



คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

เทคโนโลยีสุขภาพ เครื่องสำอางและการชะลอวัย

HEALTH, COSMETIC & ANTI-AGING TECHNOLOGY



ผศ.ดร.วรวิทย์ จันทรสุวรรณ

Asst.Prof. Woravith Chansuvarn,
Ph.D.



woravith



woravith



woravith.c@rmutp.ac.th



<http://sci.rmutp.ac.th/woravith>

หน่วย 3 สเปกโทรสโกปีแบบดูดกลืนและเปล่งออก
บทเรียน 3.3

สเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก ระดับโมเลกุล

(Molecular Emission Spectroscopy)

#แผนการเรียนรู้และการประเมินผลการเรียนรู้

3.3

สเปกโทรสโกปี แบบเปล่งออกร ระดับโมเลกุล

อธิบายการเปล่งออกระดับโมเลกุล



อธิบายสเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก



บอกส่วนประกอบของเครื่องฟลูออเรสเซนส์
สเปกโตรโฟโตมิเตอร์



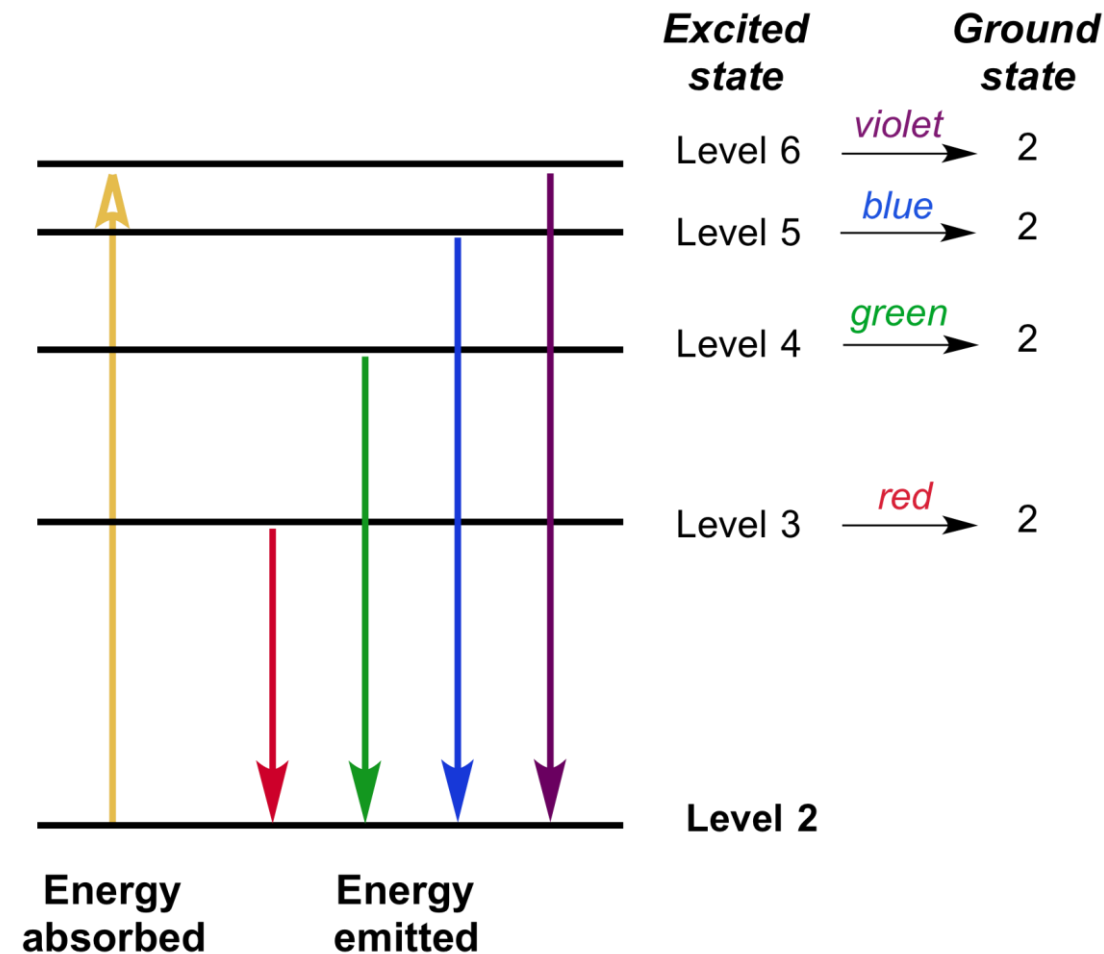
ปฏิบัติการวัดการวาวแสงด้วยเครื่อง
ฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์



การเปล่งออกระดับโมเลกุล

การเปล่งออกจะเกิดขึ้นได้เมื่ออะตอมหรือโมเลกุลถูกกระตุ้นโดยการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า ไปยังสถานะกระตุ้น (excited state) จากนั้นเกิด relaxation สู่สถานะพื้น (ground state) โดยคายพลังงานส่วนเกินในรูปของโฟตอน ในรูป **Fluorescence** (การวาวแสง) และ **Phosphorescence** (การเรืองแสง)

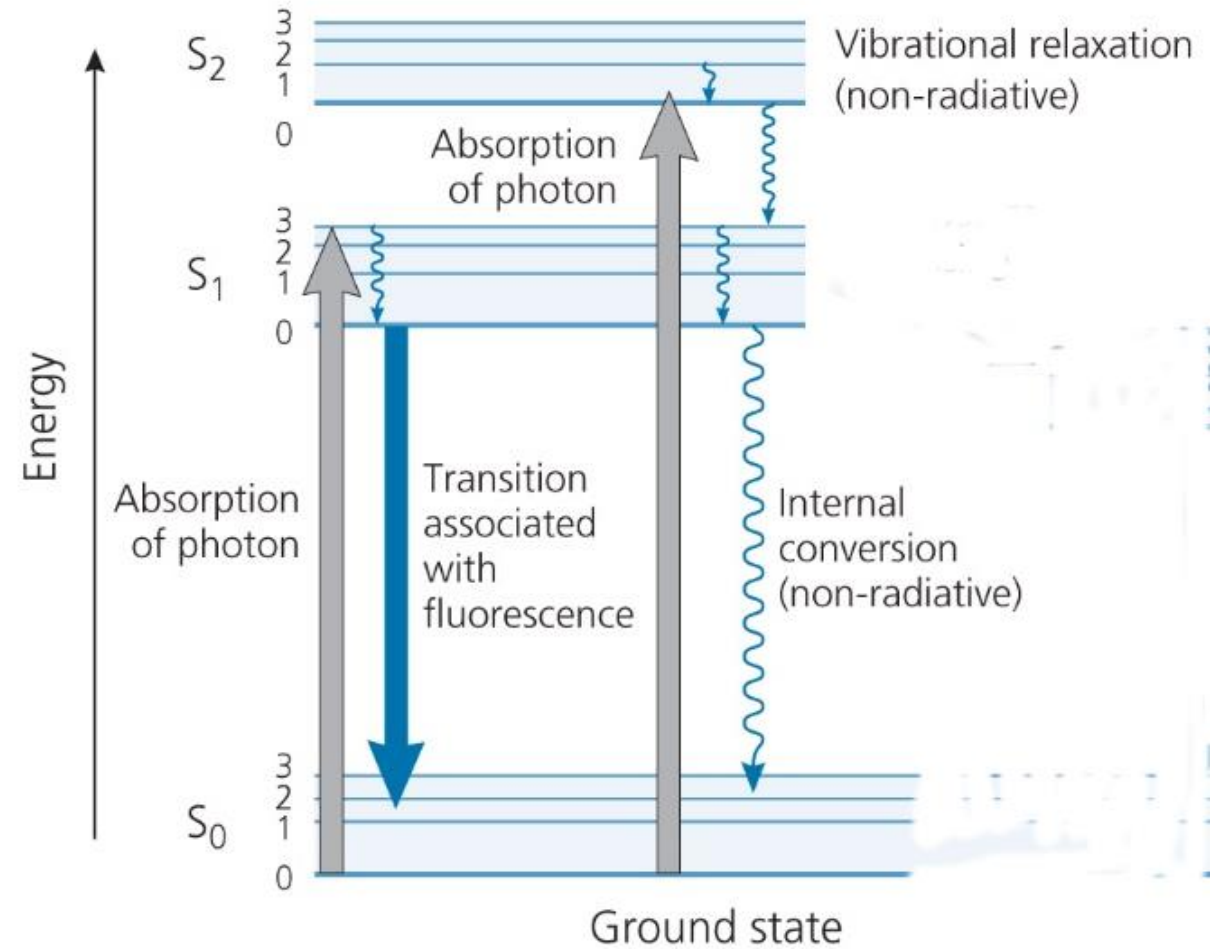
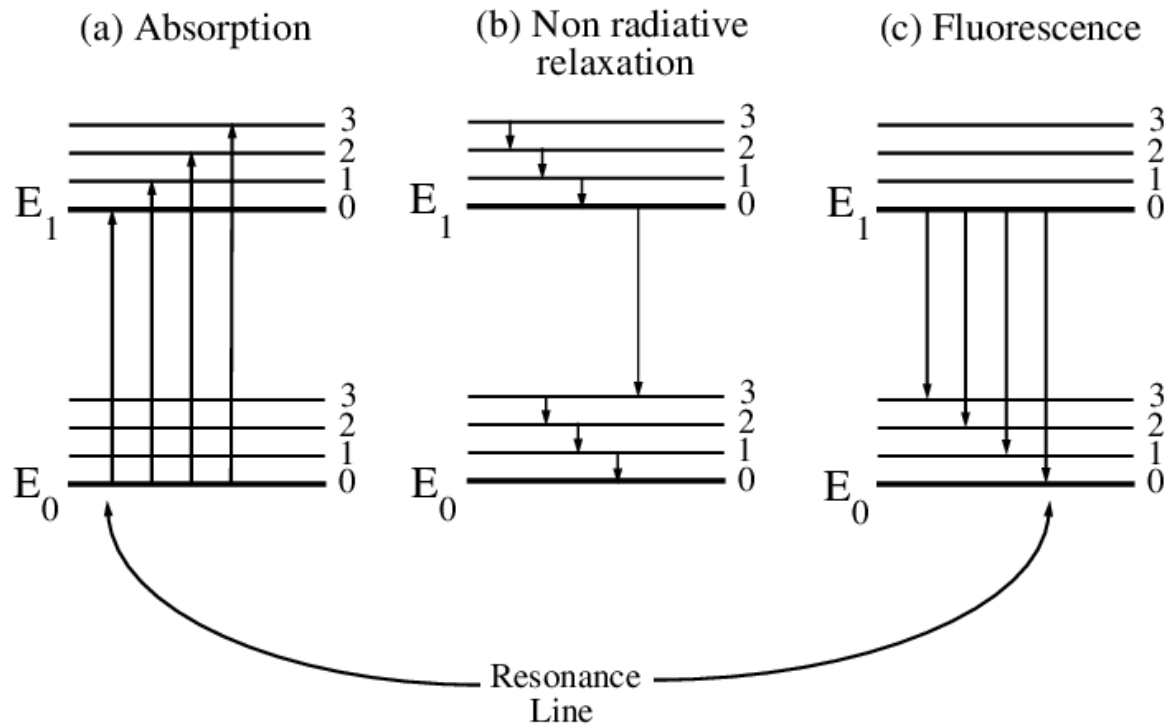
1. การปล่อยพลังงานส่วนเกินในรูปที่ไม่ใช่รังสี (Nonradiative relaxation)
2. การปล่อยพลังงานส่วนเกินในรูปของรังสี (Radiative relaxation)



