ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ กศ
อว 1

เอกสารผลงานที่เสนอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 8 ว

การพัฒนาคู่มือการทดลองวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง

ของ
นางอุมาพร สุขม่วง
ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7 ว

กลุ่มวิชาการ 2
กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

เอกสารผลงานที่เสนอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง
นักวิทยาศาสตร์ 8 ว

การพัฒนาคู่มือการทดลองวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง

วป กศ
ลว 1

ของ

นางอุมาพร สุขม่วง

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7 ว

กลุ่มวิชาการ 2

กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำคู่มือการทดลองวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงนี้ สำเร็จได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากผู้บังคับบัญชา ที่ให้คำแนะนำแก้ไขปรับปรุงเนื้อหา อาจารย์ทุกท่านซึ่งทำหน้าที่สอนในรายวิชาเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงที่เป็นผู้นำเอกสารไปใช้ประกอบการสอน และได้นำปัญหาที่พบมาเสนอแนะ เพื่อการปรับปรุง/แก้ไขทั้งด้านเนื้อหาและขั้นตอนการปฏิบัติ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของกองการศึกษาเคมีปฏิบัติ ที่ให้ความร่วมมือในการจัดเตรียมเครื่องมือ/อุปกรณ์/สารเคมี/สารละลายสำหรับการทดลอง เจ้าหน้าที่คอมพิวเตอร์ที่ให้ความอนุเคราะห์จัดพิมพ์ต้นฉบับ รวมทั้งนักศึกษาผู้ปฏิบัติการทดลองซึ่งเป็นผู้ให้ข้อมูลย้อนกลับ จึงทำให้เอกสารนี้มีความสมบูรณ์ สามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้จัดทำคู่มือฯ ขอขอบคุณ

คำนำ

การพัฒนาคู่มือการทดลองฉบับนี้ ได้รวบรวมข้อมูลทางวิชาการจากตำรา เอกสารทางวิชาการจากมหาวิทยาลัยทั้งในและต่างประเทศ ตลอดจนเอกสารเผยแพร่จากหน่วยงานด้านมาตรฐานระดับประเทศและต่างประเทศ แล้ววิเคราะห์ความเหมาะสมกับหลักสูตรอนุปริญญาเคมีปฏิบัติ องค์ความรู้ของผู้เรียนที่มีอยู่เดิมและได้รับจากวิชาอื่นที่เรียนควบคู่กัน เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่มีในกองการศึกษาเคมีปฏิบัติ และเวลาที่ใช้ในการเรียน นำมาจัดทำเป็นขอบข่ายของเนื้อหา แล้วทำการศึกษาทดลองปฏิบัติ เพื่อพัฒนาคู่มือการทดลองประกอบการเรียนวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงเป็นสื่อการสอนนักศึกษาชั้นปีที่ 3 ของสถานศึกษาเคมีปฏิบัติ คู่มือการทดลองประกอบด้วย 5 เรื่อง จำนวน 13 การทดลอง คือเรื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี จำนวน 3 การทดลอง เรื่องแก๊สโครมาโทกราฟี จำนวน 3 การทดลอง เรื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรมิตรีจำนวน 2 การทดลอง เรื่องโมเลกุลาร์ลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรมิตรี จำนวน 2 การทดลอง และเรื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิตรี จำนวน 3 การทดลอง การทดลองทั้ง 13 การทดลอง มีเนื้อหาสอดคล้องและครอบคลุมเนื้อหาของวิชาเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง ภาคทฤษฎี และการประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้กับการทดลองแต่ละเรื่องได้ตามความเหมาะสม

การจัดทำเอกสารคู่มือการทดลองเป็นรูปเล่มฉบับสมบูรณ์ครั้งนี้ เพื่อใช้เป็นตำราทางวิชาการในการเรียนการสอนของสถานศึกษาเคมีปฏิบัติ และการฝึกอบรมเรื่องการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการวิเคราะห์/ทดสอบและวิจัย ในโครงการฝึกอบรมและพัฒนาเทคนิคทางวิทยาศาสตร์ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ต่อไป

