ว่า fluorescence มาจากคำว่า fluorspar ซึ่งเป็นแร่ที่สามารถเรืองแสงเป็นสีน้ำเงินขาว (เป็นคำ Latin fluo = to flow และ spar = a rock) ตั้งแต่นั้นมามีผู้ศึกษาและค้นคว้าเกี่ยวกับ luminescence มากขึ้น ในปลายศตวรรษที่ 19 มีผู้พบว่าสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นnon-biological เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานแสงแล้วสามารถเรืองแสงได้เช่นเดียวกับพวกสิ่งมีชีวิต มีผู้สนใจเกี่ยวกับ luminescence และนำมาประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ทางเคมีวิเคราะห์มากขึ้นจนกระทั่งทุกวันนี้

2 ชนิดของ Luminescence

เมื่อโมเลกุลของสารใด ๆ ได้รับพลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากแหล่งผลิตแสงจะทำให้อีเลกตรอนในโมเลกุลเปลี่ยนระดับพลังงานไปสู่ระดับพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) ซึ่งไม่เสถียรจะกลับไปสู่ระดับพลังงานเดิม(ground state) โดยคายพลังงานในรูปแสงซึ่งมีความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน (UV,VIS,IR) ขึ้นอยู่กับชนิดและธรรมชาติของสารที่ใช้ศึกษา แสงที่คายออกมานี้เรียกว่า lumi-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nescence luminescence จำแนกออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามวิธีดูดกลืนพลังงานจาก excitation source ต่าง ๆ กันและการคายพลังงานของ excited molecules ดังนี้คือ

1. Photoluminescence เป็นการเรืองแสงที่เกิดเมื่อโมเลกุลของสารใด ๆ ทำปฏิกิริยาร่วมกับ photon ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (เช่น แสง UV หรือ VIS) อิเลกตรอนในโมเลกุลจะเปลี่ยนระดับพลังงานไปอยู่ที่ excited state ในระยะเวลาหนึ่งแล้วเปลี่ยนสภาวะพลังงานสู่ ground state โดยคายพลังงานแสงออกมา เรียกว่า Photoluminescence ถ้าโมเลกุลคายพลังงานออกมาทันทีทันใดในขณะที่เกิด excitation จาก $S \longrightarrow S_0$ หรือ G ระยะเวลาที่เกิดการเรืองแสงเป็น 10^{-9} - 10^{-7} วินาที ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า fluorescence

ถ้าโมเลกุลกลับสู่ระดับพลังงานต่ำสุดของ excited state ซึ่งเป็น meta stable ชั่วระยะเวลาหนึ่งก่อนกลับสู่ ground state แล้วจึงเกิด $T \dashrightarrow S_0$ หรือ G transition พร้อมทั้งคายพลังงานแสงออกมา ระยะเวลาในการเกิดการคายพลังงานแสงเป็น 10^{-3} - 10 วินาที ขบวนการคายแสงนี้เรียกว่า phosphorescence

2. Thermoluminescence เป็นการเรืองแสงของโมเลกุลหลังจากได้รับพลังงานความร้อน

3. Electroluminescence เป็น luminescence ที่เกิดขึ้นโดยการ apply voltage ให้แก่โมเลกุล

4. Cathodoluminescence เป็น luminescence ที่เกิดจาก excited molecule ซึ่งได้รับพลังงานจาก cathode rays

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Chemiluminescence เป็น luminescence ซึ่งเกิดขึ้นโดยการใช้พลังงานของปฏิกิริยาเคมีในการ excite สาร

6. Bioluminescence เป็น luminescence ที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต

3 แสงและการทำปฏิกิริยาร่วมของแสงกับสสาร

แสงเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีสมบัติเป็นคลื่น ซึ่งมีความยาวคลื่นและความถี่โดยมีความสัมพันธ์กันตามสมการ .1

ขณะที่แสงตกกระทบสารจะเกิดปรากฏการณ์ 2 อย่าง กรณีแรก แสงอาจผ่านทะลุสารนั้นไปโดยที่สารนั้นไม่ดูดกลืนแสงเลย กรณีที่สองสารนั้นอาจดูดกลืนหมดหรือดูดกลืนไว้บางส่วน ซึ่งจะมีการถ่ายเทพลังงานจากแสงไปสู่โมเลกุล ขบวนการดูดกลืนแสงนั้นพลังงานในการดูดกลืนมีค่าอยู่ในหน่วยที่เรียกว่า quanta ดังแสดงในสมการ .2