Nonradiative relaxation

การปล่อยพลังงานส่วนเกินในรูปที่ไม่ใช่รังสี

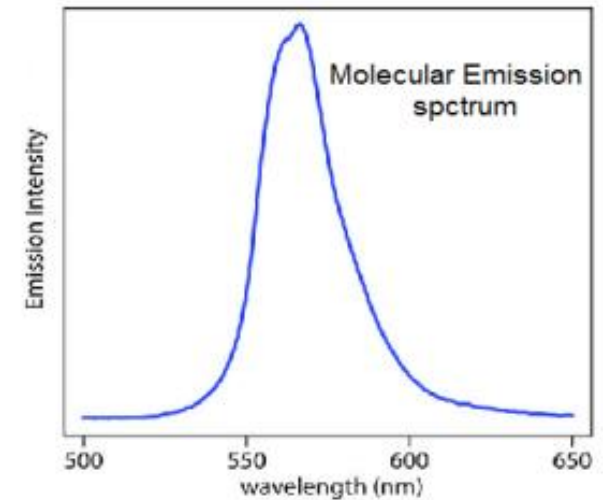
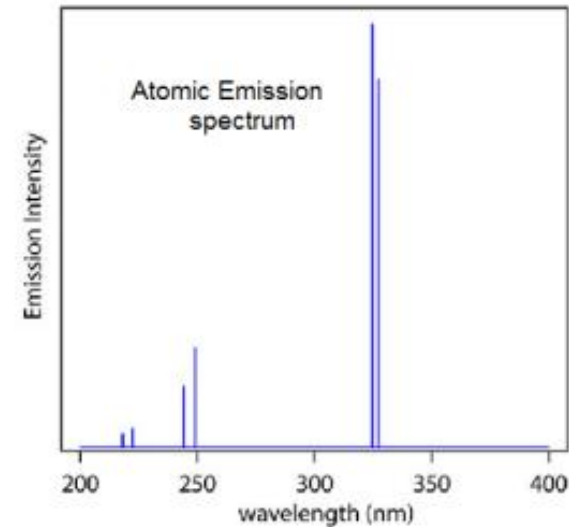
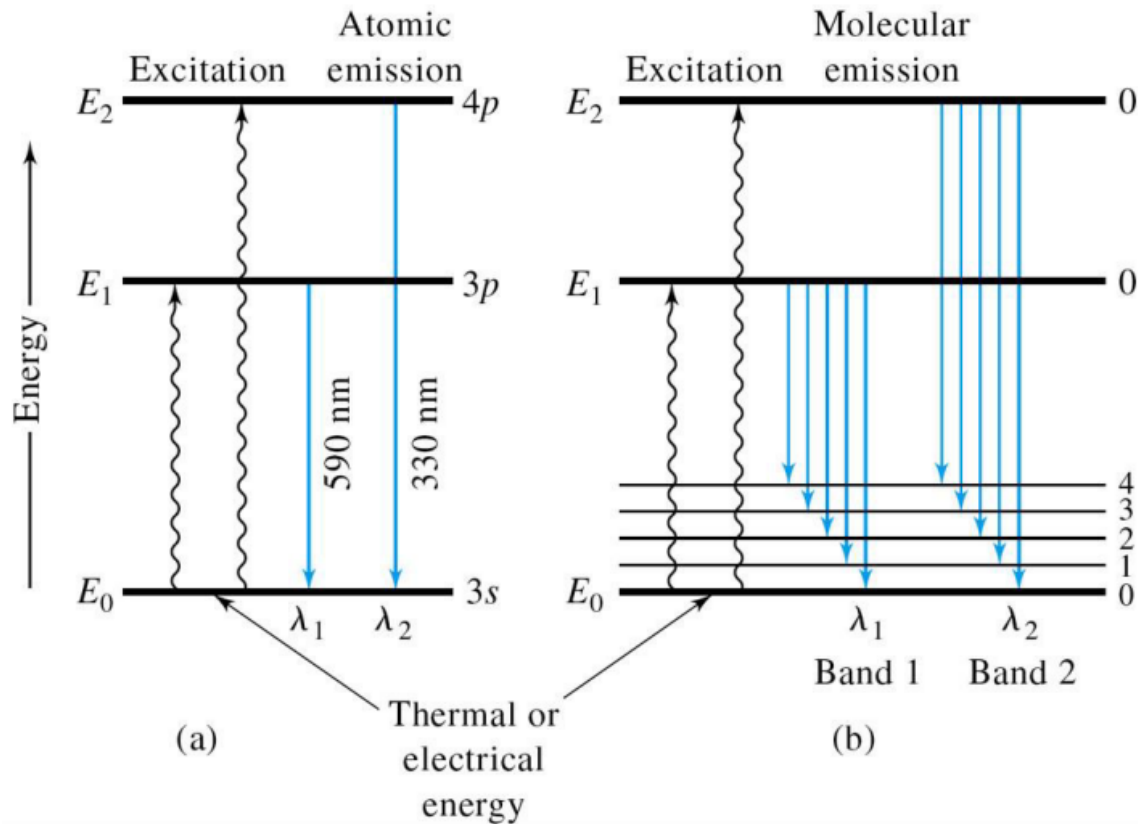
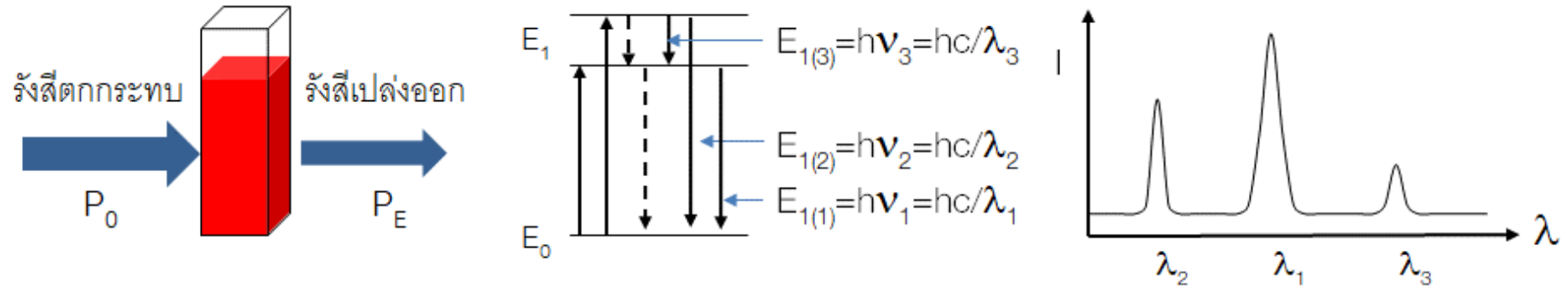
- Vibrational relaxation เกิดขึ้นเมื่อ excited molecules ชนกับโมเลกุลของตัวทำละลาย และ vibrational energy ส่วนเกินถูกถ่ายโอนไปยังโมเลกุลของตัวทำละลายเป็นลำดับขั้น ทำให้ตัวทำละลายมีอุณหภูมิสูงขึ้นเล็กน้อย
 - vibrational relaxation เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ ชั่วชีวิตเฉลี่ยของ excited vibrational state สั้นมาก เพียงประมาณ 10^{-15} วินาที
- Internal Conversion เป็น nonradiative relaxation ระหว่าง vibrational level ต่ำสุดของ excited electronic state และ vibrational level สูงสุดของอีก excited electronic state หนึ่ง กลไกของกระบวนการนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก
 - internal conversion เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพน้อยกว่า vibrational relaxation ชั่วชีวิตเฉลี่ยของ excited electronic state มีค่า 10^{-9} – 10^{-6} วินาที

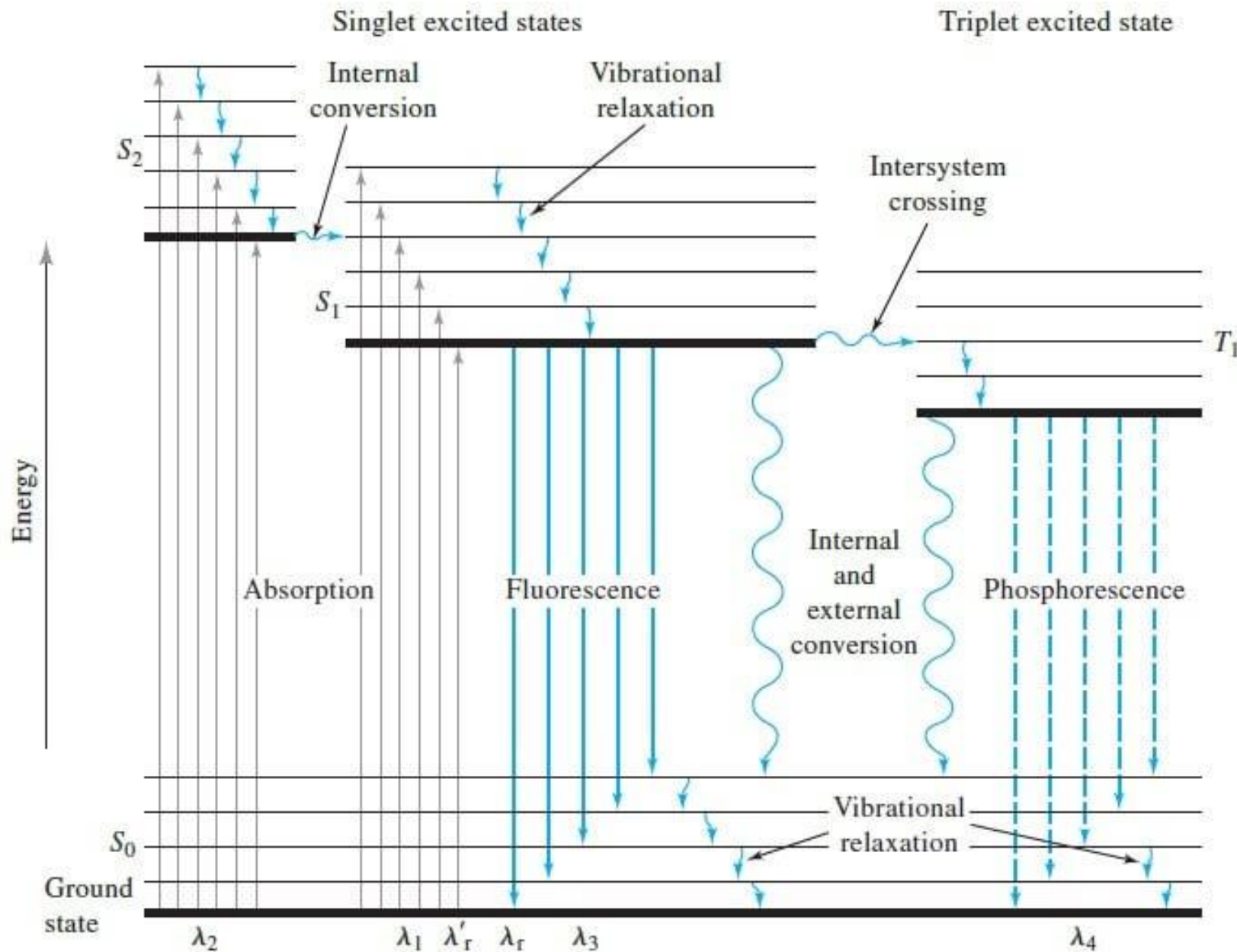


Radiative relaxation

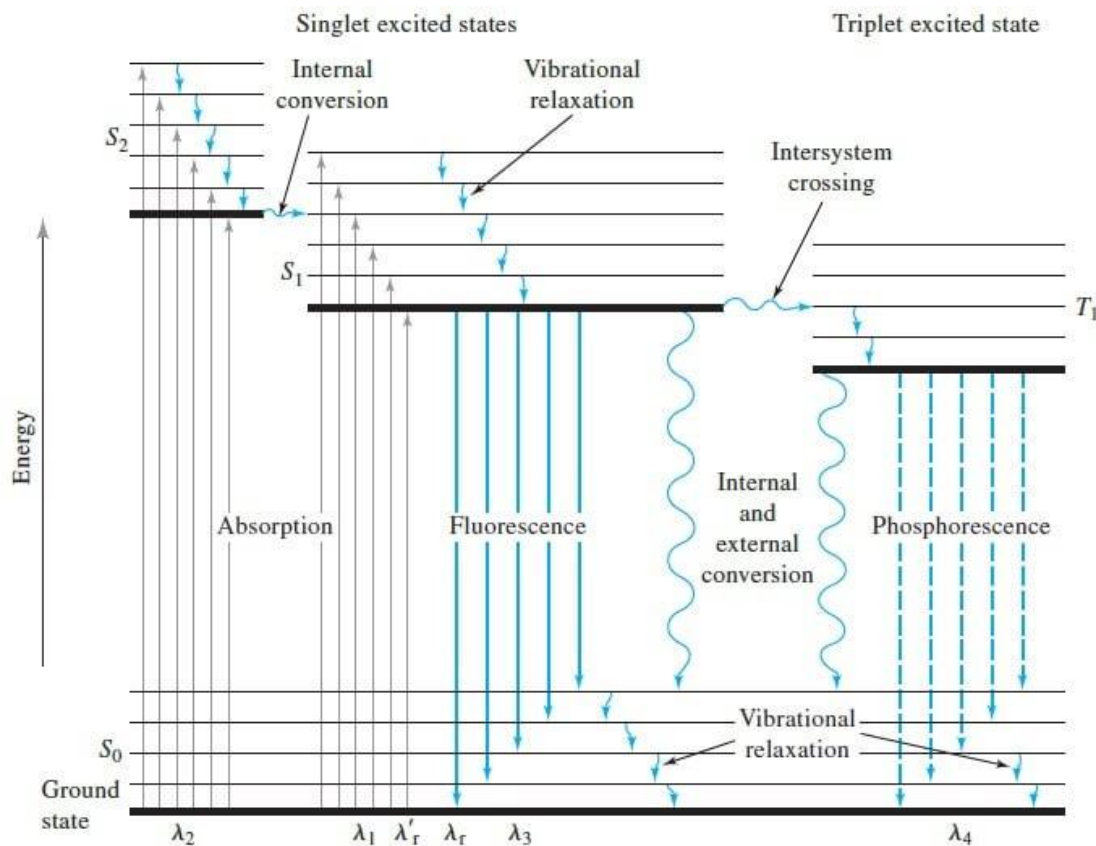
การปล่อยพลังงานส่วนเกินในรูปของรังสี

- Fluorescence (การวาบแสง)
- Phosphorescence (การเรืองแสง)