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความเป็นมา	1
	1.2 เครื่องมืออุปกรณ์	2
	1.3 ขั้นตอนการพัฒนาคู่มือ	2
	1.4 ปัญหา อุปสรรค และการแก้ไข	2
บทที่ 2	ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี	5
	2.1 องค์ประกอบของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี	6
	2.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)	10
	2.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	12
	2.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ	12
	2.5 ข้อควรปฏิบัติและการแก้ปัญหาเบื้องต้นในการใช้เครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ	14
	การทดลองที่ 2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียในเครื่องสำอาง	17
	การทดลองที่ 2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนโดยใช้เครื่อง HPLC	23
	การทดลองที่ 2.3 การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ	30
บทที่ 3	แก๊สโครมาโทกราฟี	37
	3.1 หลักการวิเคราะห์สาร	37
	3.2 องค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ	38
	3.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	42
	3.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ	43
	3.5 ข้อควรปฏิบัติและการแก้ปัญหาเบื้องต้นในการใช้เครื่อง	44
	การทดลองที่ 3.1 เทคนิคพื้นฐานการใช้แก๊สโครมาโทกราฟ	46
	การทดลองที่ 3.2 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารในทินเนอร์	50
	การทดลองที่ 3.3 การหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทินเนอร์	55
บทที่ 4	อัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิตรี	59
	4.1 องค์ประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	59
	4.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ	67
	4.3 การบำรุงรักษาเครื่องมือ	67
	การทดลองที่ 4.1 การตรวจสอบความแม่นของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	69
	การทดลองที่ 4.2 การหาค่าคงที่การแตกตัวของเมธิลเรด	73

หน้า

บทที่ 5 โมเลกุลาร์ลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรมิตรี 79

5.1 ส่วนประกอบของสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ 80

5.2 การประยุกต์ใช้งาน 82

5.3 การบำรุงรักษาเครื่องมือ 84

การทดลองที่ 5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณควินีนด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก 85

การทดลองที่ 5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี-2ด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก 89

บทที่ 6 อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรสโกปี 94

6.1 เทคนิคที่ใช้ในอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิตรี 94

6.2 อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบใช้เปลวไฟ 95

6.3 อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบใช้เตาเผาไฟฟ้า 96

6.4 ส่วนประกอบของอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ 98

6.5 การประยุกต์ใช้ 103

6.6 ข้อควรปฏิบัติและการแก้ปัญหาเบื้องต้นในการใช้เครื่อง AAS 104

การทดลองที่ 6.1 การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Flame AAS 108

การทดลองที่ 6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงด้วยเทคนิค Flame AAS 114

การทดลองที่ 6.3 การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ทองแดงด้วยเทคนิค Flame AAS 118

บทที่ 7 สรุปและวิจารณ์ 124

7.1 ผลการพัฒนาคู่มือการทดลอง 124

7.2 ประโยชน์ที่ได้รับ 124

7.3 สรุป 125

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีทดสอบ 126

ภาคผนวก 2 ตัวทำละลาย คอลัมน์ และดีเทกเตอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีและแก๊สโครมาโทกราฟี 134

ภาคผนวก 3 หน่วยวัดปริมาณตามศัพท์วิทยาศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน 138

เอกสารอ้างอิง 139

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงปัญหา สาเหตุ และวิธีแก้ไข	15
ตารางที่ 3.1	แสดงปัญหา สาเหตุและวิธีแก้ไข	44
ตารางที่ 3.2	แสดงปริมาตรของสารมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน	56
ตารางที่ 4.1	แสดงตัวอย่างข้อมูลค่าแอบซอร์แบนซ์ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของฟิลเตอร์มาตรฐาน	70
ตารางที่ 4.2	รายละเอียดสารชนิดและปริมาตรต่าง ๆที่เตรียมสารละลายเมธิลเรด ในรูปกรด และเบส	77
ตารางที่ 6.1	แสดงขั้นตอนกระบวนการทำให้เกิดอะตอมโดยเทคนิค Furnace AAS	96
ตารางที่ 6.2	ตารางแสดงปัญหา สาเหตุ และวิธีแก้ปัญหา	105
ตารางที่ A1	แสดงสมบัติทางฟิสิกส์และการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายอินทรีย์	134
ตารางที่ A2	แสดงสภาพขั้วของตัวทำละลาย	135
ตารางที่ A3	แสดงหน่วยวัดความดัน	135
ตารางที่ A4	แสดงสารบางชนิดที่ใช้เป็นเฟสนิ่ง และช่วงอุณหภูมิที่ใช้งาน	136
ตารางที่ A5	แสดงคุณลักษณะของคอลัมน์ของแก๊สโครมาโทกราฟ	136

