การทดลองที่ 2 สเปกโทรโฟโตเมตรี

อ. ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อให้เข้าใจถึงหลักการของสเปกโทรโฟโตเมตรีและการใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. รู้จักวิธีการหาสเปกตรัมของสาร
3. สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารในสารละลายด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี

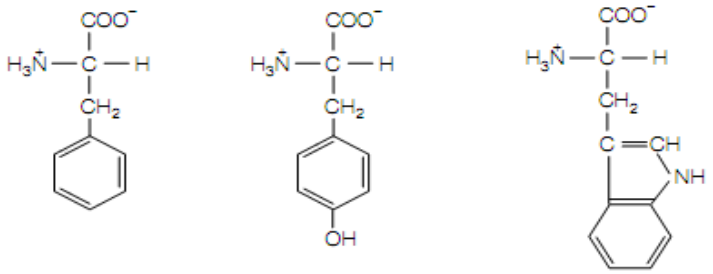
สเปกโทรโฟโตเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสารได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยอาศัยสมบัติการดูดแสงของสาร เทคนิคนี้จัดเป็นเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญที่มีการใช้อย่างมากในงานทางชีวเคมี เนื่องจากให้ความรวดเร็วในการวิเคราะห์ มีความแม่นยำสูง วิเคราะห์ปริมาณสารได้น้อยถึงในระดับไมโครกรัมแม้ว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์นั้นจะอยู่ในสารละลายผสมก็ตาม

แสง สีและการดูดกลืนแสงของสาร

ช่วงคลื่นแสงที่มีประโยชน์สำหรับงานทางชีวเคมีได้แก่ ช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต (180 - 350 นาโนเมตร) และช่วงคลื่นที่ตามองเห็น (350 – 780 นาโนเมตร) แสงในช่วงคลื่นทั้งสองนี้มีระดับพลังงานที่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้อิเล็กตรอนที่อยู่วงนอกสุดของโมเลกุลสารในสภาวะพื้น (ground state) เปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะเร้า (excited state) ซึ่งอิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นมักเป็นอิเล็กตรอนของพันธะคู่ (double bond) และพันธะสาม (triple bond)

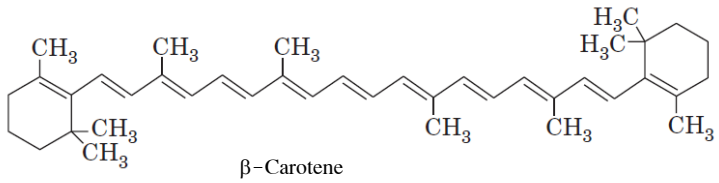
สมบัติการดูดแสงของสารถูกกำหนดจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลสารนั้น ๆ โครงสร้างโมเลกุลที่มีพันธะคู่สลับเดี่ยว (conjugated double bond) ไม่มากนัก ทั้งที่เป็นสารประกอบแอโรแมติกและเฮเทอโรไซคลิก เช่น กรดอะมิโนไทโรซีน เฟนิลอะลานีน และทริปโตเฟน (รูปที่ 1 ก.) ไนโตรจีนัสเบสพิวรีนและไพริมิดีน เป็นต้น สารพวกนี้มักดูดกลืนแสงอัตราไวโอเลตได้ดี โครงสร้างโมเลกุลมีพันธะคู่สลับเดี่ยวกันมากขึ้น เช่น เบต้า-คาโรทีน (β - carotene) (รูปที่ 1 ข.) หรือโมเลกุลที่มีไอออนของธาตุแทรนซิชันรวมอยู่ด้วย เช่น เฮโมโกลบิน โมเลกุลเหล่านี้มีขนาดใหญ่และโครงสร้างซับซ้อนมักดูดกลืนแสงช่วงคลื่นที่ตามองเห็นได้ดีและเป็นสารที่มีสี โดยปกติคลื่นแสงที่ตามองเห็นประกอบด้วยแถบของแสงสีต่าง ๆ กัน ซึ่งในสายตาของคนจะมองเห็นเป็นแสงสีขาวเมื่อแสงแม่สีที่เป็นสีเหลือง สีแดงและสีน้ำเงินผสมกัน แสงที่เดินทางกระทบสารเหล่านั้นจะมีการดูดกลืนแถบแสงสีที่มีระดับพลังงานเหมาะสมไว้ สีของสารเหล่านั้นที่ตาเรามองเห็นจึงเป็นแสงสีที่ไม่ถูกดูดกลืน แถบแสงสีที่สารดูดกลืนไว้จะทำให้เรามองเห็นสารนั้นมีสีอะไรนั้นได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

ก.



Phenylalanine 260 nm | Tyrosine 275 nm | Tryptophan 280 nm

ข



β-Carotene

รูปที่ 1 สารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสง ก. ในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต และ ข. ในช่วงที่คลื่นตามองเห็น

ตารางที่ 1 แสดงสีและสีตรงกันข้ามของสเปกตรัมช่วงคลื่นที่ตามองเห็น

ความยาวคลื่น * (นาโนเมตร)	สีที่ถูกดูดกลืน	สีตรงกันข้าม (complementary color) หรือสีของสารที่ตาเรามองเห็น
350 - 430	ม่วง	เหลือง
430 - 475	น้ำเงิน	ส้ม
475 - 495	เขียวแกมน้ำเงิน	ส้มแกมแดง
495 - 505	เขียวแกมน้ำเงิน	แดงแกมส้ม
505 - 555	เขียว	แดง
555 - 575	เขียวแกมเหลือง	ม่วงแดง
575 - 600	เหลือง	ม่วง
600 - 650	ส้ม	น้ำเงิน
670 - 700	แดง	เขียว