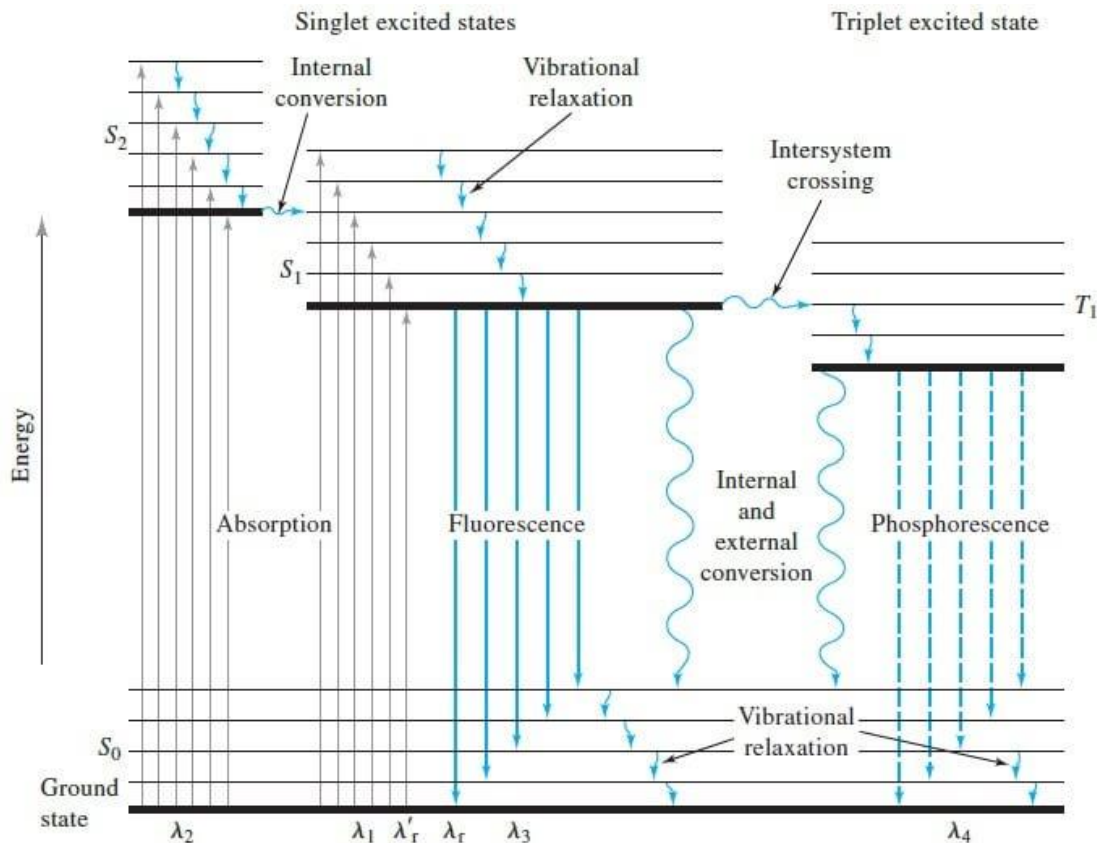




แผนภาพแสดงระดับ
 พลังงาน
 Jablonski เกี่ยวกับการ
 การวาวแสงและการ
 เรืองแสง

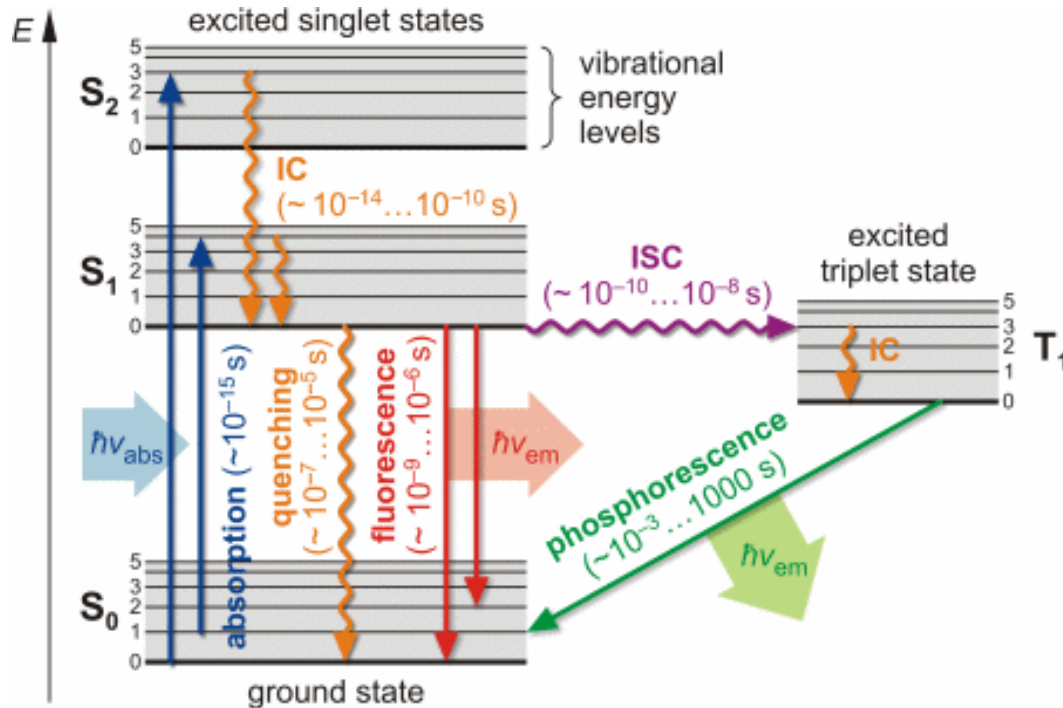


- เมื่อโมเลกุลของอิเล็กตรอนถูกกระตุ้นไปสู่สถานะกระตุ้น S_2 ณ บริเวณนี้อิเล็กตรอนจะคายพลังงานและกลับลงมาสู่สถานะพื้น
- แต่การที่โมเลกุลจะกลับลงมาสู่สถานะพื้นจะมีกระบวนการหลายขั้นตอน
- การคายพลังงานของอิเล็กตรอน จะเกิดขึ้นเร็วมาก (10^{-14} – 10^{-15} วินาที)
- อิเล็กตรอนที่ S_2 ลดระดับพลังงานการสั่นที่ต่ำที่สุด เรียกกระบวนการนี้ว่า vibrational relaxation ใช้เวลาน้อยกว่า 10^{-12} วินาที
- จะเกิดคือ internal conversion ขึ้นพร้อมกัน โดยอิเล็กตรอนพยายามที่จะลดระดับพลังงานให้ลงมาอยู่ในระดับพลังงานที่มีการสั่นต่ำที่สุด
- เมื่อสถานะกระตุ้น 2 สถานะ มีระดับใกล้เคียงกัน จะมีการเปลี่ยนสถานะของอิเล็กตรอนจากสถานะกระตุ้นหนึ่งไปยังอีกสถานะกระตุ้นหนึ่ง จนกระทั่งระดับพลังงานการกระตุ้นก็จะลดลงไปสู่ S_0 โดยมีการคายโฟตอน เรียกว่า การวาวแสง (fluorescence) ซึ่งเกิดขึ้นได้รวดเร็วมาก (10^{-9} – 10^{-7} วินาที)



- หลังจากมีการสูญเสียพลังงานบางส่วน อิเล็กตรอนจะกลับสู่สถานะพื้นพร้อมกับเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าออกมา
- แต่จากการเปลี่ยนสถานะทริปเปตมาถึงสถานะพื้นใช้เวลานานมากกว่า 10^{-9} วินาที จะเรียกกระบวนการนี้ว่า การเรืองแสง (phosphorescence)

เมื่อโมเลกุลถูกกระตุ้นให้อยู่ในสถานะกระตุ้น เช่น S_2 การกลับคืนสู่สถานะพื้น (S_0) สามารถเกิดขึ้นผ่านหลายกระบวนการที่แตกต่างกัน ดังนี้

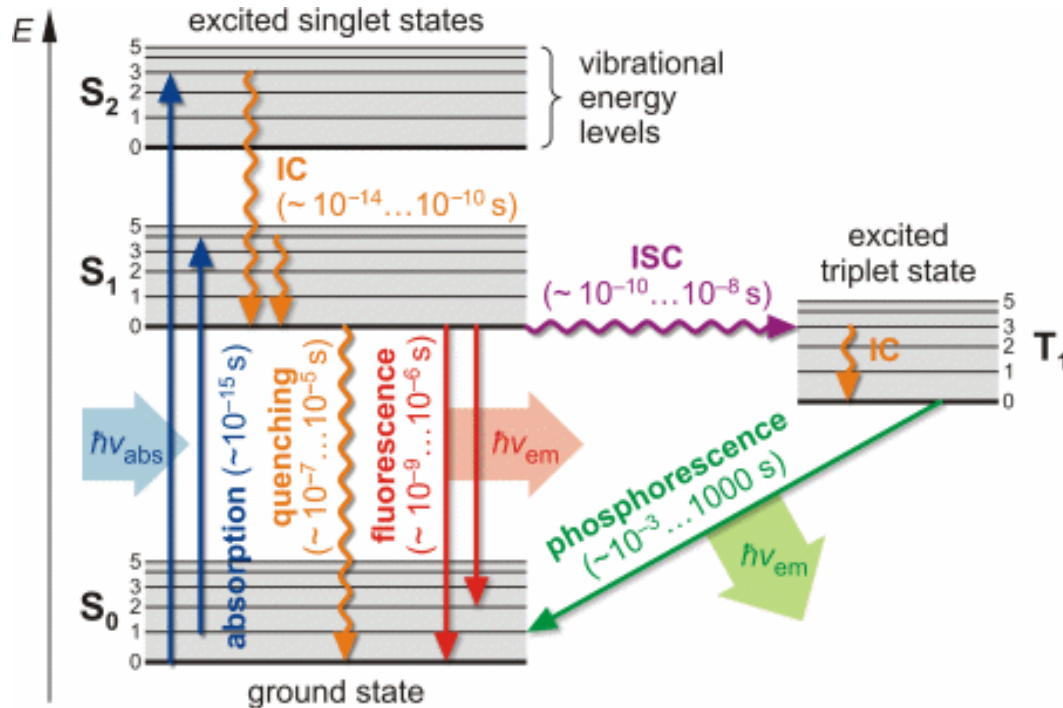


1. การลดพลังงานผ่าน **Vibrational Relaxation (VR)** และ **Internal Conversion (IC)**

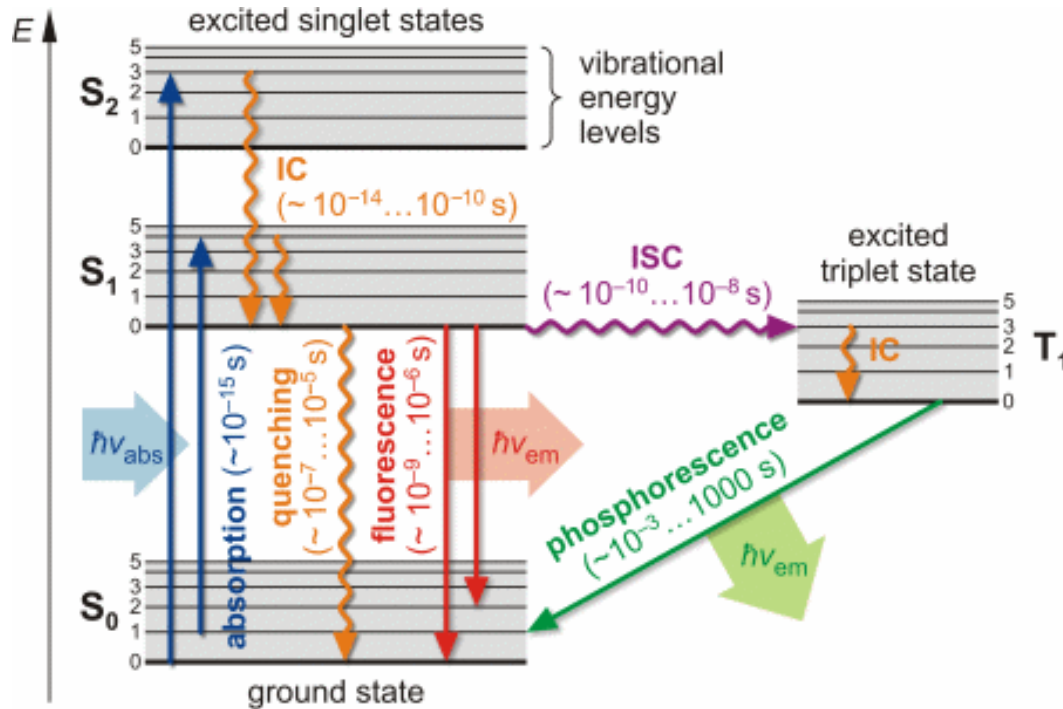
- ในสารละลาย โมเลกุลสามารถลดพลังงานของการสั่น ได้โดยการชนกับโมเลกุลของตัวทำละลาย ทำให้พลังงานส่วนเกินถูกปล่อยออกมาในรูปของความร้อน กระบวนการนี้เรียกว่า **vibrational relaxation (VR)**
- โมเลกุลที่อยู่ในสถานะ S_2 อาจลดระดับพลังงานของการสั่นลงมาสู่สถานะ S_1 โดยไม่มีการปล่อยรังสีออกมา ซึ่งเรียกว่า **internal conversion (IC)**
- กระบวนการ VR และ IC เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก (ประมาณ 10^{-12} วินาที)