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	แสดงโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟฟี	5
รูปที่ 2.2	แสดงส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC	6
รูปที่ 2.3	แสดงลักษณะของพีก และการคำนวณแฟกเตอร์ความไม่สมมาตรของพีก	11
รูปที่ 2.4	แสดงโครมาโทแกรมและรายละเอียดที่ใช้คำนวณหาค่าการแยกของพีก	12
รูปที่ 2.5	แสดงกราฟมาตรฐานของ external standard	13
รูปที่ 2.6	แสดงกราฟมาตรฐานของ internal standard	14
รูปที่ 3.1	แสดงโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GC	38
รูปที่ 3.2	แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ	38
รูปที่ 3.3	แสดงซีริงก์ที่บรรจุสารละลายตัวอย่างที่ต้องการฉีด	39
รูปที่ 3.4	แสดงดีเทกเตอร์ชนิด FID	40
รูปที่ 3.5	แสดงดีเทกเตอร์ชนิด TCD	41
รูปที่ 3.6	แสดงวงจรไฟฟ้า และ TCD เซลล์	41
รูปที่ 3.7	แสดงการหาอัตราการไหลที่เหมาะสม	47
รูปที่ 4.1	แสดงส่วนประกอบของเครื่อง ยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	60
รูปที่ 4.2	แสดงเซลล์รูปร่างและขนาดต่าง ๆ ที่ใช้กับเครื่อง ยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	63
รูปที่ 4.3	แสดงการส่งผ่านแสงของเซลล์ที่ทำจากวัสดุต่าง ๆ	64
รูปที่ 4.4	ดีเทกเตอร์ชนิดโฟโตวอลเตอิกเซลล์	65
รูปที่ 4.5	ดีเทกเตอร์ชนิดโฟโตทิวบ์	66
รูปที่ 4.6	ดีเทกเตอร์ชนิดโฟโตมัลติฟลายเออร์ทิวบ์	66
รูปที่ 4.7	แสดงกราฟมาตรฐาน external standard	67
รูปที่ 4.8	แสดงสเปกตรัมของ Holmium oxide มาตรฐาน	70
รูปที่ 4.9	แสดงสเปกตรัมของ HMR และ MR^-	75
รูปที่ 4.10	แสดงกราฟมาตรฐานของ HMR และ MR^- วัดที่ λ_A และ λ_B	75
รูปที่ 5.1	แสดงกลไกการคายพลังงานของโมเลกุลเพื่อเลื่อนระดับพลังงานสู่สถานะพื้น	79
รูปที่ 5.2	แสดงการจัดสปินของอิเล็กตรอนแบบ singlet state และ triplet state	80
รูปที่ 5.3	แสดงเครื่องมือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์	80
รูปที่ 5.4	แสดงกราฟมาตรฐานแบบ external standard	83
รูปที่ 5.5	แสดงกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์วิธี standard addition	83
รูปที่ 6.1	แสดงขั้นตอนการทำให้เกิดอะตอมในเทคนิค Flame AAS	95
รูปที่ 6.2	แสดงเส้นสเปกตรา (a) อะตอมโซเดียม (b) อะตอม Mg^+	97

		หน้า
รูปที่ 6.3	แสดงองค์ประกอบของเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชัน สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	98
รูปที่ 6.4	แสดงส่วนประกอบของ HCL	100
รูปที่ 6.5	แสดงส่วนประกอบของ EDL	100
รูปที่ 6.6	แสดงส่วนประกอบของเครื่องทำให้เกิดอะตอมแบบใช้เปลวไฟ	101
รูปที่ 6.7	แสดงลักษณะของ graphite furnace	102
รูปที่ A1	แสดงความสัมพันธ์ของ coefficient of variation	129
รูปที่ A2	แสดงตำแหน่งของ LOD LOQ และ LOL	130
รูปที่ A3	แสดงการหาค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์ (S_0)	131