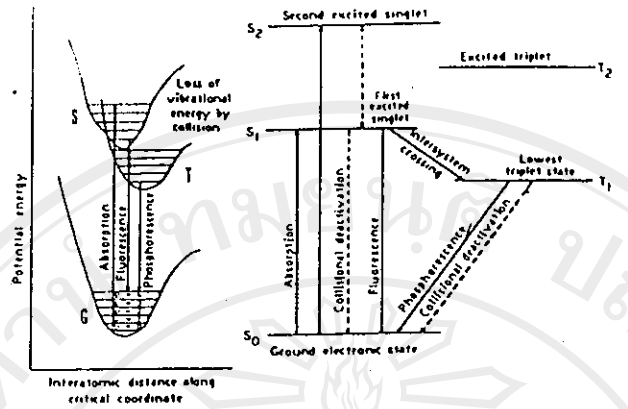
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \qquad (1)$$

เมื่อ E = พลังงานของโฟตอน (erg)

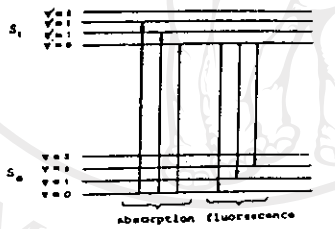
h = Planck's constant ซึ่งมีค่า 6.62×10^{-27} erg-sec

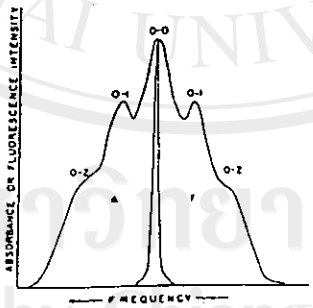
โมเลกุลทั้งหลายเมื่อได้รับพลังงานโดยการดูดกลืนแสงแบบ discrete quantum จะทำให้อิเลกตรอนในโมเลกุลเคลื่อนไปสู่ orbital ใหม่ซึ่งมีพลังงานสูงขึ้น (excited state) และจะกลับสู่ระดับพลังงานที่ต่ำกว่า (ground state) โดยการคายพลังงานออกมาในรูป luminescence

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 1 ระดับพลังงานสำหรับ **diatomic molecule** (๑๔)





รูป 2 **Absorption** และ **Fluorescence spectrum** (๑๔)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากรูป 1 จะเห็นว่าในแต่ละ electronic state จะมีระดับพลังงาน vibrational ของโมเลกุลอยู่ด้วยซึ่งแทนด้วย V = 0, 1, 2, 3, 4 electronic state ระดับต่ำสุดเป็น ground state แทนด้วย G, excited singlet state แทนด้วย S และ T เป็น excited triplet state S และ T จะแตกต่างกันตรงการ spin ของอีเลคตรอนโดย S มีการ spin ของอีเลคตรอนตรงกันข้ามกัน แต่ T มีการ spin แบบขนานกัน

Polyatomic molecule ที่ ground stage G ส่วนมาก spin จะเป็นแบบตรงกันข้าม คือ อีเลคตรอนตัวหนึ่งมี S = + ½ อีกตัวหนึ่ง มี S = -½ ค่า multiplicity (M) ได้จากความสัมพันธ์ดังสมการ 2

$$M = 2S + 1 \qquad (2)$$

เมื่อ M = multiplicity

S = spin quantum number

ในกรณี paired electrons S = 0 M จะมีค่า = 1 เรียกว่า singlet electronic state ในกรณีที่ electronic state ของโมเลกุลมีการ spin ของอีเลคตรอนแบบขนาน (unpaired electrons) อีเลคตรอนทั้ง 2 ตัวจะมี S = $+\frac{1}{2}$ หรือ $-\frac{1}{2}$ ทั้งคู่ ดังนั้น S = 1 จะได้ M = 3 ซึ่งเรียกว่า triplet electronic state