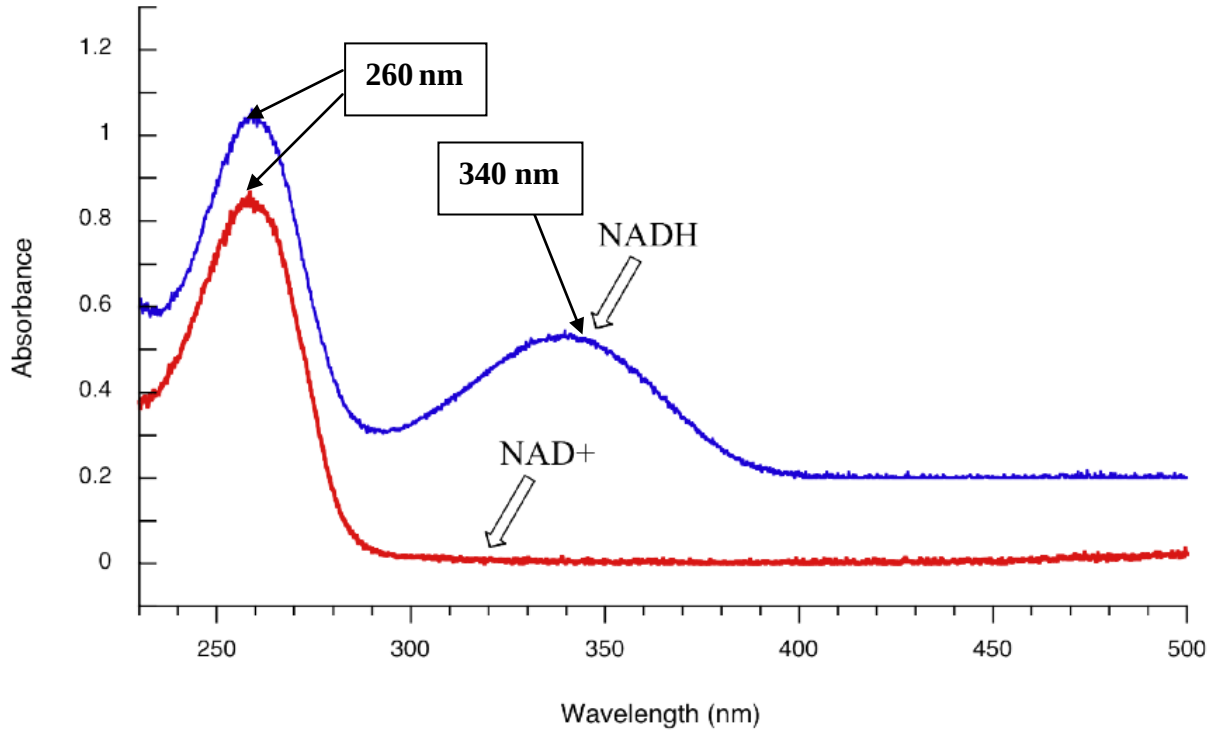
* ช่วงความยาวคลื่นที่ระบุเป็นค่าประมาณของแสงแถบสีต่าง ๆ

ที่มา : Pesce, Frings และ Gauldie (1996)

สเปกตรัมของสาร

สารแต่ละชนิดดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆได้ไม่เท่ากัน ซึ่งเมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น จะได้เส้นกราฟมีลักษณะเป็นเส้นโค้งที่เรียกว่า **สเปกตรัม (spectrum)** ซึ่งจะพบมีความยาวคลื่นที่มีการดูดแสงสูงสุดเรียกว่า λ_{max} (อ่านว่าแลมป์ดาแมกซ์)

ดังตัวอย่างสเปกตรัมของสารละลาย Nicotinamide adenine dinucleotide (รูปที่ 2) เมื่ออยู่ในสภาพออกซิไดซ์มี λ_{max} ที่ 260 นาโนเมตร ขณะที่เมื่ออยู่ในสภาพรีดิวซ์ (NADH) จะมี λ_{max} อยู่ 2 ค่าที่ 260 และ 340 นาโนเมตร ดังนั้นสเปคตรัมของสารที่บ่งบอกค่า λ_{max} จัดเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด การทราบ λ_{max} ของสารมีประโยชน์ต่อการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารนั้นด้วย โดยทั่วไปมักวัดค่าการดูดแสงที่ λ_{max} ซึ่งทำให้วิธีวิเคราะห์มีความไว (sensitivity) สูงสุด เว้นเสียแต่มีการรบกวนจากการดูดแสงของสารชนิดอื่นที่มี λ_{max} ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 2 สเปคตรัมของ NAD^+ และNADH

กฎของเบียร์และแลมเบิร์ตและการหาค่าการดูดกลืนแสงของสาร

เมื่อให้ลำแสงความยาวคลื่นเดี่ยวหรือที่เรียกว่าแสงเอกรงค์ (monochromatic light) ส่องผ่านเข้าไปในสารละลายโมเลกุลของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งละลายอยู่ บางส่วนของแสงจะถูกดูดกลืนไว้และแสงส่วนที่เหลือจะผ่านออกมา ดังนั้นความเข้มของแสงที่ผ่านออกจากสารละลายมีความเข้มที่น้อยลงกว่าเดิม การดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นเป็นไปตามกฎ 2 ข้อ คือ **กฎของเบียร์และกฎของแลมเบิร์ต** กฎข้อแรกกล่าวว่า **ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสง** ส่วนกฎข้อหลังกล่าวถึง**ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนนั้นเป็นปฏิภาคโดยตรงกับระยะทางที่แสงส่องผ่าน** เมื่อรวมกฎทั้ง 2 ข้อเข้าด้วยกัน เรียกว่า **กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert's law)** โดยทั่วไปมักเรียกกันสั้น ๆ ว่า **กฎของเบียร์ (Beer's law)** ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$\mathbf{A = abc} \quad \text{หรือ} \quad \mathbf{A = \log \frac{I_0}{I}}$$

โดยที่ **A** คือ ค่าการดูดแสง (absorbance) หรืออาจเรียกในชื่อเดิมซึ่งปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมแล้วว่า Optical density (O.D.) **ค่านี้ไม่มีหน่วย**

a คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสง (extinction coefficient)

b คือ ระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็นเซนติเมตร (path length) โดยทั่วไปเป็น 1 เซนติเมตร

c คือ ความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสง

$\mathbf{I_o}$ คือ ความเข้มของแสงก่อนส่องผ่านสารละลาย

I คือ ความเข้มของแสงที่ผ่านออกจากสารละลาย

เมื่อความเข้มข้นมีหน่วยเป็นโมลาร์และระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็น 1 เซนติเมตร ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงเรียกว่า **molar extinction coefficient** ซึ่งมักใช้สัญลักษณ์เป็น ε แทน a และมีหน่วยเป็น M^{-1} cm^{-1} ในกรณีไม่ทราบน้ำหนักโมเลกุลของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสงได้ อาจกำหนด a เป็น $E^{1\%}_{1\,cm}$ ซึ่งก็คือค่าการดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารดูดกลืนแสงเป็น 1 กรัมเปอร์เซ็นต์และความยาวของระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็น 1 เซนติเมตร **ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงเป็นค่าคงที่เฉพาะของสารแต่ละชนิดและมีค่าเปลี่ยนแปลงไปเมื่อความยาวคลื่นหรือสภาวะอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ตัวทำละลายหรือพีเอชของสารละลายเปลี่ยนแปลงไป** การหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสารสามารถทำได้โดยวัดค่าการดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 1 หน่วยความเข้มข้นและระยะทางที่แสงส่องผ่านสารละลายเป็น 1 เซนติเมตร

ในทางปฏิบัติจะวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยสารที่ต้องการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดย**สารละลายเปล่า (blank solution) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสารทุกชนิดละลายอยู่เหมือนในสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ยกเว้นสารที่ต้องการวิเคราะห์** ปริมาณแสงที่ผ่านออกจากสารละลายเปล่าจะเทียบค่าให้เท่ากับ I_0 ปริมาณแสงที่วัดได้จากสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ให้เท่ากับ I ความส่องผ่าน (transmittance) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะแสดงในรูปของอัตราส่วนดังสมการ

$$\text{Transmittance} \quad \text{หรือ} \quad T = \frac{I}{I_0}$$

อัตราส่วนนี้โดยทั่วไปมักเปลี่ยนเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ เรียกว่า **เปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (%Transmittance)**

$$\%\ \text{Transmittance} = \frac{I}{I_0} \times 100\ \%$$

เมื่อความเข้มข้นของสารที่ดูดกลืนแสงสูงขึ้น แสงถูกดูดกลืนมากขึ้นและมีปริมาณแสงที่ผ่านออกมาได้น้อยลง (% T น้อยลง) การลดลงของเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านจึงเป็นปฏิภาคผกผันเชิงล็อคกับความเข้มข้น โดยทั่วไปเรามักนิยมแสดงเป็นค่าการดูดแสง (A) ซึ่งเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น ดังนั้นความ สัมพันธ์ระหว่าง A และ %T แสดงด้วยสมการซึ่งมีวิธีพิสูจน์ ดังนี้

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log T = \log \frac{1}{T}$$

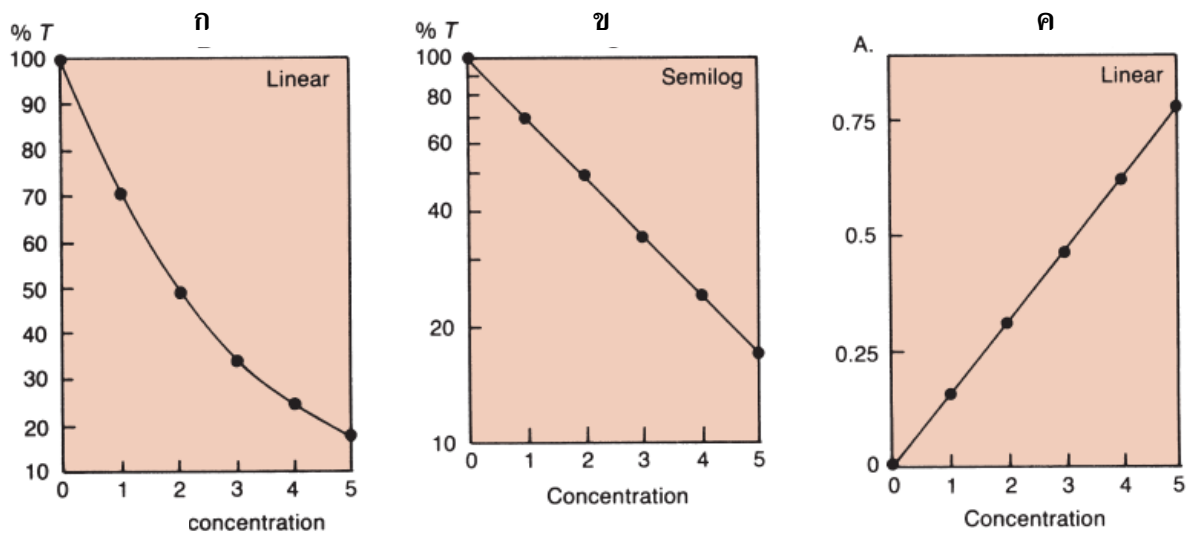
แปลง T ให้เป็น % T จะได้ $A = \log \frac{1}{T} \times \frac{100}{100} = \log \frac{100}{\%T}$

$$A = \log 100 - \log \%T$$

$$\boxed{A = 2 - \log \%T}$$

เพราะฉะนั้นค่าการดูดแสงไม่ใช่ค่าที่มาจากการวัดโดยตรง แต่ได้มาจากการคำนวณทางคณิตศาสตร์โดยอาศัยข้อมูลความส่องผ่านและมีสเกลเป็นเชิงล็อคระหว่าง 0 - ∞ ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านเป็นสเกลเชิงเส้น มีค่าจาก 0 - 100%

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดแสงหรือเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านกับความเข้มข้นที่เป็นไปตามกฎของเบียร์มีลักษณะของกราฟดังในรูปที่ 3 กราฟระหว่างค่าการดูดแสง (A) กับความเข้มข้น (รูปที่ 3 ค) เป็นกราฟเส้นตรงที่ผ่านจุดตั้งต้น ส่วนกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านกับความเข้มข้น (รูปที่ 3 ก) เป็นกราฟเส้นโค้ง แต่ถ้านำข้อมูลไปสร้างบนกระดาษกราฟเซมิล็อคจะได้กราฟเป็นเส้นตรง (รูปที่ 3 ข)



รูปที่ 3 ลักษณะของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ก. ความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน ข. ความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านในกราฟเซมิล็อค ค.ความเข้มข้นกับค่าการดูดแสง
ที่มา : Bishop, Fody และ Schoeff (2010)

การเบี่ยงเบนไปจากกฎของเบียร์เกิดขึ้นได้เมื่อ

1) ลำแสงที่ใช้ไม่ใช่ความยาวคลื่นเดี่ยวอย่างแท้จริง
2) สารละลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (non-homogeneous solution)
3) มีการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายที่ใช้อย่างมีนัยสำคัญ
4) วัดค่าการดูดแสงของความเข้มข้นที่สูงมาก
5) สารที่ต้องการวัดมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้น เช่น มีการแตกตัว มีการรวมกลุ่มของสาร เป็นต้น

ช่วงการดูดกลืนแสงที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ จะแสดงเป็นกราฟเส้นตรงผ่านจุดตั้งต้นในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้นสูง ๆ เส้นกราฟอาจเริ่มโค้งขึ้นหรือโค้งลงไม่เป็นไปตามกฎของเบียร์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร

ประโยชน์ของเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีทางชีวเคมี

1. การคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย กระทำได้หลายวิธี ดังนี้

ก. คำนวณโดยอาศัยกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต ถ้าทราบค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสง(extinction coefficient) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ซึ่งมักเป็นค่าที่ λ_{max} และทราบค่าการดูดแสงที่วัดที่ความยาวคลื่นเดียวกันจะสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารนั้นได้ โดยแทนค่าที่ทราบทั้งหมดลงในสูตร ดังตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 สารละลายนิวคลีโอไทด์ยูราซิลในคิวเวตขนาด 1 เซนติเมตร อ่านค่าการดูดแสงที่ λ_{max} (260 นาโนเมตร) ได้เท่ากับ 0.58 จงหาความเข้มข้นของสารละลายยูราซิลนี้ เมื่อยูราซิลมีค่า molar extinction coefficient หรือ ε ที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ $8.2 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$.

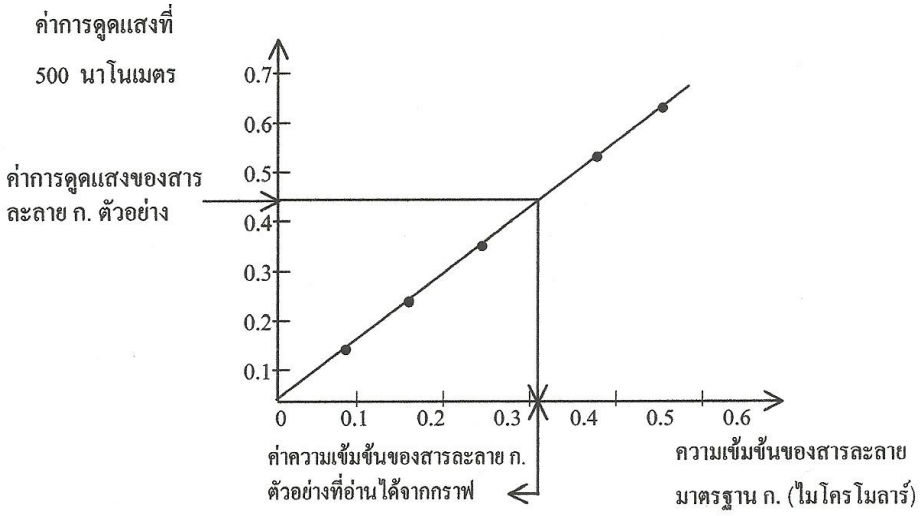
จากกฎของเบียร์ $A = \varepsilon bc$

$$c = \frac{A}{\varepsilon b} = \frac{0.58}{\left(8.2 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}\right)\left(1\ cm\right)}$$

$$= 7.1 \times 10^{-5}\ M$$

เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของยูราซิลในสารละลาย = 71 μM

ข. คำนวณจากเส้นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เมื่อไม่ทราบค่า extinction coefficient ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ หรือไม่สามารถวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นและสภาวะเดียวกับที่ใช้คำนวณหา ε ได้ ใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานแทน กรณีนี้ต้องมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์มาเตรียมสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยทั่วไปอย่างน้อย 4-5 ค่า นำไปวัดค่าการดูดแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดแสงกับความเข้มข้น จะได้กราฟเส้นตรงที่ผ่านจุดตั้งต้น เรียกว่า **เส้นกราฟมาตรฐาน** เมื่อทราบค่าการดูดแสงของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน ก็หาความเข้มข้นได้โดยอ่านค่าความเข้มข้นได้โดยตรงจากเส้นกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น ดังรูปนี้



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ก.

การอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานต้องอ่านจากเฉพาะเส้นกราฟช่วงที่ยังเป็นเส้นตรงเท่านั้น ซึ่งช่วงความเข้มข้นนี้เป็นปฏิภาคโดยตรงกับค่าการดูดแสง ไม่มีการต่อเส้นกราฟออกไปเพื่ออ่านค่าความเข้มข้นที่สูงกว่าที่ระบุไว้ในกราฟมาตรฐาน เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดแสงอาจไม่เป็นไปตามกฎของเบียร์ เส้นกราฟอาจมีลักษณะโค้งขึ้นหรือโค้งลง ซึ่งทำให้การอ่านค่าความเข้มข้นไม่ถูกต้องตามความเป็นจริง

ค. คำนวณโดยเปรียบเทียบค่าการดูดแสงของสารละลายตัวอย่างกับค่าการดูดแสงของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง ในกรณีที่ทราบถึงช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ยังคงเป็นไปตามกฎของเบียร์ เราสามารถใช้ค่าการดูดแสงของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานค่าใดค่าหนึ่งในช่วงดังกล่าวมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างได้ ซึ่งแสดงวิธีคำนวณดังนี้

จากความสัมพันธ์ $A = abc$

สำหรับสารละลายมาตรฐาน $A_{std} = abc_{std}$ ----------สมการที่ 1

สำหรับสารละลายตัวอย่าง $A_{unk} = abc_{unk}$ ----------สมการที่ 2

ในการวัดค่าการดูดแสง เราใช้หลอดบรรจุสารละลายที่มีขนาดเท่ากันและทั้งสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างต่างเป็นสารชนิดเดียวกัน ดังนั้น a และ b ในสมการทั้งสองจึงเท่ากัน

นำสมการที่ 1 หารด้วยสมการที่ 2 จะได้ $\frac{A_{std}}{A_{unk}} = \frac{c_{std}}{c_{unk}}$

จัดพจน์ใหม่จะได้

$$\boxed{c_{unk} = \frac{A_{unk}}{A_{std}} \times c_{std}}$$

สำหรับการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารที่ไม่มีสีหรือสารที่ไม่ดูดกลืนแสงมากในช่วงคลื่นใด ๆ เช่น น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ หรือสารที่ดูดกลืนเฉพาะช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต เช่น กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก ก็สามารถใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นได้ โดยต้องนำสารมาทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสีเพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีเสียก่อน แล้วจึงวัดการดูดแสงของสารประกอบที่มีสีเหล่านั้น ซึ่งจะได้ศึกษาวิธีการลักษณะนี้จากการทดลองเรื่อง คาร์โบไฮเดรตในหัวข้อการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

2. การวิเคราะห์ชนิดของสาร

สารแต่ละชนิดแสดงลักษณะสเปกตรัมเฉพาะตัว จึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาสเปคตรัมของสารที่ต้องการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสเปคตรัมของสารมาตรฐาน โดยทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน ซึ่ง λ_{max} จะบ่งชี้สารที่ต้องการวิเคราะห์นั้นเป็นสารอะไร

3. การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

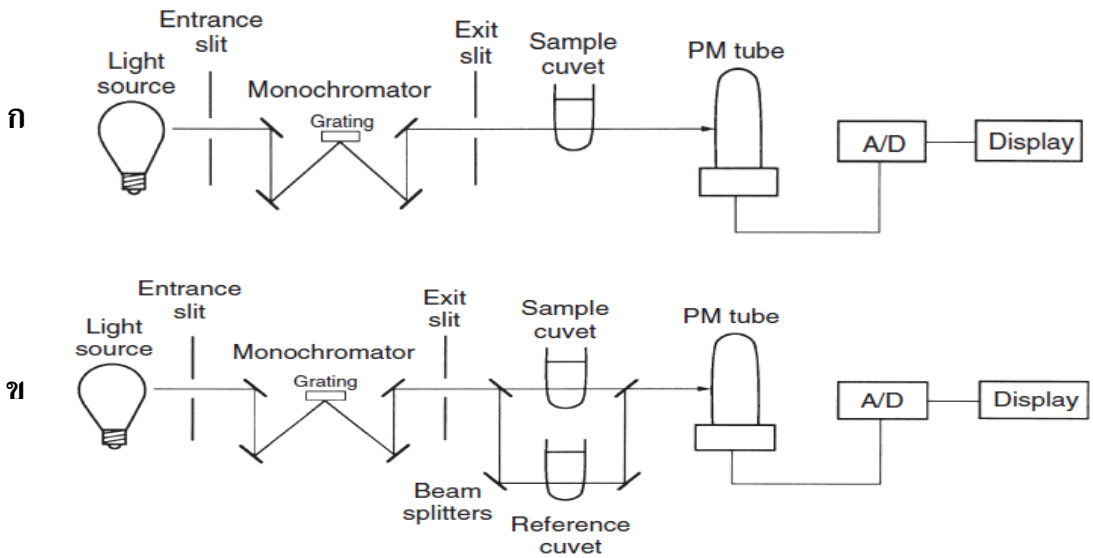
$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

ถ้าสาร A หรือ B และสาร C หรือ D ในปฏิกิริยาสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_1 และ

λ_2 ได้ตามลำดับ เราสามารถติดตามทิศทางและหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยติดตามการดูดแสงที่ลดลงของสาร A หรือ B ที่ λ_1 เมื่อปฏิกิริยาเกิดไปทางขวา และเมื่อปฏิกิริยาเกิดไปทางซ้ายก็สามารถติดตามได้จากการลดลงของการดูดแสงของสาร C หรือ D ที่ λ_2

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดการดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการศึกษา มีส่วนประกอบหลักที่สำคัญดังแสดงไว้ในรูปที่ 5 ซึ่งแต่ละส่วนมีรายละเอียดที่ควรทราบ ดังนี้



รูปที่ 5 แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ทั่ว ๆ ไป

ก. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ลำแสงเดี่ยว (single beam spectrophotometer)

ข. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ลำแสงคู่ (doublele beam spectrophotometer)

ที่มา : Bishop, Fody และ Schoeff (2010)

1. **แหล่งกำเนิดแสง (light source)** การวัดการดูดแสงในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นจะใช้ดวงไฟทังสเตน (tungsten lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 340-800 นาโนเมตร ส่วนการวัดการดูดแสงในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตจะใช้ดวงไฟไฮโดรเจน (hydrogen lamp) หรือดวงไฟดิวเทอเรียม (deuterium lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 200-340 นาโนเมตร เนื่องจากดวงไฟชนิดหลังนี้มีราคาสูง เมื่อไม่มีการใช้งานในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต ควรต้องปิดดวงไฟชนิดนี้ในเครื่องมือที่มีการติดตั้งดวงไฟทั้ง 2 ชนิดนี้ไว้ด้วยกัน

2. **ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator)** ทำหน้าที่คัดเลือกแสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงให้ได้แถบแสงเอกรงค์หรือแสงความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromatic light) ตามต้องการโดยการใช้ปริซึม (prism) หรือเกรตติง (diffraction grating)

3. **ช่องเล็กยาว (Slit)** ที่ทำหน้าที่ปรับความเข้มของแสงก่อนส่งผ่านไปยังสารละลายให้มีความเข้มที่เหมาะสมกับความไวของหลอดรับแสง

4. หลอดบรรจุสารตัวอย่างหรือคิวเวต (cuvette) ทำจากแก้ว ควอทซ์ (Quartz) หรือพลาสติก เช่น พอลิเมทราคลิเลต (polymethacrylate) และพอลิสไตรีน (polystyrene) รูปทรงที่ผลิตขึ้นมีหลายแบบ แต่ที่พบกันทั่วไปเป็นแบบหลอดสี่เหลี่ยมจัตุรัสและแบบหลอดทดลอง ทุกแบบส่วนใหญ่มีระยะทางที่แสงส่องผ่านเท่ากับ 1 เซนติเมตร การวิเคราะห์ในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นใช้หลอดที่ทำจากวัสดุชนิดใดก็ได้ แต่การวิเคราะห์ในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตต้องจำเพาะใช้แต่หลอดที่ทำจากควอทซ์เท่านั้น เนื่องจากวัสดุชนิดอื่นสามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นนี้ได้ ทำให้ค่าการดูดแสงที่วัดได้ไม่ถูกต้อง

ข้อระวังในการใช้คิวเวต

1) คิวเวตที่บรรจุสารละลายต้องปราศจากรอยขีดข่วน รอยคราบเปื้อนหรือรอยนิ้วมืออยู่ภายนอกหลอด ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการหักเหของแสงก่อนเข้าสู่สารละลาย ก่อนนำหลอดคิวเวตใส่ลงในช่องใส่หลอดบรรจุสารตัวอย่าง ให้ใช้กระดาษเนื้อนุ่มที่สะอาดเช็ดทำความสะอาดภายนอกให้เรียบร้อยก่อนนำใส่ ห้ามจับบริเวณที่ทำความสะอาดแล้วนั้นอีก ให้จับที่ปากหลอดหรือจับด้านที่ทึบแสงของคิวเวตรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส

2) ต้องบรรจุสารละลายที่ต้องการวัดการดูดแสงหรือสารละลายเปล่าลงคิวเวตในระดับเพียงพอสามารถวัดได้

3) ก่อนนำคิวเวตลงในช่องใส่หลอดคิวเวตของเครื่อง ให้ตรวจดูสารละลายที่นำมาวัดการดูดแสงต้องผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ขุ่นหรือมีตะกอนแขวนลอยอยู่ ไม่มีฟองอากาศอยู่ในสารละลายหรือเกาะอยู่ข้างหลอดคิวเวต

4) ห้ามทำสารละลายหกใส่ช่องใส่หลอดบรรจุสารตัวอย่างโดยเด็ดขาด

5) ไม่วัดการดูดแสงขณะที่สารละลายยังเย็นจัด เนื่องจากจะเกิดไอน้ำมาเกาะภายนอกคิวเวต การวัดที่กระทำที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของสารละลาย ก่อให้เกิดฟองอากาศขึ้นในสารละลาย จากการละลายได้น้อยลงของอากาศ ไอน้ำและฟองอากาศที่เกิดขึ้นจะหักเหและกระจายแสงส่องผ่านทำให้ค่าการดูดแสงอ่านได้สูงกว่าความเป็นจริง

5. อุปกรณ์ตรวจวัดแสง (detector) เมื่อแสงผ่านสารตัวอย่างออกมา **หลอดรับแสง (photo-multiplier tube)** ทำหน้าที่วัดความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจากสาร ละลายโดยเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานไฟฟ้า แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้านั้นต่อไปยังมาตรหรือเครื่องบันทึกข้อมูล

6. มาตรหรือเครื่องบันทึกข้อมูล (meter หรือ recorder) เป็นหน่วยแสดงค่าที่วัดได้ เครื่องมือบางแบบ เช่น Spectronic 21 เปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าที่ผ่านเข้าสู่แกลแวนอมิเตอร์ให้เป็นพลังงานกลดันให้เข็มบนหน้าปัทม์ของเครื่องเคลื่อนไปบนสเกล แบบอื่นๆ อาจต่อกับเครื่องพิมพ์คอมพิวเตอร์พิมพ์ผลการวัดและผลวิเคราะห์ต่าง ๆ ออกมาได้ตามคำสั่ง

ช่วงค่าการดูดแสงที่ให้ค่าที่ถูกต้องและเชื่อถือได้สำหรับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ธรรมดา เช่น รุ่น Spectronic 21 อยู่ระหว่าง 0.1 – 0.9 (72 %T – 12 %T) ดังนั้นในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นสารละลายที่วัดค่าการดูดแสงได้สูงกว่านี้ควรเจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้ก่อนวัดค่าใหม่อีกครั้ง หากเป็นสารละลายที่มีสีและสีนั้นเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยา ห้ามเจือจางด้วยน้ำหรือตัวทำละลายโดยตรง เพราะอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสารประกอบที่มีสีที่เกิดขึ้น ให้นำสารละลายตัวอย่างไปเจือจางเสียก่อน แล้วจึงทำปฏิกิริยาให้เกิดสีและวัดการดูดแสงใหม่อีกครั้ง

การทดลองที่ 2.1 การหาสเปกตรัมและ λ_{max} ของสีผสมอาหาร

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Brilliant blue FCF
ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Carmoisine
ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Sunset yellow FCF
ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Ponceau 4 R
ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
5. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Tartrazine
ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
6. สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง หมายเลข SU……..

วิธีทดลอง

1. เทสารละลายสีผสมอาหารลงในหลอดคิวเวต 6 หลอด ๆ ละ 1 สี และใส่น้ำกลั่นลงในหลอดคิวเวตอีกหลอดเพื่อใช้เป็นหลอดสารละลายเปล่า
2. เปิดเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทิ้งไว้ 15 นาที เป็นการอุ่นเครื่องก่อนใช้
3. ตั้งความยาวคลื่นเริ่มต้นที่ 400 นาโนเมตร
4. ใส่คิวเวตที่มีสารละลายเปล่าลงในช่องใส่คิวเวต เพื่อตั้งมาตรฐานตัวเครื่องที่ความยาวคลื่นนั้น ๆ โดยปรับให้ค่าการดูดแสง (absorbance) เป็นศูนย์ และให้ทำเช่นนี้ทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนความยาวคลื่น
5. ใส่คิวเวตที่มีสารละลายสีผสมอาหารลงในช่องใส่คิวเวต อ่านค่าการดูดแสง (absorbance) และบันทึกผลไว้ ทำจนครบทั้ง 3 หลอดสีผสมอาหาร
6. เปลี่ยนค่าความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นทีละ 20 นาโนเมตร แล้วทำการทดลองซ้ำในข้อ 4 และ 5 ทำเช่นนี้จนถึงความยาวคลื่นที่ 640 นาโนเมตร

ข้อพึงปฏิบัติ

1. ทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนความยาวคลื่น ต้องใช้หลอดสารละลายเปล่าตั้ง 100%T หรือ A = 0 เสมอ
2. สเกลที่เป็น absorbance ถ้าอ่านได้มากกว่า 0.7 ขึ้นไป ให้เปลี่ยนไปอ่านค่าเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (%T) แทน และเปลี่ยนค่า %T ที่อ่านได้เป็นค่า A โดยคำนวณจากความสัมพันธ์ $A = 2 - \log\%T$

7. เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดแสง (A) (แกน Y) และความยาวคลื่น (แกน X) เส้นกราฟที่ได้แต่ละเส้นเป็นสเปกตรัมของสีผสมอาหารแต่ละสี
8. ตรวจดูเส้นกราฟแต่ละเส้นว่ามีความยาวคลื่นใดที่ให้ค่าการดูดแสงสูงสุด (λ_{max})
9. เปรียบเทียบ λ_{max} ของสารละลายสีผสมอาหารตัวอย่างกับ λ_{max} ของสารละลายสีผสมอาหารมาตรฐานสีต่าง ๆ แล้ววิจารณ์หาข้อสรุปในกลุ่มว่า สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่างที่ได้มาประกอบด้วยสีผสมอาหารมาตรฐานสีใดบ้าง

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2.1 ค่าการดูดแสงของสารละลายสีผสมอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 400-640 นาโนเมตร

	ค่าการดูดแสง (A) ที่ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)												
	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640
สารละลายสีผสมอาหาร Brilliant blue FCF สี.....													
สารละลายสีผสมอาหาร Carmoisine สี.....													
สารละลายสีผสมอาหาร Sunset yellow FCF สี.....													
สารละลายสีผสมอาหาร Ponceau 4 R สี.....													
สารละลายสีผสมอาหาร Tartrazine สี.....													
สารละลายสีผสมอาหาร ตัวอย่าง SU..... สี.....													

รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ของค่าการดูดแสงและความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 640 นาโนเมตรของสารละลายสีผสมอาหารชนิดต่าง ๆ

สรุปผลการทดลองที่ 2.1

สารละลายสีผสมอาหาร Brilliant blue FCF พบว่ามี λ_{max} อยู่ที่.....นาโนเมตร

สารละลายสีผสมอาหาร Carmoisine พบว่ามี λ_{max} อยู่ที่.....นาโนเมตร

สารละลายสีผสมอาหาร Sunset yellow FCF พบว่ามี λ_{max} อยู่ที่.....นาโนเมตร

สารละลายสีผสมอาหาร Ponceau 4 R พบว่ามี λ_{max} อยู่ที่.....นาโนเมตร

สารละลายสีผสมอาหาร Tartrazine พบว่ามี λ_{max} อยู่ที่.....นาโนเมตร

สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง SU.....สี.....พบว่ามี λ_{max} อยู่ที่.....และ.....นาโนเมตร

การทดลองที่ 2.2 การหาความเข้มข้นของสีผสมอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ผสมอยู่ในสีผสมอาหารตัวอย่าง

วิธีทดลอง

1. จากการทดลองที่ 2.1 ทำให้เราทราบค่า λ_{max} ของสีผสมอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ผสมอยู่ในสีผสมอาหารตัวอย่าง ค่า λ_{max} นี้มีความสำคัญมากต่อการหาปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่ผสมอยู่ในสารละลายนั้น ซึ่งเราเลือกวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นนั้นไปใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้น

2. คำนวณหาความเข้มข้นของสีผสมอาหารแต่ละชนิดที่ผสมอยู่ในสารละลายสีผสมอาหารตัวอย่างโดยใช้ความสัมพันธ์

$$\frac{A_{std}}{A_{unk}} = \frac{c_{std}}{c_{unk}}$$

วิธีคำนวณและสรุปผลการทดลองที่ 2.2

สีผสมอาหารตัวอย่าง SU..... สี.....ประกอบด้วย	
สีผสมอาหาร.....	**สีผสมอาหาร**.....
1. λ_{max} = ...นาโนเมตร	1. λ_{max} = ...นาโนเมตร
2. ค่า A ที่ λ_{max} = ... (A_{std})	2. ค่า A ที่ λ_{max} = ... (A_{std})
3. ค่า A ของสีผสมอาหาร..... ที่ λ_{max} เดียวกับข้อ1 = ... (A_{unk})	3. ค่า A ของสีผสมอาหาร..... ที่ λ_{max} เดียวกับข้อ1 = ... (A_{unk})
4. ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน สีผสมอาหาร..... = ...ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C_{std}) (ดูค่าความเข้มข้นจากการทดลองที่ 2.1)	4. ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน สีผสมอาหาร..... = ...ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C_{std}) (ดูค่าความเข้มข้นจากการทดลองที่ 2.1)

5. ดังนั้นสีผสมอาหาร.....ที่เป็นองค์ประกอบในสีผสมอาหารสี.....มีความเข้มข้นเท่ากับ (แทนค่าข้อ 2 3 และ 4 แล้วคำนวณ) = ...ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C_{unk})	5. ดังนั้นสีผสมอาหารสี.....ที่เป็นองค์ประกอบในสีผสมอาหารสี.....มีความเข้มข้นเท่ากับ (แทนค่าข้อ 2 3 และ 4 แล้วคำนวณ) = ...ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C_{unk})

การทดลองที่ 2.3 การหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลายสีผสมอาหารโดยการคำนวณจากเส้นกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

สารเคมีที่ใช้

1. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Brilliant blue FCF ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Carmoisine ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Sunset yellow FCF ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Ponceau 4 R ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
5. สารละลายสีผสมอาหารมาตรฐาน Tartrazine ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
6. สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง หมายเลข SC.....