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา

การพัฒนาคู่มือการทดลอง และจัดทำเป็นเอกสารประกอบการเรียนเป็นความจำเป็นสำหรับสถานศึกษา ที่ต้องพัฒนาเนื้อหาของรายวิชาให้ทันสมัย ตามความต้องการของผู้ใช้บุคลากรด้านวิทยาศาสตร์ เนื้อหาวิชาที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ทดสอบ ต้องมีการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงด้านเทคโนโลยี การนำระบบประกันคุณภาพมาใช้ในการดำเนินงาน ดังนั้นในการวิเคราะห์ทดสอบโดยใช้เครื่องมือ ต้องคำนึงถึงเรื่องการประกันคุณภาพด้วย ได้แก่ การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ ตลอดจนการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ คู่มือการทดลองประกอบด้วย 5 เรื่อง คือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟี ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรมิตรี โมเลกุลาร์ลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรมิตรี และอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิตรี รายละเอียดในเนื้อหาของแต่ละเรื่องประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง เป็นความรู้ทั่วไป ประกอบด้วย ข้อมูลเกี่ยวกับทฤษฎีของการวิเคราะห์สารโดยสังเขป ส่วนประกอบและหลักการทำงานของเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้เทคโนโลยีระดับสูง รวมทั้งข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องมือและการแก้ปัญหาเบื้องต้น ส่วนที่สองเป็นแนวทางการทดลอง แต่ละเรื่องประกอบ 2-3 การทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายให้ผู้เรียนได้ศึกษาองค์ประกอบขั้นพื้นฐาน หลักการทำงาน และการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือวิทยาศาสตร์แต่ละชนิด การทดลองที่ประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ทดสอบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ และการทดลองเรื่องการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ทดสอบ ซึ่งเป็นหัวใจสำคัญในการประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์/ทดสอบ รายละเอียดของการทดลองประกอบด้วย วัตถุประสงค์ของการทดลอง การทดลองซึ่งกล่าวถึงทฤษฎี และขั้นตอนการทดลองอย่างย่อ มีรายละเอียดเกี่ยวกับ สารเคมี เครื่องมือ สภาวะของเครื่องมือ อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ และวิธีการทดลองอย่างละเอียด นอกจากนี้ได้จัดทำตารางบันทึกข้อมูล/ผลการทดลอง เพื่อให้ผู้ทดลองมีแนวทางจัดการข้อมูลจากการทดลองเป็นไปตามวัตถุประสงค์ ในส่วนสุดท้ายของเอกสารเป็นภาคผนวก ซึ่งได้รวบรวมแนวทางในการทำการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้กับการทดลองแต่ละเรื่องได้ตามความเหมาะสม

คู่มือการทดลอง วิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงนี้ เป็นคู่มือประกอบการเรียนที่มีเนื้อหาสมบูรณ์ครอบคลุมหัวข้อที่สำคัญและจำเป็นต่อการปฏิบัติงานในสภาวะปัจจุบัน ใช้เป็นคู่มือการทดลอง ซึ่งจำเป็นต้องมีในระบบการเรียนการสอน ทำให้ผู้เรียนสามารถเตรียมตัวล่วงหน้าก่อนทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลอง เตรียมเครื่องมือ/อุปกรณ์/สารเคมี เป็นการฝึกการทำงานอย่างเป็นระบบ นอกจากนี้การที่ผู้เรียนมีคู่มือการทดลองที่มีเนื้อหาเกือบครบทุกหัวข้อในรายวิชา ทำให้ผู้เรียนได้ศึกษาในเชิงเปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์หลายวิธีที่แตกต่างกัน

1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาทดลอง เพื่อพัฒนาคู่มือการทดลอง เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการเรียนการสอนของสถานศึกษาเคมีปฏิบัติ

1.2.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ(High performance liquid chromatograph), Thermoseparation

1.2.2 แก๊สโครมาโทกราฟ (Gas chromatograph), Hewlet Packard Model 6890

1.2.3 ยูวี - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet visible spectrophotometer), Perkin Elmer , Lambda 14

1.2.4 สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer) , Perkin Elmer LB 50

1.2.5 อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Atomic absorption spectrophotometer), Perkin Elmer , Model 4100

1.2.6 เครื่องมือ/อุปกรณ์/เครื่องแก้ว สำหรับห้องปฏิบัติการทดลองทางเคมี

1.2.7 เอกสารอ้างอิง และเอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการ เกี่ยวเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง และเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์

1.3 ขั้นตอนการพัฒนาคู่มือ

1.3.1 หาข้อมูลจากแบบสอบถามผู้เรียน เพื่อให้ทราบความเหมาะสมของเนื้อหาที่สอนอยู่เดิมเพื่อการปรับปรุง

1.3.2 หาข้อมูลจากแบบสอบถามจากบุคคลากรที่ปฏิบัติงานด้านห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เพื่อให้ได้ความต้องการฝึกอบรมของภาคอุตสาหกรรมเกี่ยวกับความต้องการความรู้เพิ่มเติมด้าน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

1.3.3 หาข้อมูลจากเนื้อหาในหลักสูตรของสถานศึกษาอื่น ที่สอนในรายวิชาเดียวกันเพื่อการศึกษาเชิงเปรียบเทียบ