เมื่อแสงตกกระทบโมเลกุลของสาร โมเลกุลจะดูดกลืนพลังงานปริมาณพอเหมาะภายในเวลา 10^{-15} วินาที ซึ่งพลังงานที่ดูดกลืนนี้จะเป็นค่าเฉพาะของแต่ละสาร หลังจากนั้นอีเลคตรอนจะเปลี่ยนระดับพลังงานไปอยู่ที่ excited singlet state S_1, S_2 ... การที่อีเลคตรอนสามารถเปลี่ยนระดับพลังงานจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$G \longrightarrow S_1$ หรือ S_2 นั้นจะเกิดขึ้นกรณีที่แสงอยู่ในช่วงคลื่น VIS และ UV ถ้าอิเลคตรอนคายพลังงานเท่ากับพลังงานที่ดูดกลืนเข้าไปตอนแรก ขบวนการนี้เรียกว่า resonance fluorescence แต่ถ้าอิเลคตรอนที่เปลี่ยนระดับพลังงานอยู่ในlowest vibrational level ของ G เมื่ออิเลคตรอนไปอยู่ที่ excited state จะอยู่ที่นั่นประมาณ 10^{-4} วินาที แล้วเปลี่ยนไปอยู่ที่ lowest vibrational level (V = O) ของ excited singlet state และกลับลงมาสู่ G โดยการคายพลังงาน ขบวนการนี้เรียกว่า fluorescence ซึ่งพลังงานแสงที่คายออกมาจะมีค่าน้อยกว่าที่ดูดกลืนเข้าไป เนื่องจากมีพลังงานบางส่วนหายไปก่อนจะมีการคายพลังงานออกมา ดังนั้น fluorescence จึงมีความยาวคลื่นยาวกว่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนเข้าไป ดังรูป 2

แต่ถ้าอิเลคตรอนเปลี่ยนแปลง multiplicity จาก singlet excited state ไปสู่ triplet state โดยขบวนการ intersystem crossing ในระยะเวลา 10^{-8} วินาที จากนั้นอิเลคตรอนจะกลับมาที่ lowest vibrational level ของ T จากนั้นอิเลคตรอนที่ T จะกลับลงมาที่ G (S_o) โดยตรงพร้อมทั้งคายพลังงานแสงออกมา ถ้าเกิดไวมากเรียกว่า delayed fluorescence แต่ถ้าเกิด transition ในช่วงเวลา 10^{-4} ถึง 10 วินาที เรียกว่าเกิด phosphorescence

4 <u>ชนิดของ Fluorescence และ Emission process</u>

Fluorescence ที่เกิดขึ้นในสารละลายเรียกว่า Stokes fluorescence ซึ่งสารจะคายแสงออกมามีความยาวคลื่นยาวกว่าแสงที่ดูดกลืนเข้าไป แต่ถ้าเพิ่มความร้อนให้กับโมเลกุลเปลี่ยนระดับพลังงานไปอยู่ที่ excited state แล้วมีการคายพลังงานแสงออกมามีความยาวคลื่นสั้นกว่าเดิมจะเรียกว่า anti-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

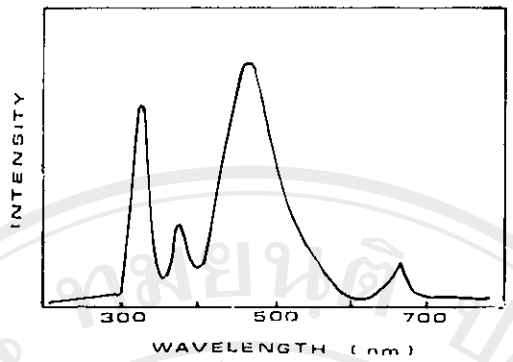
Stokes fluorescence ซึ่งมักจะพบในพวก dilute gases ที่อุณหภูมิสูง ๆ ตัวอย่างเช่น เมื่อ excite copper-activated cadmium sulfide ด้วยแสงสีแดงก็จะคายแสงสีเขียวออกมา

Resonance fluorescence คือการคายพลังงานแสงออกมามีความยาวคลื่นเท่ากับความยาวคลื่นที่ดูดกลืนเข้าไป ซึ่งจะไม่พบในพวกสารละลาย เนื่องจากผลของ solvent interactions แต่จะพบ resonance fluorescence ในกาซและของแข็ง (ซึ่งเป็นหลักการของ atomic fluorescence)

