การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy

ผศ.ดร.วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ

Asst.Prof.Woravith Chansuvarn, Ph.D.

woravith

LINE woravith

woravith.c@rmutp.ac.th

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

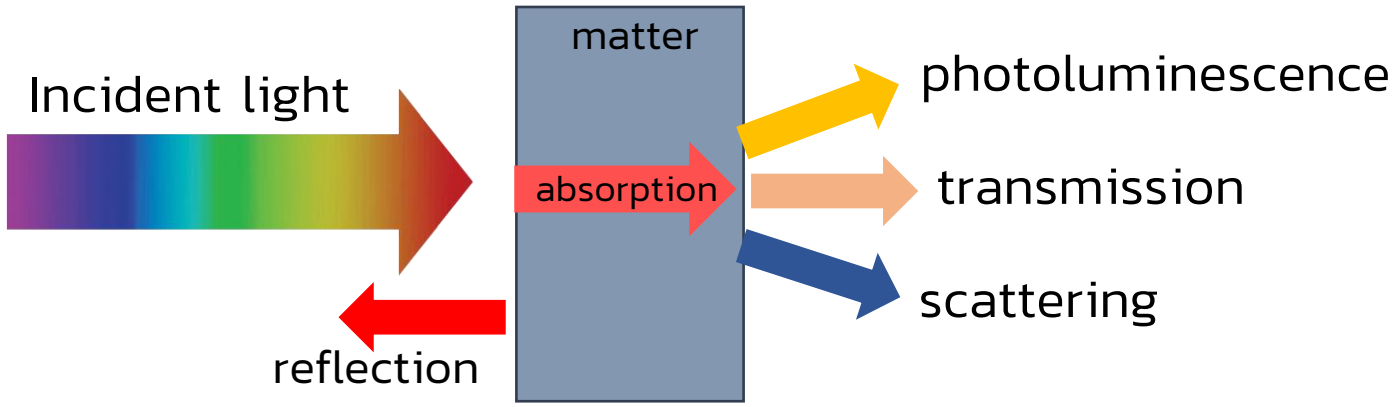
สเปกโทรสโกปี

Spectroscopy

การศึกษาสมบัติหรือข้อมูลของสสารโดยอาศัยการเกิด**อันตรกิริยา** (interaction) ระหว่าง**รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า** (electromagnetic radiation) กับสสาร (matter)

อันตรกิริยา

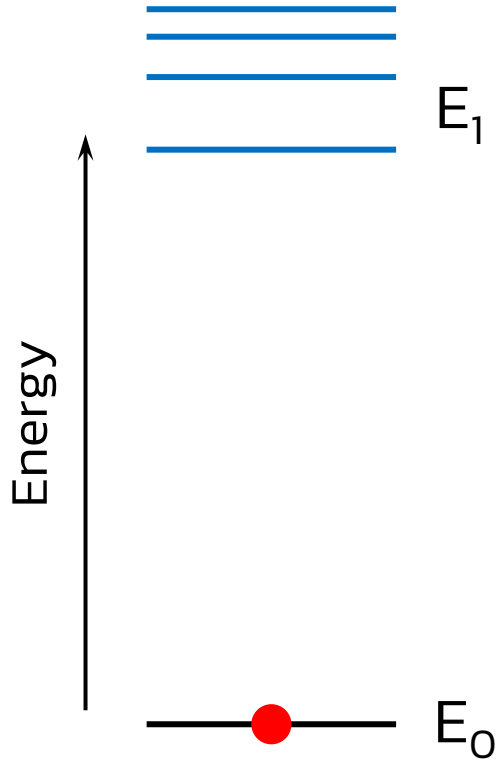
- การดูดกลืน (absorption)
- การเปล่งออก (emission)
- การเปล่งแสงด้วยแสง (photoluminescence)
- การกระเจิงแสง (scattering)



อันตรกิริยา (interaction)

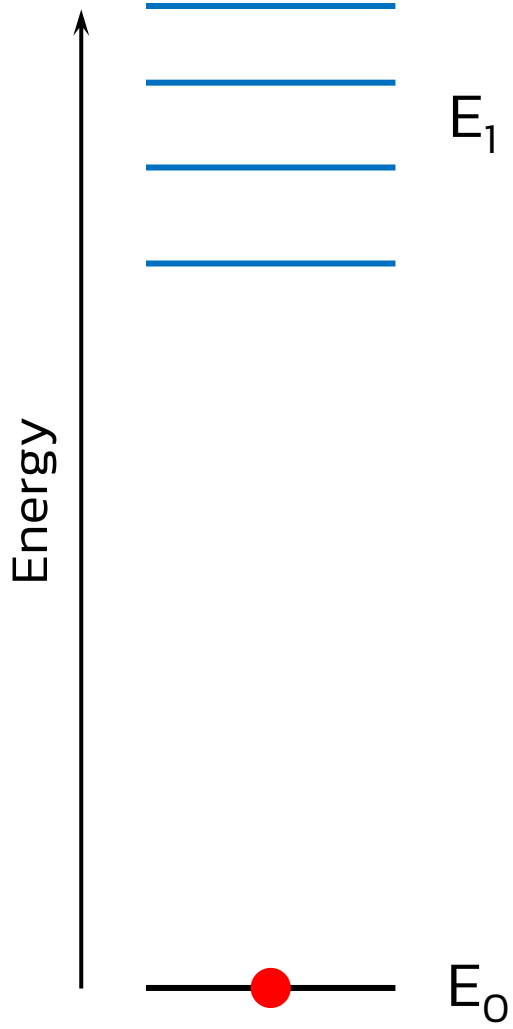
การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน (แทรนซิชัน) ของอนุภาคเมื่อสสารเกิดอันตรกิริยากับรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (โฟตอน)

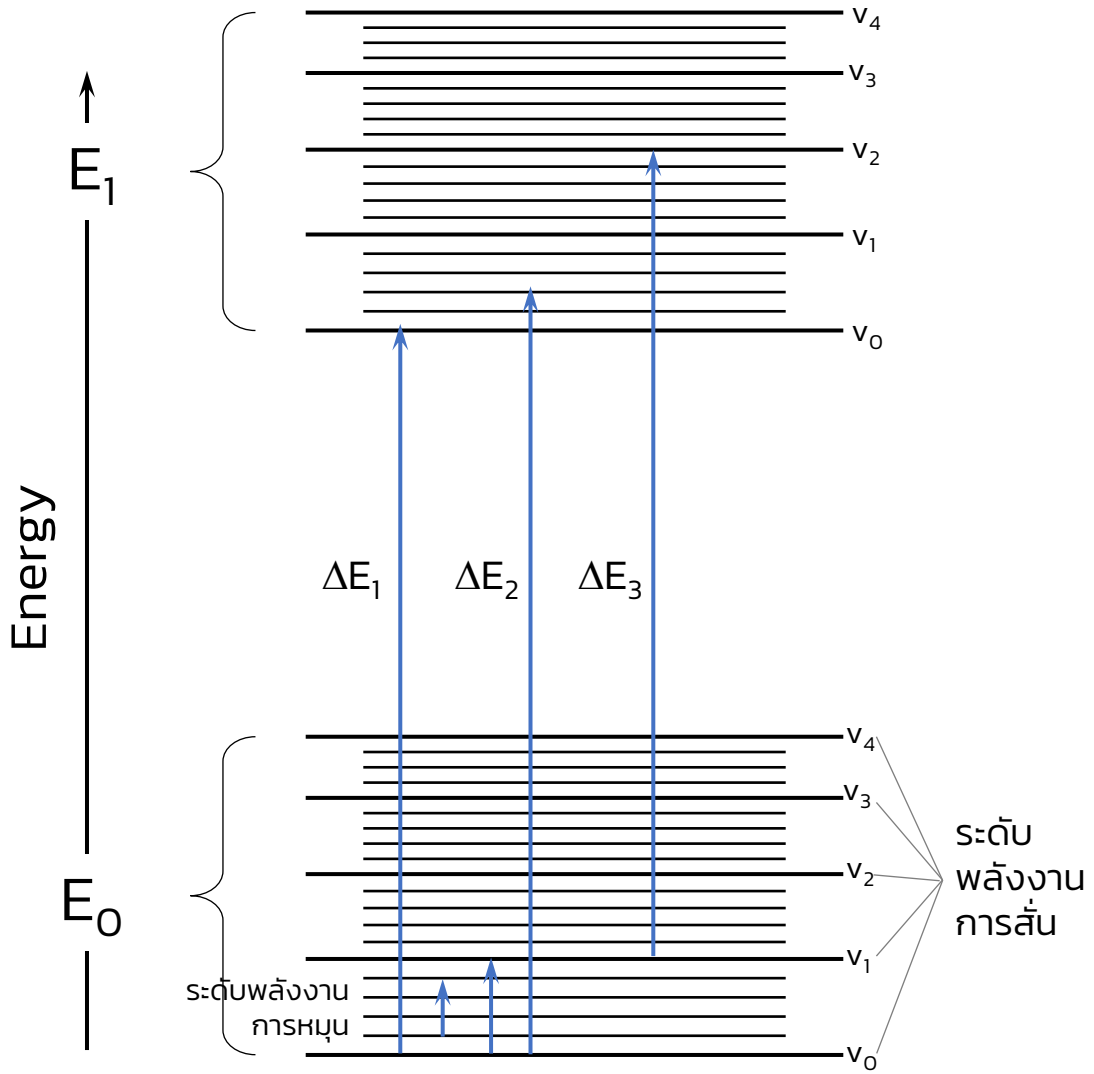
โดยเป็นการแทรนซิชันจากระดับพลังงานต่ำกว่า เรียกว่า **สถานะพื้น** (ground state, E_0) ไปยังระดับพลังงานสูงกว่า เรียกว่า **สถานะกระตุ้น** (excited state, E_1)



- เปลี่ยนระดับพลังงานนิวเคลียร์
- เปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนวงใน
- เปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนที่สร้างพันธะ (electronic transition)
- เปลี่ยนพลังงานจากการหมุน (rotation)
- เปลี่ยนพลังงานจากการสั่น (vibration)
- เปลี่ยนระดับพลังงานจากการสปินของอิเล็กตรอนในสนามแม่เหล็ก
- เปลี่ยนระดับพลังงานจากการสปินของนิวคลิไอในสนามแม่เหล็ก

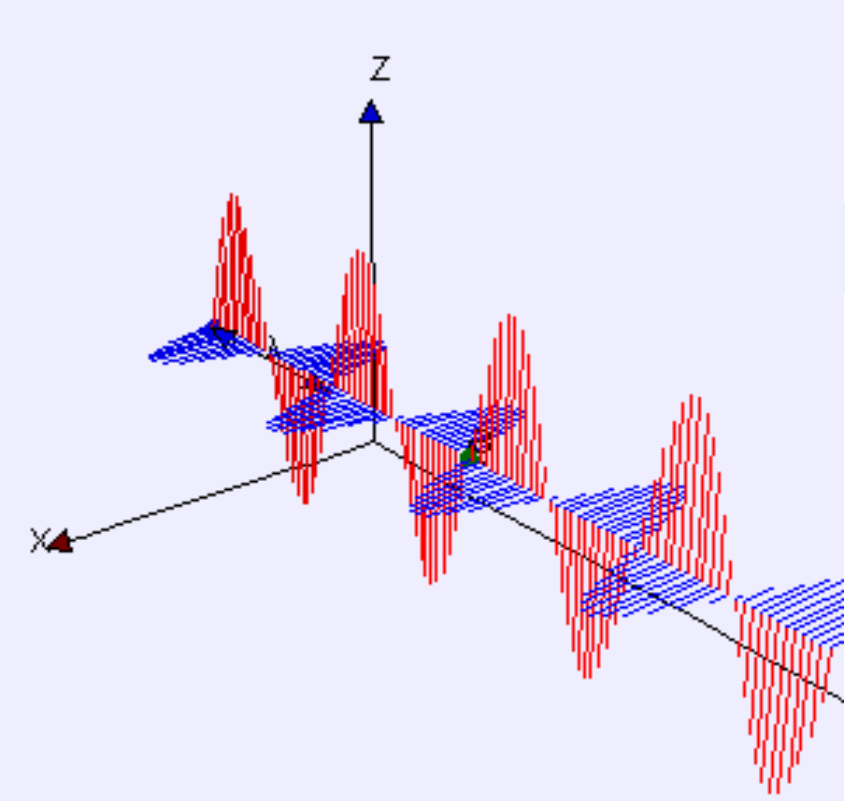
การเปลี่ยนระดับพลังงานของสสารเกิดขึ้นจากอันตรกิริยากับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นลักษณะเฉพาะของสาร





รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า

Electromagnetic radiation

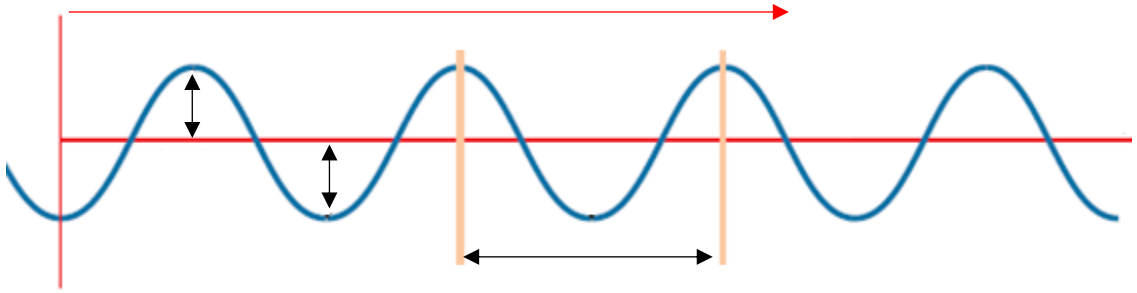


พลังงานรูปหนึ่งที่สามารถส่งผ่านที่ว่างด้วยความเร็วสูงมาก มีสมบัติเป็นได้ทั้งคลื่น (wave) และอนุภาค (particle)

ประกอบด้วยสนามแม่เหล็ก (magnetic field) และสนามไฟฟ้า (electric field) แกว่งกวัด (oscillation) เป็นคลื่นรูปไซน์ ในแนวตั้งฉากซึ่งกันและกัน และตั้งฉากกับทิศทางการแผ่รังสี

สมบัติรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า

สมบัติความเป็นคลื่น (wave property)

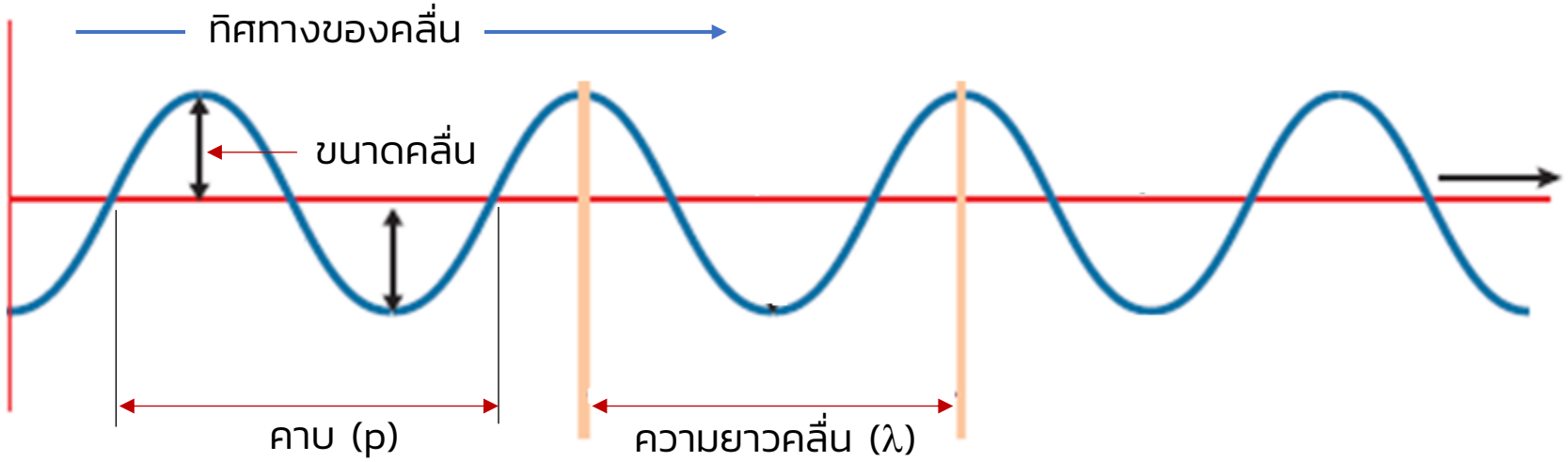


การหักเห การสะท้อน การแทรกสอด การเลี้ยวเบน

สมบัติความเป็นอนุภาค (particle property)