1.3.4 ทำการทดลองทางห้องปฏิบัติการ ในเรื่องและหัวข้อต่างๆดังรายละเอียดในบทที่ 2-บทที่ 6 เพื่อศึกษาความสอดคล้องกับเวลาเรียนในแต่ละช่วงที่กำหนดโดยตารางเรียน

1.3.5 เรียบเรียงเอกสารเกี่ยวกับหลักการวิเคราะห์สาร หลักการของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ในการทดลองแต่ละเรื่อง

1.3.6 ให้นักศึกษาใช้เป็นเอกสารประกอบการทดลอง สังเกตผลระหว่างนักศึกษาปฏิบัติการทดลอง บันทึกข้อบกพร่องจากการเรียน ระหว่างปี 2540-2543 เพื่อหาจุดที่ต้องแก้ไขเพิ่มเติม

1.3.7 ปรับปรุงขั้นสุดท้าย และรวบรวมจัดพิมพ์เป็นรูปเล่ม

1.4 ปัญหาอุปสรรคและการแก้ไข

การพัฒนาคู่มือการทดลอง วิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง เป็นเรื่องที่ยุ่งยากมาก เนื่องจาก ต้องใช้ข้อมูลจากการศึกษาทดลองทางห้องปฏิบัติการโดยใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ซึ่งมีความซับซ้อนต้องใช้เวลามากในการศึกษารายละเอียดของเครื่องมือ ซึ่งเกิดปัญหาเสมอๆใน

ระหว่างการศึกษาทดลอง ทั้งทางด้านอิเล็กทรอนิกส์ทางด้านเทคนิคการวิเคราะห์ และปัญหาด้านอื่น ๆ ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1.4.1 เวลาของการศึกษาทดลองมีจำกัด แต่การใช้เครื่องมือบางชนิด เช่น HPLC และ GC ต้องใช้เวลาในการเตรียมสภาวะของเครื่องมือก่อนการใช้งาน และล้างคอลัมน์นาน

การแก้ไข

วางแผนเลือกเวลาการทำงานให้เหมาะสม เช่น เริ่มทดลองตั้งแต่วันแรกของสัปดาห์ เพื่อให้สามารถเปิดเครื่องมือค้างคืนได้

1.4.2 เวลาเรียนของนักศึกษามีเพียง 3 ชม.ต่อครั้ง

การแก้ไข

1 เลือกการทดลองที่ใช้เวลาน้อย การเตรียมตัวอย่างไม่ยาก วิเคราะห์ผลได้รวดเร็วเพื่อให้เสร็จทันในเวลา และยังคงได้เนื้อหาตามวัตถุประสงค์

2 ประสานงานกับฝ่ายบริหารการศึกษาเพื่อการจัดตารางเรียนในเวลาที่ต่อเนื่อง อย่างน้อย 6 ชม.

1.4.3. การเปิดสอนนักศึกษาของสถานศึกษาเคมีปฏิบัติในหัวข้อเรื่องการวิเคราะห์โดยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ มีเพียงปีละครั้ง การทดสอบความเหมาะสมด้านเนื้อหา เวลา และอื่นๆ ทำได้น้อยครั้ง ทำให้ได้ข้อมูลย้อนกลับน้อย

การแก้ไข

ทำการทดลองนอกเวลาเรียน นำไปใช้สอนให้กับข้าราชการใหม่ของกองการศึกษาฯ และนำไปใช้ในการฝึกอบรม

1.4.4 เครื่องมือที่ใช้เป็นเครื่องมือที่มีความซับซ้อนมาก เมื่อมีปัญหาเครื่องมือขัดข้องด้านอิเล็กทรอนิกส์ ต้องใช้ช่างจากบริษัทผู้ขายเท่านั้น ทำให้งานล่าช้า อุปกรณ์บางอย่างต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ

การแก้ไข

ทำแผนการซ่อมบำรุงเครื่องมือ ศึกษาวิธีดูแลรักษาเครื่องมือ เพื่อให้สามารถแก้ปัญหาเบื้องต้นได้เอง และจัดเตรียมอุปกรณ์สำรองไว้ให้เพียงพอ

1.4.5 ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดมีพิษและระเหยง่าย ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการและสร้างปัญหาแก่สิ่งแวดล้อม

การแก้ไข

เลือกใช้ตัวทำละลายที่ปลอดภัย หลีกเลี่ยงการใช้สารอินทรีย์อันตราย เช่น เบนซิน คาร์บอนเทตระคลอไรด์ และเอมีน เป็นต้น