วิธีทดลอง

1. แต่ละกลุ่มจะได้รับสารละลายสีผสมอาหารสีใดสีหนึ่ง 2 หลอด หลอดหนึ่งเป็นสารละลายที่ไม่ทราบค่าความเข้มข้น ส่วนอีกหลอดหนึ่งเป็นสารละลายที่ทราบค่าความเข้มข้นแน่นอน
2. ใช้หลอดที่ทราบค่าความเข้มข้นเป็นสารละลายมาตรฐานและให้เตรียมสารละลายมาตรฐานอีก 3 ความเข้มข้น โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานในอัตราส่วนเป็น 1:2 , 1:4 และ 3:4 (อัตราส่วนนี้หมายถึง ส่วนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน : ส่วนปริมาตรทั้งหมดหลังการเจือจางแล้ว เช่น 1 : 2 คือ การนำสารละลายมาตรฐานมา 1 ส่วนปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 1 ส่วนปริมาตร ซึ่งจะได้ 2 ส่วนปริมาตรหลังเติมน้ำกลั่นแล้ว และมีความเข้มข้นลดลงจากเดิม 2 เท่า) คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายที่เจือจางได้

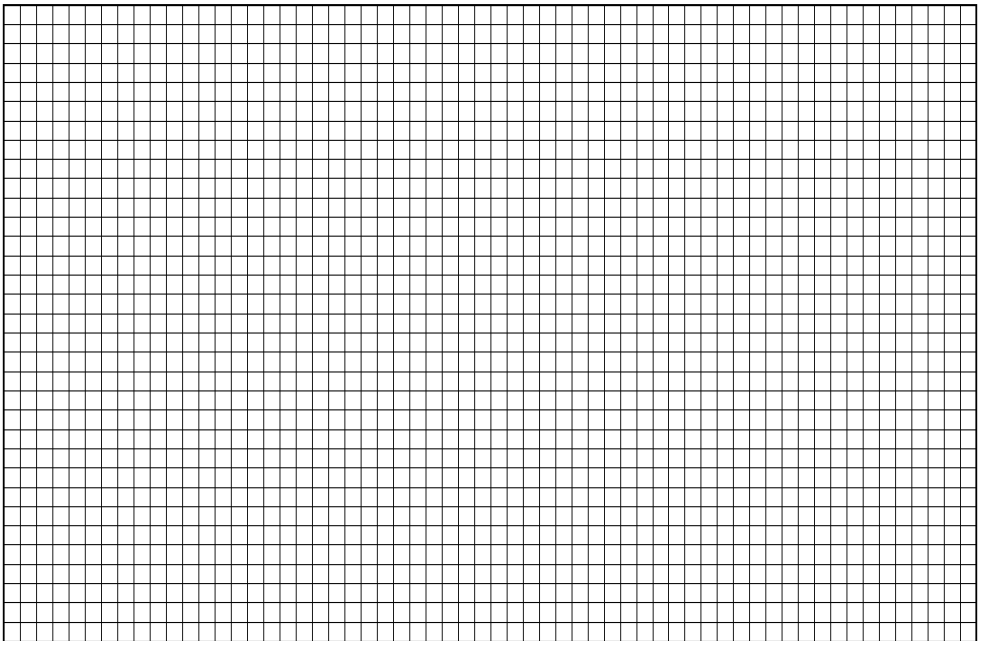
3. วัดค่าการดูดแสง (A) ของสารละลายทุกหลอด ที่ λ_{max} ของสีผสมอาหารที่ได้ซึ่งหาได้จากการทดลอง 2.1 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปล่า

4. สร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และแกน Y เป็นค่าการดูดแสง เส้นตรงที่ลากได้ คือ เส้นกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่า A กับค่าความเข้มข้นของสีผสมอาหารในสารละลาย

5. อ่านค่าความเข้มข้นของสารละลายสีผสมอาหารที่ไม่ทราบค่าความเข้มข้นจากเส้นกราฟมาตรฐาน

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2.3 ค่าการดูดแสงของสารละลายสีผสมอาหาร…….
สี.....ที่ความยาวคลื่น……..นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายสีผสมอาหาร…….. สี……(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดแสง ที่…….นาโนเมตร
สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น.....ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (จากการเจือจาง สีผสมอาหาร 1 ส่วน น้ำกลั่น 3 ส่วน)	
สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น.....ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (จากการเจือจาง สีผสมอาหาร 1 ส่วน น้ำกลั่น 1 ส่วน)	
สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น.....ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (จากการเจือจาง สีผสมอาหาร 3 ส่วน น้ำกลั่น 1 ส่วน)	
สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น.....ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่มีการเจือจาง)	
สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง หมายเลข SC.....	



รูปที่ 2. กราฟมาตรฐานของสารละลายสีผสมอาหาร…….

สรุปผลการทดลองที่ 2.3

คำถามท้ายบท

1. นำเนย 10 กรัม มาทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน แล้วสกัดเอา non-saponification fraction มาละลายในคลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร ค่าการดูดแสงที่วัดได้โดยใช้คิวเวตขนาด 1 เซนติเมตร เป็น 0.55 ที่ 328 นาโนเมตรและ 0.48 ที่ 458 นาโนเมตร จงคำนวณหาปริมาณแคโรทีนและวิตามินเอที่มีอยู่ในเนย โดยกำหนดค่า extinction coefficient ของแคโรทีนและวิตามินเอที่ความยาวคลื่นทั้งสองไว้ในตารางข้างล่างนี้

สารประกอบ	$E_{1cm}^{1\%}$ ในคลอโรฟอร์ม	
	328 นาโนเมตร	458 นาโนเมตร
แคโรทีน	340	2200
วิตามินเอ	1550	~0

แนวทางการหาคำตอบ นิสิตต้องตอบให้ได้ก่อนว่าสารทั้งสองต่างรบกวนการวิเคราะห์ซึ่งกันและกันหรือไม่ และถ้ารบกวนการวิเคราะห์ซึ่งกันและกันจริง การรบกวนนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อมีการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นใด

ในกรณีที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้น สารทั้งสองต่างรบกวนซึ่งกันและกัน นี่หมายความว่า ที่ความยาวคลื่นนี้ สารทั้งคู่ต่างวัดค่าการดูดแสงได้ ดังนั้นค่าการดูดแสงที่วัดได้คือค่าการดูดแสงของสารแต่ละชนิดรวมกัน ซึ่งการหาปริมาณสารชนิดใดจากค่าการดูดแสงด้วยการคำนวณโดยใช้กฎของเบียร์จึงต้องหักค่าการดูดแสงของสารอีกตัวที่รบกวนการวิเคราะห์ออกก่อน

2. สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง SU.....สี.....ที่กลุ่มนิสิตได้มา นิสิตคิดว่าจะสามารถหาความเข้มข้นของแต่ละแม่สีที่ผสมอยู่ได้ถูกต้องหรือไม่

แนวการตอบ ให้ดูแนวทางจากคำถามข้อ 1.

3. จงให้เหตุผลมา เพราะเหตุใดการหาความเข้มข้นของสารจึงต้องวัดค่าการดูดแสงที่ λ_{max} ของสารนั้น