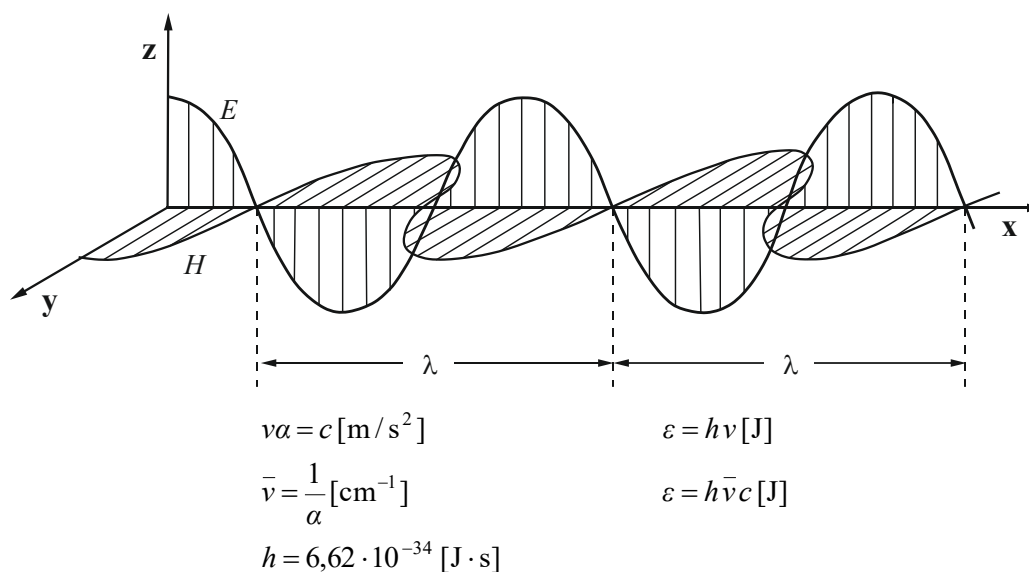


2. ANALITYCZNE ASPEKTY SPEKTROFLUORYMETRII

(dr hab. Łukasz Tymecki, dr Marta Fiedoruk-Pogrebniak)

Spektroskopia jest dziedziną nauki, która bada oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią. Z tego powodu, aby zrozumieć zjawiska jakie podczas takiej interakcji zachodzą należy określić z jednej strony naturę promieniowania elektromagnetycznego, a z drugiej budowę materii, z którą światło ma oddziaływać. Zrozumienie natury tych oddziaływań umożliwiło wykorzystanie ich w analizie chemicznej.