1.4.6 เรื่องการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี ซึ่งเพิ่มขึ้นมาทั้งภาคทฤษฎี และการทดลอง เป็นเรื่องที่ค่อนข้างยุ่งยาก ห้องปฏิบัติการต่างๆกำลังอยู่ระหว่างดำเนิน

การจึงไม่มีเอกสารอ้างอิงเป็นภาษาไทย ได้เพียงข้อมูลและแนวทางจากเอกสารจากต่างประเทศ

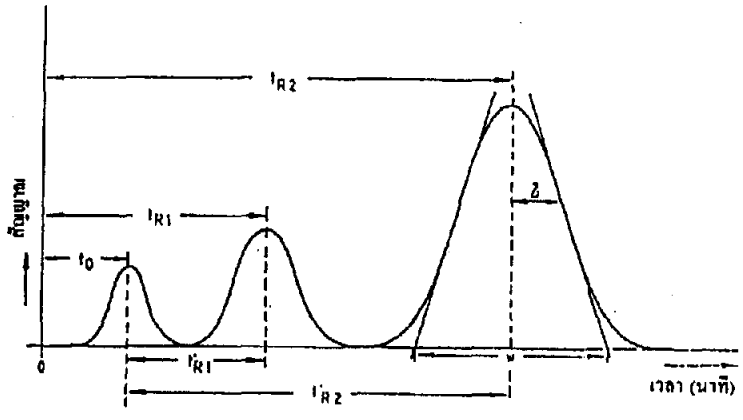
การแก้ไข

เข้ารับการฝึกอบรมในเรื่องดังกล่าวจากหน่วยงานที่ทำงานด้านนี้โดยตรง ศึกษาค้นคว้าข้อมูลจากแหล่งต่างๆ เช่นเอกสารตีพิมพ์ของมหาวิทยาลัยในต่างประเทศ เอกสารเผยแพร่จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับมาตรฐานสากล แล้วนำมาทดลองเพื่อความเหมาะสมกับเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่สามารถหาได้ และมีความปลอดภัย

บทที่ 2
ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
(High Performance Liquid Chromatography)

ลิควิดโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน หลักการวิเคราะห์สาร ต้องแยกสารผสมออกจากกัน โดยที่สารแต่ละชนิดในตัวอย่างเกิด differential sorption ระหว่างเฟส 2 เฟสคือ เฟสนิ่ง (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยที่เฟสนิ่งเป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็ง บรรจุอยู่ในคอลัมน์ จึงมักเรียกว่าคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ เป็นของเหลว เรียกว่าสารละลายตัวชะ (eluent) สารผสมจะแยกออกจากกันได้เนื่องจากเคลื่อนที่ผ่านเฟสนิ่งโดยการนำพาของเฟสเคลื่อนที่ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน (differential migration) ซึ่งเป็นผลจากการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดที่อยู่ในตัวอย่าง บนเฟสนิ่งแตกต่างกัน

การวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยอาศัยวิธีทางโครมาโทกราฟีให้ได้ผลดีนั้น หลักสำคัญคือจะต้องสามารถแยกสารที่ผสมรวมกันอยู่ออกจากกันให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลาที่เหมาะสม ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ (High Performance Liquid Chromatograph , HPLC) เป็นเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ที่พัฒนาขึ้นมาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้กันทั่วไป โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-5 มม. สารที่บรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-10 ไมครอน และใช้เครื่องสูบดูดสารละลายตัวชะเข้าสู่ระบบ สารละลายตัวชะนำสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ เกิดการแยกสารที่คอลัมน์ สารที่แยกแล้วผ่านเข้าสู่ดีเทกเตอร์ (detector) ตามลำดับ ควบคุมการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ แสดงผลทางจอภาพหรือเครื่องพิมพ์ เป็นกราฟความสัมพันธ์ของเวลา (แกนนอน) กับสัญญาณทางไฟฟ้า (แกนตั้ง) เรียกว่าโครมาโทแกรม ดังแสดงใน*รูปที่ 2.1* พร้อมทั้งข้อมูลจากการประมวลผลจากคอมพิวเตอร์



รูปที่ 2.1 แสดงโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี[8]

t_0 คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ตั้งแต่ระบบฉีดสารถึงเครื่องวัดโดยไม่ถูกยึดด้วยคอลัมน์

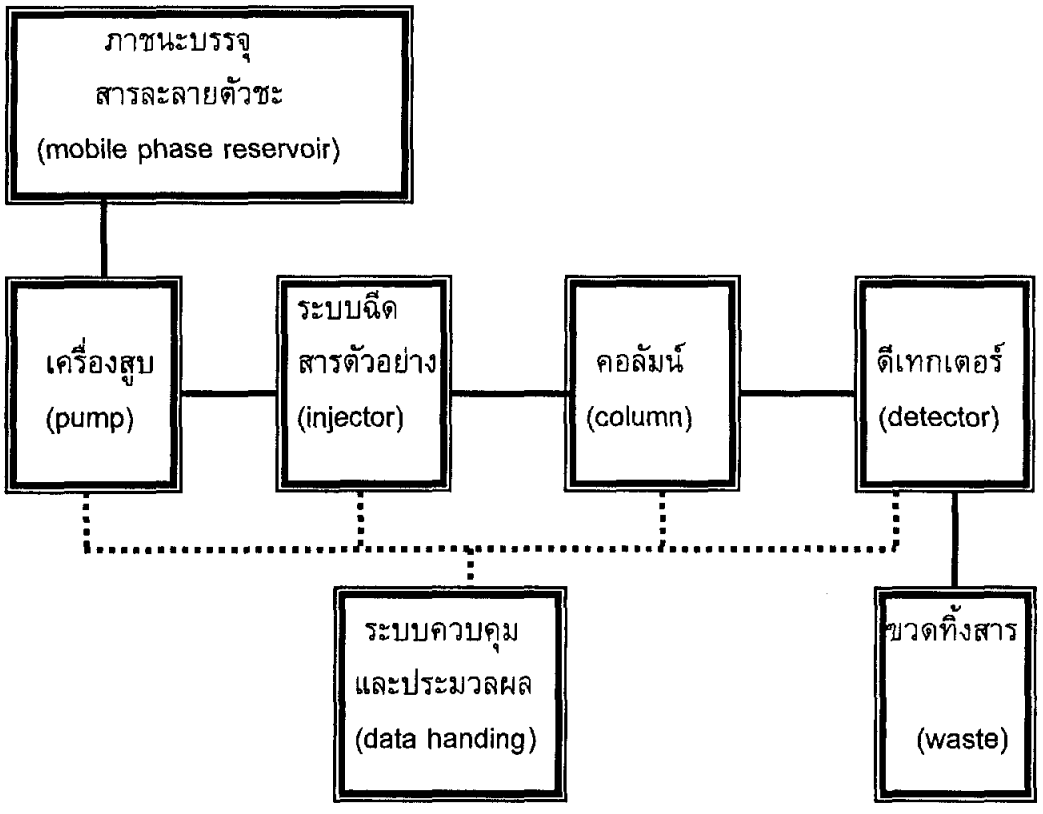
t_R คือเวลาที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ ตั้งแต่ระบบฉีดสารถึงเครื่องวัด

t'_R คือเวลาที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ ในคอลัมน์

การใช้เครื่อง HPLC สำหรับวิเคราะห์สารแต่ละชนิดต้องเลือกใช้คอลัมน์ สารละลายตัวชะ และดีเทกเตอร์ให้เหมาะสม สามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม ใช้สารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องปริมาตรต่ำระดับไมโครลิตร

2.1 องค์ประกอบของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ

เครื่องมือมีส่วนประกอบที่สำคัญดังแสดงด้วยแผนภาพ *ในรูปที่ 2.2*



รูปที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC

หลักการทำงานของเครื่อง สารตัวอย่างที่เตรียมเป็นของเหลวแล้ว นำมาฉีด (inject) เข้าเครื่อง HPLC ด้วยระบบฉีดสาร (injector) ที่เหมาะสม สารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์โดยการนำพาของสารละลายตัวชะที่ไหลผ่านระบบอยู่ตลอดเวลา สารแต่ละชนิดในตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเฟสนิ่งด้วยระยะทางแตกต่างกัน ทำให้สารผสมแยกออกจากกัน เคลื่อนที่เข้าดีเทกเตอร์ตามลำดับ รายงานผลเป็นโครมาโทแกรมดังแสดงใน*รูปที่ 2.1* ขนาดของสัญญาณแสดงด้วยความสูงหรือพื้นที่พีก ซึ่งแปรผันโดยตรงกับปริมาณสาร

2.1.1 ภาชนะบรรจุสารละลายตัวชะ มีหลายแบบ ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม ดังนี้