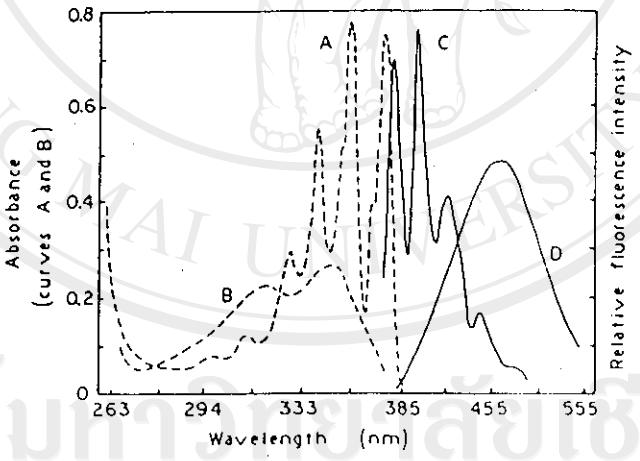
ถ้าอิเลคตรอนดูดกลืนพลังงานแสงแล้วเปลี่ยนระดับพลังงานไปอยู่ที่ higher vibrational level โดยไม่เกิด electronic transition แล้วอิเลคตรอนก็กลับลงมาที่ original state (V = 0) ภายในเวลา 10^{-15} วินาที จะให้แสงออกมามีความยาวคลื่นเท่ากับที่ excite (มีพลังงานเท่ากัน) การคายแสงแบบนี้เรียกว่า Rayleigh scattering ปรากฏการณ์นี้ทำให้ลดลงได้โดยทำการทดลองที่ความยาวคลื่นยาวกว่าเดิม แต่ก็จะมีปัญหาเกิดขึ้น กล่าวคือ จะทำให้ intensity ของ fluorescence ลดลง ถ้าใช้ความยาวคลื่นยาวกว่าเดิม excite สาร และจะทำให้ absorption และ fluorescence spectra อยู่ใกล้กันเกินไป

นอกจากนี้ยังมี scattering emission ซึ่งคล้ายคลึงกับRayleigh scattering คือ Raman effect Raman scatter จะเกิดใน fluorescence scattering ที่ความยาวคลื่นมากกว่าหรือน้อยกว่า Rayleigh-scatter peak Raman bands จะ weak กว่า Rayleigh-scatter peak มาก แต่ถ้าใช้ source ที่มี intensity สูง Raman band จะเข้มขึ้น ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 นี้ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3 Fluorescence spectra ของ quinine sulfate[33] ใน 0.1 N H_2SO_4 (λ_{ex} = 320 nm)
Peak : 320 nm, Rayleigh scatter; 360 nm, Raman scatter ของน้ำ ; 450 nm, quinine fluorescence; 640 nm, second-order Rayleigh scatter; 720 nm, second-order Raman scatter.



รูป 4 Absorption และ fluorescence spectra[33] ของ Anthracene (ใน ethanol) และ Quinine (ใน 0.1 N H_2SO_4) : curve A, anthrancene absorption; curve B, quinine absorption; curve C, anthracene fluorescence; curve D, quinine fluorescence.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5 Excitation และ Emission spectrum

fluorescence จะมี spectrum 2 อย่าง คือ excitation spectrum (เป็น spectrum ที่แสดงความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนเพื่อทำให้เกิด fluorescence) และ emission spectrum (เป็น spectrum แสดงความเข้มของแสงที่คายออกมาที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ) ในโมเลกุลของสารแต่ละชนิด รูปร่างของ excitation spectrum ควรจะเหมือนกับ absorption spectrum (ถึงแม้จะไม่เกิด fluorescence) แต่จากการทดลองพบว่า spectrum ทั้งสองอาจจะต่างกัน ซึ่งอาจจะเนื่องมาจาก

(1) sensitivity ของ photomultiplier tube เปลี่ยนไป

(2) bandwidth ของ monochromator เปลี่ยนไป

(3) ผลของการใช้ slit คงที่ในการศึกษา

Emission หรือ fluorescence spectrum จะมีลักษณะอย่างไรขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นที่ใช้ในการ excite สาร ถ้า excite สารที่ความยาวคลื่นตรงกับ absorption สารนั้นจะดูดกลืนแสงนั้นได้มากและจะคายแสงออกมาได้มากเช่นกัน แต่ละ absorption band ที่เกิดจากสารซึ่งอยู่ที่ excited state กรณี first electronic state จะสอดคล้องกับ emission หรือfluorescence band ซึ่ง bands ทั้งสองจะเป็น mirror image ซึ่งกันและกัน ดังรูป 4