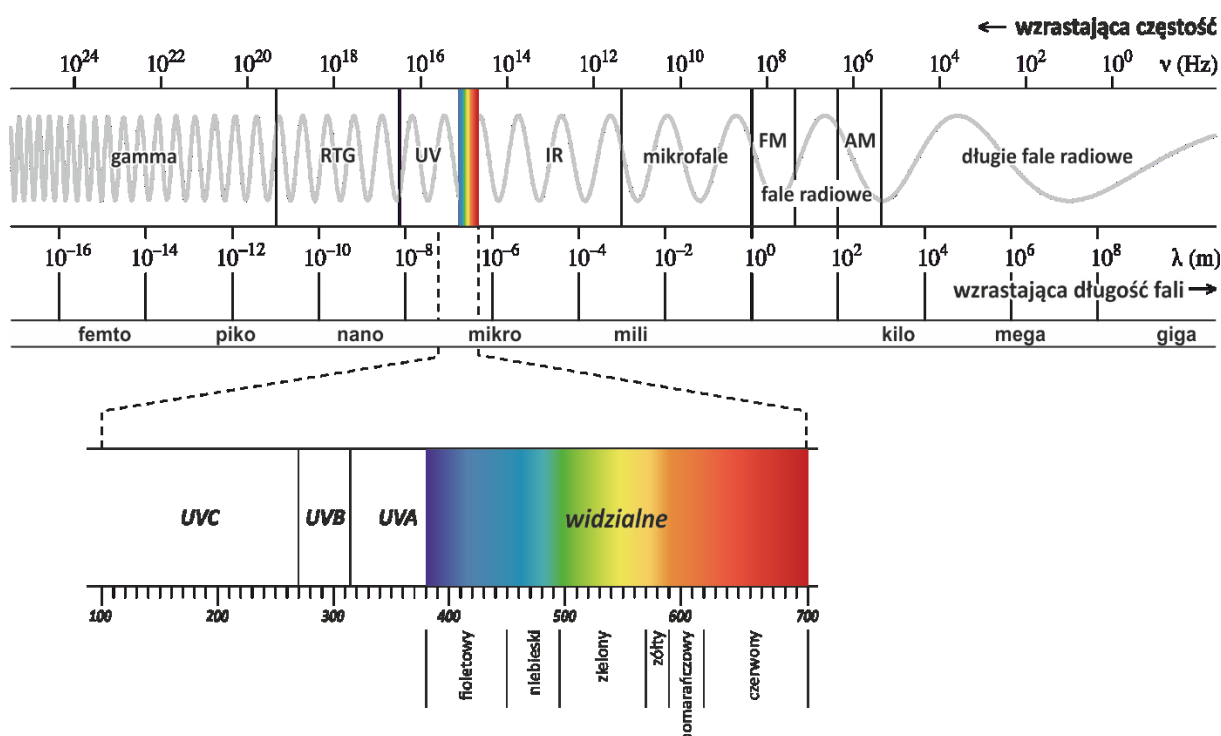
Promieniowanie elektromagnetyczne (EM) to rozchodzące się w przestrzeni w postaci płaskiej fali drganie pola elektromagnetycznego, któremu towarzyszy zaindukowane przez pole elektryczne, zmienne pole magnetyczne. Zaburzenia te rozchodzą się z prędkością $c = 3 \cdot 10^8$ m/s (w próżni), natomiast prędkość ta jest mniejsza w ośrodkach materialnych. Wektory składowej elektrycznej i magnetycznej zmieniają się wzdłuż prostopadłych osi do kierunku rozchodzenia się promieniowania elektromagnetycznego i prostopadle względem siebie (rysunek 1). Cechą charakterystyczną promieniowania elektromagnetycznego jest wielkość nazywana **długością fali** (λ) definiowana jako odcinek drogi (wyrażony w jednostkach odległości – [m]), na którym zachodzi jeden, pełny (od zera do zera) okres drgania pól. Dysponując informacją o liczbie drgań pola w ciągu określonego czasu, można wprowadzić kolejną charakterystyczną wartość – **częstość** (częstotliwość). Wyrażona w tzw. „odwrotnych sekundach” (ν [s^{-1}]) lub hercach [Hz] oznacza liczbę drgań na sekundę. Aby scharakteryzować promieniowanie elektromagnetyczne można także użyć wielkości zwanej **liczbą falową** ($\bar{\nu}$ [cm^{-1}]), która określa liczbę drgań pola przypadającą na każdy przebyty przez promieniowanie odcinek drogi.



Rysunek 1. Falowy obraz promieniowania elektromagnetycznego [1] wraz ze wzorami opisującymi parametry promieniowania i łączące falową oraz korpuskularną naturę promieniowania EM.

Znany jest fakt tzw. **dualizmu korpuskularno–falowego** promieniowania EM. W opisie niektórych zjawisk niemożliwe jest wyjaśnienie ich przyczyny bez użycia kwantowego opisu natury promieniowania elektromagnetycznego, w którym światło traktuje się jako kwanty energii (**fotony**). Pod względem wielkości fotony charakteryzowane są przez częstość promieniowania (z opisu natury falowej światła) pomnożonej przez tzw. stałą Plancka (h). ε wyraża wartość energii pojedynczego fotonu w monochromatycznym promieniowaniu.

W zależności od cech jakościowych można określić zakresy promieniowania elektromagnetycznego. Granice pomiędzy zakresami są umowne. Podział przedstawiony jest na rysunku 2.



Rysunek 2. Zakresy promieniowania elektromagnetycznego.

Termin „**monochromatyczne**” niesie informację o tym, że rozpatrywane promieniowanie elektromagnetyczne złożone jest z fal (fotonów) o jednej tylko długości fali/częstości/liczbie falowej (energii). Taka sytuacja nie występuje w realnym świecie, gdzie mamy do czynienia z promieniowaniem EM **polichromatycznym** (czyli złożonym z fal o różnych długościach/częstościach/liczbach falowych (energii)). Dzięki specjalnym przyrządom, zwanym monochromatorami możliwe jest ograniczenie mnogości fal promieniowania EM i uzyskanie światła, którego długość fal, zakres energii będzie mniejszy. W takiej sytuacji mówimy o promieniowaniu **monochromatycznym**. W tym miejscu należy podkreślić, że w praktyce nie istnieją źródła światła monochromatycznego, a jedynie takie, których zakres częstości fal jest stosunkowo nieduży (kilka – kilkanaście nm). Do kategorii takich źródeł światła należą lasery i diody elektroluminescencyjne (LED).

Intensywność promieniowania (parametr istotny, gdy chcemy, w sposób ilościowy, opisywać interakcję światła z materią) jest energią przechodzącą przez powierzchnię [m^2], prostopadłą do biegu promieniowania w czasie [s]. Źródła światła stosowane w aparaturze naukowej do analizy chemicznej powinny charakteryzować się wysoką intensywnością i stabilnością promieniowania w czasie. Poza wymienionymi wcześniej laserami i diodami elektroluminescencyjnymi stosowane są także źródła światła polichromatycznego takie jak:

- lampy deuterowe, emitujące użyteczne promieniowanie EM w zakresie od ok. 180 do 380 nm;
- lampy wolframowo-halogenowe emitujące użyteczne promieniowanie EM w zakresie od ok. 380 do NIR (bliska podczerwień);
- wysokociśnieniowe łukowe lampy ksenonowe, emitujące promieniowanie zarówno ultrafioletowe, jak i widzialne.

Budowa materii jest bardzo skomplikowana, a jej opis ewoluował przez ostatnie sto lat od koncepcji opartej na modelu atomu Bohra do opisu opartego na mechanice kwantowej. W uproszczeniu, kwantowe ujęcie budowy materii postuluje, że energia atomów i molekuł nie może zmieniać się w sposób ciągły, a przyjmować jedynie określone – **skwantowane** – wielkości. Dotyczy to wszystkich parametrów cząsteczek i atomów. I tak: zarówno to w jaki sposób drgają atomy w cząsteczce (energia oscylacji), obracają się (energia rotacji), a także w jakiej odległości od jądra atomów w cząsteczce znajdują się elektrony (energia elektronowa), jest ściśle określony zasadami mechaniki kwantowej. Dla każdego rodzaju energii można z dużym przybliżeniem obliczyć wartości kolejnych poziomów i za pomocą diagramów energetycznych tłumaczyć różne zjawiska fizyczne – np. efekty związane z interakcją światła z materią. Efekty te związane są z podwyższeniem energii układu w wyniku absorpcji promieniowania niosącego energię, a następnie różnych mechanizmów oddawania energii przez taki układ.

W związku z tym, że poziomy energetyczne są skwantowane, to fale promieniowania elektromagnetycznego podczas oddziaływania z materią będą zmieniały różne rodzaje energii w atomach i cząsteczkach:

- promieniowanie mikrofalowe i dalekiej podczerwieni wzbudzą szybsze obroty cząsteczek (i);
- promieniowanie podczerwone (IR) spowoduje szybsze drgania poszczególnych atomów w cząsteczce wokół położenia równowagi (ii);
- promieniowanie widzialne oraz ultrafioletowe powoduje zwiększenie energii elektronowej (iii).

Zjawiska te poddane są pewnym oczywistym ograniczeniom – efekt zmiany energii cząsteczki bądź atomu może być osiągnięty jedynie, gdy oddziałująca z cząsteczką lub atomem fala posiada energię dopasowaną do rozkładu poziomów energetycznych (przerw między poziomami energetycznymi) molekuł danego rodzaju. Ma to znaczenie praktyczne w analizie chemicznej. Gdy chcemy poznać skład substancji (analiza jakościowa) i/lub zawartość substancji w próbce materiału (analiza ilościowa) możemy skierować promieniowanie elektromagnetyczne o określonych parametrach (intensywność, długość fali) i obserwować czy po przejściu przez próbkę pozostało niezmienione, czy zostało

pochłonięte lub zmieniona została długość fali tego światła. Gdy taka obserwacja zostanie dokonana dla kolejnych fal o zmieniającej się energii, otrzymamy wykres zwany widmem (zmiana intensywności promieniowania po przejściu przez próbkę względem długości fali tego promieniowania). Ze względu na skwantowanie poziomów energetycznych, z użyciem fal z różnych zakresów promieniowania otrzymamy różne widma: (i) rotacyjne, (ii) oscylacyjne i (iii) elektronowe.

Z kształtu wykresu i miejsca (długości fali), gdzie dokonała się największa zmiana intensywności promieniowania, możemy wnioskować o jakościowym składzie próbki. Wielkość zmiany intensywności w wybranym punkcie krzywej porównana do analogicznej wartości dla próbki o znanym składzie jest podstawą do określenia ilościowego składu próbki.

Pochłanianie promieniowania, jako niesprężyste oddziaływanie, nie jest jedynym rodzajem interakcji z materią. Istnieje także wiele rodzajów sprężystych oddziaływań, zachodzących m.in. gdy energia padających fal „nie pasuje” do poziomów energetycznych molekuł. W czasie takich oddziaływań zachodzą jedynie zmiany kierunku promieniowania bez zmian energetycznych molekuł. Zmiany kierunku mogą być spowodowane rozproszeniem, zmianą współczynnika załamania światła ośrodka, interferencji. Do niesprężystych oddziaływań zalicza się także zmianę płaszczyzny polaryzacji po przejściu przez badaną materię. Każde z tych zjawisk także jest podstawą oznaczeń analitycznych – odpowiednio (nefelometria/turbidymetria, refraktometria, interferometria i polarymetria).

W chemii analitycznej powszechnie wykorzystuje się procesy związane z pochłanianiem światła widzialnego (vis) i ultrafioletowego (UV) – ten dział spektrometrii nazywa się spektrofotometrią UV–vis, a fizyczną podstawą zjawisk w tej technice są energetyczne przejścia elektronowe. Prawa, jakie są podstawą stosowania spektrofotometrii UV-vis do oznaczeń analitycznych zostały omówione w innej części skryptu.

Niektóre ze związków chemicznych mają też zdolność emisji promieniowania elektromagnetycznego. Oczywiście, zanim dany układ wyemituje światło, musi najpierw przyjąć odpowiednią porcję energii. Energia ta może być dostarczona w różny sposób, począwszy od ogrzania, skutkującego w odpowiednich warunkach **żarzeniem**, ale także w bardziej wyrafinowany sposób, powodując, że także ciała „zimne” emitują promieniowanie.

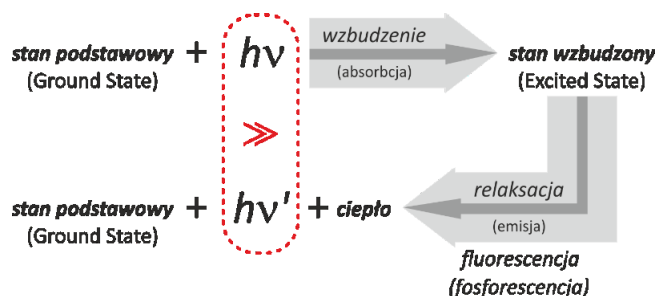
Luminescencja (emisja promieniowania przez ciała zimne – fluorofory) może być pobudzona przez efekty energetyczne reakcji chemicznych (chemiluminescencja (i)), także w organizmach żywych (bioluminescencja (ii)), mechaniczne odkształcanie kryształów (tryboluminescencja (iii)), wzbudzenie polem elektrycznym (elektroluminescencja (iv)) oraz oczywiście wzbudzenie promieniowaniem elektromagnetycznym (fotoluminescencja (v) i fosforescencja (vi)). Bardziej egzotycznym sposobem wzbudzania molekuł do świecenia jest oddziaływanie na nie ultradźwiękami – wtedy mamy do czynienia z sonoluminescencją. Przykładami luminescencji znanymi z życia codziennego mogą być odpowiednio:

- latarki chemiczne, najczęściej złożone z dwóch pojemników, w których znajdują się: roztwór np. nadtlenu wodoru oraz roztwór np. estru kwasu szczawiowego i barwnika fluorescencyjnego;

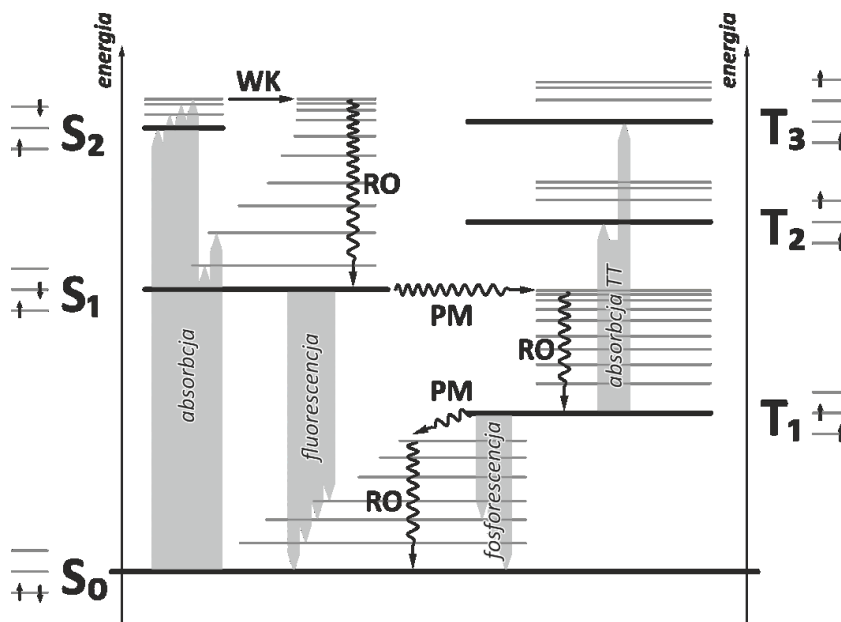
- świecenie robaczków świętojańskich w wyniku zachodzenia w ich ciałach reakcji enzymatycznego utleniania lucyferyny z udziałem lucyferazy;
- świecenie kryształów sacharozy podczas ich kruszenia;
- świetlówki, w których świeci luminofor wzbudzony promieniowaniem UV (powstającym w wyniku wyładowań elektrycznych w argonie lub parach rtęci);
- niebieska poświata napojów zawierających chininę, wystawionych na światło słoneczne;
- pigmenty pokryte farbą zawierającą np. glinian strontu służące do wytwarzania świecących w ciemności znaków ewakuacyjnych.

Techniki analityczne wykorzystujące fotoluminescencję mają duże znaczenie praktyczne i w zależności od występujących przejść elektronowych możemy wyróżnić dwa zjawiska: fluorescencję i fosforescencję. Przejścia elektronowe zobrazowane zostały schematycznie na rysunku 3, który jest uproszczoną wersją tzw. diagramu Jabłońskiego. Pełniejszy obraz zachodzących przemian znajduje się w literaturze rekomendowanej, podanej na końcu rozdziału.

A



B



Rysunek 3. Schemat procesu fotoluminescencji (A) oraz diagram Jabłońskiego (B): S – stany singletowe, T – stany trypletowe, WK – wewnętrzna konwersja, RO – relaksacja oscylacyjna, PM – przejście międzysystemowe (opis w tekście).

Fotoluminescencja, zgodnie ze schematycznym opisem przedstawionym na rysunku 3 musi być poprzedzona absorpcją promieniowania. Oznacza to, że elektrony w cząsteczce fluorofora mogą przechodzić ze stanu podstawowego (stan singletowy S_0) na wyższy poziom singletowy. Relaksacja cząsteczki fluorofora może zachodzić w różny sposób. Najprostszym jest bezpośredni powrót i emisja kwantów promieniowania – w takiej sytuacji mamy do czynienia z procesem fluorescencji. Część energii jest rozpraszana, poprzez zwiększenie oscylacji atomów (RO – relaksacja oscylacyjna) w cząsteczce. Dlatego też energia fluorescencji jest niższa niż energia absorpcji promieniowania. Z kolei w przypadku gdy obserwujemy fosforescencję, wcześniej dochodzi do wzbronionego przejścia międzysystemowego (PM) ze stanu wzbudzonego singletowego na wzbudzony stan trypletowy. Opis kwantowy tych procesów pozwala także na wyjaśnienie faktu dłuższego czasu trwania fosforescencji ($10^{-3} \div 10^{-2}$ s, ale też rzędu minut w niektórych przypadkach) w porównaniu do fluorescencji ($10^{-4} \div 10^{-9}$ s).

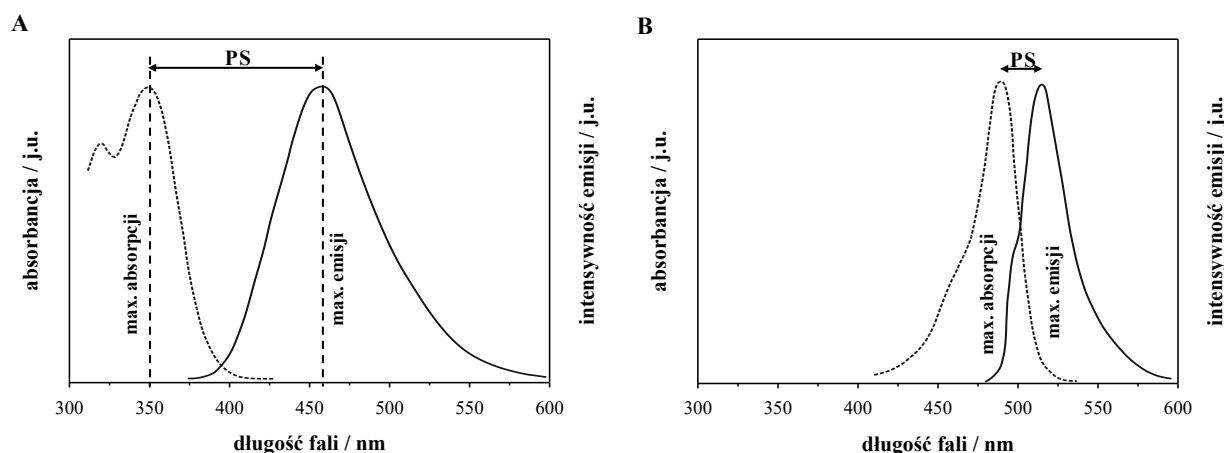
Chromofory, czyli atomy, jony, cząsteczki lub inne indywidua chemiczne, w obrębie których zachodzą przejścia elektronowe absorbujące energię. Wiele z chromoforów wykazuje także fotoluminescencję. Istnienie sprzężonych wiązań podwójnych oraz odpowiednich podstawników w cząsteczkach związków organicznych wpływa znacząco na obserwowany efekt luminescencyjny. Podstawniki w związkach organicznych silnie wpływają na fluorescencję. Podstawnik, który delokalizuje elektrony, taki jak grupy $-NH_2$, $-OH$, $-F$, $-OCH_3$, $-NHCH_3$ i $-N(CH_3)_2$, często zwiększa fluorescencję, ponieważ podstawniki takie wykazują tendencję do zwiększania prawdopodobieństwa przejścia między najniższym wzbudzonym stanem singletowym a stanem podstawowym. Grupy odpychające elektrony zawierające $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-NHCOCH_3$, $-NO_2$ lub $-COOH$ zmniejszają lub całkowicie gaszą fluorescencję.

Fluorescencja jest szczególnie preferowana w cząsteczkach, które mają sztywne struktury. Sztywność molekularna zmniejsza możliwość konkurujących przejść nieradiacyjnych poprzez zmniejszenie drgań. Minimalizuje to przejście między systemami do stanu trypletowego i kolizyjnej degradacji na sposób termiczny. Na przykład fluoresceina i eozyna są silnie fluorescencyjne, ale podobny związek fenoloftaleina, który nie jest sztywny nie jest fluorescencyjny.

W związku z tym, że przed wystąpieniem fluorescencji musi zaistnieć absorpcja promieniowania, to dla danego fluorofora można zarejestrować widmo absorpcyjne. Dysponując źródłem światła polichromatycznego oraz monochromatorem można naświetlać roztwór fluorofora wiązką światła i obserwować stopień transmisji promieniowania po przejściu przez próbkę. Monochromator jest mechanicznym urządzeniem, które poza szczeliną wejściową i wyjściową, przez które światło trafia i opuszcza urządzenie, posiada także kolimator i element rozszczepiający promieniowanie. Funkcją kolimatora jest zamienienie chaotycznego, propagującego we wszystkich kierunkach światła w wiązkę równoległą. Wiązka taka trafia na ruchomy pryzmat (lub w innych konstrukcjach na siatkę dyfrakcyjną) i zostaje rozszczepiona na składowe. Rozszczepione światło

zajmuje w przestrzeni wycinek stożka w którym na jednej krawędzi zlokalizowane jest światło ultrafioletowe a na drugim podczerwone (jeśli użyta została np. lampa ksenonowa). Taki fragment stożka oświetla szczelinę wyjściową ale urządzenie opuszcza wyłącznie zakres określony przez szerokość szczeliny. Element rozszczepiający może być precyzyjnie obracany (np. sterowanym mikroprocesorowo serwomechanizmem) i dzięki temu inny fragment stożka oświetla szczelinę wyjściową. Wysyłając w stronę próbki promieniowanie o zwiększającej/zmniejszającej się długości fali kolejno dla całego badanego zakresu promieniowania (i rejestrując promieniowanie po przejściu przez próbkę) otrzymujemy widmo.

Z widma absorpcyjnego można odczytać informację na temat zakresu długości fali, który jest najbardziej pochłaniany przez próbkę fluorofora. Użycie do wzbudzenia fluorofora światła, które jest najchętniej przez niego absorbowane, da w efekcie największy efekt luminescencyjny. Efektem analitycznym uzyskanym przy użyciu wąskiego zakresu wzbudzenia jest widmo emisyjne, czyli obraz zmian intensywności emisji promieniowania EM fluorofora względem długości fal, przy których prowadzono obserwację. Maksimum zmian na widmie fluorescencji będzie zlokalizowane po stronie większych długości fal (wynika to z tego, że układ oddaje mniej energii niż pochłoniął, a odwrotna sytuacja jest niemożliwa), zaś różnica pomiędzy maksimami absorpcji i emisji nazywa się przesunięciem Stokesa (rysunek 4). Jeśli możliwe jest zajście fosforescencji, to maksimum emisji fosforescencji zlokalizowane będzie jeszcze dalej (przy większych długościach fali niż maksimum emisji fluorescencji), ponieważ w wyniku fosforescencji emitowana jest jeszcze mniejsza energia niż w przypadku fluorescencji. Zaobserwować można także, że kształt widm emisyjnych jest lustrzanym odbiciem widm absorpcyjnych.



Rysunek 4. Widma absorpcyjne (po lewej) i emisyjne (po prawej) dla roztworów wodnych siarczanu chininy (A) oraz soli sodowej fluoresceiny (B). Na obu wykresach zaznaczono przesunięcie Stokesa (PS). Skala absorbancji i intensywności emisji jest identyczna.

Jeżeli dla danego fluorofora przesunięcie Stokesa jest niewielkie (kilka, kilkanaście nm), może to sprawiać kłopoty w analizie widma emisyjnego. Wynika to z tego, że przy zastosowaniu niedostatecznie zmonochromatyzowanego światła nie będzie wiadomo, czy obserwujemy źródło promieniowania wzbudzającego, czy emisję badanego fluorofora. Z tego też powodu preferowane są

układy, w których przesunięcie Stokesa jest znaczne (np. dla chininy wynosi ok. 100 nm). Niemniej jednak odpowiednia konfiguracja aparatury do badań spektrofluorymetrycznych umożliwia także badanie związków charakteryzujących się niewielką wartością przesunięcia Stokesa. Obejmuje to użycie aż dwóch wysokiej klasy monochromatorów (udostępniających wiązkę promieniowania o zakresie długości fal poniżej 1 nm) w jednym aparacie oraz odpowiednią ich konfigurację w przestrzeni (tak, aby wiązka wzbudzająca i emitująca zorientowane były pod kątem 90°).

Wykorzystanie zjawiska fluorescencji w analizie chemicznej może być także uzależnione od wartości wydajności kwantowej fluorescencji, opisywanej jako stosunek liczby kwantów promieniowania wyemitowanego przez roztwór próbki i liczby kwantów promieniowania zaabsorbowanego. Do analizy ilościowej fluoroforów, które ten parametr mają niewielki (znacząco mniejszy od 1) niezbędne jest użycie aparatów wyposażonych w odpowiednie detektory promieniowania. Detektory stosowane w aparaturze do instrumentalnej analizy chemicznej najczęściej wykorzystują zjawisko fotoelektryczne (wewnętrzne lub zewnętrzne), w wyniku którego informacja „światłna” przetwarzana jest na elektryczną. W obwodzie elektrycznym, do którego podłączony jest detektor, obserwowana jest zmiana natężenia prądu albo napięcia lub też oporu, proporcjonalna do intensywności padającego światła. O klasie przyrządu służącego do detekcji promieniowania EM decyduje to, czy charakteryzuje się dużą czułością i szerokim zakresem liniowości wskazań. Warunki te spełniają zarówno fotokomórki (efekt fotoelektryczny zewnętrzny), jak i fotodiody (efekt fotoelektryczny wewnętrzny), a także zwykłe diody elektroluminescencyjne, fotorezystory i fototranzystory, ale na ich tle bezkonkurencyjnym detektorem promieniowania EM jest fotopowielacz. Fotopowielacz działa podobnie jak fotodioda, opierając się na zjawisku fotoelektrycznym zewnętrznym, ale wyposażony jest w serię specjalnych elektrod (dynod). Elektron wybity z materiału fotokatody wybija z dynody serię kilku następnych, te trafiają na kolejną dynodę aż ostatecznie cały zabieg multiplikacji elektronów (wtórnych) powoduje zwielokrotnienie fotoprądu w układzie elektronicznym. Wielkość tego zwielokrotnienia jest uzależniona od napięcia przyłożonego do fotopowielacza i dzięki tej regulacji fotopowielacz jest detektorem najbardziej uniwersalnym – umożliwia rejestrację sygnału świetlnego zarówno o wysokim, jak i niskim natężeniu, zachowując liniową charakterystykę wskazań (przy zadanym napięciu) o znacznym nachyleniu.