2. การเกิดฟลูออเรสเซนส์

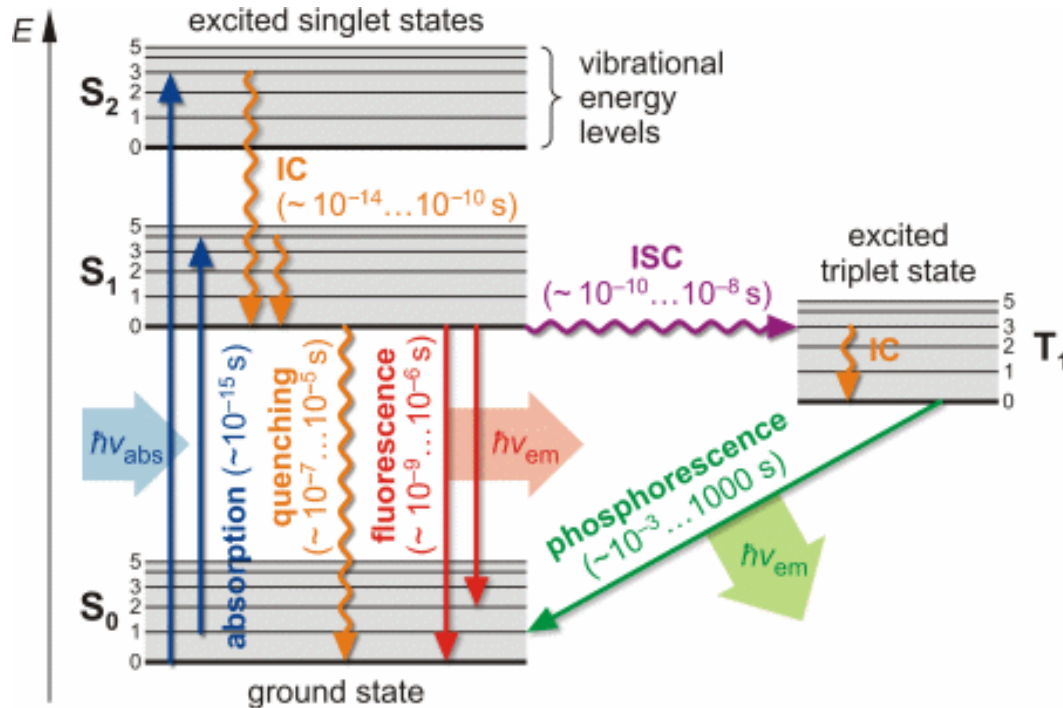
- เมื่อโมเลกุลลดพลังงานจาก S_1 สู่ S_0 โดยการปล่อยโฟตอนออกมา เราเรียกกระบวนการนี้ว่า ฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) หรือการวาวแสง
- การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์เกิดขึ้นรวดเร็วมาก (ประมาณ 10^{-9} – 10^{-7} วินาที)
- พลังงานที่โมเลกุลดูดกลืนและปล่อยออกมาอาจแตกต่างกันเล็กน้อยเนื่องจากอิทธิพลของตัวทำละลาย (solvent effect)



3. การเปลี่ยนแปลงไปสู่สถานะ triplet state (intersystem crossing, ISC)



- โมเลกุลอยู่ในสถานะ S_1 อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนที่ทำให้ Spin กลับทิศทาง ส่งผลให้โมเลกุลเปลี่ยนจาก singlet state ไปเป็น triplet state (T_1)
- กระบวนการนี้เรียกว่า Intersystem Crossing (ISC) และเป็นกระบวนการที่ไม่ปล่อยรังสีออกมา (Non-radiative transfer)
- เนื่องจาก T_1 มีพลังงานต่ำกว่า S_1 โมเลกุลจะเกิดการผ่อนคลายพลังงานผ่าน VR เพื่อลดพลังงานให้อยู่ที่ระดับ T_1

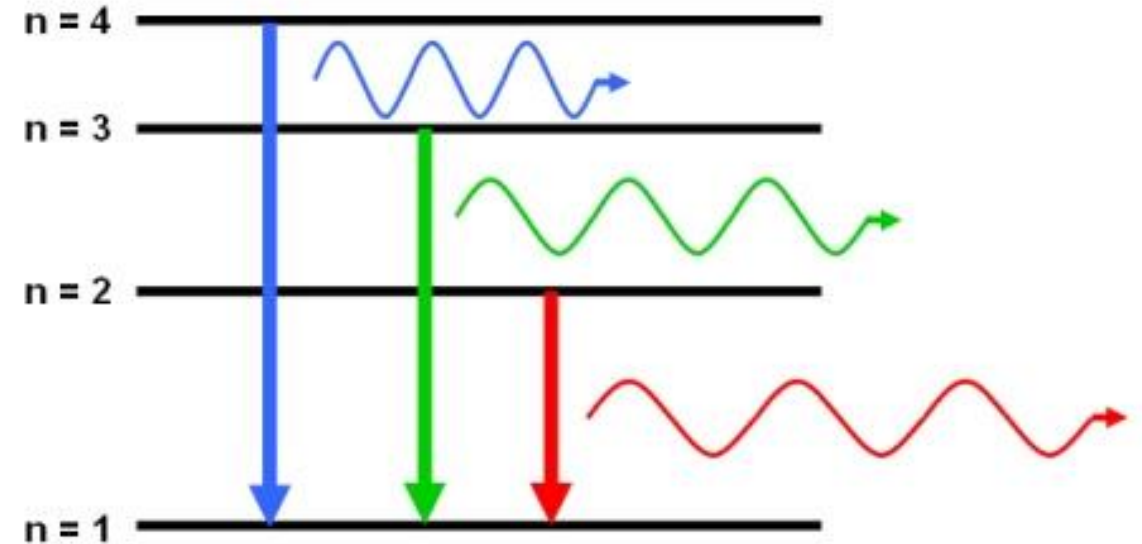


4. การเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์ (phosphorescence)

- การปลดปล่อยพลังงานจาก T_1 ไปยัง S_0 โดยการปล่อยโฟตอนออกมา เรียกว่า ฟอสฟอเรสเซนส์ (phosphorescence) หรือการเรืองแสง
- กระบวนการนี้ใช้เวลานานกว่าฟลูออเรสเซนส์มาก (ประมาณ 10^{-3} ถึง 10 วินาที)
- การเรืองแสงของฟอสฟอเรสเซนซ์สามารถสังเกตเห็นได้แม้หลังจากที่หยุดให้พลังงานกระตุ้น

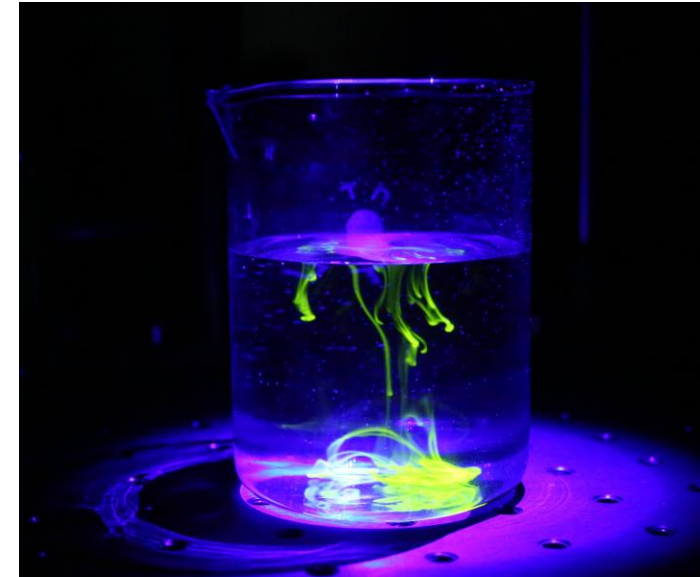
สเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก

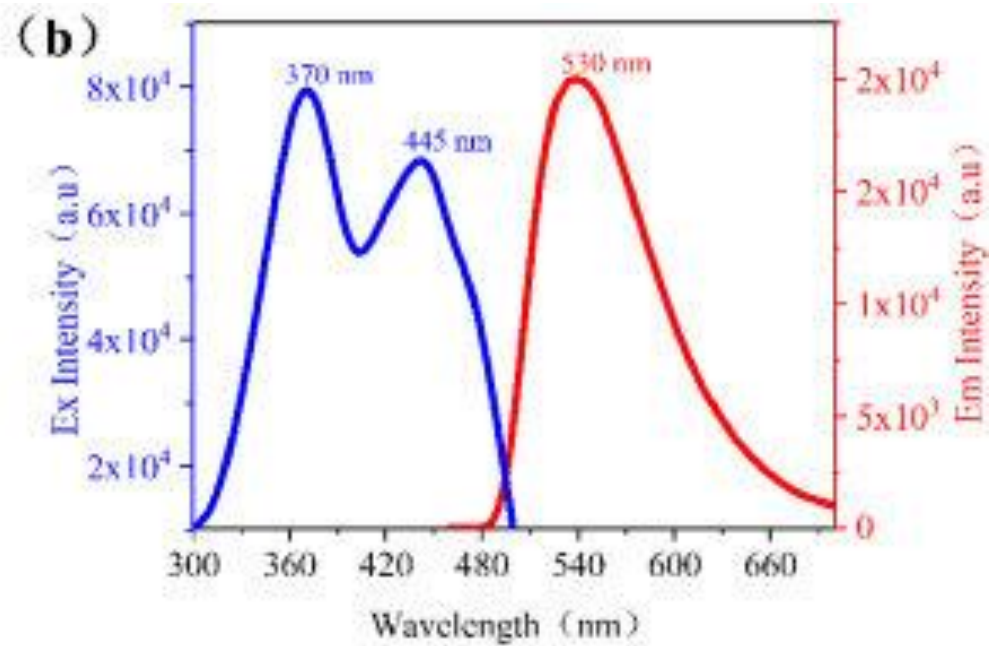
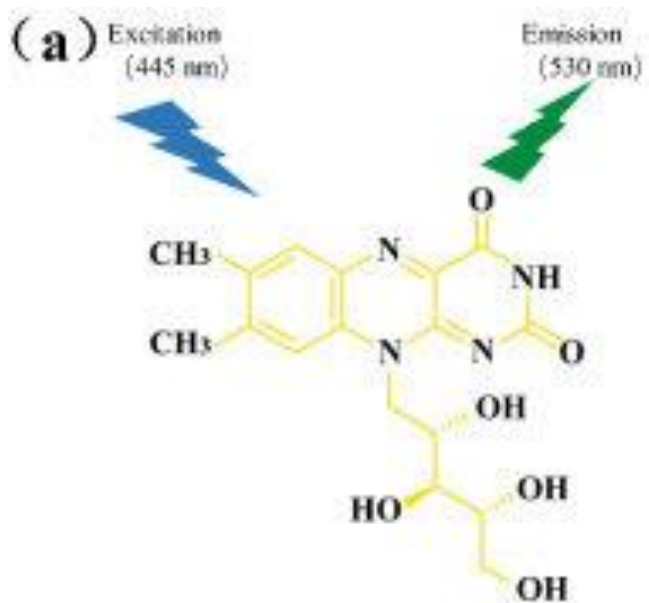
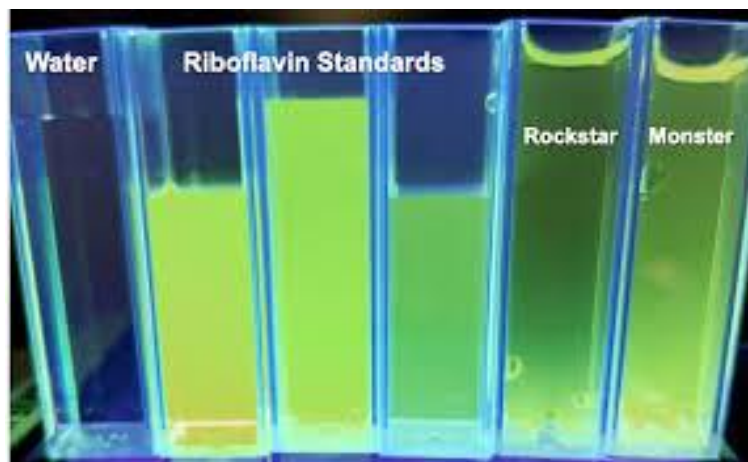
เมื่อโมเลกุลอยู่ในสถานะกระตุ้น (excited state) และกลับคืนสู่ระดับพลังงานต่ำกว่า พลังงานส่วนเกินจะถูกปล่อยออกมาในรูปแบบของโฟตอน (photon) หรือแสง เรียกกระบวนการนี้เรียกว่า การเปล่งออก (emission) เรียกเทคนิค **photoluminescence**



เทคนิคสเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก (Emission spectroscopy)

- 1) โฟโตลูมิเนสเซนส์ (photoluminescence) เกิดจากการที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีแล้วเปล่งแสงออกมา
 - การวาวแสง หรือ ฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence)
 - การเรืองแสง หรือ ฟอสฟอเรสเซนส์ (phosphorescence)
- 2) เคมีลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence) เกิดจากปฏิกิริยาเคมีที่ปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสง

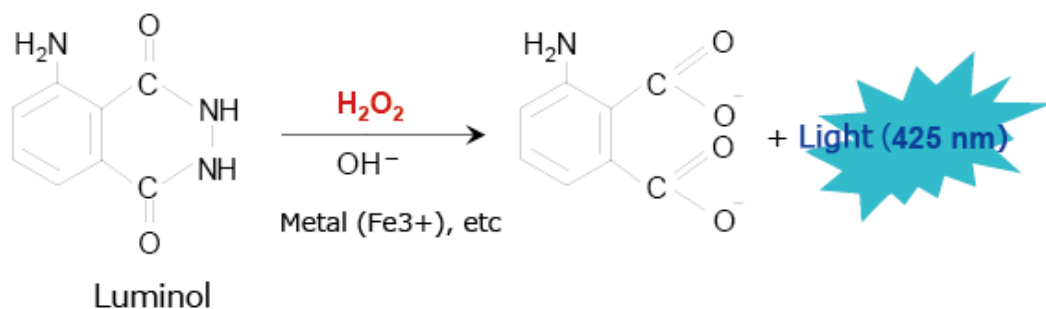




เทคนิคสเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก (Emission spectroscopy)

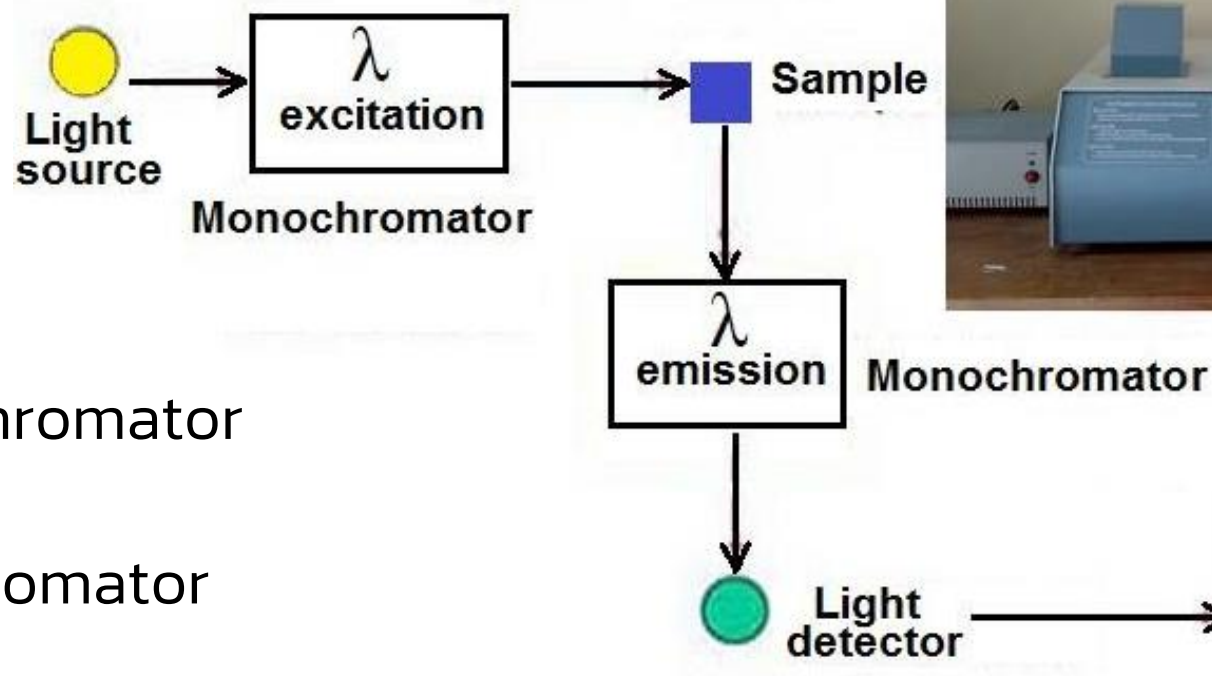
3) Chemiluminescence

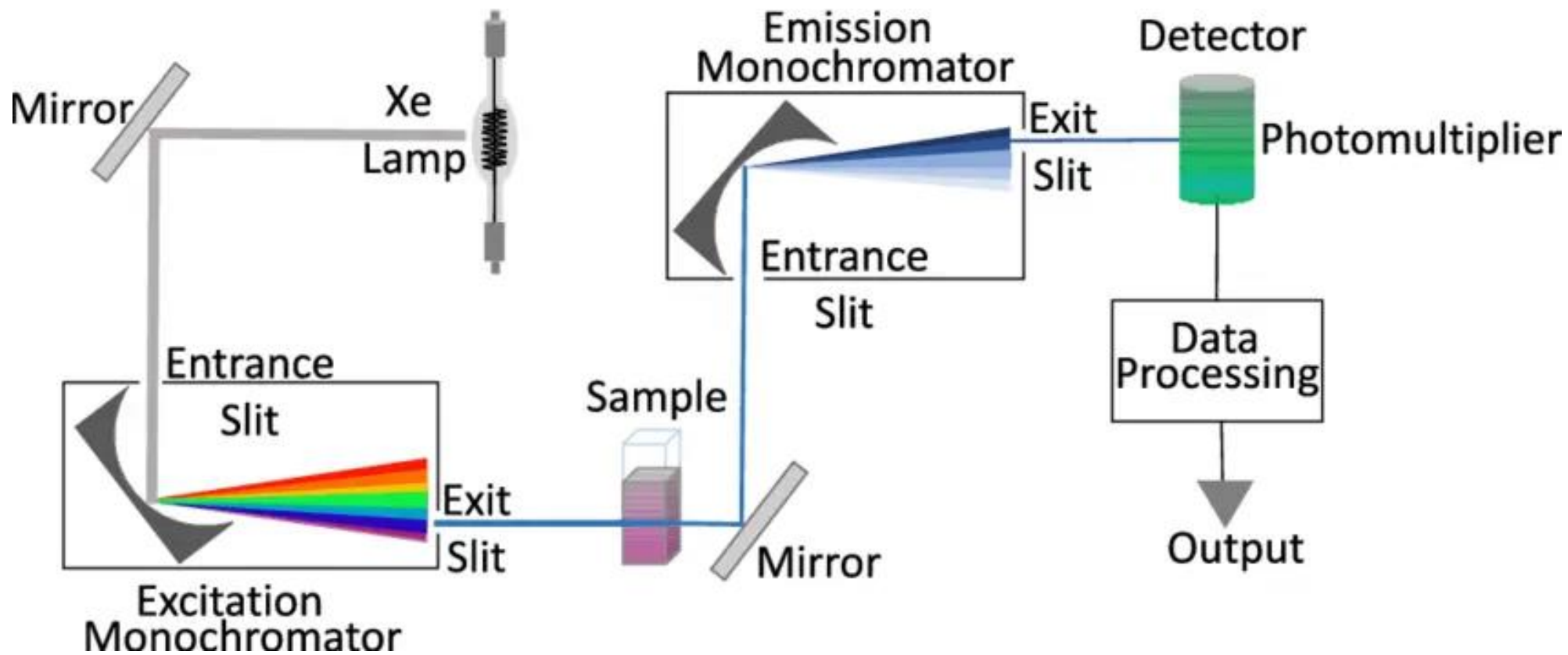
เป็นการเปล่งออกที่เกิดจากอะตอมหรือโมเลกุลถูกกระตุ้นโดยปฏิกิริยาเคมี แล้วกลับสู่สถานะพื้น โดยปล่อยพลังงานส่วนเกินในรูปของโฟตอน



ส่วนประกอบของเครื่องฟลูออเรสเซนส์ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

- 1) Light source
- 2) Excitation monochromator
- 3) Sample holder
- 4) Emission monochromator
- 5) Detector





Our available : Fluorescence and Absorbance Spectrometer

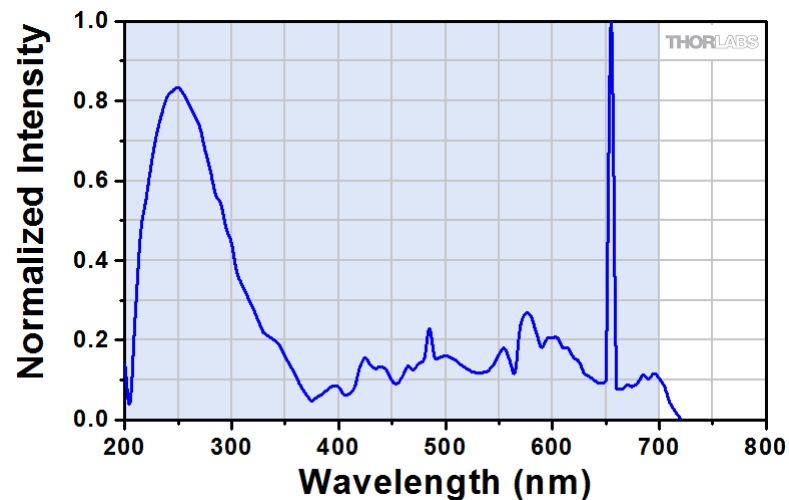
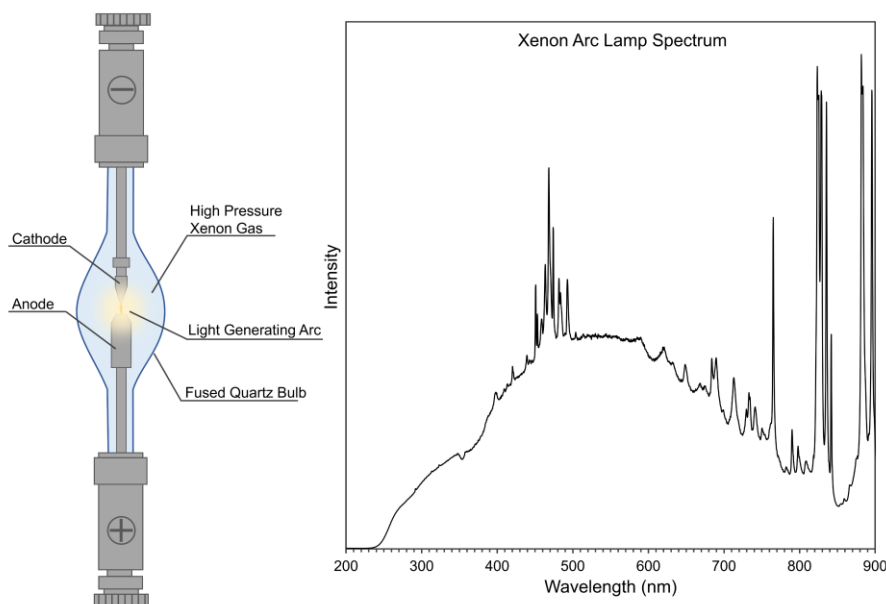
Fluorescence Sensitivity	Water Raman SNR >6,000:1 RMS, 350 nm excitation, 5 nm slits
Spectral Acquisition Rate	510,000 nm/min
EEM Acquisition Rate	As fast as 1 second
A-TEEM Acquisition Rate	As fast as 30 seconds
Fluorescence Detector	CCD/Spectrograph (250 to 1,100 nm)
Fluorescence Bandwidth	1, 2, 3, 5,10, 20 nm (excitation and emission)
Light Source	75 W Xenon arc lamp
Absorbance Detector	Silicon Photodiode (250 to 1,000 nm)
Absorbance Bandwidth	1, 2, 3, 5,10, 20 nm
Absorbance Range	0 to 2 A
Absorbance Accuracy	+/- 0.02 A
Wavelength Accuracy	+/- 1 nm