จากรูป 4 เป็น absorption และ emission spectrum ของ anthracene และ quinine anthracene จะมี 4 absorption peaks ในการเกิด $S_0 \longrightarrow S_1$ transition (ดูดกลืนแสงแล้วไปอยู่ที่ vibrational level ที่ต่างกัน) แล้วก็จะคายแสงออกมา ซึ่งจะมี 4 emission peaks มีลักษณะคล้ายกับเป็น mirror image กัน (A และ C) สำหรับ quinine จะมี 2 exci-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

tation peaks peak แรกอยู่ที่ 250 nm คือ เกิด $S_0 \longrightarrow S_2$ transition และ peak ที่สองที่ 350 nm คือ เกิด $S_0 \longrightarrow S_1$ transition แต่จะคายแสงที่ความยาวคลื่นเดียว คือ มี emission peak เพียง peak เดียวเกิดจาก $S_1 \longrightarrow S_0$ transition

เนื่องจากการคายพลังงานแสงเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสาร กรณีสารในสารละลายผสมจึงสามารถใช้ fluorescence ศึกษาสารนั้นได้ แต่ถ้าสารมี emission peak เกิดที่ความยาวคลื่นเท่ากัน ก็ใช้ excitation หรือabsorption peak ซึ่งจะต่างกัน ศึกษาสารก็ได้ fluorescence spectroscopy จึงสามารถใช้งานได้กว้างกว่า

.6 Fluorescence quantum efficiency

ทุกโมเลกุลที่ดูดกลืนแสงแล้วสามารถให้ fluorescence ออกมาจะอธิบายได้ในเทอมของ quantum yield หรือ quantum efficiency, Φ ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างพลังงานที่คายออกมาต่อ quantum ของพลังงานที่ดูดกลืน

$$\Phi = \frac{\text{จำนวน quanta ที่ emitted}}{\text{จำนวน quanta ที่ absorbed}} \qquad (.3)$$

ถ้า Φ มีค่าสูง fluorescence intensity ก็จะมีสูงด้วย ถ้า Φ มีค่าเท่ากับ 0 หรือใกล้ 0 ก็จะไม่มี fluorescence พลังงานที่โมเลกุลดูดกลืนเข้าไปบางส่วนจะหายไปอย่างรวดเร็วโดย collisional deactivation

ค่าของ Φ จะหาได้จากการวัด fluorescence ของพวกสารละลายเจือจาง เช่น สารละลาย quinine sulfate ซึ่งมีค่า $\Phi = 0.55$ จากนั้นก็หาค่า Φ ของ unknown ได้จากสูตรต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\Phi_{unk} = \Phi_{std} \frac{F\ unk}{F\ std} \cdot \frac{q\ std}{q\ unk} \cdot \frac{A\ std}{A\ unk} \qquad (4)$$

เมื่อ F = relative fluorescence หาโดยการ integrate พื้นที่ใต้ curve fluorescence

q = relative photon output ของ source ที่ excitation wavelength

A = Absorbance

quantum yield ของสารประกอบต่าง ๆ จะขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นที่ใช้ excite สาร และยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิสูง ๆ Φ จะลดลง

7 ความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity กับความเข้มข้นของสาร

Fluorescence intensity และความเข้มข้นของสารมีความสัมพันธ์กันตามสมการ 5

$$F = \Phi I_0 (1-e^{-\epsilon bc}) \qquad (5)$$

เมื่อ F = fluorescence intensity

Φ = quantum yield

I_0 = incident radiation power

ϵ = molar absorptivity

b = path length ของ cell

c = molar concentration

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากสมการ 5 จะเห็นว่าสิ่งที่มีผลต่อค่า F มีอยู่ 3 factors คือ