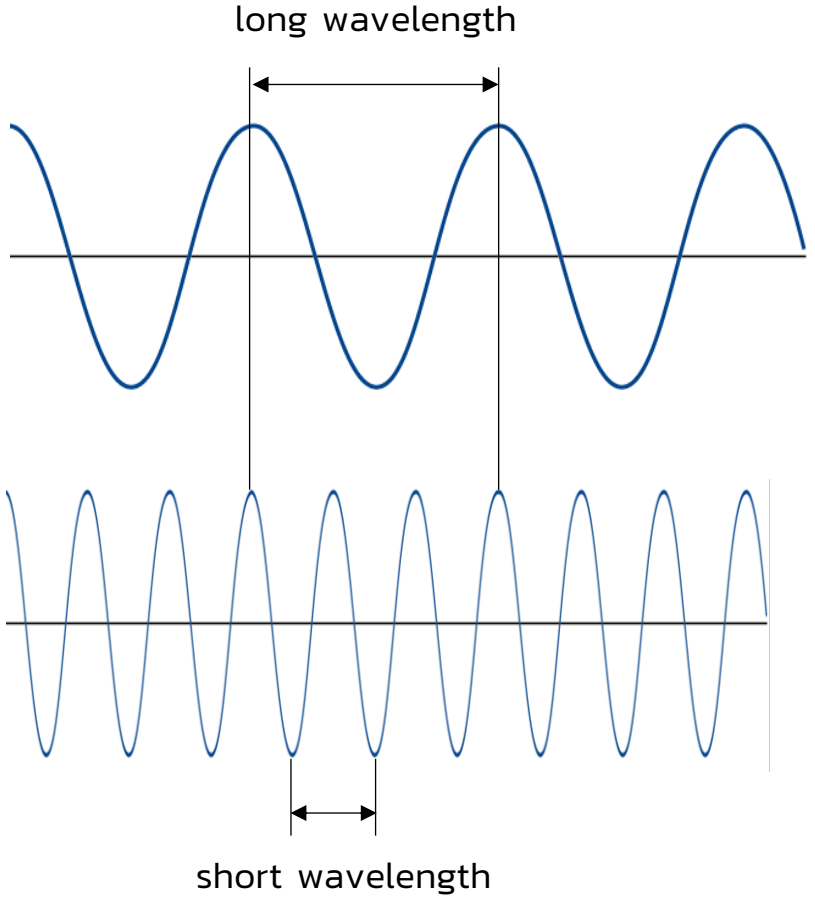
การแผ่พลังงานในลักษณะอนุภาค
เรียกว่า **โฟตอน** (photon)
หรือ ควอนตัม (quantum)

สมบัติความเป็นคลื่น

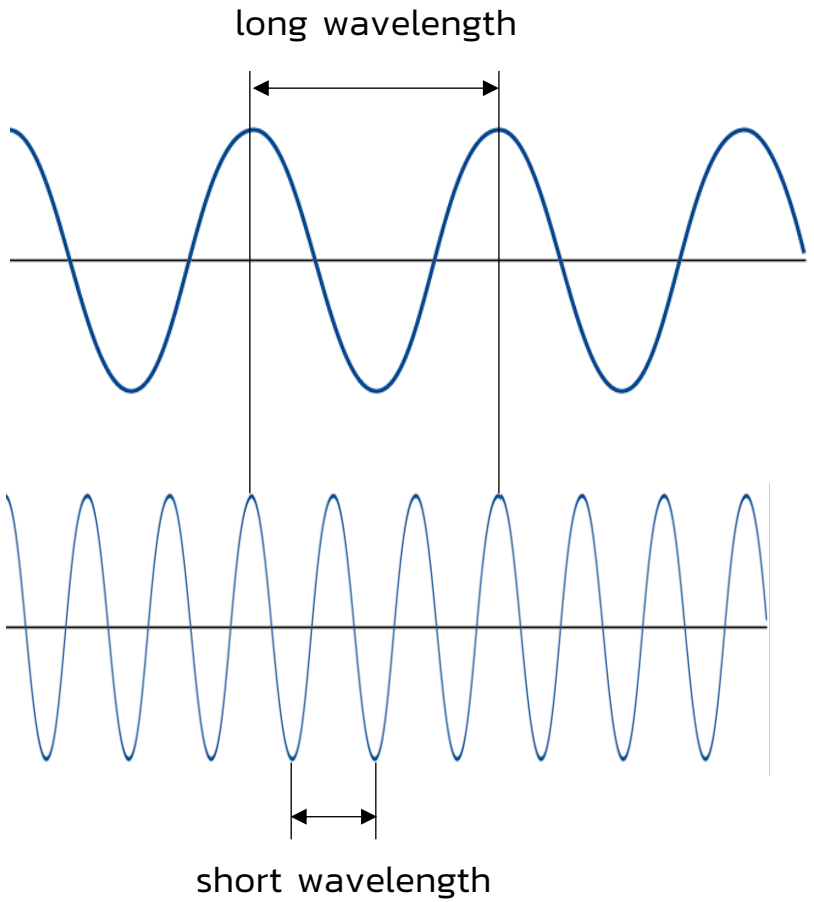


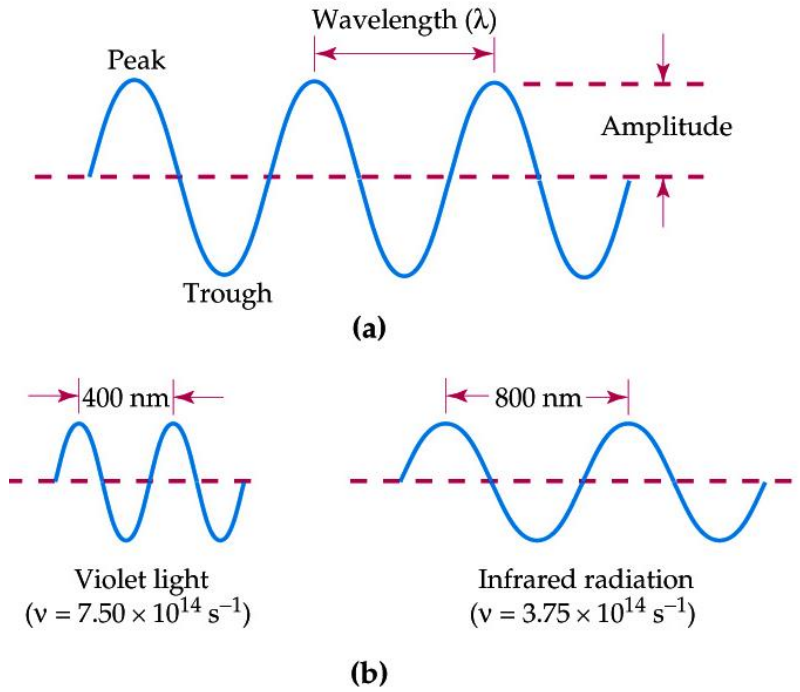
- ขนาดคลื่น (amplitude, A) คือขนาดของเว็กเตอร์ซึ่งใช้บอกความแรงของสนามไฟฟ้า
- คาบ (period, p) คือเวลา (วินาที) ที่คลื่น 1 รอบผ่านจุดๆ หนึ่งในที่ว่าง (space)

- จำนวนคลื่นที่ผ่านจุดๆ หนึ่งใน 1 วินาที
  $\nu = 1/p$
- มีหน่วยเป็นเฮิรต์ (Hz) ซึ่งสอดคล้องกับ 1 รอบ/วินาที (1 Hz = s^{-1})
- ขึ้นกับแหล่งกำเนิดรังสี
- ความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อรังสีผ่านตัวกลาง (medium) ที่ต่างกัน



ความยาวคลื่น (wavelength, λ) คือ ระยะระหว่างจุด 2 จุดที่สอดคล้องกันบนคลื่นที่ต่อเนื่องกัน





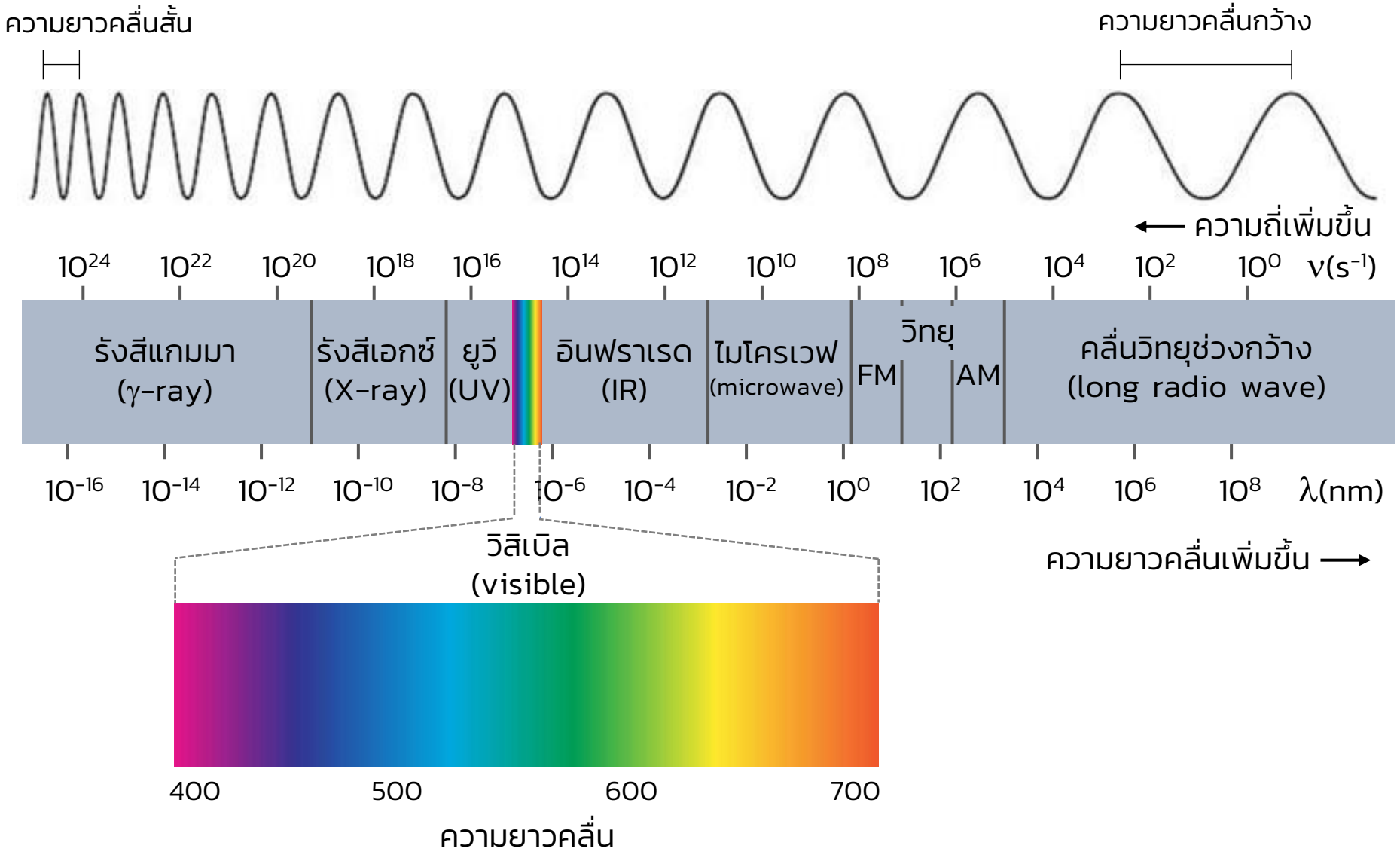
- รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าประกอบด้วยอนุภาคซึ่งเรียกว่า **โฟตอน** (photon) หรือ ควอนตา (quanta)
- โฟตอน 1 ตัวมีพลังงานที่แน่นอน จะมากหรือน้อยขึ้นกับความถี่

สมการของพลังค์ (Planck)

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

E = พลังงานของโฟตอน 1 ตัว (J)
h = ค่าคงที่ของพลังค์ (6.63×10^{-34} Js)
ν = ความถี่ (s^{-1})
λ = ความยาวคลื่น (nm)
$\bar{\nu}$ = เลขคลื่น (m^{-1})
c = ความเร็วของแสง (3.0×10^{8} m s^{-1})

สเปกตรัมของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า



อันตรกิริยาระหว่างโฟตอนกับสสาร

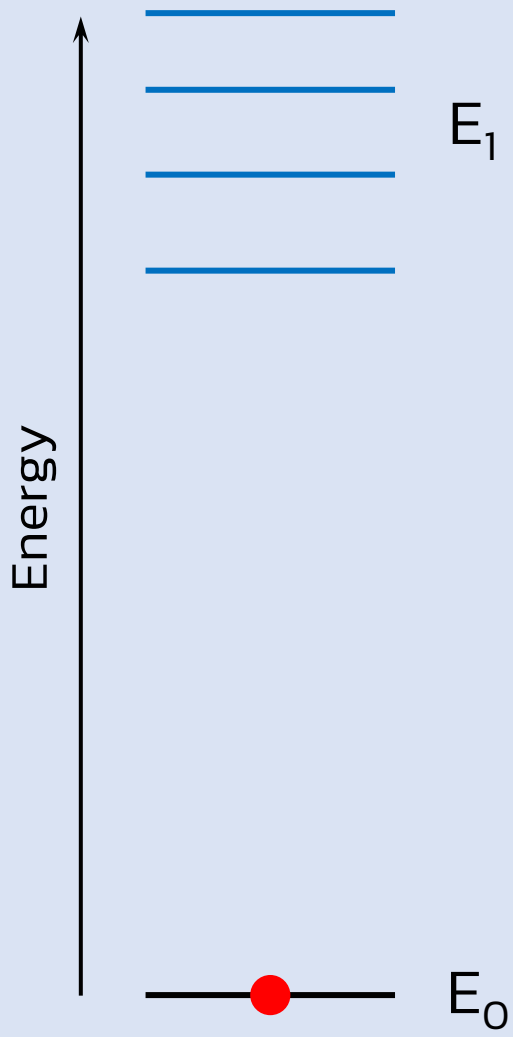
Interaction between Photon and Matter

เกี่ยวข้องกับการแทรนซิชันของอนุภาคจาก
สถานะพื้น (ground state; E_0)
ไปยัง
สถานะกระตุ้น (excited state; E_1)

- พลังงานโฟตอนที่แตกต่างกันทำให้เกิดอันตรกิริยากับสสารได้แตกต่างกัน

วิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี (UV-vis spectrophotometry)

- เทคนิคการวิเคราะห์สารที่สามารถดูดกลืนแสงย่านยูวี-วิสิเบิลได้
- กลไกการดูดกลืนเป็นอันตรกิริยาที่เกิดจากการแทรนซิชันของอิเล็กตรอน (electronic transition) จากระดับพลังงานในสถานะพื้นไปยังสถานะกระตุ้น
- การแทรนซิชันของอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้จาก 3 รูแบบ
- สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธะหรืออนุมูลสารที่ดูดกลืนแสง (absorbing species)
- การวิเคราะห์เชิงปริมาณจะอาศัยวิธีกราฟมาตรฐานความเข้มข้นตามกฎของเบียร์



การแทรนซิชันของอิเล็กตรอน (Electronic Transition)

- การแทรนซิชันของไพ–อิเล็กตรอน, ซิกมา–อิเล็กตรอน และอิเล็กตรอนที่ไม่สร้างพันธะ (π, σ, n–electronic transition)
- การถ่ายโอนประจุอิเล็กตรอน (charge transfer electron)
- การแทรนซิชันในออร์บิทัลดี (*d*–orbital) และออร์บิทัลเอฟ (*f*–orbital)

กฎการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า

Absorption Laws

กฎการดูดกลืนแสง
- กฎของแลมเบิรต์
- กฎของเบียร์

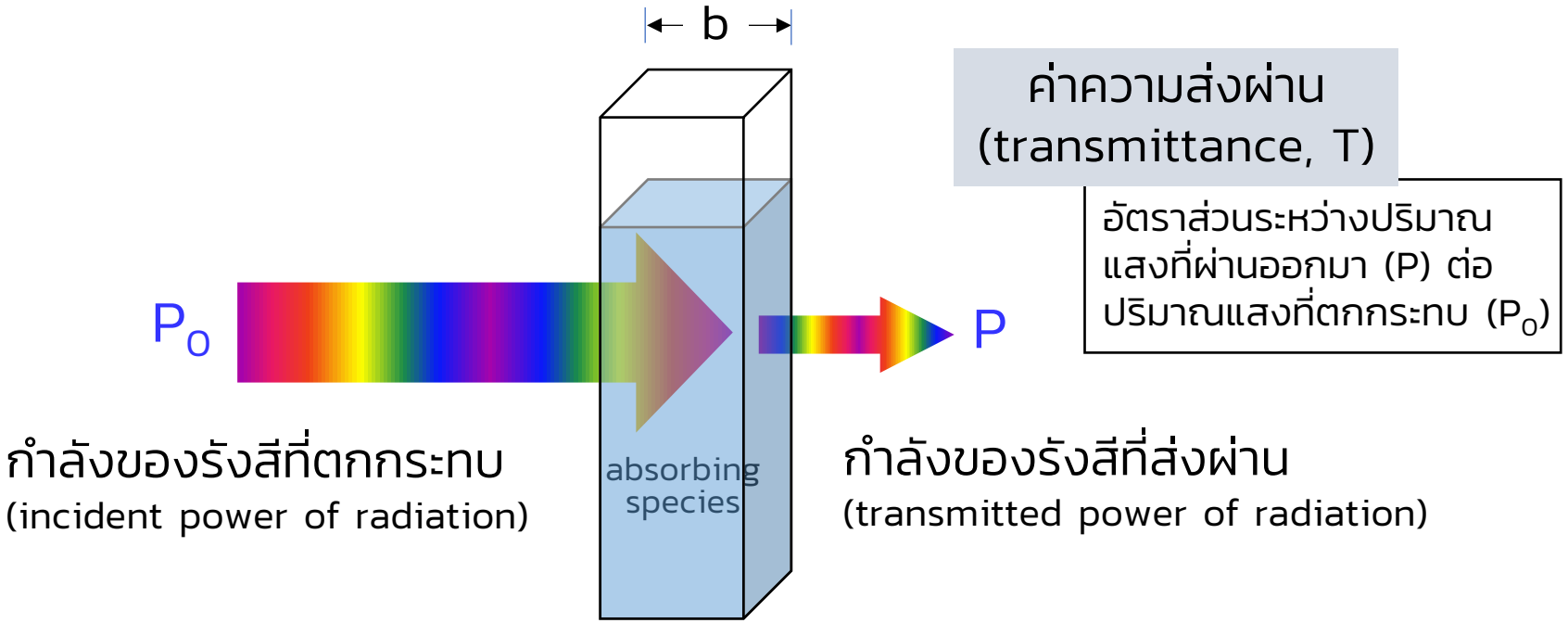
สภาพดูดกลืนแสงต่อโมล

(molar absorptivity, ε)

การเบี่ยงเบนจากกฎของเบียร์

เมื่อลำแสงขนานของรังสีความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromatic radiation) ผ่านสารละลายที่มีสารที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (absorbing species) กำลังของรังสีจะลดลง

แสงที่ตกกระทบ (incident light)
แสงที่ถูกดูดกลืน (absorbed light)
แสงที่ส่งผ่าน (transmitted light)



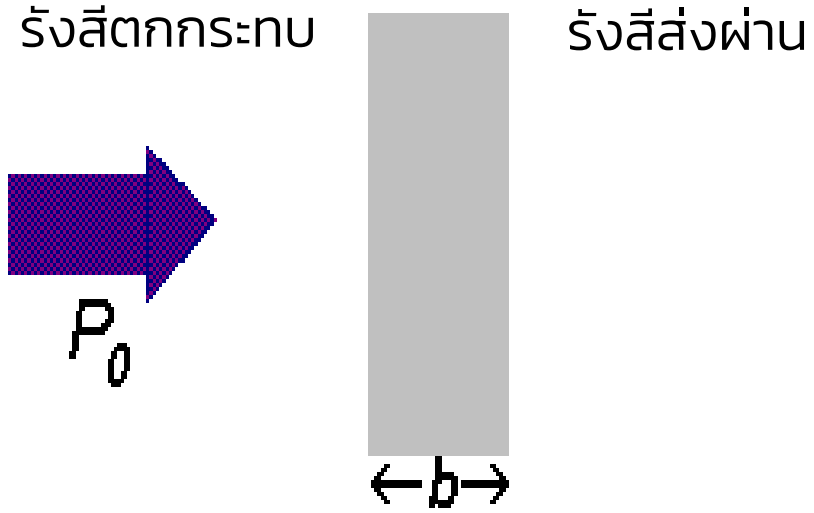
กำลังของรังสีที่ตกกระทบ
(incident power of radiation)

กำลังของรังสีที่ส่งผ่าน
(transmitted power of radiation)

ค่าความส่งผ่าน (transmittance, T)

อัตราส่วนระหว่างปริมาณแสงที่ผ่านออกมา (P) ต่อปริมาณแสงที่ตกกระทบ (P_0)

ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A)



ค่าความส่งผ่าน (T) คือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณแสงที่ผ่านออกมา (P) ต่อปริมาณแสงที่ตกกระทบ (P_0)

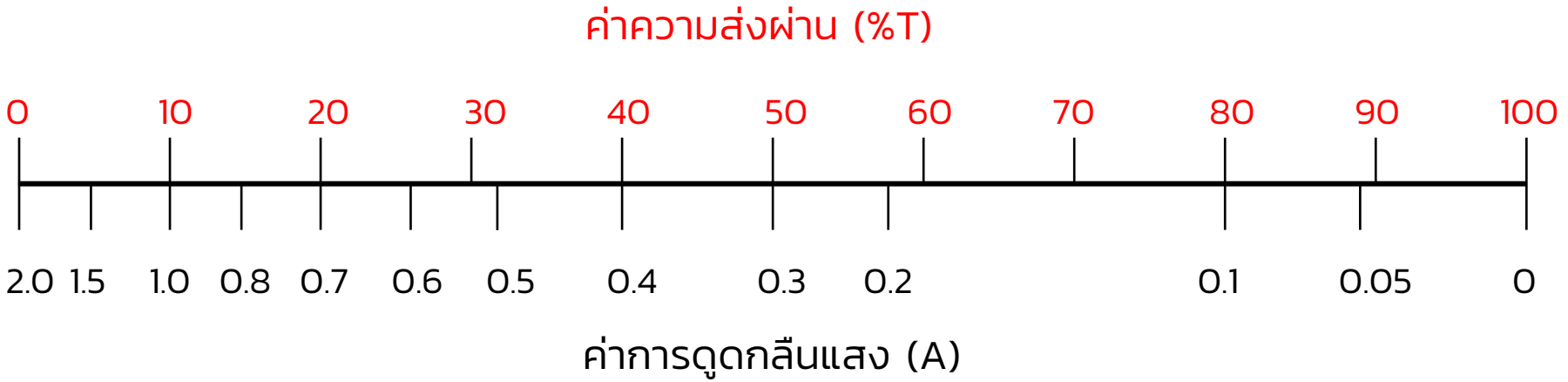
$$T = \frac{P}{P_0}$$

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100$$

ค่าการดูดกลืนแสง (A) คือ ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนไปจากปริมาณแสงที่ตกกระทบ

$$A = -\log T = -\log \frac{P_0}{P} = \log \frac{P}{P_0}$$

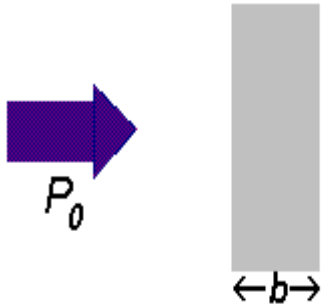
ความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance (A) และ transmittance (T)



- เมื่อแสงผ่านสารละลายโดยไม่มีการดูดกลืน A = 0 และ %T = 100
- เมื่อ A เพิ่มขึ้น %T จะลดลง
- สำหรับสเกลของเครื่องมือรุ่นเก่า %T จะเป็น linear scale ส่วน A เป็น log scale จึงมักอ่าน %T แล้วหา A จาก A = 2–log%T

กฎการดูดกลืนแสง

กฎของแลมเบิร์ต
Lambert's Law (ค.ศ.1760)



"เมื่อรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นเดี่ยว ผ่านตัวกลางเนื้อเดียว ค่าความส่งผ่านจะลดลงแบบเลขชี้กำลัง (exponential) กับความหนาของตัวกลางที่แสงผ่าน (path length)"

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-kb}$$

k = ค่าคงที่สัดส่วน (proportional constant)

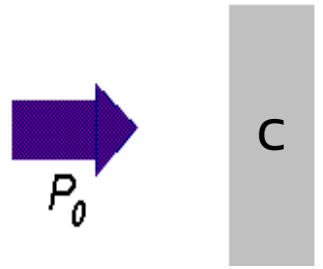
b = ความหนาตัวกลางที่แสงผ่าน (path length)

"ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาของตัวกลางที่แสงผ่าน"

กฎการดูดกลืนแสง

กฎของเบียร์
Beer's Law (ค.ศ.1852)

"เมื่อรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นเดี่ยว ผ่านตัวกลางเนื้อเดียว ค่าความส่งผ่านจะลดลงแบบเลขชี้กำลัง (exponential) กับความเข้มข้นอนุมูลสารที่สนใจ (c)"



$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-k'c}$$

K' = ค่าคงที่สัดส่วน (proportional constant)
c = ความเข้มข้นอนุมูลสารที่สนใจ

"ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของอนุมูลสารที่สนใจ (absorbing species) ในสารตัวอย่าง"

สมการแลมเบิร์ต

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-kb}$$

สมการเบียร์

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-k'c}$$

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-abc}$$

$$\log T = \log \frac{P}{P_0} = -abc$$

$$-\log T = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

สมการเบียร์-แลมเบิร์ต หรือเรียกว่า สมการของเบียร์

- ค่าการดูดกลืนแสง (A) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นอนุมูลสารที่สนใจ (c) และ path length (b)
- a เป็นค่าคงที่ เรียกว่า absorptivity ใช้แสดงปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนต่อหน่วยความเข้มข้น ค่าของ a ขึ้นกับหน่วยของ b และ c
  - ถ้า b เป็น cm และ c เป็น g/L เทอม a มีหน่วยเป็น $Lg^{-1}cm^{-1}$
  - ถ้า b เป็น cm และ c เป็น mol/L เทอม a เรียกว่า **molar absorptivity (ε)** และมีหน่วยเป็น $Lmol^{-1}cm^{-1}$

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

$$A = \varepsilon bc$$

A = absorbance (ไม่มีหน่วย)

ε = molar absorptivity ($Lmol^{-1}cm^{-1}$)

b = path length (cm)

c = concentration ($mol\ L^{-1}$)

ε ขึ้นกับความยาวคลื่น ดังนั้น A ขึ้นกับความยาวคลื่น

A เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น (เมื่อ ε และ b คงที่)

A เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ path length (เมื่อ ε และ c คงที่)

A เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ε (เมื่อ b และ c คงที่)

A ไม่ใช่ %absorption (ซึ่งเท่ากับ 100 – %T)

สภาพดูดกลืนแสงต่อโมล (ε)

Molar absorption coefficient, Molar extinction coefficient

“ค่าคงที่เฉพาะของสารดูดกลืนแสง
ที่ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและความยาวคลื่นที่วัด”

สารที่มีค่า ε มาก จะดูดกลืนแสงต่อโมลได้ดี ซึ่งจะส่งผลให้สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ แม้ความเข้มข้นต่ำมากๆ (หรือมีสภาพไวสูง)

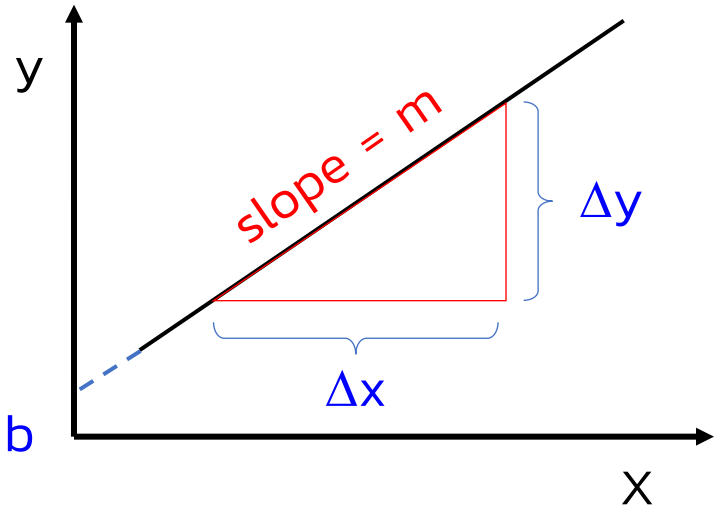
ชนิด	โครโมฟอร์	λ (nm)	ε
Acetylide	-C=C	175-180	6000
Aldehyde	-CHO	210	1500
Amine	$-NH_2$	195	2800
Azo	-N=N-	285-400	3-25
Bromine	-Br	208	300
Carboxyl	-COOH	200-210	50-70
Disulphide	-S-S-	194	5500
Ether	-O-	185	1000
Ketone	-C=O	195	1000
Nitrite	-ONO	220-230	1000-2000
Nitro	-NO2	210	สูง

จากสมการของเบียร์ $A = \varepsilon bc$

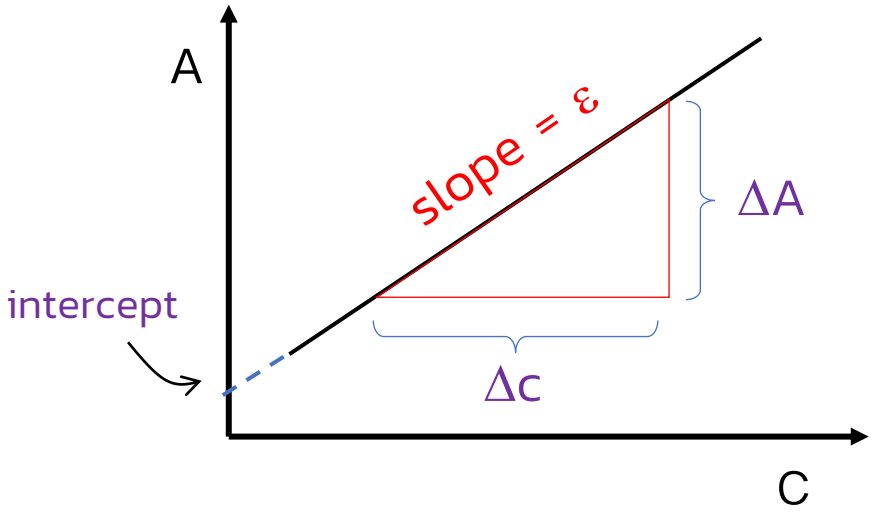
“A เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ c (เมื่อ ε และ b คงที่)”

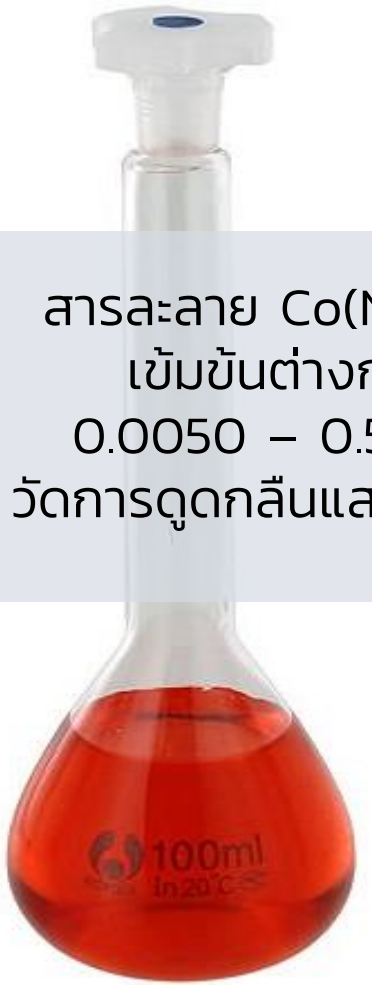
เมื่อเขียนกราฟระหว่าง A กับ c ของสารละลายชนิดหนึ่งที่มีความหนาตัวกลางที่แสงผ่านคงที่ (=1 cm) จะได้กราฟเส้นตรง ที่มีความชันเท่ากับ ε

$y = mx + b$

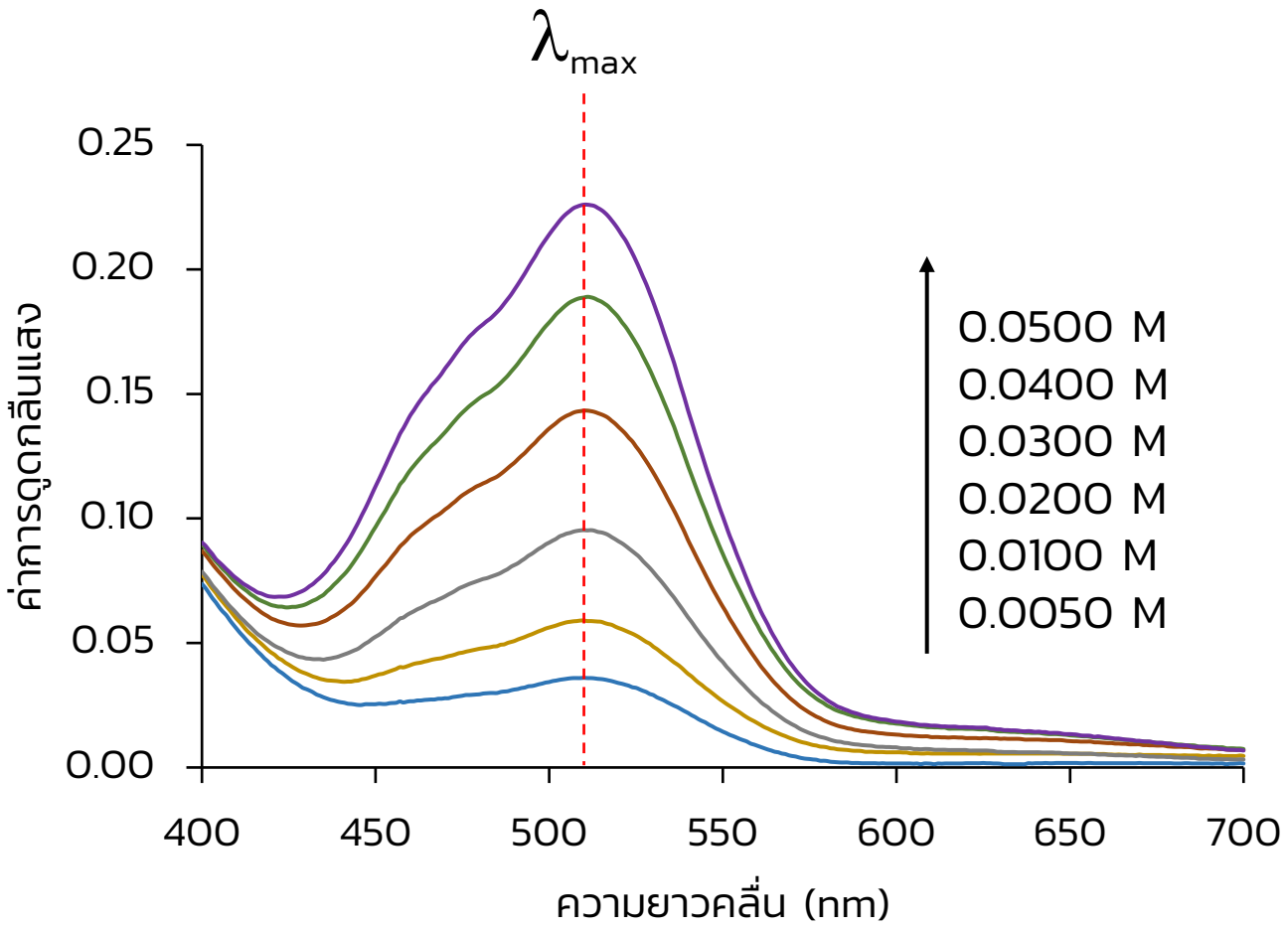


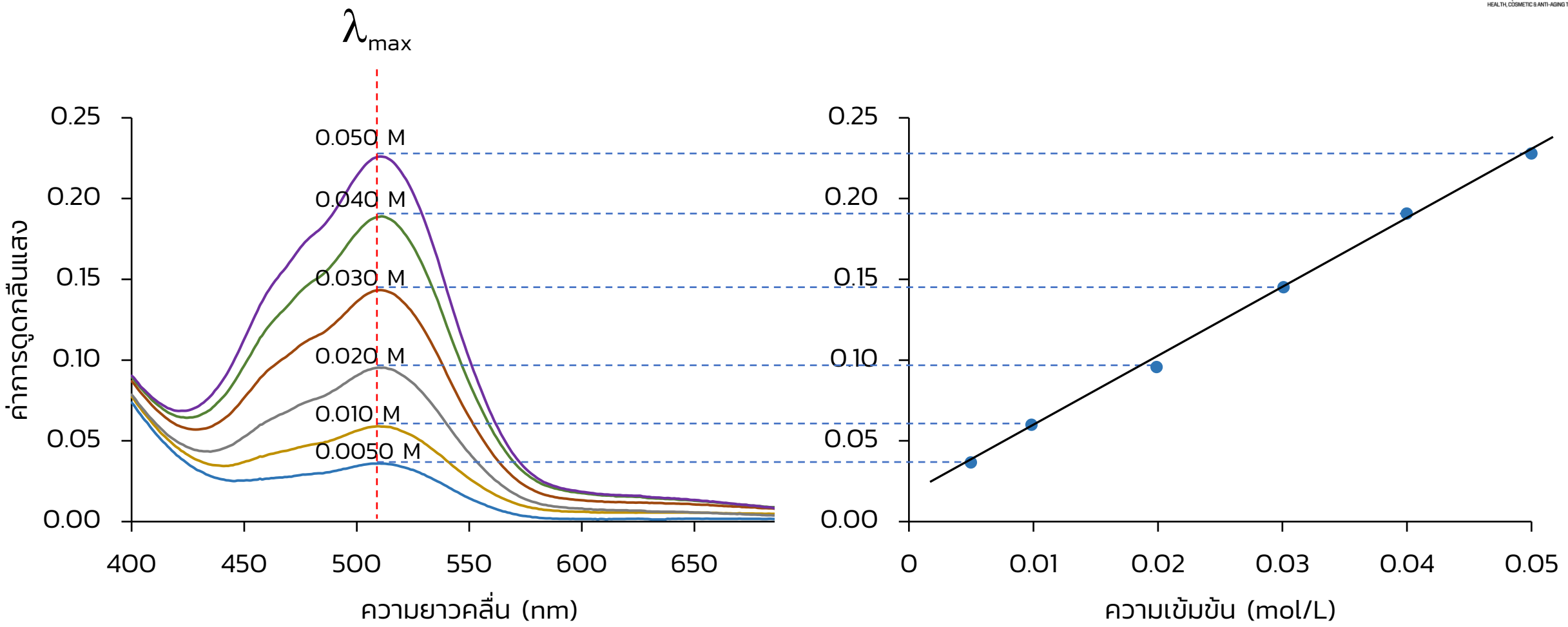
$A = \varepsilon bc$



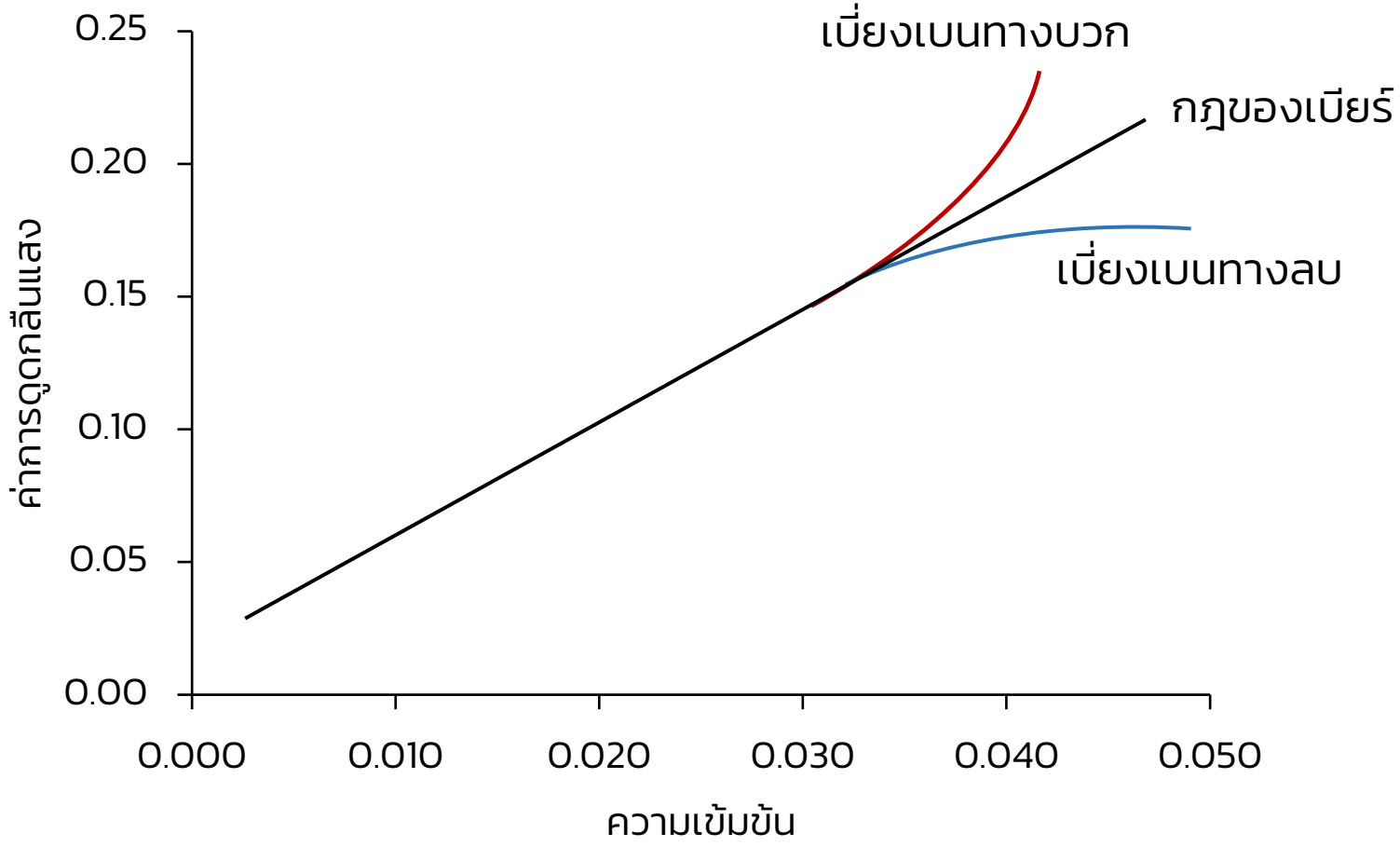


สารละลาย $Co(NO_3)_2$ มีความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 0.0050 – 0.500 mol/L วัดการดูดกลืนแสงในย่านวิสิเบิล




λmax
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.050 M
0.040 M
0.030 M
0.020 M
0.010 M
0.0050 M
ค่าการดูดกลืนแสง
400
450
500
550
600
650
ความยาวคลื่น (nm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
ความเข้มข้น (mol/L)

การเบี่ยงเบนจากกฎของเบียร์



สมการของเบียร์

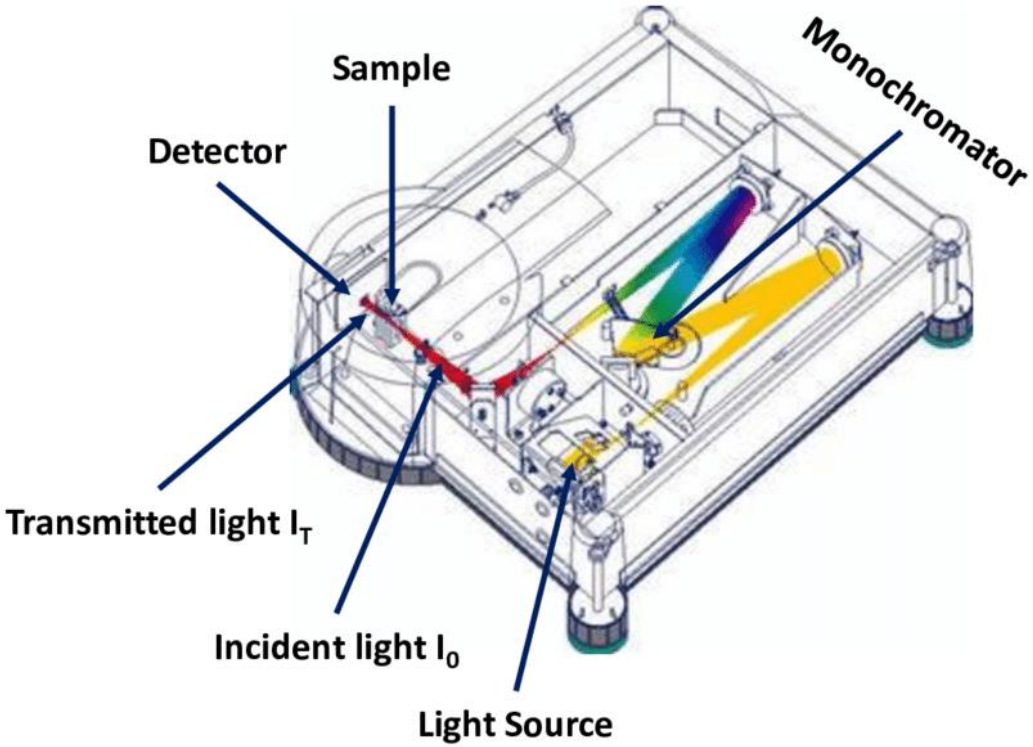
$A = \varepsilon bc$

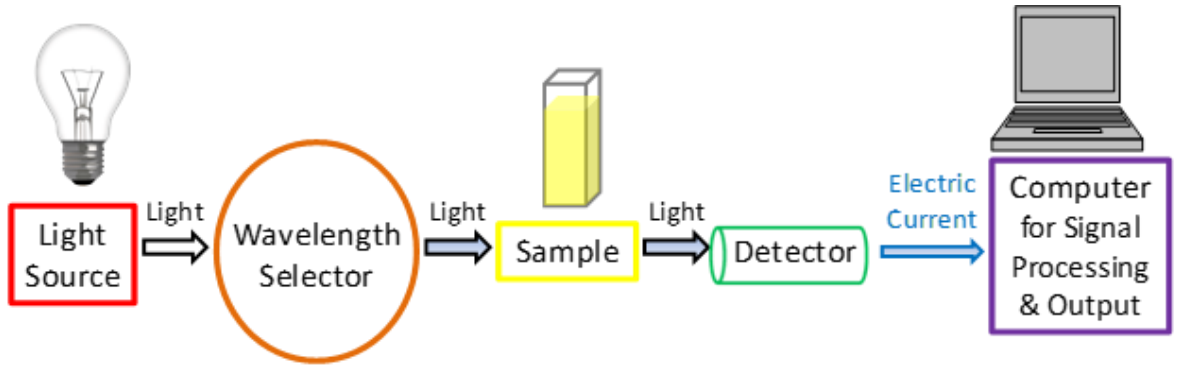
1) การเบี่ยงเบนทางทฤษฎี

2) การเบี่ยงเบนทางเคมี

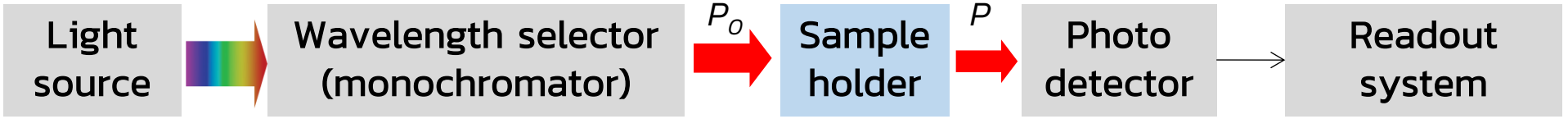
3) การเบี่ยงเบนจากเครื่องมือ

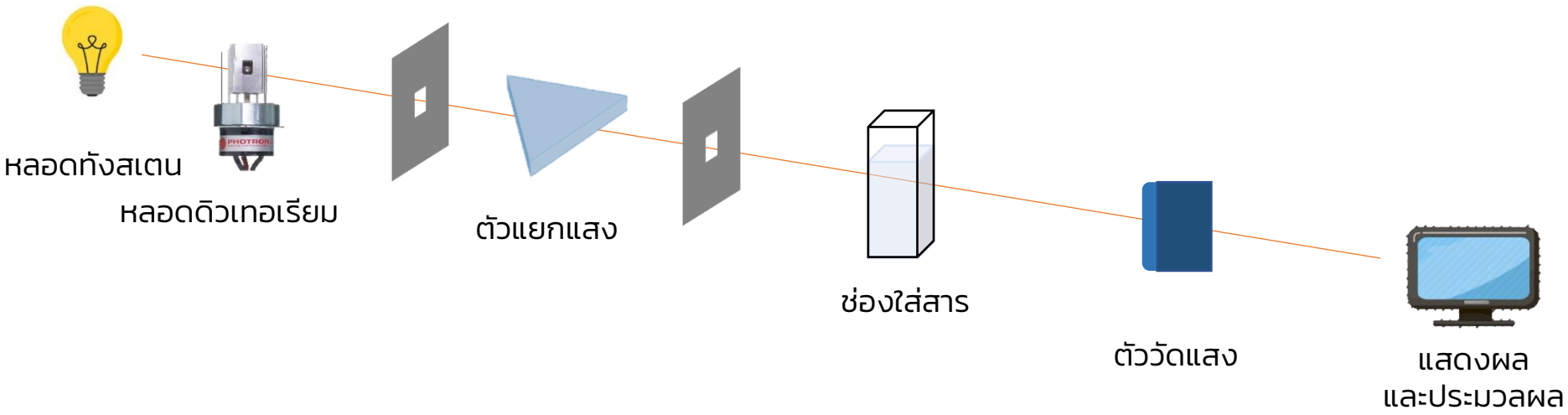
ส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis



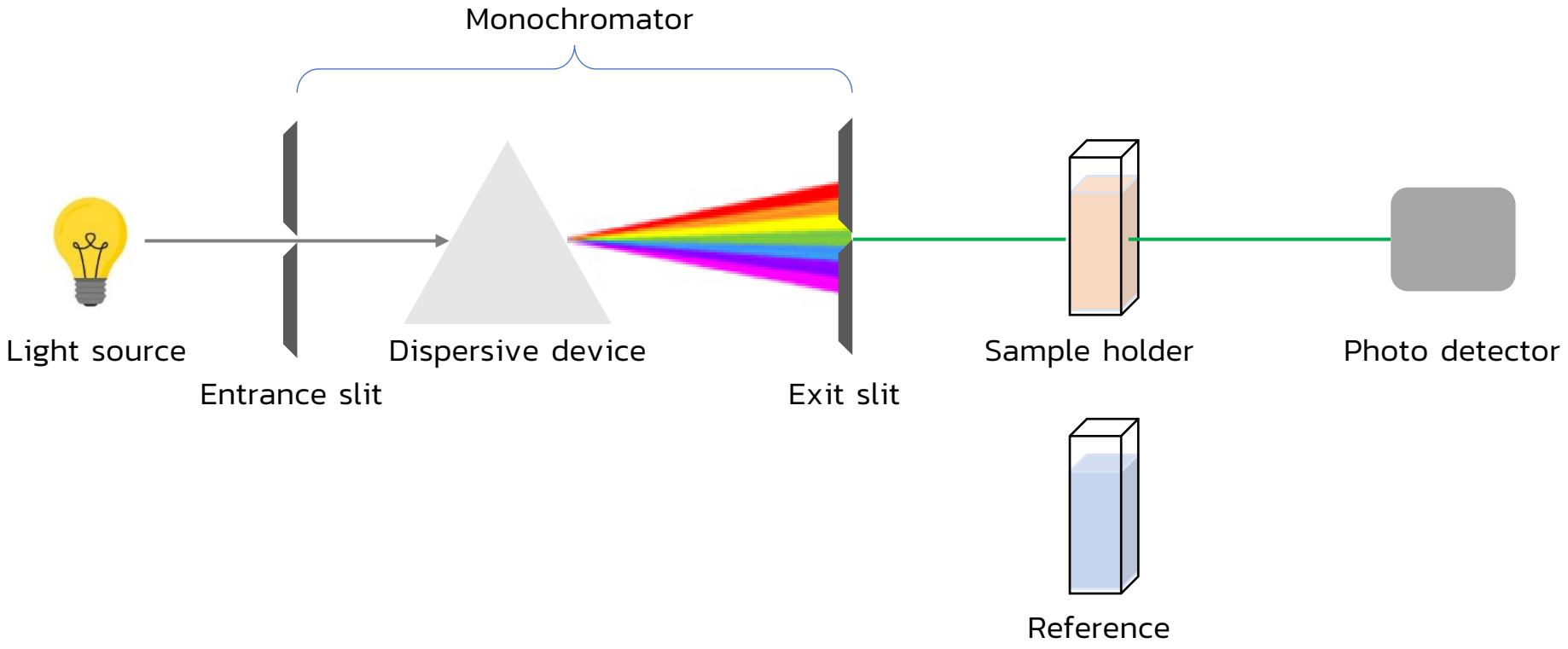


ส่วนประกอบเครื่อง UV-Vis





Single beam : Conventional

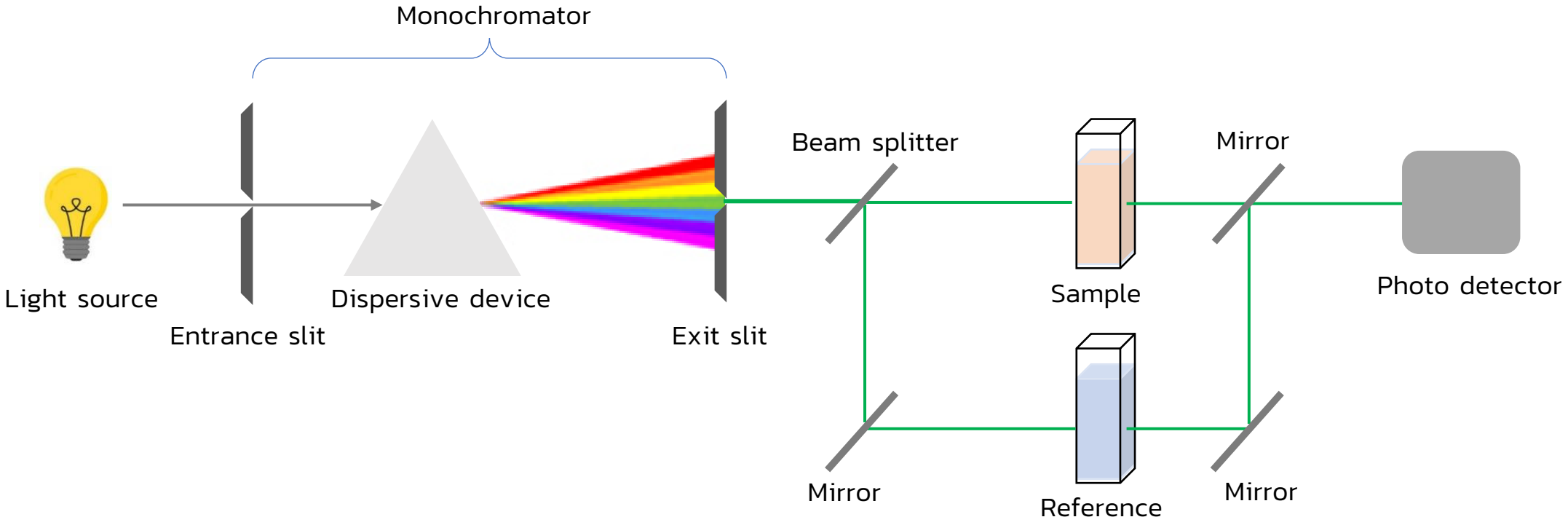


ชนิดลำแสงเดี่ยว : ใช้ลำแสงเพียงลำเดียวผ่านจากตัวแยกแสงไปสู่ช่องใส่สารตัวอย่างและเข้าสู่ตัววัดแสง

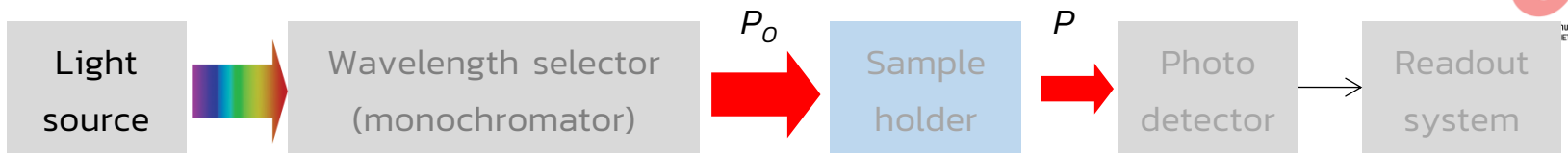
การวัดจึงต้องวัดวัดสารอ้างอิงและวัดสารตัวอย่าง (sample) ทีละครั้ง

Double beam : Split beam

ลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงออกจากช่องแสงออก ลำแสงจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำแสง (beam splitter) ซึ่งจะทำหน้าที่สะท้อนลำแสงไปผ่านสารตัวอย่าง และจะสะท้อนลำแสงไปผ่านสารอ้างอิง ลำแสงทั้งสองนี้ไปตกกระทบบนตัววัดแสง ความแตกต่างของความเข้มแสงหลังจากผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิงจะเป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



แหล่งกำเนิดแสง



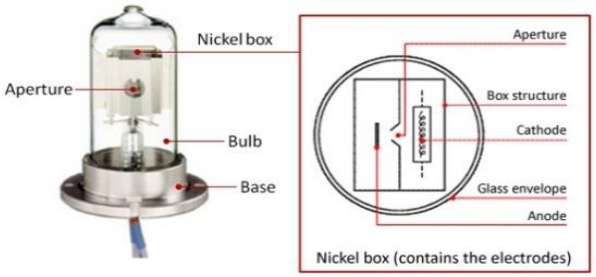
เป็นส่วนกำเนิดแสงที่ต้องมีความเข้มแสงคงที่และแบบต่อเนื่อง (continuous source) จะเปล่งแสงที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแสงตามความยาวคลื่น

หลอดทังสเตน (W)

- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 380-800 nm
- หลอดทำจากแก้วธรรมดา
- ไส้หลอดทังสเตนเมื่อทำให้ร้อน 2,870 K จะเกิดการเปลี่ยนสถานะของอิเล็กตรอนทำให้เกิดการปล่อยแสงช่วง 200 ถึง 20,000 nm

หลอดดิวทีเรียม (D_2)

- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 180-350 nm



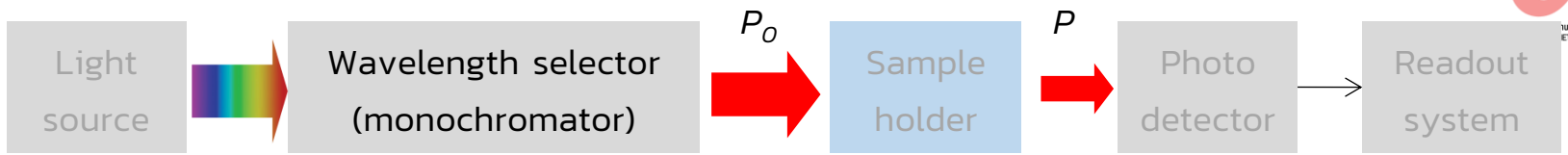
หลอดทังสเตนแฮโลเจน (W-halogen)

- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 240-2,500 nm
- พัฒนามาจากหลอดทังสเตน โดยการเติมธาตุกลุ่มแฮโลเจนในกระเปาะ เช่น ไอโอดีน
- ใช้ควอตซ์ทำกระเปาะหลอดไฟแทนแก้ว

หลอดซีนอน (Xe)

- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 185-2,000 nm

ตัวแยกแสง

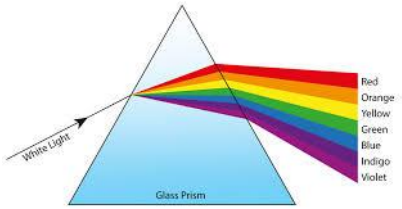


ทำหน้าที่แยกแสงหลายสีหรือหลายความยาวคลื่นให้เป็นแสงสีเดียว (monochromatic radiation) ที่มีความยาวคลื่นแสงช่วงแคบ ๆ (band)

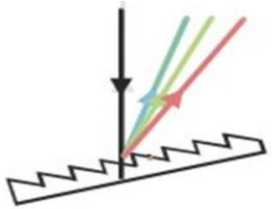
โดยอาศัยการดูดกลืน การสะท้อนกลับ หรือการหักเหของแสง

- ตัวกรองแสง (filter)
- ปริซึม (prism)
- เกรตติง (grating)

filter



prism

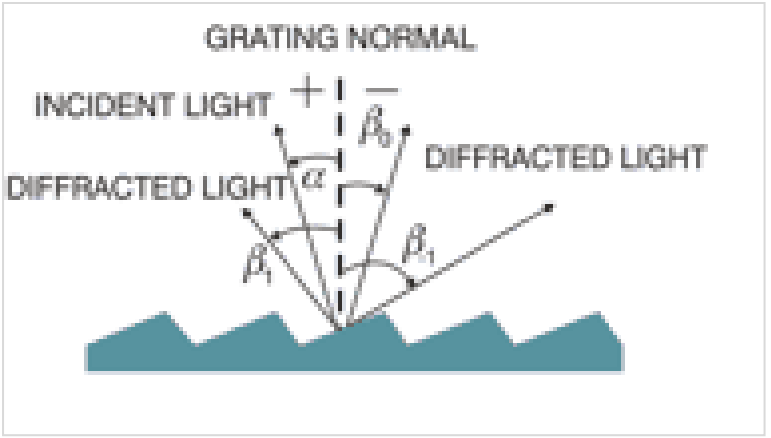


grating

เกรตติง (grating)

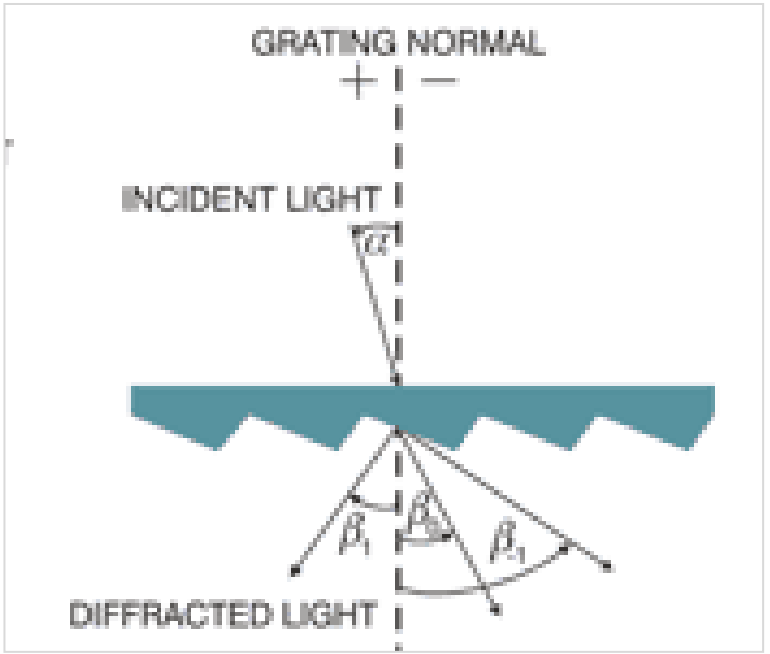
เกรตติงแบบสะท้อน (reflection grating)

แผ่นโลหะผิวหน้าเรียบและสะท้อนแสงได้ดี ด้านหน้าจะเซาะร่องขนาดเล็ก ๆ ขนานกัน จำนวน 600–2,000 ร่องต่อมิลลิเมตร

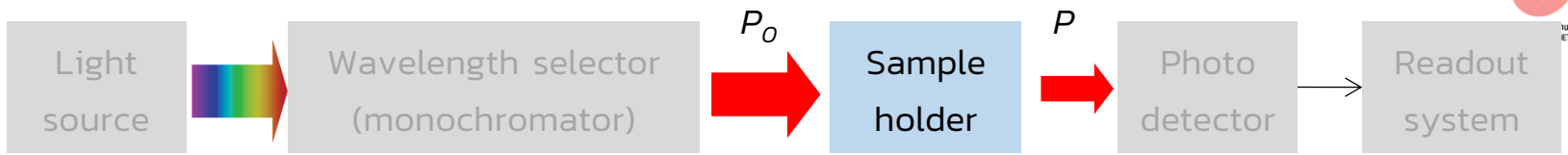


เกรตติงแบบส่งผ่าน (transmission grating)

ทำด้วยวัสดุโปร่งใส เป็นกระจกที่นำมาขีดให้ร่องขนานกัน ให้แสงออกเป็นหลาย ๆ ความยาวคลื่นในด้านที่ตรงข้ามกับแสงเข้า



ช่องใส่ตัวอย่าง



หน้าต่างบรรจุสารละลายตัวอย่างที่ให้แสงความยาวคลื่นเดี่ยวที่ผ่านจากตัวแยกแสงผ่านไปสัมผัสกับอนุภาคสารที่ดูดกลืนแสงได้

เรียกว่า
เซลล์ (cell)
หรือ
คิวเวตต์ (cuvette)

แก้ว (glass)

- แก้วชนิดโบโรซิลิเคต เนื่องจากมีความแข็ง ทนต่อการขีดข่วน และทนความร้อนได้สูง
- ข้อเสีย > ดูดกลืนแสงได้เกือบ 100% ที่ 270 nm และครึ่งหนึ่ง (50%T) ที่ 310 nm และไม่เกิน 20%T ที่ 340 nm
- ช่วงใช้งานควรเริ่มตั้งแต่ 360–2,000 nm

ควอตซ์ (quartz)

- เกรดอัลตราไวโอเลต (UV) เหมาะการใช้งานช่วง 185–220 nm (คิวเวตต์เปล่าให้แสงส่งผ่านประมาณ 80%T)
- เกรดมาตรฐาน (standard grade) เหมาะการใช้งานช่วง 220–340 nm (คิวเวตต์เปล่าให้แสงส่งผ่านมากกว่า 80%T)
- เกรดอินฟราเรด (IR grade) เหมาะการวัดในช่วงมากกว่า 2,700 nm (คิวเวตต์เปล่าให้แสงส่งผ่านมากกว่า 85%T)

พลาสติก (plastic)

- พลาสติกพอลีสไตรีน โปร่งใส ยอมให้แสงส่งผ่านได้มาก สามารถใช้งานได้ในช่วง 340–750 nm มีราคาถูก

Cuvette

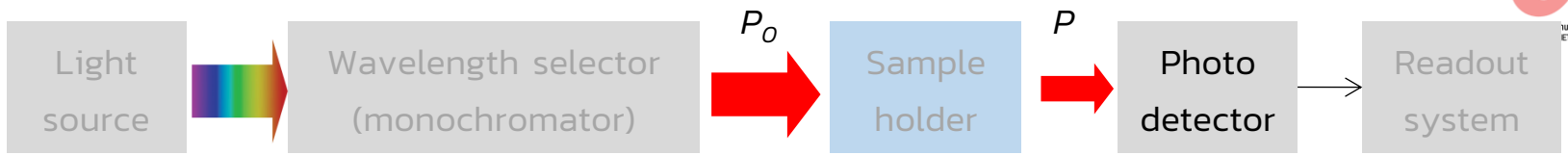
Semi micro cell, 1400 µL

Flow cell, 390 µL

macro cell, 350 µL

Ultra micro cell, 10 µL

ตัวตรวจวัดแสง

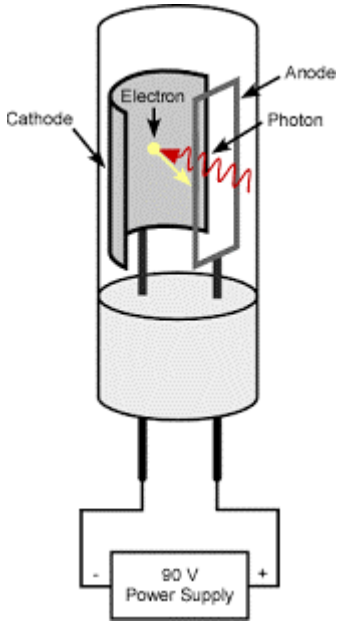


ทำหน้าที่เปลี่ยนความเข้มของแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าแล้วส่งต่อไปยังภาคขยายสัญญาณและวงจรอิเล็กทรอนิกส์เพื่อให้สามารถแสดงค่าออกมาในรูปการดูดกลืนแสง

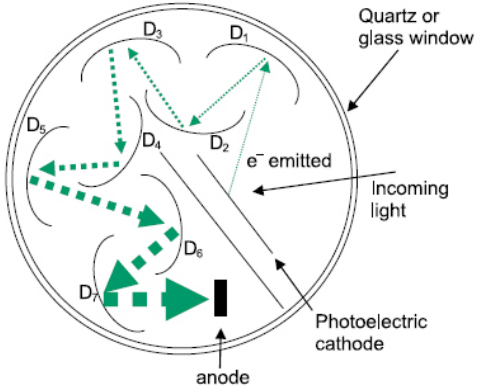
- โฟโตทิวบ์ (phototube)
- โฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์ (photomultiplier tube; PMT)
- ซิลิคอนโฟโตไดโอด (silicon photodiode,)
- โฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode array, PDA)
- (charge coupled device, CCD)
- (charge injection device, CID)

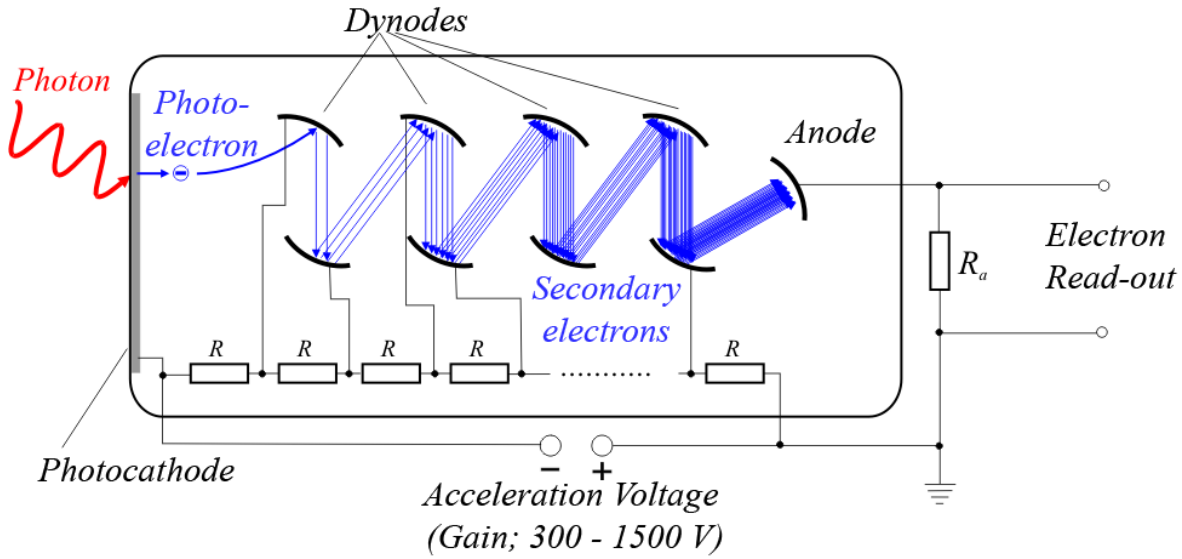
- มีอัตราในการตอบสนองเป็นแบบเส้นตรง
- มีความไว (sensitivity)
- สัญญาณรบกวนต้องน้อย
- การตอบสนองขึ้นอยู่กับความถี่หรือความยาวคลื่นแสง
- มีเสถียรภาพดี

Photo detector



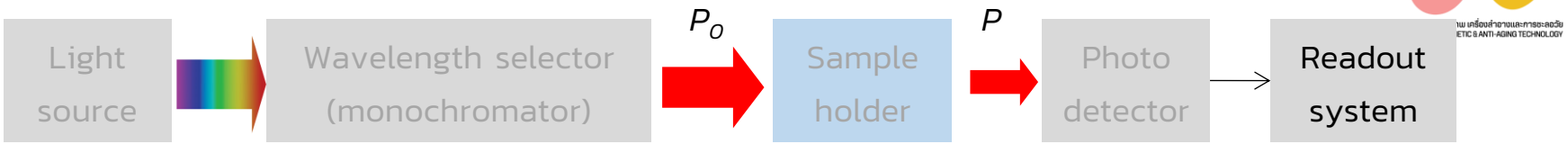
phototube





photomultiplier tube

ภาคขยายสัญญาณและภาคแสดงผล

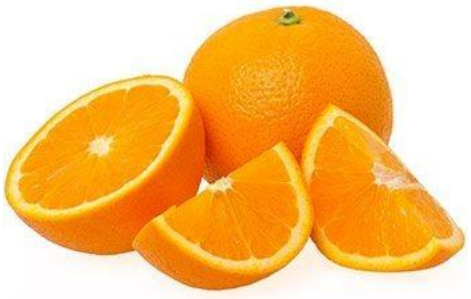


ภาคขยายสัญญาณ (amplifier) มีหน้าที่หลักในการขยายสัญญาณไฟฟ้าจากตัววัดแสงให้มีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่าออกมาได้โดยการรบกวนจากสัญญาณอื่น ๆ ให้น้อยที่สุด

ภาคแสดงผล (read out device) มีหน้าที่เปลี่ยนสัญญาณไฟฟ้าให้มาเป็นหน่วยวัดที่ต้องการ ตัวอย่างเช่นค่าการดูดกลืนแสง (A) ค่าเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (%T) และค่าความเข้มข้น (concentration)

การเตรียมตัวอย่างและการเจือจาง

เทคนิค UV-Vis สารตัวอย่างต้องอยู่ในสถานะสารละลาย (ใส ไม่เป็นสารแขวนลอย ไม่มีตะกอนหรือขุ่น)

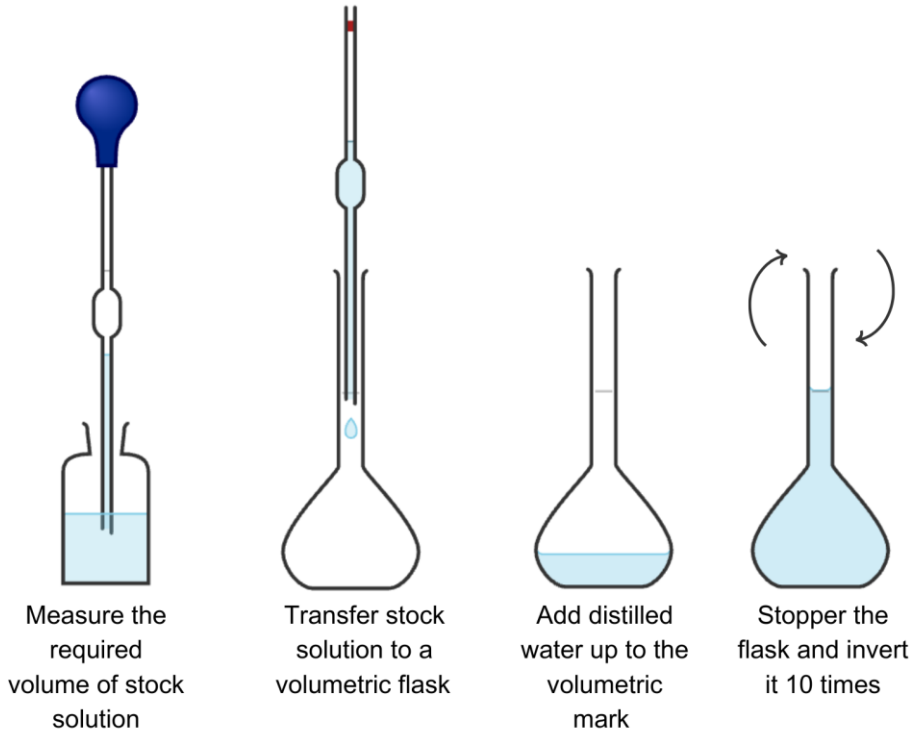


Ascorbic acid

- ตัวอย่างอยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับเทคนิควิเคราะห์ (เช่น ละลายสมบูรณ์ และเสถียร)
- ลดสิ่งรบกวน (interference) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืน

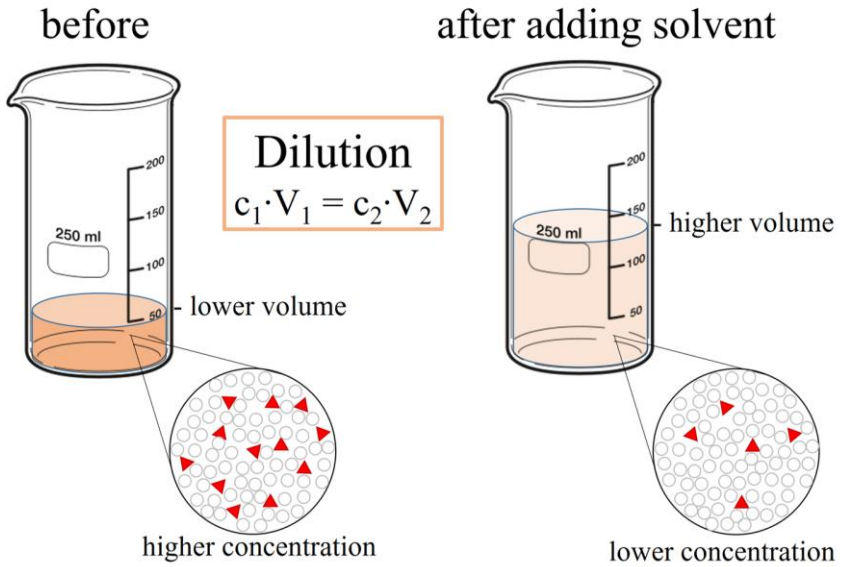
การเจือจาง

การเตรียมสารละลาย

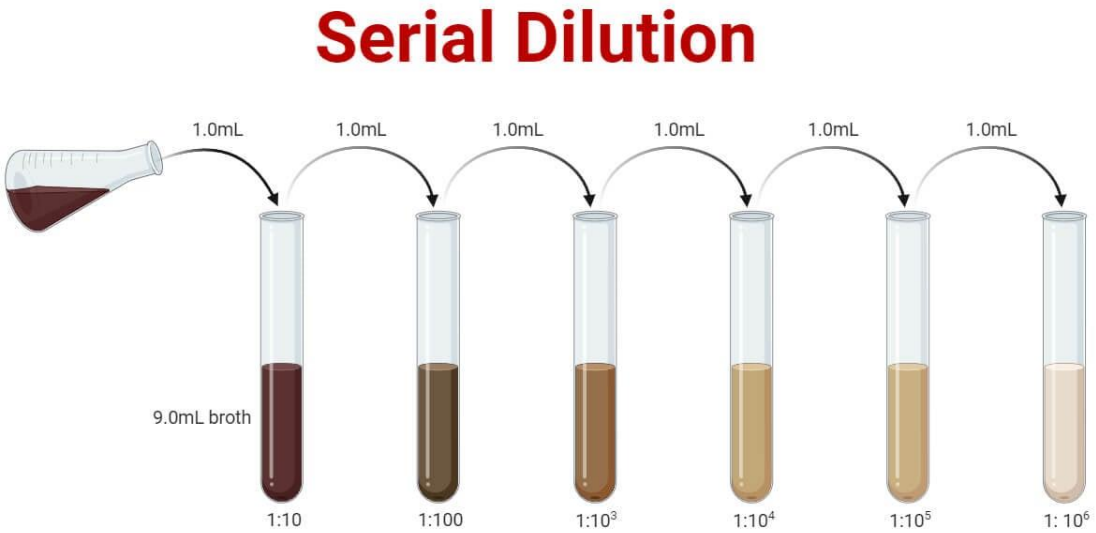


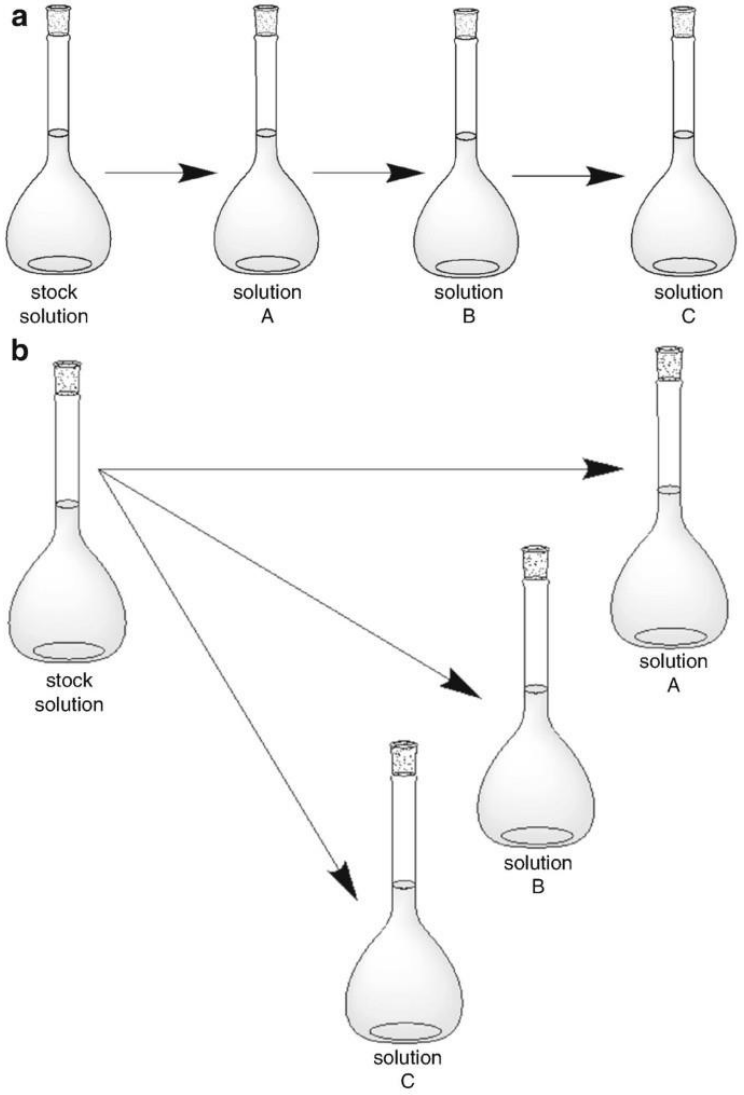
การเจือจางสารละลาย

$$C_1V_1 = C_2V_2$$



การเจือจาง

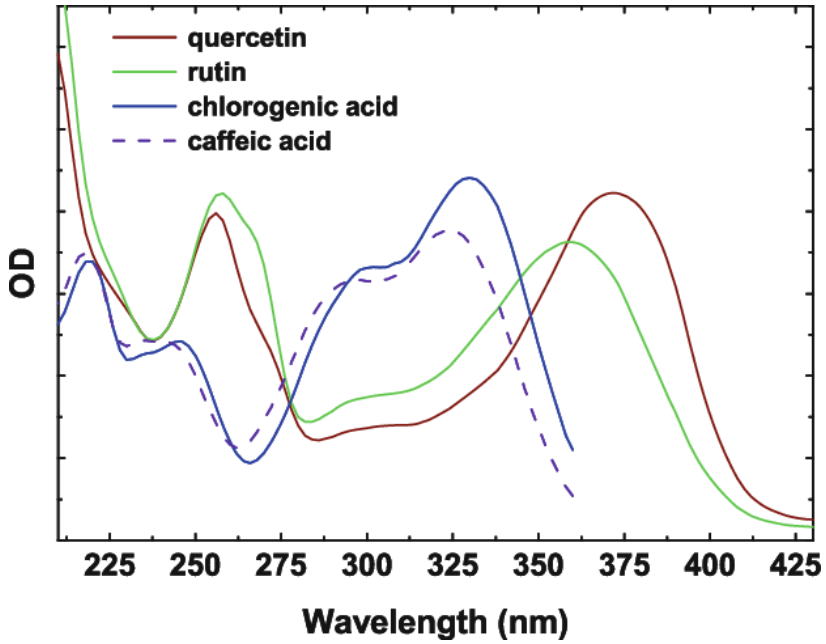

Serial Dilution
1.0mL
1.0mL
1.0mL
1.0mL
1.0mL
1.0mL
9.0mL broth
1:10
1:100
1:10^3
1:10^4
1:10^5
1: 10^6

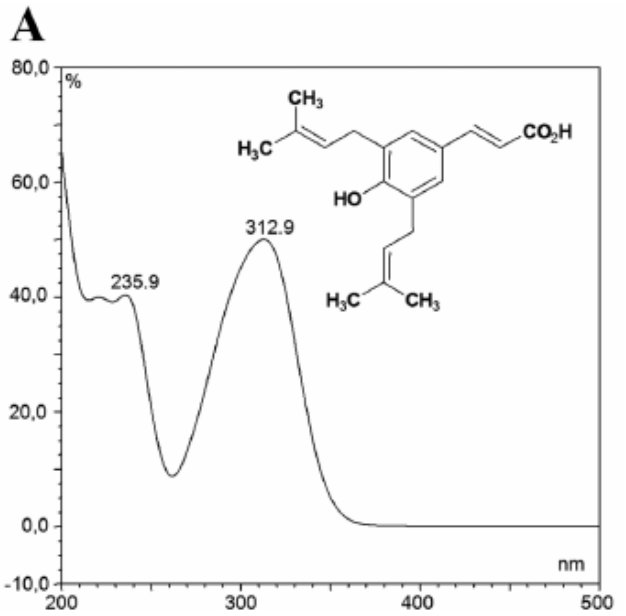

a
stock solution
solution A
solution B
solution C
b
stock solution
solution A
solution B
solution C

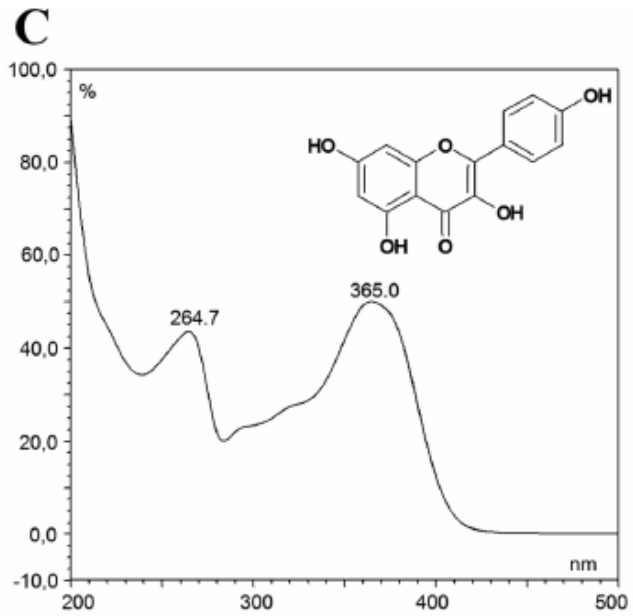
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

- การใช้การดูดกลืนแสงในย่าน UV-Vis เพื่อระบุชนิดของสารหรือกลุ่มฟังก์ชันทางเคมีในสารตัวอย่าง
- อาศัยหลักการที่ว่าสารต่างชนิดกันจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะเจาะจงแตกต่างกัน ทำให้สามารถใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้ชนิดของสารได้
- การวัดตำแหน่งของค่าการดูดกลืนสูงสุด (λ_{max})
- ลักษณะของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเป็นข้อมูลที่ใช้ในการระบุสารหรือเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

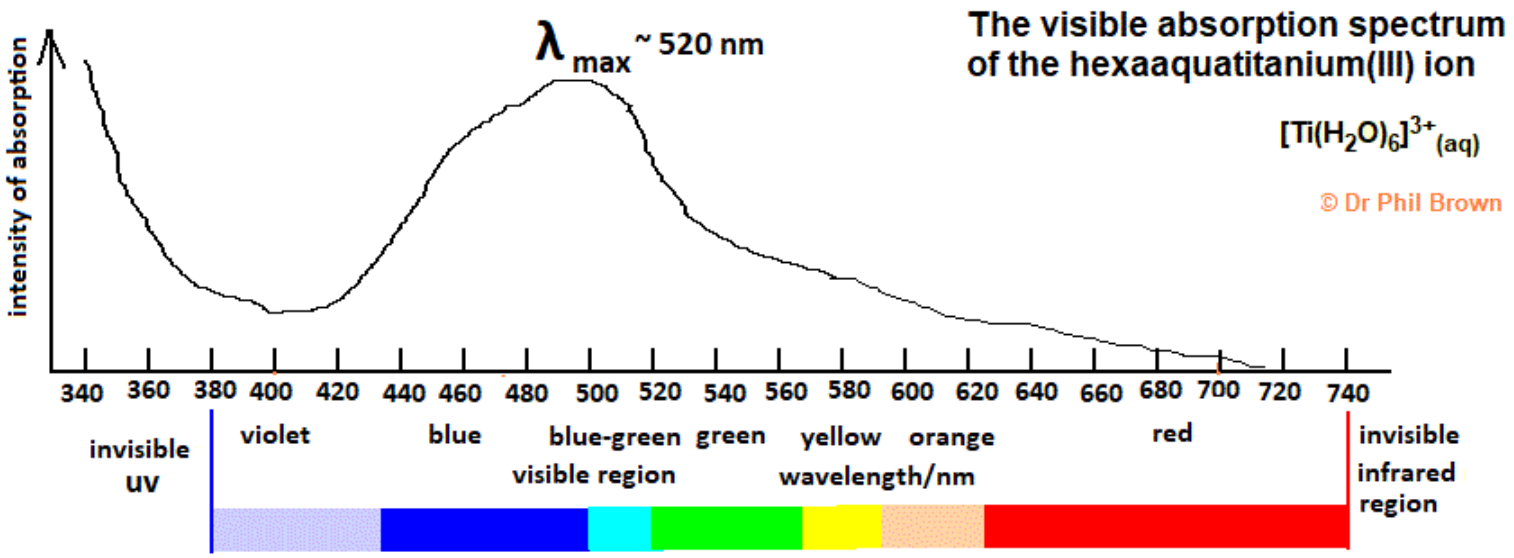
การตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากพืช เช่น ฟลาโวนอยด์ หรือกรดฟีนอลิก มีโครงสร้างแอโรเมติกคอนจูเกต ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วง 250–400 nm สามารถใช้เปรียบเทียบ λ_{max} กับข้อมูลอ้างอิง เพื่อยืนยันชนิดของฟีนอลในสารสกัด

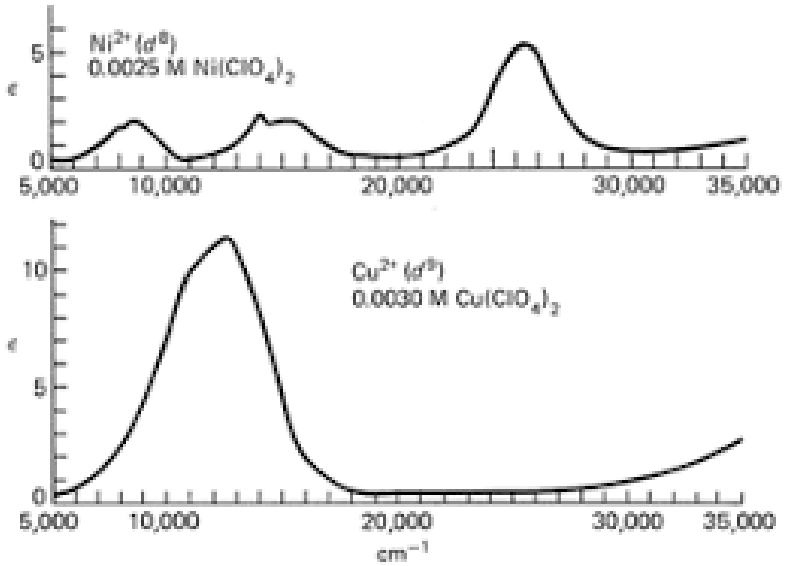






การยืนยันการเกิดปฏิกิริยาสำหรับสารเชิงซ้อนโลหะ (metal complexes) โลหะแทรนซิชันจะเกิดการดูดกลืนแสงเฉพาะเมื่อสร้างเชิงซ้อนกับลิแกนด์ ใช้ดูการเปลี่ยนแปลง λ_{max} หรือการเปลี่ยนสีเพื่อระบุว่ามีการเกิดเชิงซ้อน





วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ

Quantitative Method

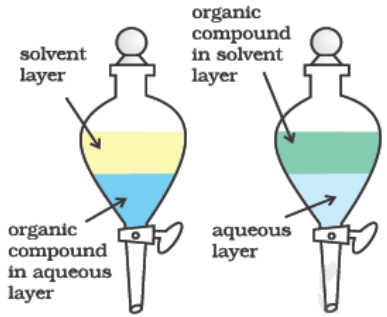
- วิธีกราฟมาตรฐานความเข้มข้น (calibration method)
- วิธีเติมสารมาตรฐาน (standard addition method)

(red cabbage)

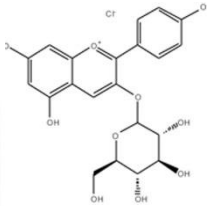
กะหล่ำปลีม่วง (red cabbage)
มีสารแอนโทไซนานิน (anthocyanin)
อยู่ปริมาณเท่าใด

เลือกวิธีวิเคราะห์ :
วิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี

Methodology



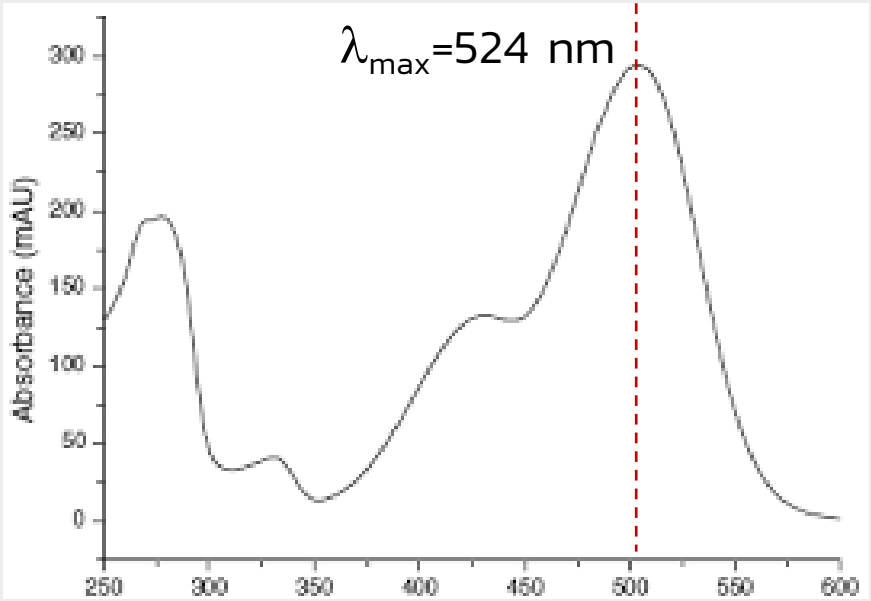
เตรียมตัวอย่างโดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย



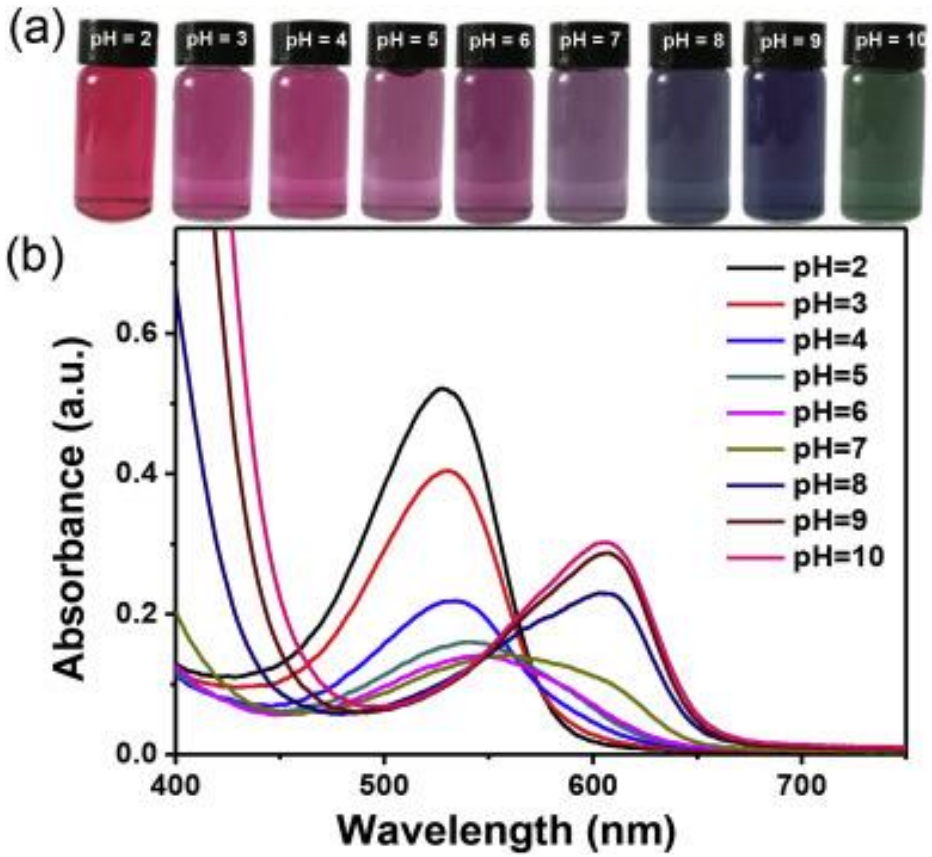
สารสกัดที่มี anthocyanin

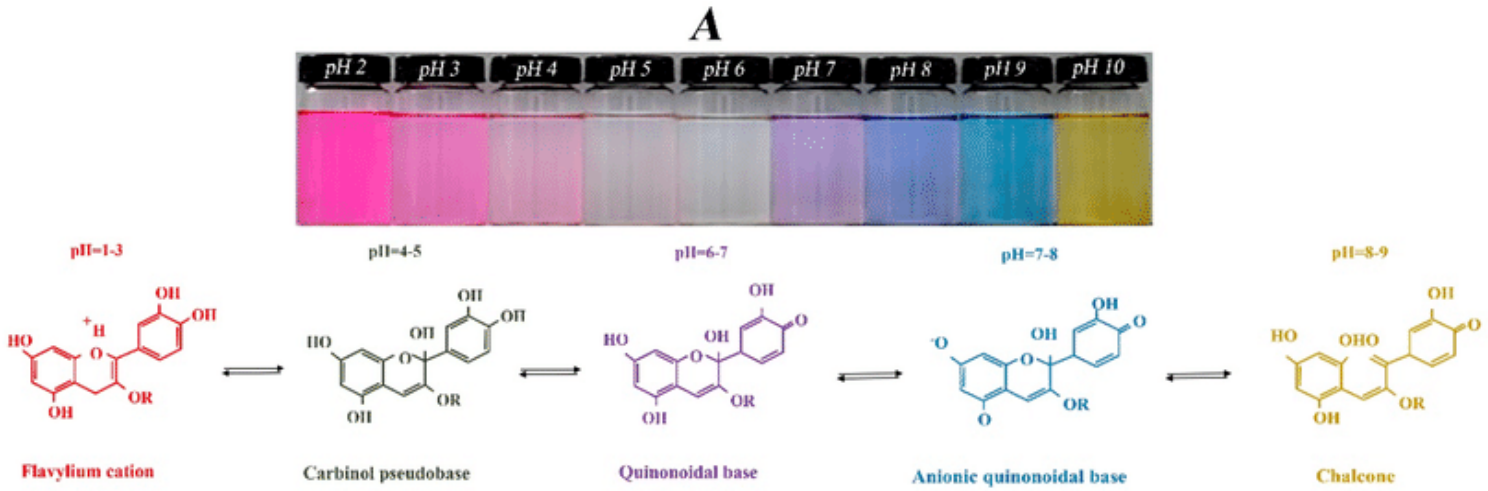
สเปกตรัมดูดกลืนแสงของสาร anthocyanin ในกระหล่ำปลีม่วง