Spektrofluorymetria i jej zastosowanie w analizie ilościowej bazuje na stałej (w określonych warunkach) liniowej zależności pomiędzy stężeniem fluorofora a intensywnością emitowanego promieniowania. Można zauważyć, że w porównaniu z innymi analitycznymi technikami optycznymi, spektrofluorymetria charakteryzuje się większą czułością i niższymi granicami oznaczalności. Jednakże, jak każda technika analityczna, również obarczona jest pewnymi ograniczeniami, o których należy pamiętać, konstruując metodę analityczną do oznaczania konkretnego związku chemicznego.

Poważnym ograniczeniem stosowania spektrofluorymetrii jest występowanie tzw. **gaszenia stężeniowego**. Zjawisko to zachodzi w sytuacji, gdy cząsteczek fluorofora w jednostce objętości badanego roztworu jest zbyt dużo. Postuluje się, że wtedy cząsteczki wykazują zdolność do tworzenia

asocjatorów, a te tracą zdolności emisyjne. Drugim wyjaśnieniem zachodzenia gaszenia stężeniowego może być, szczególnie w przypadku fluorofora o niewielkiej wartości przesunięcia Stokesa, zjawisko wtórnej absorpcji promieniowania (efekt filtra wewnętrznego). W rozcieńczonych roztworach gaszenie stężeniowe nie zachodzi, zatem konstruując metodę analityczną warto zaplanować przygotowanie roztworów krzywej kalibracyjnej w zakresie stężeń charakterystycznych dla proporcjonalnych zmian intensywności emisji, czyli lepiej o stężeniach niższych niż wyższych.

Nie jest to jedyny przypadek gdy intensywność fluorescencji może być niższa niż oczekiwana. Znany jest **wpływ polarności rozpuszczalnika** na fluorescencję i fosforescencję. Rozpuszczalniki zawierające ciężkie atomy w swoich strukturach zmniejszają fluorescencję. Również halogenki z reguły zaburzają pomiar fluorescencji, przy czym odbywa się to w wyniku zderzeń jonów halogenków z molekułami fluoroforów (**gaszenie dynamiczne**). Zaobserwowano, że zdolność gaszenia fluorescencji wzrasta od chlorku do jodku. Jest to związane z tym, że jon jodkowy ma niższą gęstość ładunku ze względu na jego większy promień, a zatem w rozpuszczalniku polarnym, powłoka solwacyjna jonu jodkowego jest mniejsza i dlatego jest bardziej prawdopodobne, że zderzy się on bezpośrednio ze wzbudzoną cząsteczką. Także rozpuszczony w roztworach tlen gasi fluorescencję prawdopodobnie z powodu indukowanego fotochemicznie utleniania fluorofora. To wygaszanie (ang. *quenching*) cząsteczkami tlenu zachodzi również na skutek jego paramagnetycznych właściwości.

Zjawisko wygaszania, gdy jest znane i kontrolowane, może być zastosowane jako sposób oznaczania ilościowego substancji powodującej wygaszenie. W takim przypadku, dany jest roztwór fluorofora (np. siarczan chininy) o wysokim stężeniu, ale wciąż znajdującym się na liniowej części krzywej opisującej zależność intensywności emisji od stężenia fluorofora. Dodając kolejne porcje wygaszacza (np. jonów chlorkowych), możemy skonstruować krzywą kalibracyjną wobec wygaszacza i wykorzystać ją do pośredniego oznaczania zawartości wygaszacza w nieznanej próbce.

Wykonując pomiary spektrofлуorymetryczne należy także pamiętać o potencjalnym **wpływie pH** na intensywność fluorescencji. Na przykład anilina wykazuje niebieską fluorescencję w zakresie pH 5÷13, gdy jest wzbudzana przy 290 nm. Przy niższym pH anilina występuje jako kation anilinowy, zaś w środowisku silnie alkalicznym jako anion. Ani anion, ani kation nie są fluorescencyjne.

Temperatura roztworów zawierających fluorofor także ma wpływ na emisję promieniowania. Podwyższona temperatura zwiększa prędkość ruchu molekuł, co może skutkować efektywniejszymi zderzeniami i utratą energii na drodze bezpromienistej przez wzbudzone molekuły. Dlatego też zaleca się, aby badania spektrofлуorymetryczne prowadzić w termostatowanych warunkach.