1. quantum efficiency, Φ ถ้าค่า Φ มากจะทำให้ค่า F มากด้วย
2. ความเข้มของแสง, I_0 ถ้า I_0 มีค่ามากก็จะให้ค่า F มาก แต่ในทางปฏิบัติพบว่าความเข้มของ source มากจะทำให้สารสลายตัวได้ ดังนั้นต้องใช้ source ที่เหมาะสมเช่น ใช้ Hg หรือ Xe-lamp
3. molar absorptivity, ε ถ้าค่า ε มาก ค่า F ก็จะมาก

สำหรับกรณี dilute solution สมการ 5 จะเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) ดังนี้

$$F = K\Phi I_0 \varepsilon bc \qquad (6)$$

เมื่อ K = proportionality constant

ในกรณีสารที่มีความเข้มข้นมาก ๆ ค่า F จะลดลง เนื่องจากสารละลายเข้มข้นการกระจายแสงจะไม่สม่ำเสมอ จึงเกิด quenching ทำให้เกิดการเบี่ยงเบนไปจากกฎของเบียร์

.8 สิ่งที่ต้องพิจารณาในการทดลอง (Practical considerations)

(1) ข้อดีของ fluorescence ในกรณี molecular emission เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่สำคัญวิธีหนึ่งเพราะมี sensitivity ดี และ specificity ดี สามารถใช้วัดความเข้มข้นได้ต่ำมากถึงระดับ ppb และมี sensitivity มากกว่า spectrophotometric methods ประมาณ 1000 เท่า ทั้งนี้เพราะ fluorescence วัดโดยตรง ซึ่งสามารถจะเพิ่มหรือลด intensity โดยเปลี่ยนแปลง exciting radiant energy แต่ใน spectrophotometric methods วัด absorption ของสารโดยการวัดแสงที่เหลืออยู่ หลังจากสารนั้นดูดกลืนแสงไปแล้ว ซึ่งจะมี intensity ต่ำ ดังนั้น sensitivity จึงลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fluorescence เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มี specificity ด้วยเหตุผล 2 ประการคือ

1.1 สารที่จะศึกษา fluorescence ได้จำเป็นต้อง absorb แสงได้ แต่สารที่ absorb แสงได้ไม่จำเป็นต้องคายแสง (emit) แสงได้ ดังนั้นจึงมีสารบางตัวเท่านั้นที่ให้ fluorescence ซึ่งอาจใช้ความยาวคลื่นที่ absorb หรือ emit แสงเป็นตัวบอกลักษณะสาร

1.2 เทคนิคนี้สามารถใช้ได้ 2 ความยาวคลื่นในการศึกษา ในขณะที่ spectrophotometry ใช้เพียงความยาวคลื่นเดียว

ความแตกต่างระหว่าง excitation และ emission peak จะอยู่ในช่วง 10-280 nm ส่วน emission ที่ความยาวคลื่นเดียวกับ excitation ก็คือ เกิด scattering

(2) ขีดจำกัดของ fluorescence techniques Fluorescence ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการดังต่อไปนี้

2.1 Photochemical decomposition

ความเข้มของแสง UV ที่ใช้ excite สารอาจมีผลทำให้สารเกิดการสลายตัวทำให้ fluorescence intensity ลดลงได้ ดังนั้นในการศึกษาโดยเทคนิคนี้ จึงควรใช้ความยาวคลื่นที่ยาวในการ absorb เป็นตัว excite สาร และควรวัด fluorescence ทันทีที่เริ่ม excite ไม่ควรปล่อยให้ถูกแสงนาน ๆ ในกรณีที่เป็นสารมาตรฐาน เช่น quinine sulfate ก็ควรเก็บไว้ในขวดสีดำ เพื่อป้องกันไม่ให้ถูกแสงอาทิตย์หรือแสง UV

2.2 Viscosity (ความหนืด)

Fluorescence intensity ของสารประกอบจะขึ้นอยู่กับความหนืดของตัวกลาง กล่าวคือ ถ้ามีความหนืดมาก fluorescence intensity จะมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งนี้เนื่องจากการชนกันระหว่างโมเลกุลมีน้อยลง จึงมีการสูญเสียของพลังงานน้อย ดังนั้นในการวิเคราะห์ ถ้าต้องการเพิ่ม intensity ก็ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความหนืด ที่นิยมใช้คือ glycerol หรือ gelatin เป็นต้น