แหล่งกำเนิดแสง (light source)

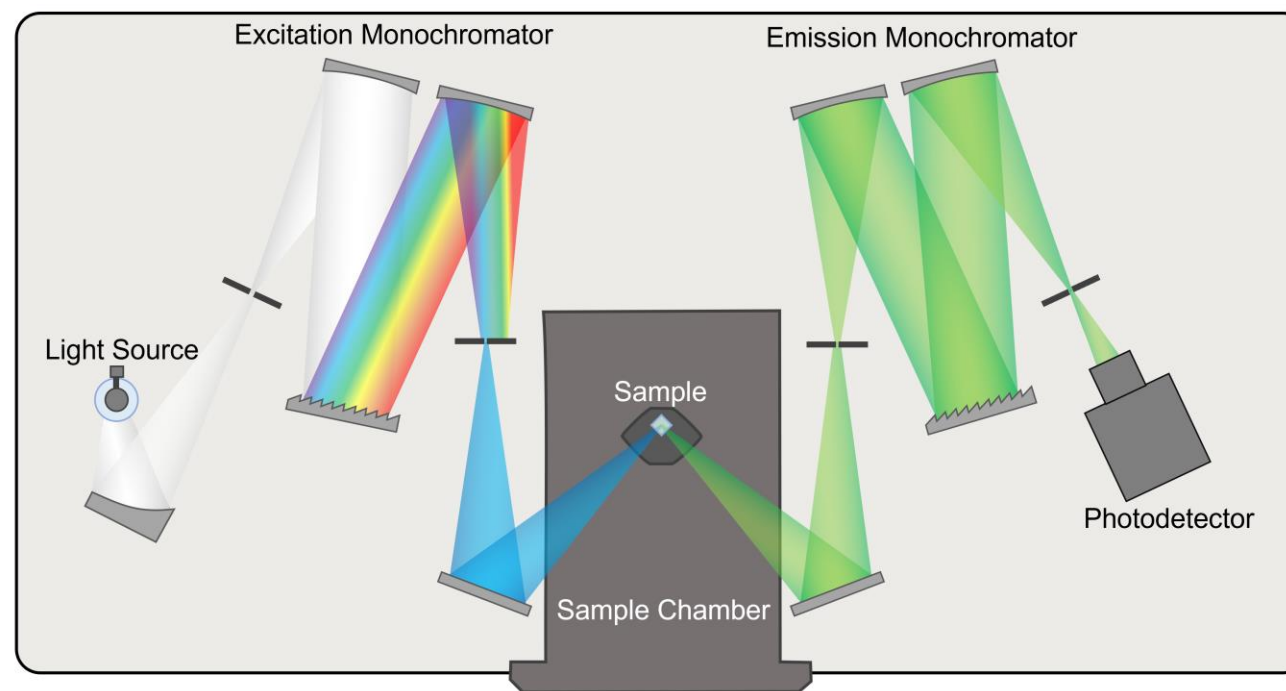
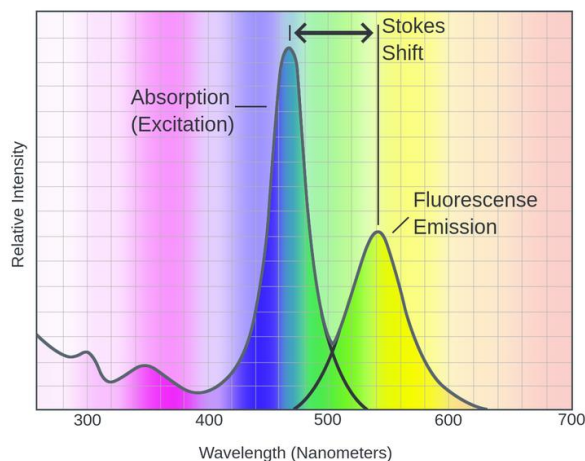
หลอดกำเนิดแสงที่สามารถปล่อยรังสีในย่าน UV-Vis และบางครั้ง near-IR

- ทำหน้าที่เป็นแสงกระตุ้น (excitation beam) เช่น
 - หลอดซีนอน (xenon lamp)
 - หลอดดิวเทอเรียม (deuterium lamp) สำหรับย่าน UV
 - เลเซอร์ (laser)



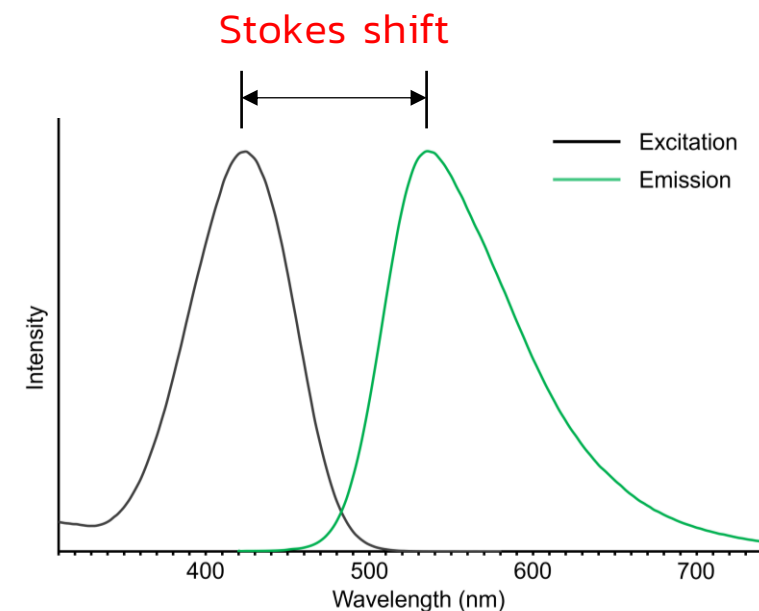
โมโนโครโมมิเตอร์สำหรับเลือกความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation monochromator)

- แสงจากแหล่งกำเนิดจะผ่านโมโนโครโมมิเตอร์ตัวแรก
- ทำหน้าที่เลือกความยาวคลื่นเฉพาะที่ต้องการใช้ในการกระตุ้นตัวอย่าง



โมนโครโมมิเตอร์สำหรับแสงที่ปล่อยออกมา (Emission monochromator)

- เมื่อโมเลกุลในสถานะกระตุ้น อิเล็กตรอนจะค่อย ๆ คืบกลับสู่สถานะพื้นพร้อมปลดปล่อยพลังงานในรูปของแสงเรืองที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น
- ความแตกต่างของความยาวคลื่นระหว่างแสงกระตุ้นและแสงเรืองเรียกว่า Stokes shift ซึ่งคือการวาวแสงของตัวอย่าง (fluorescence emission) แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกมาจะถูกส่งเข้าสู่โมนโครโมมิเตอร์ตัวที่สอง ซึ่งอยู่ในแนวฉาก (90°) กับลำแสงกระตุ้น เพื่อหลีกเลี่ยงสัญญาณรบกวนจากแสงกระตุ้น และเพื่อเลือกความยาวคลื่นเฉพาะที่ต้องการวัด



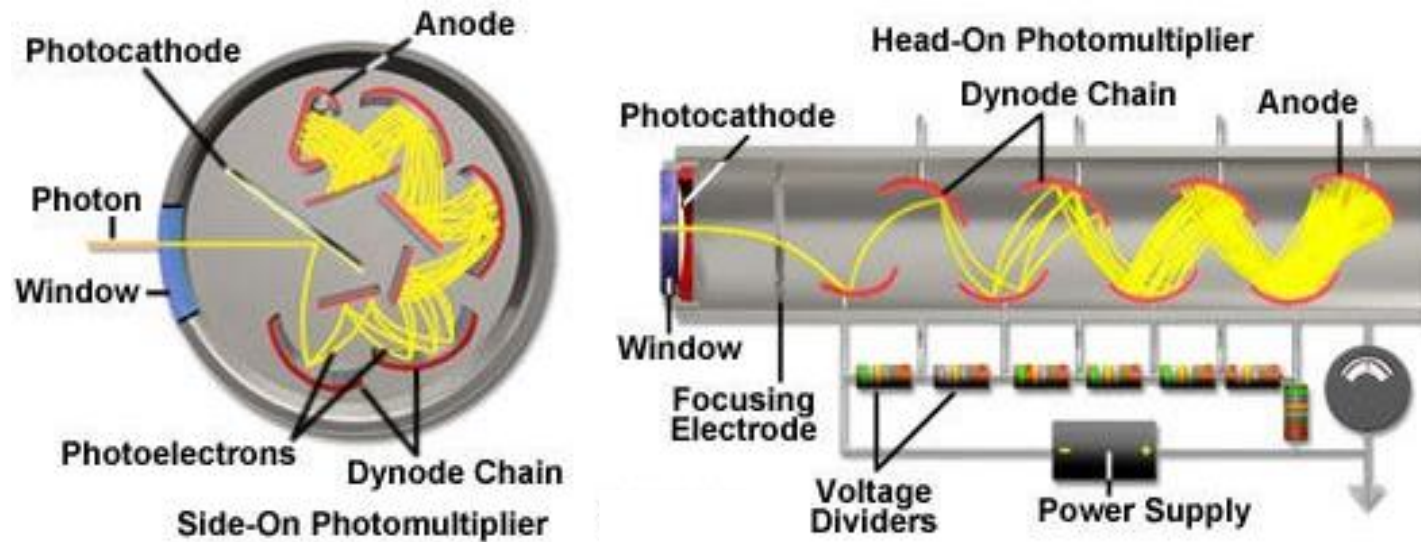
Sample holder

- Carry out in solution (cuvette or flow cell)
- Cuvettes may be circular, square or rectangular, constructed of a material that will transmit both the incident and emitted light.
- Square cuvettes to be most precise since the parameters of path length



Detector

- แสงที่ถูกเลือกแล้วจะส่งเข้าสู่ตัวตรวจวัด ซึ่งมักเป็นหลอดโฟโตมัลติไฟลเลอร์ (photomultiplier tube, PMT)
- สามารถวัดแสงที่มีความเข้มต่ำมากได้อย่างแม่นยำ โดยจะเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า



การทำปริมาณวิเคราะห์

หลักการวิเคราะห์เชิงปริมาณเช่นเดียวกับเทคนิคสเปกโทรสโกปี

- Calibration
- Standard addition
- Internal standard

- เทคนิค fluorescence spectroscopy ไม่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) เนื่องจาก สภาวะของโมเลกุลที่มีโครงสร้างต่างกันอาจให้ fluorescence spectra คล้ายกัน
- fluorescence bands ของสารละลายจะค่อนข้างกว้าง (broad) ที่อุณหภูมิห้อง
- เทคนิค fluorescence สามารถประยุกต์กับสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าเทคนิค absorption จึงเป็นวิธีที่สภาพไว (sensitivity) สูง เนื่องจากกำลังของ fluorescence (F) สัมพันธ์กับความเข้มข้นและกำลังของแหล่งกำเนิดแสง

$$F = 2.3K \epsilon bc P_0$$

- การเพิ่มสภาพไวทำได้โดยการเพิ่ม P_0 หรือการขยายสัญญาณ fluorescence
- โดยทั่วไปเทคนิค fluorescence มี sensitivity สูงกว่าเทคนิค absorption ประมาณ 1-3 เท่า

Methods for Inorganic

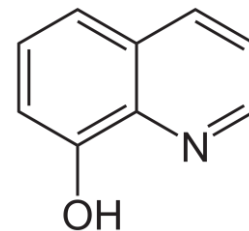
1. Direct Methods

สารที่สนใจ (analyte) ทำปฏิกิริยากับ complexing agent เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนที่วาวแสงได้ (fluorescent complex) แล้ววัดสัญญาณ fluorescence

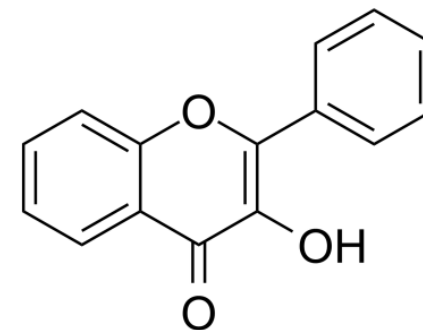
2. Indirect Methods

วัดการลดลงของ fluorescence ที่เรียกว่า **quenching** ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อสารที่สนใจทำปฏิกิริยากับ fluorescent reagent เช่น

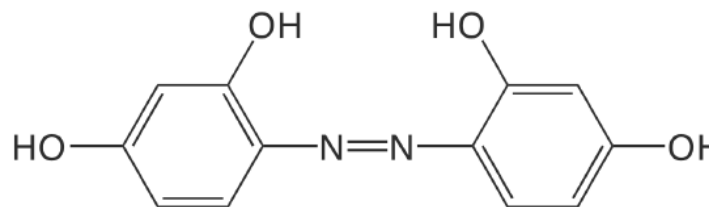
- 8-Hydroxyquinoline (สำหรับ Al, Be, และ metal ions อื่นๆ)
- Flavanol (สำหรับ Zr and Sn)
- Alizarin garnet R (สำหรับ Al, F⁻)
- Benzoin (สำหรับ B, Zn, Ge, และ Si)



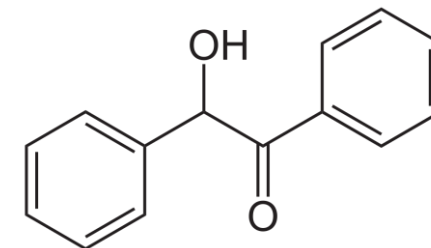
8-Hydroxyquinoline



Flavanol



Alizarin garnet R

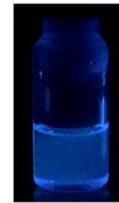
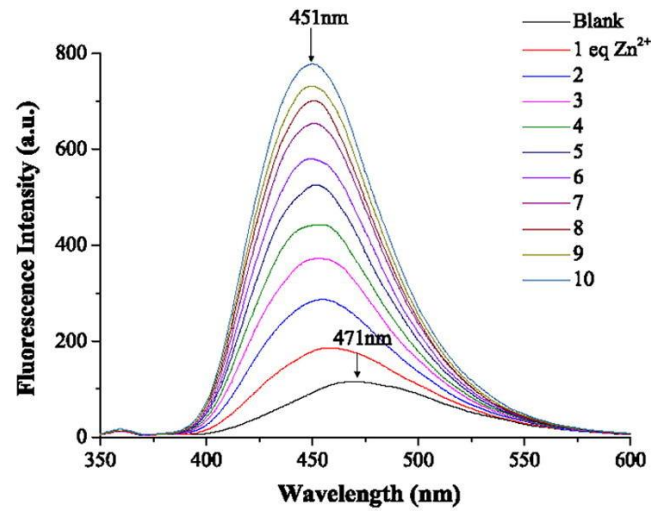
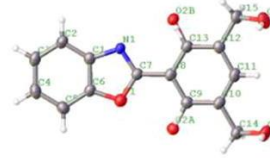
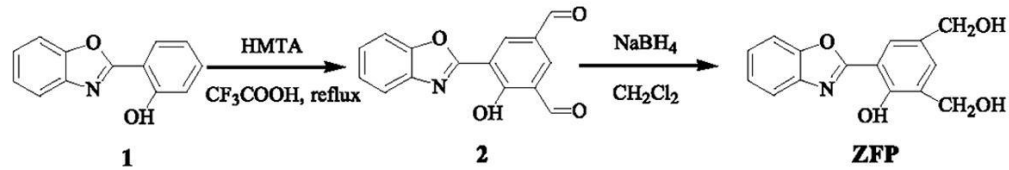


Benzoin

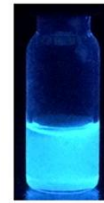
Methods for Inorganic

Ion	Reagent	Wavelength, nm		Sensitivity μg/mL
		Absorption	Fluorescence	
Al ³⁺	alizarin garnet R	470	500	10.007
F ⁻	Al complex ของ alizarin garnet R (quenching)	470	500	0.001
B ₄ O ₇ ²⁻	Benzoin	370	450	0.04
Cd ²⁺	2-(o-Hydroxyphenyl)-benzoxazole	365	Blue	2
Li ⁺	8-hydroxyquinoline	370	580	0.2
Sn ⁴⁺	Flavanol	400	470	0.1
Zn ²⁺	Benzoin	--	Green	10

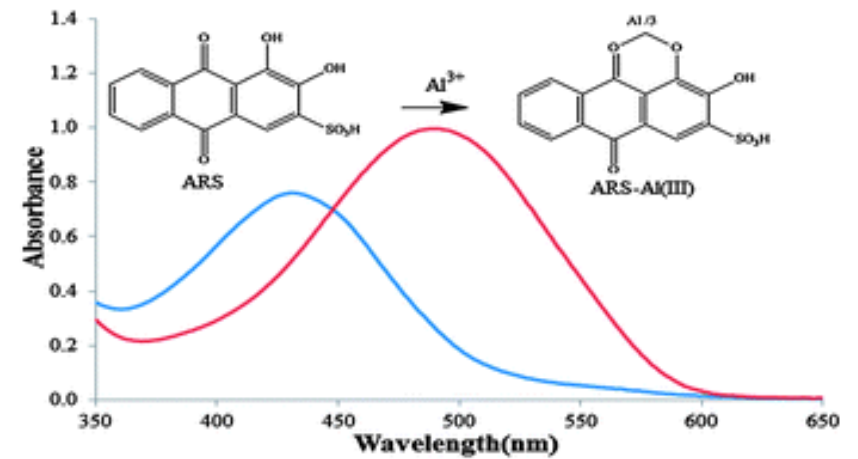
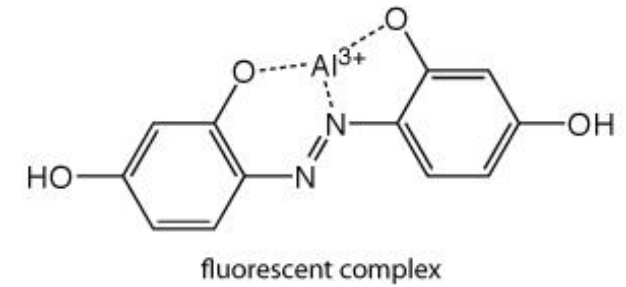
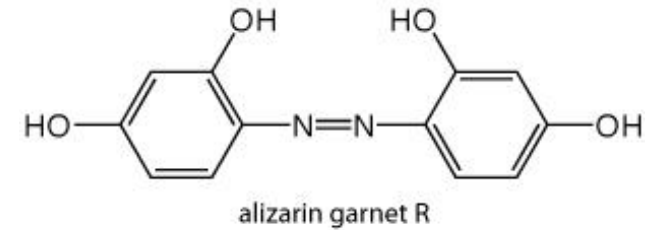
2-(2'-hydroxyphenyl) benzoxazole

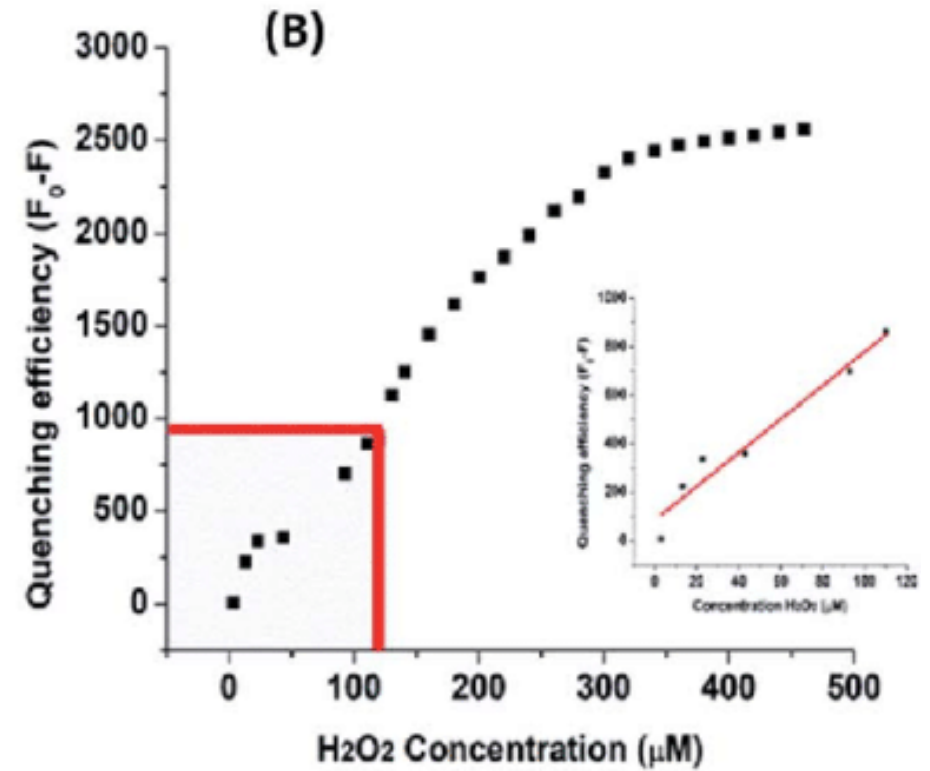
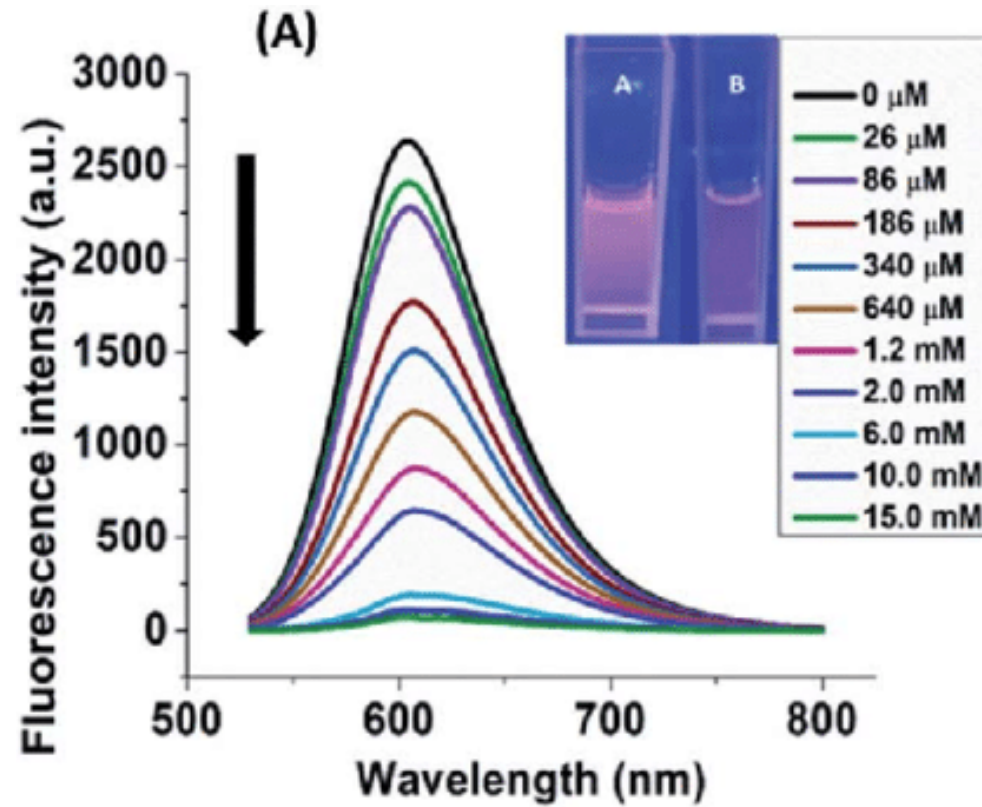


ZFP



ZFP+Zn²⁺





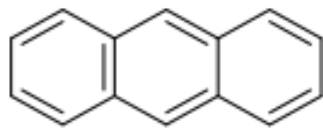
Methods for Organic and Biochemical Species

เทคนิค fluorescence สามารถใช้กับสารอินทรีย์ และสารกลุ่มชีวเคมีจำนวนมาก ได้แก่ amino acids, proteins, coenzymes, vitamins, nucleic acids, alkaloids, porphyrins, steroids, flavanoids และ metabolites

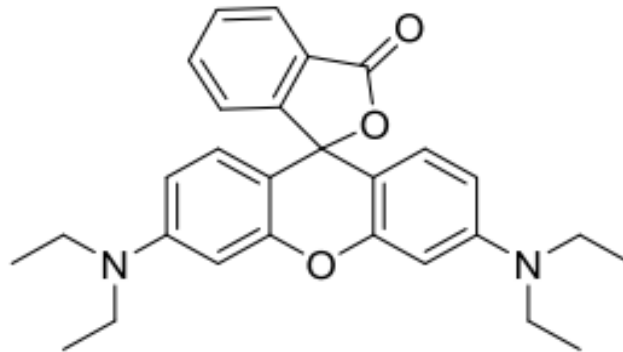
- ส่วนใหญ่ใช้ในการวิเคราะห์อาหาร ยา ตัวอย่างทางคลินิก และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
- เนื่องจากเทคนิค fluorescence มีสภาพไวสูงจึงใช้เป็นตัวตรวจวัดสำหรับ HPLC และ electrophoresis

ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore)