λ_{max}=524 nm



anthocyanin





Color changes in response to pH variation of anthocyanin

วิธี
กราฟมาตรฐาน

เป็นการเทียบมาตรฐานทางอ้อม โดยกราฟที่สร้างขึ้นเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง
สัญญาณตอบสนองที่วัดได้ (แกน y)
กับ
ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x)

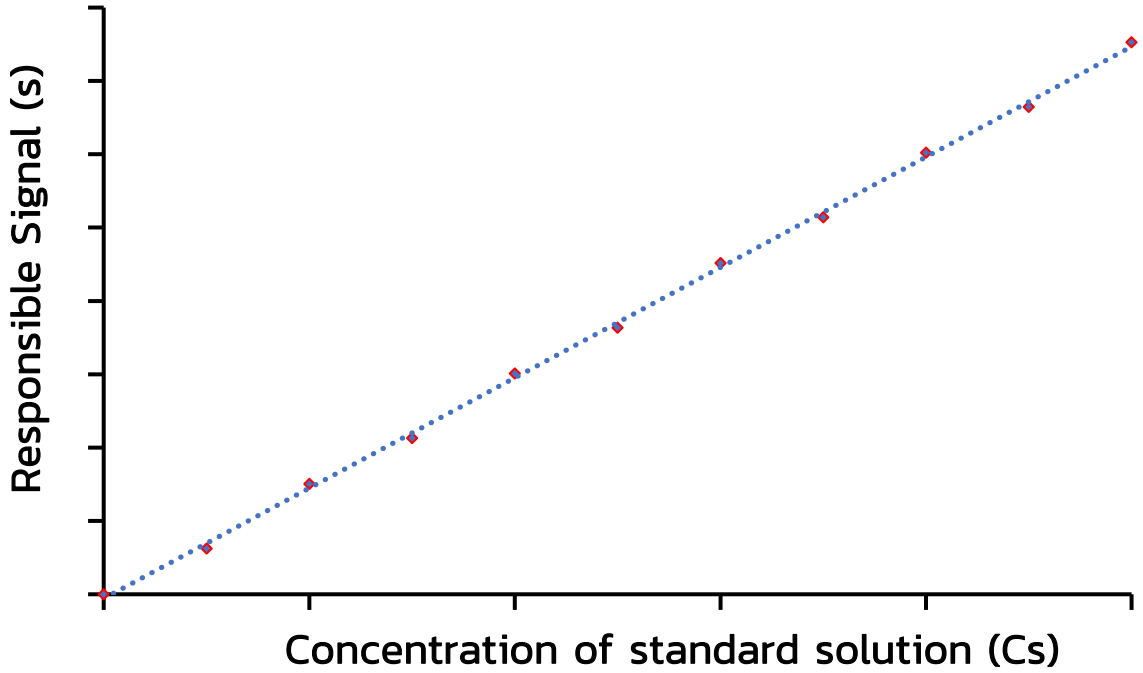
"โดยสัญญาณตอบสนองที่วัดได้ต้องแปรผันโดยตรงกับปริมาณสารที่สนใจ"

"การสร้างกราฟมาตรฐานจึงเป็นวิธีการสร้างความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (หรือปริมาณ) กับสัญญาณตอบสนองที่ได้จากเครื่องมือวิเคราะห์"

วิธีกราฟมาตรฐาน

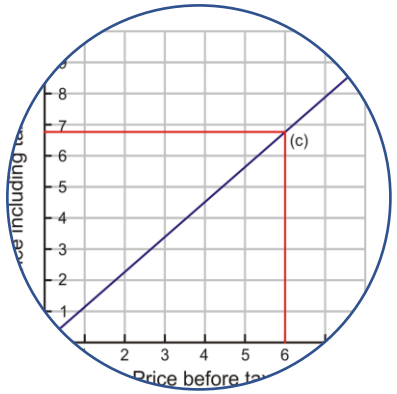
วิธีสารมาตรฐานภายนอก (External standard)

- การสร้างกราฟมาตรฐานภายนอก จะต้องกำหนดช่วงความเข้มข้นให้เหมาะสม โดยควรเป็นช่วงความเข้มข้นที่สัมพันธ์กับสัญญาณที่วัดได้มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด เรียกว่า ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ต้องครอบคลุมความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่าง
- ความเป็นเส้นตรงแสดงด้วย r^2 (มากกว่า 0.995)
- กราฟมาตรฐานภายนอก คือสัญญาณตอบสนองของเครื่องมือวัดที่สัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน



สร้างกราฟมาตรฐานภายนอก เพื่ออะไร...?

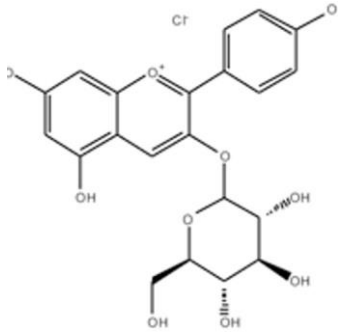
- ✓ บอกสัญญาณตอบสนองตามโดเมนการวัด
- ✗ ไม่สามารถบอกความเข้มข้น



- ✓ ทราบความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายนอก (จากการเตรียม)
- ✓ บอกสัญญาณตอบสนองตามโดเมนการวัดตามความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายนอก

Link ▶ หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโดยอาศัยกราฟมาตรฐาน
http://sci.rmutp.ac.th/woravith/?page_id=4559

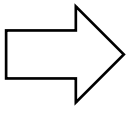
วิธีกราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐานภายนอก



สารมาตรฐาน
anthocyanin

0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 mg/L

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน anthocyanin ที่มีความเข้มข้นต่างกันจำนวน 6 ความเข้มข้น (0.20–1.20 mg/L)
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 524 nm
- เขียนกราฟมาตรฐานความเข้มข้น

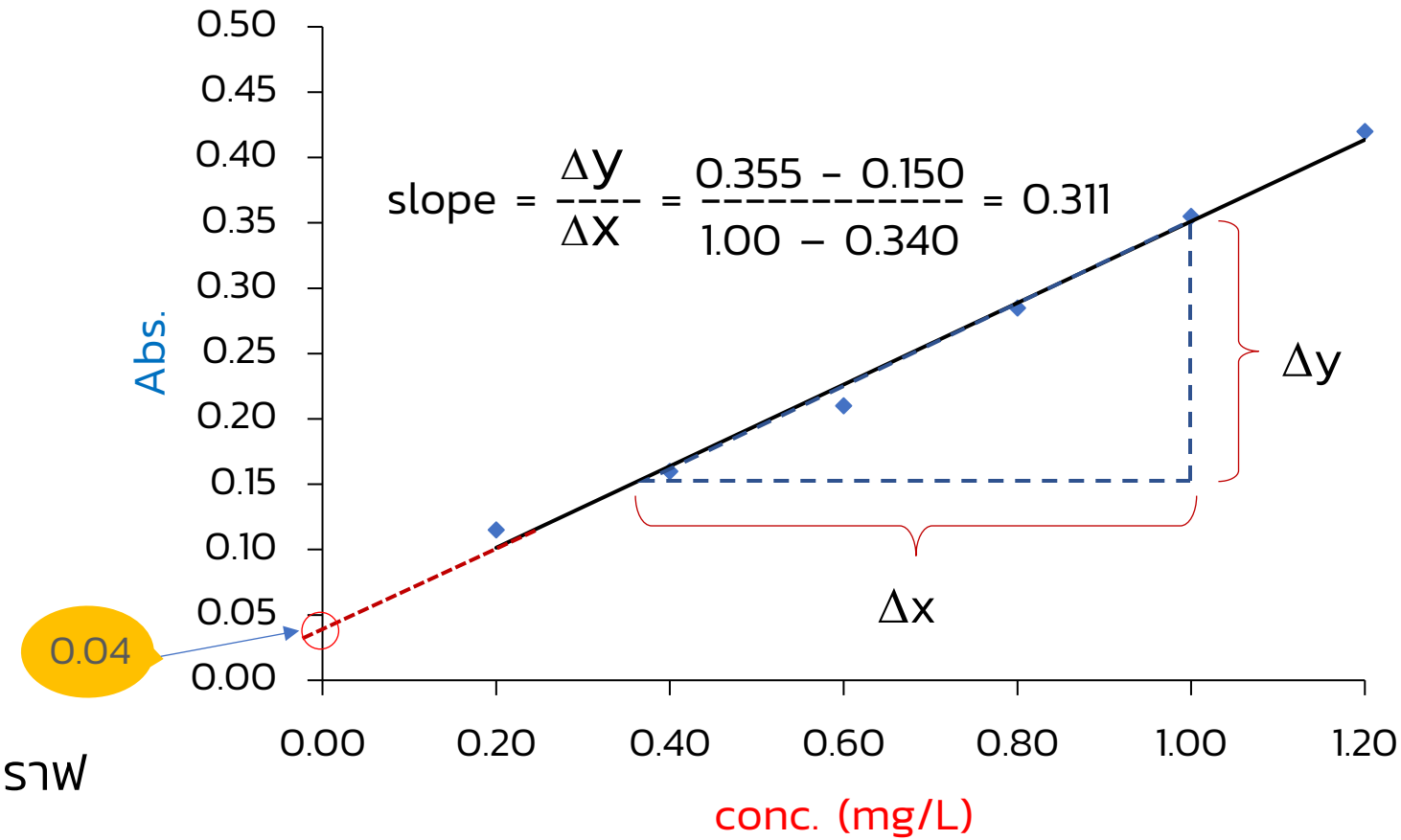


ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง (524 nm)
0.20	0.115
0.40	0.160
0.60	0.210
0.80	0.285
1.00	0.355
1.20	0.420

หมายเหตุ ศึกษาวิธีสร้างกราฟด้วยโปรแกรมเอกเซลล์ Click

Conc. (mg/L)	Abs
0.20	0.115
0.40	0.160
0.60	0.210
0.80	0.285
1.00	0.355
1.20	0.420

เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น



หาความชันกับจุดตัดแกนจากเส้นกราฟ

- ความชัน = 0.311
- จุดตัดแกน = 0.04

สมการเส้นตรง $y = 0.311x + 0.04$

สร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นด้วยโปรแกรมเอกเซลล์ แสดงสมการเส้นตรง และค่า R^2

$y = 0.3121x + 0.039 \quad R^2=0.9922$

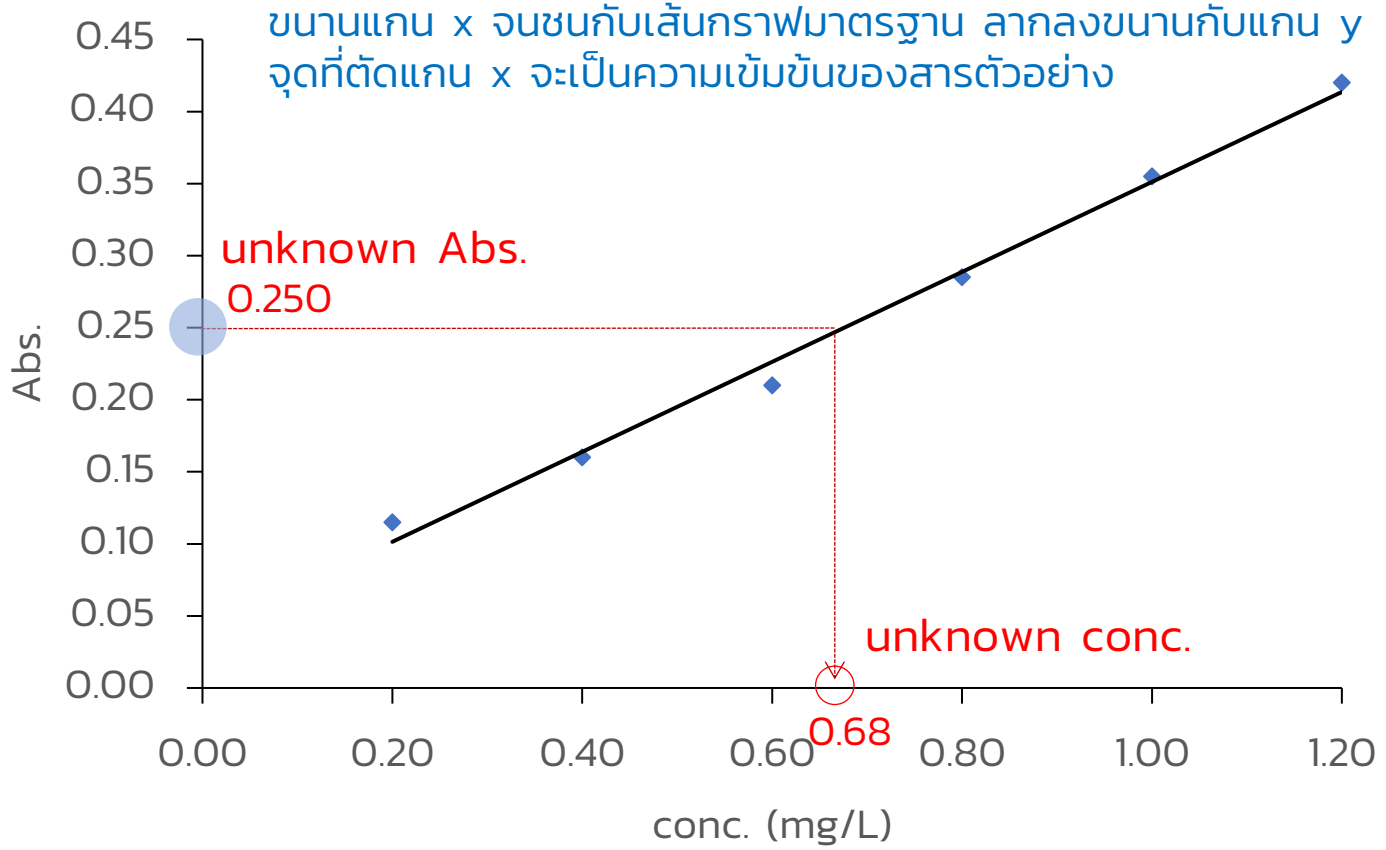
นำสารตัวอย่าง(unknown) หนัก 1.00 g วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 524 nm พบว่า เครื่องมือรายงานค่าการดูดกลืนแสง = 0.250

ความเข้มข้นเป็นเท่าไร ?

1) หาความเข้มข้นโดยลากเส้นบนกราฟมาตรฐานความเข้มข้น

2) คำนวณความเข้มข้นโดยสมการเส้นตรง

กำหนดจุด Abs บนแกน y (Abs ของสารตัวอย่าง) ลากเส้นขนานแกน x จนชนกับเส้นกราฟมาตรฐาน ลากลงขนานกับแกน y จุดที่ตัดแกน x จะเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่าง



แทนค่า Abs ของสารตัวอย่าง (y) ลงในสมการเส้นตรง คำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (x)

$$y = 0.3121x + 0.039$$

$$0.250 = 0.3121x + 0.039$$

$$x = (0.250-0.039)/0.3121$$

$$= 0.675$$

THANK YOU

สาขาวิชาเทคโนโลยีสุขภาพ เครื่องสำอางและการชะลอวัย
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ศูนย์พระนครเหนือ)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
1381 ถนนประชาราษฎร์ 1 แขวงวงศ์สว่าง เขตบางซื่อ
กรุงเทพมหานคร 10800
โทร 0-2836-3000 ต่อ 4159

https://hcat.sci.rmutp.ac.th hcatscirmutp hcat.sci@rmutp.ac.th