بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه پیام نور

پایان نامه
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته شیمی تجزیه

دانشکده علوم
گروه علمی شیمی

عنوان پایان نامه:

روشی جدید و کارامد جهت جداسازی همزمان کافئین و پاراستامل با استفاده از کروماتوکرافی لایه نازک– فلورسانس صفحه خوان در نمونه های دارویی

استاد راهنما:
دکتر حسین توللی

استاد مشاور:
دکتر احمد رضوی زاده

نگارش:
سیده فرانه زارعیان جهرمی

آذر 88

تقدیم به

ستاره های پر فروغ زندگیم

به

مهر بی دریغ پدرم

قلب پر عاطفه مادرم

و به

همراهان تمامی لحظات زندگیم

برادر و خواهر نازنینم

سپاسگزاری

بدینوسیله صمیمانه ترین مراتب قدردانی خود را از استاد، راهنما و معلم بزرگوارم آقای دکتر تـوللی به خاطر رهنمودهای بیدریغ و ارزنده‌شان در تحقیق، تنظیم و تصحیح رساله و ایمان بخشیدن به کـار وتلاش ابراز می‌دارم.

همچنین از استاد بزرگوارم آقای دکتر رضوی زاده که به عنوان مشاور در ایـن پایـان نامـه مـرا یـاری نموده اند سپاسگزاری نموده و از هدایت و مساعدت ایشان قدردانی می‌گردد.

همچنین وظیفه خود می‌دانم از راهنماییهای دلسوزانه استاد بزرگوارم آقای دکتر آبسـالان کـه زحمـت داوری پایان نامه را بر عهده داشتند قدردانی و تشکر نمایم.

و در آخر از خانواده عزیزم که در تمام مراحل زندگی مشوق من بوده اند تشکر می‌نمایم.

چکیده

روشی جدید و کارا جهت تعیین همزمان کافئین و پاراستامل با استفاده از کروماتوکرافی لایه نازک– فلورسانس صفحه خوان[1] در فرمولهای دارویی

این پایان نامه شامل بررسی روشی جدید در جداسازی و اندازه گیری همزمان داروهای حاوی کافئین و پاراستامل با استفاده از خاموشی فلورسانی پس از جداسازی توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک توسط دستگاه صفحه خوان می‌باشد.

تعیین این دو جزء با استفاده از خاموشی فلورسانی بر روی کاغذ TLC در طول موج تحریک 254 نانومتر و طول موج نشر 270 نانومتر و در محدوده خطی1900/0-200/0 و 1500/0-30/0 $\mu g\ mL^{-1}$ به ترتیب برای کافئین و پاراستامل انجام شد. بهترین نتیجه در جداسازی مواد با استفاده از مخلوط حلال شستشو شامل n-هگزان، اتیل استات و اتانول و به ترتیب با نسبت های بهینه (2/5: 1/5: 0/4 حجمی/ حجمی) بدست آمد. پارامترهای مؤثری مانند نوع و نسبت فاز متحرک، اثر غلظت و پارامترهای دستگاهی نیز مورد مطالعه قرار گرفت. حد تشخیص کافئین و پاراستامل به ترتیب25/0 و 32/0 $\mu g\ mL^{-1}$ و انحراف استاندارد نسبی برای غلظت 600/0 $\mu g\ mL^{-1}$ از کافئین و 60/0 $\mu g\ mL^{-1}$ از پاراستامل با n=5 بترتیب 1/93% و 2/06 بدست آمد.

همچنین تعدادی از مواد مؤثر موجود در داروهای مورد بررسی مانند کدئین، فنوباربیتال، آسپرین و فنی توئین که ممکن بود در اثر همراهی با کافئین و پاراستامل ایجاد تداخل کنند آزمایش شد و اثرات تداخلی آنها نیز بررسی گردید.

روش پیشنهادی به طور موفقیت آمیزی برای تعیین کافئین و پاراستامل در نمونه های دارویی استفاده گردید.

[1] Thin Layer Chromatography-Fluorescence Plate Reader (TLC-FLPR)

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	
فصل اول: مقدمه	
1-1 طیف سنجی و کاربرد در شیمی تجزیه	1
1-2 نشر لومینسانس	3
1-3 انواع فلورسانس	5
1-3-1 فلورسانس رزنانسی (تشدیدی)	5
1-3-2 فلورسانی خط مستقیم	6
1-3-3 فلورسانی خط پله‌ای	6
1-3-4 فلورسانس حساس	6
1-3-5 فلورسانس چند فوتونی	6
1-4 فاکتورهای مؤثر بر بازده فلورسانس	8
1-4-1 اثرات ساختمانی	8
1-4-2 اثر دما	8
1-4-3 اثر حلال	8
1-4-4 اثر pH	8
1-4-5 حضور ترکیبات پارامغناطیس (اکسیژن)	9
1-5 فسفرسانس	9
1-6 لومینسانس فاز جامد	9
1-7 خاموش گنندگی	12
1-7-1 خاموشی فلورسانی دینامیک (برخوردی)	14
1-7-2 خاموشی ایستا (استاتیک)	16
1-8 دستگاهوری فلورسانس	18
1-9 کروماتوگرافی لایه نازک	20

عنوان | صفحه

1-10 مراحلی برای توسعه روش 20
1-10-1 انتخاب فاز ساکن 20
1-10-2 معیارهای انتخاب یک حلال مناسب 21
1-10-2-1 حلالیت 21
1-10-2-2 تمایل 21
1-10-2-3 تفکیک 21
1-10-3 جدول بررسی حلالیت حلال 22
1-10-4 تمایل گروه های عاملی مختلف برای سیلیکاژل 22
1-11 تئوری فاز ساکن کروماتوگرافی 23
1-12 فاز متحرک 24
1-13 روش های کوپل شدن و مزایای آن 25
1-14 کافئین 27
1-14-1 اثرات کافئین 28
1-14-2 سوخت ساز کافئین و بررسی اثرات آن 28
1-15 پاراستامل 29
1-15-1 مسمومیت 31
1-16 سورفکتانت ها 31
1-16-1 تریتون X-100 31
1-16-1-2 مزایای استفاده از تریتون X-100 32
1-16-2 تریتون X-114 32

فصل دوم: مروری بر کارهای گذشته در اندازه گیری همزمان کافئین و پاراستامل

2-1 مروری بر کارهای گذشته در اندازه گیری همزمان کافئین و پاراستامل 34
2-2 هدف و کاربرد 36

فصل سوم:آزمایش ها و نتایج

عنوان | صفحه

3-1 مواد شیمیایی مورد استفاده 38
3-2 دستگاه های مورد استفاده 39
3-3 روش کار 41
3-4 نحوه استفاده از دستگاه صفحه خوان 21
3-5 انتخاب طول موج مناسب تحریک و نشر برای بررسی خاموشی در دستگاه صفحه خوان 43
3-6 نحوه عمل سیلیکات روی فعال شده با منگنز بر خاموشی فلورسانی 44
3-7 انتخاب حلال شستشوی مناسب 44
3-8 اثر pH 47
3-9 بررسی اثر سورفکتانت های مختلف بر روی میزان خاموشی فلورسانس کاغذ TLC 48
3-9-1 بررسی اثر تریتون X-100 بر میزان خاموشی فلورسانس کاغذ TLC با افزودن آن به کافئین و پاراستامل 48
3-9-2 بررسی اثر تریتون X-114 بر میزان خاموشی فلورسانس کاغذ TLC با افزودن سورفکتانت به کافئین 49
3-10 بررسی اثر غلظت کافئین و پاراستامل بر روی میزان خاموشی فلورسانس کاغذ TLC 50
3-11 نمودار استرن-ولمر کافئین و پاراستامل 51
3-12 پارامترهای تجزیه ای 53
3-12-1 منحنی کالیبراسیون 53
3-12-2 حد تشخیص 54
3-12-3 تکرارپذیری نتایج 55
3-13 اثر مزاحمت ها 56
3-14 کاربرد 57
3-14-1 قرص آ.ث.آ، نوافن، استامینوفن و سرماخوردگی بزرگسالان و نمودارهای مربوط به اندازه گیری این داروها 59
3-15 نتیجه گیری 61
فهرست منابع 63

فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
1-1 روشهای تجزیه دستگاهی	2
2-1 انواع فلورسانس و نحوه انجام آنها	7
3-1 تکنیک ها و کاربردهای لومینسانس فاز جامد	11
4-1 شیوه برهمکنش آنالیت با سیلیکاژل	24
5-1 کافئین	27
6-1 پاراستامل	29
7-1 ساختار تریتون X-100	32
8-1 ساختار تریتون X-114	33
1-3 معرفی شماتیک دستگاه اسپکترومتر به همراه صفحه خوان	40
2-3 برنامه مورد استفاده در دستگاه صفحه خوان	42
3-3 انتخاب طول موج مناسب بر روی بر روی کاغذ TLC در دستگاه صفحه خوان	43
4-3 بررسی فازمتحرک n-هگزان، اتیل استات و برای جداسازی مناسب کافئین و پاراستامل	46
5-3 بررسی اثر افزایش تریتون X-100 بر روی میزان خاموشی فلورسانی کافئین	48
6-3 بررسی اثر افزایش تریتون X-100 بر روی میزان خاموشی فلورسانی پاراستامل	49
7-3 بررسی اثر افزایش تریتون X-114 بر روی میزان خاموشی فلورسانی کافئین	50
8-3 بررسی اثر خاموشی کافئین و پاراستامل بر شدت فلورسانس کاغذ TLC	51
9-3 نمودار استرن- ولمر کافئین و پاراستامل	52
10-3 نمودارهای آ.ث.آ، نوافن، استامینوفن و سرماخوردگی بزرگسالان در دستگاه صفحه خوان	60

فهرست جداول

عنوان	صفحه
3-1 بهینه سازی فاز متحرک جهت جداسازی کافئین و پاراستامل	45
3-2 پارامترهای آماری بدست آمده از منحنی کالیبراسیون	54
3-3 حد تشخیص برای کافئین و پاراستامل	54
3-4 انحراف استاندارد نسبی روش برای کافئین	55
3-5 انحراف استاندارد نسبی روش برای پاراستامل	56
3-6 بررسی مزاحمت گونه های مختلف در اندازه گیری کافئین ($200/0\mu g\ mL^{-1}$) و پاراستامل ($200/0\mu g\ mL^{-1}$)	57
3-7 داده ها و نتایج کاربرد روش پیشنهادی در نمونه حقیقی	58

فصل اول

مقدمه

1-1 طیف سنجی و کاربرد در شیمی تجزیه

ما در دنیایی زندگی می‌کنیم که تجزیه مواد از اهمیت بالایی برخوردار است. روشهای تجزیه ای کمکی برای تشخیص وضعیت سلامت انسانهاست. مواد غذایی که ما می‌خوریم و آبی که می‌نوشیم و چگونگی محیط اطراف ما همه مربوط به انسان و سلامتی اوست. تجزیه همچنین نقش مهمی در فرایندهای صنعتی و گسترش محصولات صنعتی دارد [1].

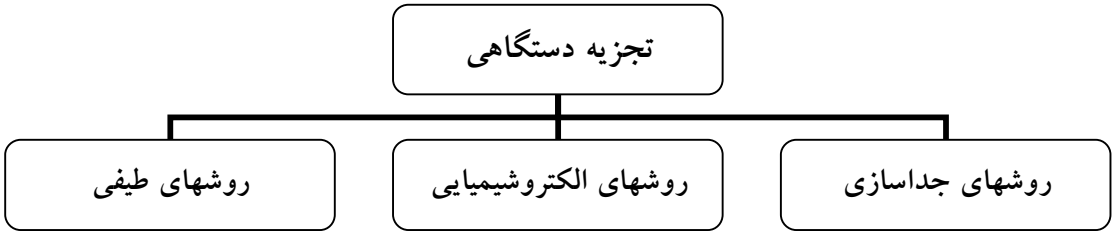
شیمی تجزیه به عنوان علم و هنر تعیین ترکیب و درصد مواد بر حسب عناصر و یا ترکیباتی که در آنها موجود است تعریف می‌شود. از نقطه نظر تاریخی توسعه روشهای تجزیه متعاقباً با پیدایش دستگاه های جدید اندازه‌گیری انجام گرفت و اولین تجزیه کمی، روش وزن سنجی بود که با اختراع ترازوی دقیق امکان پذیر گشت. بزودی این حقیقت آشکار گشت که با به کارگیری ظروف شیشه ای مدرج که برای اندازه‌گیری حجمی محلول های استانداردی که به روش وزنی تهیه شده اند امکان صرفه جویی زیادی در زمان اندازه‌گیری به وجود خواهد آمد [2].

سپس به تدریج چند روش رنگ سنجی به وجود آمد و با تحقق این اصل که اندازه‌گیری های الکتریکی ممکن است برای تعیین پایان تیتراسیون به کار برده شود، همراه با توسعه سریع الکترونیک که از سال 1930 آغاز شد انقلاب مهمی در تجزیه با دستگاه ها ایجاد گشت [3].

تقریباً هر خاصیت فیزیکی خاص هر عنصر یا ترکیب می‌تواند اساس یک روش برای تجزیه آن عنصر یا ترکیب باشد. بدین ترتیب جذب نور، قابلیت هدایت یک محلول و یا خاصیت یونیزه شدن گاز هر کدام می‌تواند اساس کار یک دستگاه تجزیه باشد [2].

روشهای تجزیه دستگاهی[1] پس از سالهای 1940 توسعه فراوان یافتند. علت اصلی چنین پیشرفتی را باید در کاربرد این روشها در صنایع و فعالیتهای پژوهشی جستجو کرد. ارقام شایستگی روشهای دستگاهی در مقابل روشهای کلاسیک از جمله معیارهای اساسی در استفاده از آنها محسوب می‌شود [4]. بر اساس اندازه‌گیری خواص جسم مورد سنجش، عموماً تجزیه دستگاهی را به سه گروه کلی دسته بندی می‌کنند (شکل 1-1):

[1] Instrumental analysis



شکل 1-1. روشهای تجزیه دستگاهی

الف- روشهای طیفی

بر اساس بر هم کنش تابش با ماده و اندازه‌گیری میزان آن بنا نهاده شده اند. این روشها شامل طیف بینی اتمی (جذب[1]، نشر[2]، فلورسانس اتمی[3])، طیف سنجی جذب مرئی- فرابنفش[4]، طیف سنجی جذب زیر قرمز[5] و رامان[6]، فلورسانی سنجی[7] و فسفرسانی سنجی[8]، طیف سنجی تشدید مغناطیسی هسته[9]، قطبش سنجی[10]، کدرسنجی[11]، شکست سنجی[12]، روشهای پرتو X [13]و روشهای پرتو شیمیایی[14] است [5].

[1] Absorption
[2] Emission
[3] Atomic fluorescence
[4] UV- Visible absorption spectrometry
[5] Infrared spectrometry
[6] Raman
[7] Fluorescence spectrometry
[8] Phosphorescence spectrometry
[9] Nuclear magnetic resonance spectrometry
[10] Polarizometry
[11] Turbidimetry
[12] Refractometry
[13] X-ray methods
[14] Radiochemical methods

ب- روشهای الکتروشیمیایی

در این روشها از یک علامت الکتریکی اعمال شده به نمونه استفاده می‌شود تا خواص شیمیایی نمونه مورد ارزیابی قرار گیرد. این روشها شامل پتانسیل سنجی[1]، ولت سنجی[2]، پلاروگرافی[3]، آمپرسنجی[4]، کولن سنجی[5]، وزن سنجی الکتروشیمیایی[6] و هدایت سنجی[7] است [5].

ج- روشهای جداسازی

در روشهایی که بر اساس جداسازی بنا نهاده شده است، جداسازی اجزای یک نمونه قبل از اندازه گیری آنها صورت می‌گیرد. این روشها شامل طیف سنجی جرمی[8] و انواع کروماتوگرافی است [5].

2-1 نشر لومینسانس[9]

لومینسانس پرتو نشر شده از بدنه‌ای سرد است و چندین طبقه‌بندی دارد [6 و 7]:

در شیمی لومینسانس[10] و زیست لومینسانس[11] گونه‌های آنالیت توسط واکنش‌های شیمیایی تحریک شده و نشر حاصله اندازه‌گیری می‌شود.

الکترولومینسانس[12] از حرکت الکترونهایی ایجاد می‌شود که ممکن است از تخلیه الکتریکی یا ترکیب یونها و الکترونهای یک الکترود یا از بر همکنش مواد با الکترونهای تولیدی در یک لوله اشعه کاتدی حاصل شده باشند.

تریبولومینسانس[13] از جداسازی مکانیکی بارهای حاصل از یک تخلیه و ترمولومینسانس[14] از افزایش گونه‌های دیگر در اثر افزایش گرما ایجاد می‌شود.

---

[1] Potentiometry
[2] Voltammetry
[3] Polarography
[4] Amperometry
[5] Coulometry
[6] Electrochemical gravimetry
[7] Conductometry
[8] Mass spectrometry
[9] Luminescence emission
[10] Chemiluminescence
[11] Bioluminescence
[12] Electroluminescence
[13] Triboluminescence
[14] Thermoluminescence

در روش لومینسانس نوری[1] یک منبع نور برای تحریک بکار می‌رود و شامل فلورسانس و فسفرسانس می‌باشد.

هر دو پدیده فلورسانس و فسفرسانس از جمله مکانیسمهای ممکن هستند که بدان طریق مولکولهایی که از نظر الکترونیکی برانگیخته شده‌اند می‌توانند انرژی خود را از دست بدهند. بیشتر مولکولهایی که تحت تأثیر فرایند برانگیختن قرار می‌گیرند انرژی ارتعاشی و الکترونیکی بدست می‌آورند. این قبیل مولکولها بیشترین تمایل را دارند که از طریق برخورد به حالات ارتعاشی پایین‌تر تنزل یابند. اگر این فرایند بدون تابش، در سطح الکترونیکی یگانه برانگیخته توقف کند، مولکولها می‌توانند از آنجا مستقیماً با از دست دادن یک فوتون تابشی به حالت پایه برگردند (فلورسانس).

پدیده ای که منجر به یک انتقال تابشی از پایین ترین سطح ارتعاشی در پایین ترین تراز یک تایی برانگیخته به تراز یک تایی پایه می‌شود را فلورسانس گویند. انتقال از تراز یک‌تایی برانگیخته به تراز یک‌تایی پایه از لحاظ اسپین مجاز است و بنابراین با احتمال بالا اتفاق می‌افتد زمان زوال فلورسانس 10^{-7}s تا 10^{-9} می‌باشد [8].

ندرتاً ممکن است الکترون به سطح سه گانه فرا پایدار انتقال یافته و پس از نزول به حالت پایه تشعشع نماید (فسفرسانس).

در هر دو حالت فوق، مولکول ممکن است به هر یک از حالت ارتعاشی سطح پایه برسد، و بنابراین طیف‌های فلورسانس و فسفرسانس معمولاً شامل خطوط زیادی می‌باشند که اکثر آنها در ناحیه مرئی ظاهر می‌شود. این خطوط در حضور یک حلال پهن‌تر شده و در یکدیگر ادغام می‌شوند، به طوری که ساختمان طبیعی آنها ظاهراً شبیه یک طیف جذب مرئی یا ماوراءبنفش می‌گردد.

فلورسانس بیش از فسفرسانس در تجزیه مورد استفاده قرار می‌گیرد و بنابراین جزئیات آن ابتدا مورد ملاحظه ما قرار خواهدگرفت.

در مطالعات فلورسانس و فسفرسانس معمولاً سه نوع طیف مورد نظر است:

1. طیف جذبی[2]
2. طیف برانگیختگی[3]
3. طیف نشری[4]

---

[1] Photoluminescence
[2] Absorption spectrum
[3] Excitation spectrum
[4] Emission spectrum

طیف برانگیختگی، با پیمایش طول موج اولیه در حالتی که تابش نشری (لومینسانس) ثابت است، پیگیری می شود، رسم می‌گردد. معمولاً منحنی بدست آمده تقریباً شبیه طیف جذب عادی است.
انرژی جذب شده در فرایند برانگیختن الکترون‌ها به سطوح بالاتر، به صورت حرارت دفع می‌گردد، و نشر فقط زمانی صورت می‌گیرد که الکترونها به پایین‌ترین سطوح برانگیخته رسیده و از اینجا به حالت پایه برگردند.
به دلیل اینکه انتقالات برخوردی در محلول در دمای اتاق انجام می‌گیرد میسل ها و لومینسانس در دمای اتاق برای تجزیه شیمیایی بسیار کارا و مؤثر است [8].

3-1 انواع فلورسانس

پنج نوع فلورسانس وجود دارد [1]:

- فلورسانس رزونانسی[1]
- فلورسانس خط مستقیم[2]
- فلورسانس پله‌ای[3]
- فلورسانس حساس[4]
- فلورسانس چند فوتونی[5]

در زیر به بررسی چند نوع از آنها می‌پردازیم:

1-3-1 فلورسانس رزنانسی (تشدیدی)

این نوع فلورسانس زمانی رخ می‌دهد که اتمها در طول موجی که جذب کرده‌اند، مجدداً نشر نمایند. در این حالت ترازهای انرژی پایینی و بالایی خطوط برانگیختگی و فلورسانی یکسان است.
برای مثال جهش‌هایی که از حالت پایه انجام می‌شود، جزء این دسته است. فلورسانی تشدیدی متداولترین نوع فلورسانی است (شکل 1-2 *a*) [1].

[1] Resonance fluorescence
[2] Direct-line fluorescence
[3] Stepwise-line fluorescence
[4] Sensitized fluorescence
[5] Multi photon fluorescence

1-3-2 فلورسانی خط مستقیم

در این حالت اتم توسط یک منبع تابش برانگیخته می‌شود و مستقیماً به یک تراز نیمه پایدار می‌رود. در این نوع فلورسانی ترازهای انرژی بالایی خطوط برانگیختگی وفلورسان یکسانند اما ترازهای انرژی پایینی آنها متفاوت هستند (شکل 1-2 b) [1].

1-3-3 فلورسانی خط پله‌ای

در این حالت ترازهای انرژی بالایی خطوط برانگیختگی و فلورسانی متفاوت‌اند، اما ترازهای پایینی یکسان هستند.

به دو حالت فوق فلورسانس غیر رزونانسی[1] گفته می‌شود شکل (1-2 c) [1].

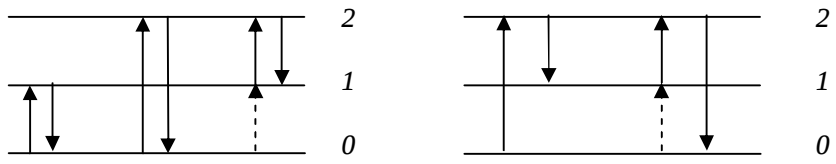
1-3-4 فلورسانس حساس

وقتی است که یک گونه دهنده (D) با جذب فوتون $h\upsilon_E$ تحریک شود (D^*) و انرژی را به گونه گیرنده (A) منتقل کند. گونه A فلورسانس $h\upsilon_F$ تولید می‌کند (1-2 d) [1].

1-3-5 فلورسانس چند فوتونی

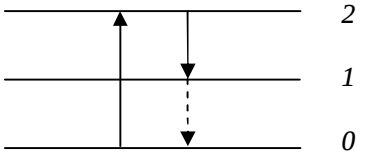
وقتی که دو یا چند فوتون یک اتم را به حالت برانگیخته‌ای تبدیل کند که در برگشت فوتون تولید شود. سطوح واسطه ممکن است مجازی یا حقیقی باشند (1-2 e, f) [1].

[1] Non resonance fluorescence

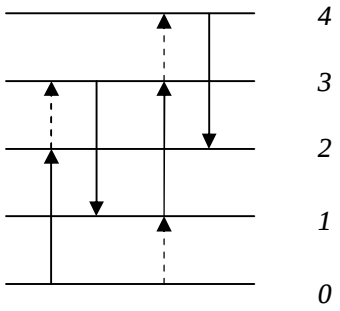


(a)

(b)



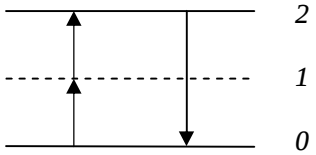
(c)



(d)

$$D + hn_E \rightarrow D^*$$
$$D^* + A \rightarrow A^* + D$$
$$A^* \rightarrow A + hn_F$$

(e)



(f)

شکل 1-2. انواع فلورسانس و نحوه انجام آنها

1-4 فاکتورهای مؤثر بر بازده فلورسانس

بازده فلورسانس یک مولکول به ساختمان مولکول و محیط اطراف آن بستگی دارد [1]. شدت نشر فلورسانس بستگی به فاکتور بهره یا راندمان کوانتومی[1] ϕ_F دارد که می‌تواند بین صفر (بدون فلورسانس) و یک (کلیه مولکولهای برانگیخته از طریق فلورسانس استراحت نمایند) تغییر نماید.

1-4-1 اثرات ساختمانی

فقدان سختی در یک مولکول احتمالاً سرعت تبدیل درونی را افزایش می‌دهد و در نتیجه احتمال وقوع عمل غیرفعالسازی بدون تابش را افزایش می‌دهد. قسمتی از یک مولکول نرم می‌تواند نسبت به بقیه قسمتهای مولکول با فرکانس کم ارتعاش کند، چنین حرکتهایی قطعاً بعضی از تلفات انرژی را باعث می‌شوند [1].

1-4-2 اثر دما

بازده فلورسانس بیشتر مولکولها با افزایش دما کاهش می‌یابد، زیرا با افزایش دما تعداد برخوردها زیاد شده و احتمال غیرفعالسازی از طریق تبدیل خارجی بیشتر می‌شود [2].

1-4-3 اثر حلال

خواصی از حلال نظیر ویسکوزیته، پلاریته و پیوند هیدروژنی بر بازده فلورسانس مؤثر هستند. کاهش ویسکوزیته حلال احتمال تبدیل خارجی را افزایش داده و باعث کاهش شدت فلورسانس می شود [2].

1-4-4 اثر pH

فلورسانس ترکیبات آروماتیک که دارای استخلافهای اسیدی و بازی هستند، معمولاً به pH بستگی دارد. طول موج و شدت نشر هر دو احتمالاً برای شکل‌های یونیده و نایونیده ترکیب متفاوت خواهد بود. این اثر اساساً به علت تغییر بار یا فرم رزنانسی کروموفر خواهد بود [1].

---

[1] Quantum efficiency

1-4-5 حضور ترکیبات پارامغناطیس (اکسیژن)

حضور اکسیژن اغلب شدت فلورسانس یک محلول را کاهش می‌دهد.در برخی موارد با اکسایش یک ترکیب آلی توسط اکسیژن، فلورسانس آن کاهش می‌یابد. اما در بیشتر مواقع O_2، از طریق تقویت عبور بین سیستمی ناشی از برخورد با گونه‌های برانگیخته، باعث فرونشانی حالت یکتایی و سه‌تایی برانگیخته می‌شود. حالت پایه یک مولکول اکسیژن سه‌تایی است و این طبیعت پارامغناطیس اکسیژن، کوپل اسپین- اوربیت با مولکولهای برانگیخته الکترونی را افزایش می‌دهد [2].

1-5 فسفرسانس

فسفرسانس از لحاظ عمل با فلورسانس به صورتهای زیر وجه تمایز دارد:

اولاً به علت طول نسبی زمان تخریب آن (میلی ثانیه تا ثانیه).

ثانیاً به واسطه انتقال به طول موجهای بلندتر.

تعدادی از ترکیبات آلی در محلول در درجه حرارت اتاق مقدار قابل ملاحظه‌ای فسفرسانس از خود نشان می‌دهند ولی ممکن است این پدیده با سرد کردن آنها با نیتروژن مایع بیشتر نمایان شود. به نظر می‌رسد که پایین آوردن درجه حرارت، احتمال انتقال از حالت برانگیخته یگانه به حالت سه‌گانه فرا پایدار را افزایش می‌دهد و همچنین از مکانیسمهای رقابتی برای برگشت غیر تابشی الکترونها به حالت پایه می‌کاهد. بدیهی است که تغییر در چندگانگی اسپین شرط لازم برای فسفرسانس است و بنابراین با کاهش دما احتمال فسفرسانس افزایش می‌یابد.

1-6 لومینسانس فاز جامد

چندین ماده شامل کاغذ صافی، سیلیکاژل، اکسید آلومینیوم، استات سدیم، پتاسیم برمید، لاستیک سیلیکون[1] و سلولز برای لومینسانس بر روی فاز جامد استفاده می‌شود. یکی از دو روش ذیل برای ورود و قرارگیری نمونه بر روی سطح جامد استفاده می‌شود:

(1) سرنگ ها و میکروپیپت ها برای تحویل مقادیر در حد میکرولیتر بر روی سطح جامد استفاده می‌شوند.

(2) روش دیگر مخلوط کردن ماده لومینسانس کننده با پودر مورد نظر مانند سیلیکاژل و سپس خشک کردن مواد می‌باشد [9].

[1] Silicone rubber