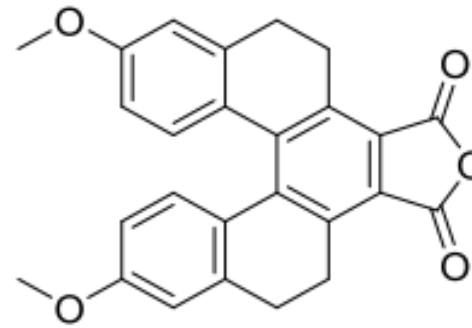
ฟลูออโรฟอร์ : เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติของฟลูออเรสเซนซ์ โดยการดูดกลืนหรือคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม



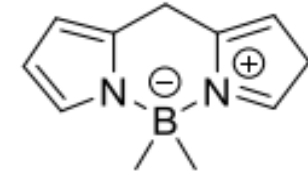
anthracene



rhodamine



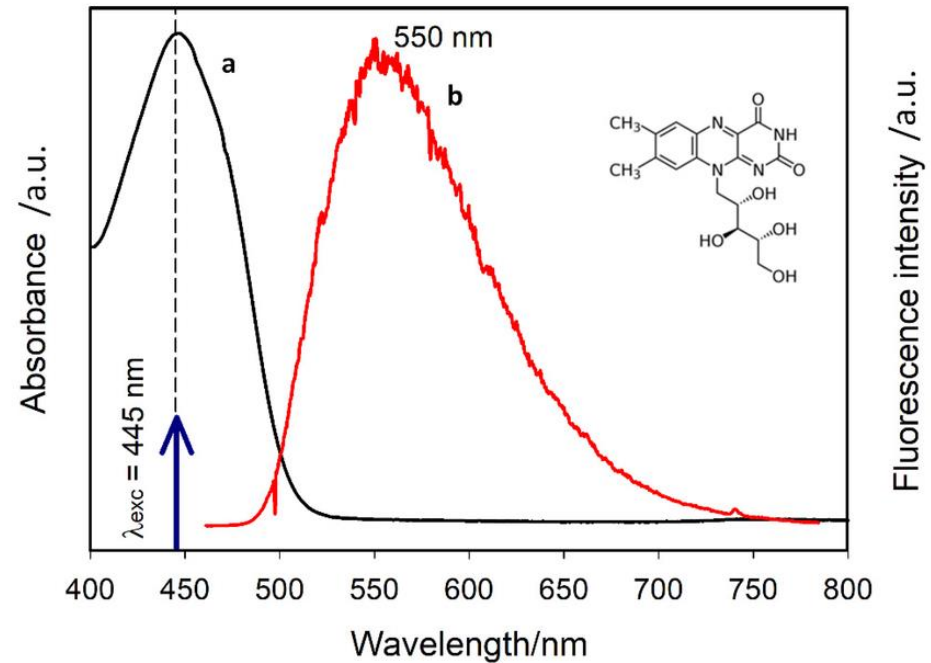
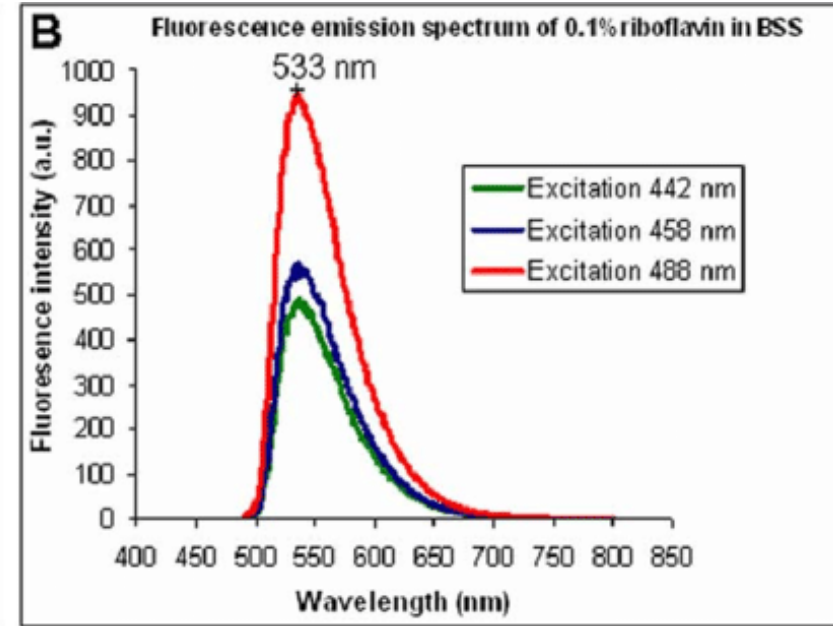
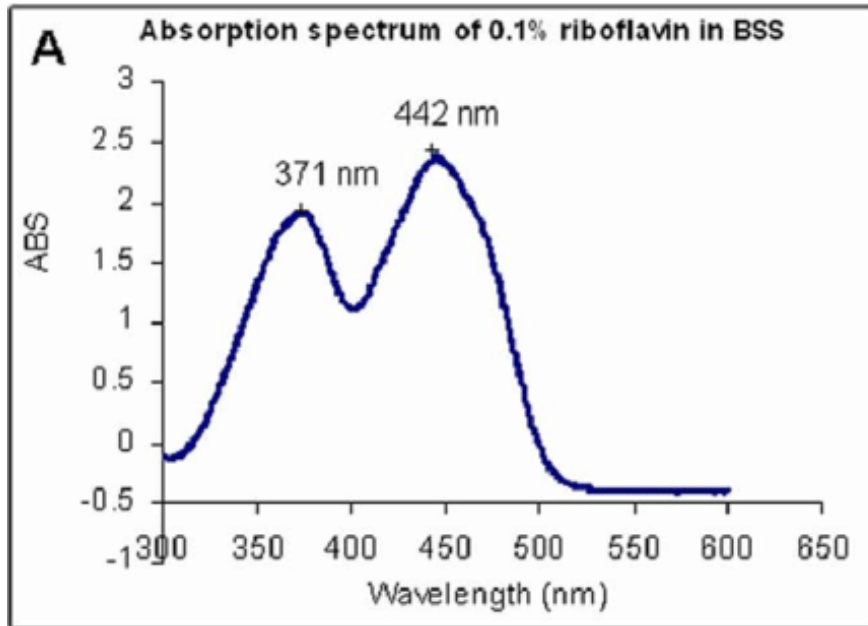
[5]helicene



bodipy

Fluorophore	Excitation Wavelengths (nm)	Emission Wavelengths (nm)
Aminio acids	260–295	280–360
NADH and NAD(P)H	290–295, 340–366	440–470
Flavins	450–488	520–560
Cellulose	250–350	350–500
Chitin	335	413
Lignin	240–320	360
Melanin	469–471	543–548
Sporopollenin	300–550	400–650
Chlorophyll	390–470	630–730
Flavonoids	365	440–610
Carotenoids	400–500	520–560
Alkaloids	360–380	410–600
Nucleic acids (DNA)	270, 320	280–370 and 350–470
Terpenoids	250–395	400–725
Phenolic compounds	300–380	400–500

fluorophore	excitation $\lambda_{\max}$ (nm)	emission $\lambda_{\max}$ (nm)
phenylalanine	258	284
tyrosine	276	302
tryptophan	280	357
vitamin A (retinol)	346	480
vitamin B ₂ (riboflavin)	270 (382, 448)	518
vitamin B ₆ (pyridoxin)	328	393
vitamin E (α -tocopherol)	298	326
NADH	344	465
ATP	292	388
chlorophyll <i>a</i>	428	663
hematoporphyrin	396	614



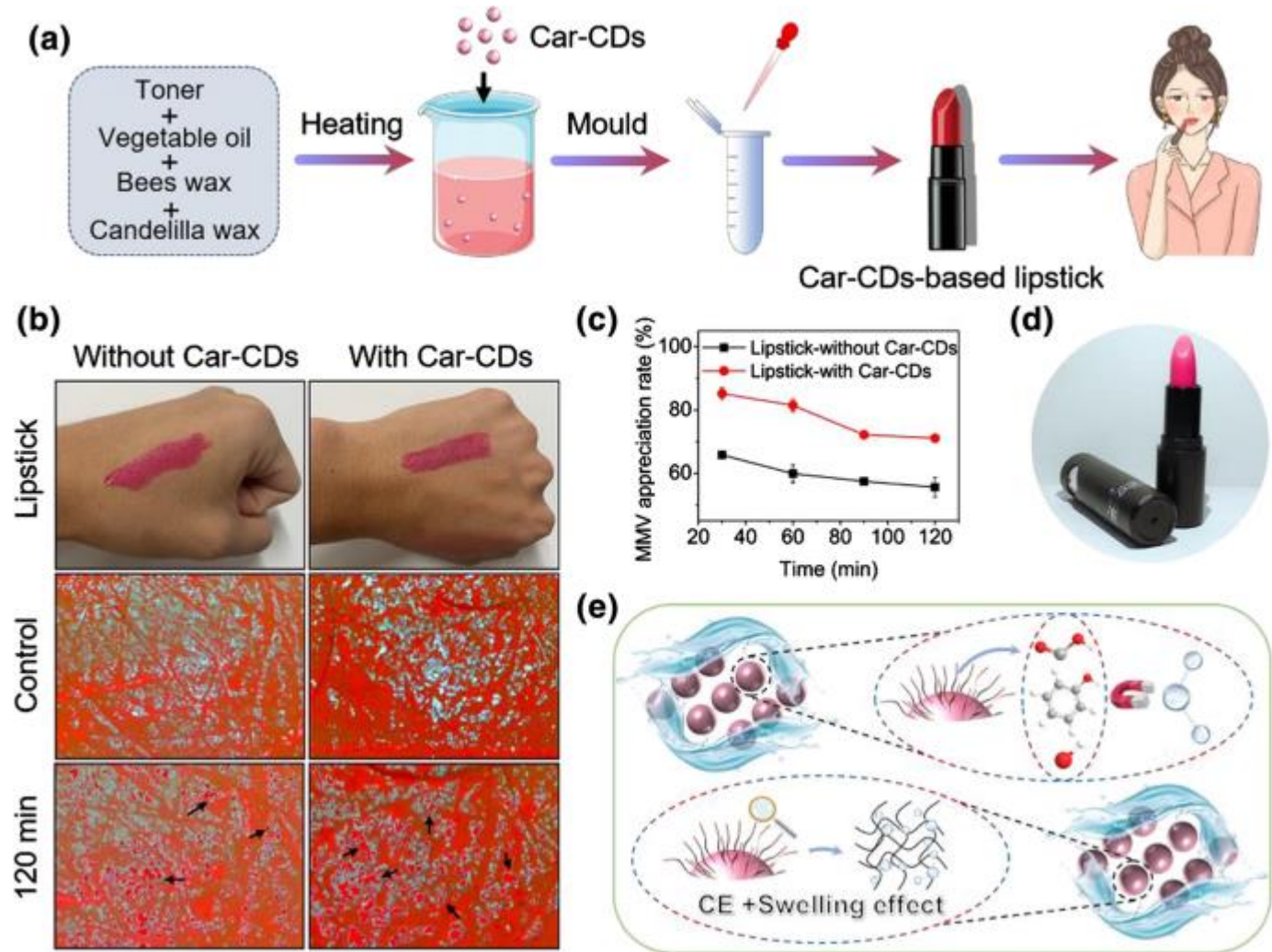
Factors

- **Quenching** : Fluorescence quenching represents any process leading to a decrease in fluorescence intensity of the sample
- **Temperature** : Increased temperature leads to increased movement of the molecules, and thereby more collisions, thus inducing a reduced fluorescence signal.
- **pH** : The pH value affects the fluorescence, and most hydroxyl aromatic compounds fluoresce better at high pH
- **Color** : Color strongly affect the fluorescence signal.
- **Scattering of Light** : This phenomenon occurs in turbid solution or solid opaque samples

Applications

Fluorescent carbon dots with excellent moisture retention capability for moisturizing lipstick

Dong, C., Xu, M., Wang S. (2021). Fluorescent carbon dots with excellent moisture retention capability for moisturizing lipstick. *J Nanobiotechnol* 19,299.
<https://doi.org/10.1186/s12951-021-01029-6>



#กิจกรรม work@class

แบ่งกลุ่มทำกิจกรรม 3.3
มอบหมายโจทย์ให้แต่ละกลุ่ม
ระดมสมองแก้ไขโดยวิธีการ
ร่วมแสดงความคิดเห็น

ให้แต่ละกลุ่มนำเสนอ วิธีการแก้ไขโจทย์ปัญหา

- 1) หลักการสำคัญหรือหลักพื้นฐานที่ถูกต้อง
- 2) วิธีการคำนวณค่าที่ถูกต้อง
- 3) วิธีอธิบายเชิงพฤติกรรม (วิธีปฏิบัติ) ที่ถูกต้อง

โดยให้กลุ่มอื่น ๆ รับฟัง และซักถามในข้อที่สงสัย