2.3 Quenching

Quenching คือ ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นแล้วทำให้ fluorescence intensity ลดลง เพราะมีการถ่ายเทพลังงานระหว่าง fluorophor กับสารอื่นที่อยู่ในระบบนั้น กลไกทั่วไปในการเกิดขบวนการ quenching (quenching process) คือ

$$M + h\nu \longrightarrow M^* \quad \text{(light absorption)} \qquad .7$$

$$M^* \longrightarrow M + h\nu \quad \text{(fluorescence emission)} \qquad .8$$

$$M^* + Q \longrightarrow Q^* + M \quad \text{(quenching)} \qquad .9$$

$$Q^* \longrightarrow Q + \text{energy} \qquad .10$$

การเกิด quenching มี 4 แบบ คือ

2.3.1 Temperature quenching

2.3.2 Concentration quenching

2.3.3 Oxygen quenching

2.3.4 Impurity quenching

Quencher อย่างหนึ่งที่มีผลทำให้ fluorescence intensity เปลี่ยนไป เช่น I^- และ NO ที่มีปริมาณเล็กน้อยก็เป็นทั้ง quencher และinterference, dichromate ที่มีปริมาณน้อย ๆ ก็สามารถ emit แสงได้ ถ้ามี excitation ที่เหมาะสม จึงไม่ควรล้าง cell ด้วย dichromate cleaning solution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Temperature quenching เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น fluorescence จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากขณะที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะเพิ่ม molecular motion และเกิด collisions ดังนั้นพลังงานบางส่วนจะหายไป ซึ่งตามธรรมดา fluorescence จะเปลี่ยนไป 1 % ขณะที่เปลี่ยนอุณหภูมิ 1 °C แต่สารบางชนิดอาจเปลี่ยนได้ถึง 5 %

ดังนั้นในการทดลองจึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เพื่อจะได้ precision และ accuracy ที่ดี

Concentration quenching เนื่องจาก fluorescence intensity จะแปรโดยตรงกับ molar absorptivity (ตามสมการ 5) ดังนั้นถ้าสารมีความเข้มข้นมากจะดูดกลืนแสงมาก ทำให้ fluorescence ที่ได้ก็มากด้วย แต่ถ้าสารดูดกลืนแสงมากเกินไปจะทำให้แสงผ่านไปในสารละลายได้ไม่สม่ำเสมอกัน เมื่อความเข้มข้นต่ำ ๆ จะได้ curve เส้นตรง (เมื่อ plot ระหว่างความเข้มข้นกับ fluorescence intensity) และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจนถึงค่าหนึ่งค่า F จะลดลง

concentration quenching อาจจะลดลงได้ถ้าเปิด slit ให้กว้างขึ้น หรือทำ cell ให้บางลง ถ้า concentration quenching กรณีที่สารนั้นเกิด dimer หรือ polymer จะเรียกว่า excimer quenching excimer จะมี electron orientation ต่างออกไป และมี emission wavelength ยาวกว่าพวก monomer

Impurity Quenching Fluorometry เป็นเทคนิคที่ specific และ sensitive ซึ่งไม่ค่อยมี impurity รบกวน เพราะในการวัดส่วนมากจะทำให้สารละลายเจือจางมาก ๆ ซึ่งจะมี impurities เหลืออยู่น้อยมาก ดังนั้นจะมีผลต่อ fluorescence โดยเกิด inner-cell effect, collisonal quenching,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

energy transfer charge transfer หรือผลของอะตอมหนัก ซึ่งผลเหล่านี้นักเคมีวิเคราะห์ต้องพยายามกำจัด interference โดยทำสารละลายให้เจือจางมาก ๆ หรือใช้เทคนิคในการแยกสารออกจากกัน

Oxygen quenching ออกซิเจนที่มีอยู่ในสารละลายซึ่งเข้มข้น 10^{-3} M จะทำให้ fluorescence intensity ของสารลดลง 20 % oxygen quenching เป็นแบบหนึ่งของ excited-state quenching ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการหา dissolved-oxygen ได้ แต่ถ้าจะศึกษาสารอื่นก็ต้องกำจัดออกซิเจนออกโดยใช้ inert gas เช่น N_2 ซึ่งจะช่วยเพิ่ม sensitivity อีกด้วย

นอกจากนี้ขีดจำกัดของ fluorescence ยังขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, pH และ ionic strength

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved