

## หน่วยที่ 14 การตรวจวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโกปี

การตรวจวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโกปี เป็นการตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างจากอากาศและตัวอย่างทางชีวภาพโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สเปกโตรโฟโตเมทรี อะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตเมทรี ก๊าซลิควิดโครมาโตกราฟี และไฮเพอร์สเซอร์ ลิควิดโครมาโตกราฟี

หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้การดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์และ แลมเบิร์ต

องค์ประกอบของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ประกอบด้วย แหล่งกำเนิดแสง โมโนโครเมเตอร์ เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง เครื่องวัดแสง และ เครื่องรับสัญญาณและประมวลผล

1. แหล่งกำเนิดแสง จะต้องให้ลำแสงที่มีกำลังสูงและให้การแผ่รังสีออกมาคงที่ตลอดเวลาที่ความยาวคลื่นที่กำหนด

แหล่งกำเนิดแสงของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้แก่ หลอดไฮโดรเจนหรือหลอดควิเทอร์เรียม เป็นแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต และหลอดทั้งสแตนเป็นแหล่งกำเนิดแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้

2. โมโนโครเมเตอร์ ทำหน้าที่ควบคุมความยาวคลื่น จะทำให้แสงที่มีความยาวคลื่นต่างๆ ที่ออกมาจากแหล่งกำเนิดแสง เปลี่ยนเป็นแสงที่มีแถบแสงแคบๆ โดยใช้อุปกรณ์ต่างๆ เช่น ฟิลเตอร์ ปริซึม และเกรตติง ในปัจจุบันเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ใช้เกรตติงเป็นส่วนใหญ่เป็นเกรตติงแบบสะท้อนแสง

3. ส่วนที่วางสารตัวอย่าง มีลักษณะเป็นเซลล์เรียกว่า คิวเวท (Cuvettes) ใช้บรรจุสารตัวอย่างและสารเปรียบเทียบในบริเวณนี้จะเป็นที่ปิดเพื่อป้องกันแสงจากภายนอกเข้าไป คิวเวทที่เป็นแก้วจะใช้กับแสงในช่วงที่มองเห็นได้เพราะแก้วธรรมดาจะดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ เซลล์ที่ใช้ในการใส่สารตัวอย่างเรียกว่า เซลล์เรียกว่า คิวเวท (Cuvettes) ถ้าต้องการวัดแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตจะต้องใช้เซลล์ที่เป็นซิลิกาและควอทซ์

4. เครื่องวัดแสง ทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า

5. เครื่องรับสัญญาณและประมวลผล

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ประกอบด้วยชนิดของสารที่วิเคราะห์ได้ การเตรียมสารมาตรฐานและกราฟมาตรฐาน และการวิเคราะห์ตัวอย่าง

- ตัวอย่างสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้แก่ สารที่มีพันธะคู่ในโมเลกุล ได้แก่ เบนซีน สไตรีน

- การเก็บตัวอย่างอากาศเพื่อหาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยตั้งอัตราการไหลของปั๊มเป็น 0.5 ลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาทีได้ปริมาตรอากาศเท่าไรและเมื่ออ่านปริมาณของไฮโดรเจนซัลไฟด์จากกราฟมาตรฐานได้ปริมาณเป็น 0.2 ไมโครกรัม ให้หาความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอากาศ

ปริมาตรอากาศ = อัตราการไหล X ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง = 0.5 ลิตร/นาที X 20 นาที = 10 ลิตร

อากาศ 10 ลิตรคิดเป็น 10/1000 ลูกบาศก์เมตร = 0.01 ลูกบาศก์เมตร

ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอากาศเป็น 0.2 ไมโครกรัม/0.01 ลูกบาศก์เมตร = 20 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เมตร

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

อะตอมมิกแอบซอร์บชัน เป็นกระบวนการที่เกิดจากอะตอมเสถียรของธาตุ ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่เฉพาะของธาตุนั้น การดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสม ทำให้อะตอมของธาตุนั้นมีการเปลี่ยนสถานะ จากสถานะพื้น (Ground state) ไปสู่สถานะกระตุ้น (Excited state) การที่จะทำให้อะตอมของธาตุนั้นในสารประกอบเกิดเป็นอะตอมเสถียรได้นั้น ต้องมีการดูดกลืนพลังงานเข้าไป อาจเป็นพลังงานความร้อนจากเปลวไฟ หรือจากไฟฟ้า

หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้การเผาโลหะด้วยเปลวไฟหรือความร้อนจากไฟฟ้าเพื่อให้ได้เป็นอะตอมอิสระแล้วดูดกลืนแสงจากแหล่งกำเนิด ปริมาณแสงที่ดูดกลืนจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของโลหะนั้นในสารตัวอย่าง

- โลหะจะดูดกลืนพลังงานจากแหล่งกำเนิดแสงได้นั้น โลหะจะต้องอยู่ในรูปแบบอะตอมเสรี
- การทำให้เกิดอะตอมเสรีอาจทำได้ โลหะต้องอยู่ในรูป ทำการเผาโลหะด้วยเปลวไฟหรือการให้ความร้อนจากกระแสไฟฟ้า

### องค์ประกอบของเครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีส่วนประกอบดังนี้

1. แหล่งกำเนิดแสง (radiation source)
2. ส่วนที่ทำให้ธาตุดูดกลืนเป็นอะตอมเสรี (Atomizer)
3. โมโนโครเมเตอร์ (Monochromator)
4. ดีเทกเตอร์ (Detector)
5. เครื่องประมวลผล (Data system)

เครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรมิเตอร์โดยทั่วไปมี 2 แบบ คือ

1. เครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยว (Single beam)
  2. เครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ (Double beam)
- เครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรมิเตอร์ลำแสงคู่ เนื่องจากมีความเสถียรมากกว่าชนิดลำแสงเดี่ยว
  - ชนิดของเปลวไฟที่ใช้วิเคราะห์โลหะด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรมิเตอร์ ได้จำนวนมากได้แก่ เปลวไฟที่ใช้ในตรีสออกไซด์และเซซิเลียนเนื่องจากมีอุณหภูมิสูงที่สุด
  - อะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ใช้ในการวิเคราะห์สารประเภทโลหะ เช่น ตะกั่ว โครเมียม
  - การเก็บตัวอย่างตะกั่วในอากาศจะเก็บตัวอย่างโดยใช้ กระดาษกรองชนิด เซลลูโลสเอสเตอร์

### การวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าสลิควิดโครมาโตกราฟี

หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าสลิควิดโครมาโตกราฟีใช้หลักการของโครมาโตกราฟี เป็น การแยกสารผสมโดยใช้หลักการกระจายตัวของสารใน 2 เฟส คือเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่

- ปัจจัยหลักๆ ที่มีผลต่อการแยกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ได้แก่ปัจจัย แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของสาร (Molecular interaction) ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) และ ประสิทธิภาพในการแยกสาร (Resolution)
  - แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล ในโครมาโตกราฟีได้แก่ แรงดึงดูดอย่างอ่อน เช่น Hydrophobic bond, London dispersion force
- องค์ประกอบเครื่องก๊าสลิควิดโครมาโตกราฟี เครื่องก๊าสลิควิดโครมาโตกราฟี มีอุปกรณ์สำคัญ 5 รายการ

1. ก๊าซพา (Carrier gas)
2. ระบบการใส่สารตัวอย่าง (Sample introduction / injector system)
3. คอลัมน์ (Column)
4. ดีเทกเตอร์ (Detector)
5. เครื่องคำนวณผล (Integrator)

- ดีเทคเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีได้แก่ FID, ECD และ PID
- การบ่งชี้ชนิดของสารด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ใช้การบ่งชี้ด้วยค่า Retention time เมื่อค่า Retention time ของสารตัวอย่าง เท่ากับ Retention time ของสารมาตรฐานที่สภาวะการทดลองเดียวกัน แสดงว่าสารตัวอย่างเป็นชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซลิควิดโครมาโตกราฟีประกอบด้วย ชนิดของสารที่วิเคราะห์ได้ การเตรียมสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐาน และการวิเคราะห์ตัวอย่าง

- เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีใช้ในการวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ เช่น สารอินทรีย์ระเหยง่าย ไตรคลอโรเอธิลีน เบนซีน โทลูอิน

### การวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟี

หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟีใช้หลักการของโครมาโตกราฟี เป็นการแยกสารผสมโดยใช้หลักการกระจายตัวของสารใน 2 เฟส คือเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่

โครมาโตกราฟี เป็นกระบวนการแยกสารโดยให้สารตัวอย่างมีการกระจายตัวระหว่าง 2 เฟสซึ่งเกิดขึ้นในคอลัมน์โดยเฟสแรกเป็นเฟสคงที่ ซึ่งอาจเป็นของแข็ง สารที่มีรูพรุน อนุภาคขนาดเล็ก หรือเป็นแผ่นฟิล์มบางๆของของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งที่ใช้เป็น Support หรือผนังของคอลัมน์ เฟสที่ 2 คือ เฟสเคลื่อนที่ อาจเป็นก๊าซหรือของเหลว ถ้าเป็นก๊าซเรียกว่า Gas chromatography ถ้าเป็นของเหลวเรียกว่า Liquid chromatography

- ประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการแยกสารสามารถดูได้จากค่า จำนวน Theoretical plates (N)
- Reverse phase chromatography มีลักษณะ เฟสคงที่ใช้น้ำมันโพลาร์และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารที่โพลาร์

องค์ประกอบของเครื่องไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟี ประกอบด้วย ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ ป้อน อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน อุปกรณ์สำหรับใส่สารตัวอย่าง คอลัมน์และเฟสคงที่ ดีเทคเตอร์ เครื่องคำนวณผล

- ดีเทคเตอร์ชนิดใดของเครื่องไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟี ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ยูวีดีเทคเตอร์
- ส่วนสำคัญของเครื่องไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟี ที่ทำให้สารผสมแยกออกจากกัน คือ คอลัมน์

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโตกราฟี ประกอบด้วยชนิดของสารที่วิเคราะห์ได้ การเตรียมสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐาน และการวิเคราะห์ตัวอย่าง

- พีคของสาร m-MHA และ p-MHA ไม่สามารถหาปริมาณแยกจากกัน เนื่องจากสารทั้งสองไม่สามารถแยกจากกันได้ มีค่า Retention time ใกล้เคียงกัน
- MHA ในปัสสาวะเป็นการตรวจวัดเพื่อประเมินการได้รับสาร ไซลิน

### ความเชื่อถือได้และการควบคุมคุณภาพวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

- ความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วย ความไว ความเที่ยงตรง ความแม่นยำและความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์
- ความไวของวิธีวิเคราะห์หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ที่แตกต่างกัน แปรลงคืออย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ

การควบคุมคุณภาพวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย ความผิดพลาดของผลการวิเคราะห์ และการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

- แผนภูมิควบคุมการวิเคราะห์ที่มีไว้เพื่อควบคุมผลการวิเคราะห์ในแต่ละการทดลอง โดยต้องทำการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมพร้อมกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง แล้วนำผลการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมไปลงจุดในกราฟแผนภูมิการควบคุม โดยผลที่ได้ต้องอยู่ในช่วงที่กำหนดของ Warning limit
- Systemic error เป็นผลการวิเคราะห์ที่ได้ค่าสูงหรือต่ำกว่าค่าที่แท้จริงคือมีค่าความถูกต้องของผลการศึกษาลดลง