- ต้องใช้วัสดุที่ทนต่อสารเคมี หรือสารละลายตัวชะที่ใช้

- ขนาดเหมาะสมกับปริมาตรสารละลาย ที่จะใช้ในแต่ละครั้งตลอดการวิเคราะห์นั้น เพื่อไม่ให้ยุ่งยากในการเตรียมหรือการเติมสารละลายขณะทำการวิเคราะห์ การเตรียมสารละลายตัวชะเพิ่มแต่ละครั้งอาจทำให้สัดส่วนขององค์ประกอบผิดไปจากเดิมได้
- ควรเป็นภาชนะปากแคบ มีจุกปิดเพื่อป้องกันสารปนเปื้อนจากภายนอก ที่จุกมีรูเพื่อให้ท่อ (tube) นำสารละลายผ่านได้พอดี ปลายท่อด้านที่จุ่มอยู่ในสารละลาย จะต้องมีโลหะสำหรับกรอง (metal filter) ขนาด 20 ไมครอน เพื่อช่วยกรองสารละลายอีกครั้งก่อนเข้าเครื่องสูบ

สารเคมี น้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ใช้เตรียมสารละลายตัวชะ ต้องมีความบริสุทธิ์สูง กล่าวคือต้องใช้สารเคมี ชั้นคุณภาพรีเอเจนต์ (reagent grade) ตัวทำละลายชั้นคุณภาพโครมาโทกราฟี (chromatography grade) หรือชั้นคุณภาพรีเอเจนต์ และใช้น้ำที่กำจัดไอออน (deionized water) เมื่อเตรียมสารละลายเสร็จแล้ว ก่อนนำไปใช้จะต้องกรองผ่านเมมเบรน (membrane) ชนิดที่ทนต่อตัวทำละลาย มีรูขนาด 0.45 ไมครอน และกำจัดแก๊ส (degas) ด้วยวิธีที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในระบบ เช่นหัวเครื่องสูบ คอลัมน์ และดีเทกเตอร์ นอกจากนี้ออกซิเจนในสารละลายอาจทำปฏิกิริยากับสารในคอลัมน์เป็นสาเหตุให้คอลัมน์เสียสภาพ ในกรณีที่ใช้สารละลายตัวชะไม่หมด เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไปต้องกรองและกำจัดแก๊สซ้ำ เครื่อง HPLC บางรุ่นมีระบบกำจัดแก๊สอัตโนมัติอยู่ในเครื่อง แต่เหมาะสำหรับกำจัดแก๊สเล็กน้อยที่เกิดขึ้นในระบบขณะที่เครื่องมือทำงาน จึงควรกำจัดแก๊สก่อนนำสารละลายมาใช้งาน การกำจัดแก๊สมีหลายวิธี เช่น

- กำจัดแก๊สโดยให้แก๊สเฉื่อยเช่น ฮีเลียม ไนโตรเจน แทนที่อากาศในสารละลายตัวชะ
- ให้สารละลายตัวชะผ่านบริเวณที่ทำเป็นสุญญากาศ (vacuum)
- กำจัดแก๊สด้วยอ่างอัลทราโซนิก (ultrasonic bath)

2.1.2 เครื่องสูบ เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่ดูดสารละลายตัวชะ จากภาชนะบรรจุเขาสู่ระบบคือ ส่วนฉีดสาร คอลัมน์ ดีเทกเตอร์ และผ่านท่อทิ้งสาร ลงในขวดทิ้งสาร เครื่องสูบที่นิยมใช้คือชนิดควบคุมอัตราการไหลให้คงที่ (constant flow)

เครื่องสูบชนิด reciprocating เป็นเครื่องสูบชนิดควบคุมอัตราการไหลให้คงที่ มีลูกสูบ 2 ตัว (dual piston) ทำงานสลับกัน พัลส์ (pulse) ที่เกิดจากลูกสูบแต่ละตัวจึงหักล้างกันพอดี ทำให้สัญญาณที่ออกมาเรียบไม่มีลักษณะเป็นพัลส์

ก่อนเปิดใช้เครื่องมือจะต้องตรวจสอบและกำจัดฟองอากาศออกจากระบบให้หมด ซึ่งต้องทำก่อนต่อคอลัมน์เข้าในระบบ ฟองอากาศอาจจะอยู่ในท่อนำสารละลายและช่องว่างภายในเครื่องสูบ (pump head) การกำจัดฟองอากาศทำโดยใช้กระบอกฉีด (syringe) ขนาด 10 มล. ดูดสารละลายออกทาง draw-off valve จนหมดฟองอากาศ โดยสามารถสังเกตจากท่อนำสารละลายซึ่งเป็นพลาสติกใส หลังจากฟองอากาศออกจากท่อหมดแล้ว ใช้สารละลายตัวชะ บรรจุในกระบอกฉีด ฉีดเข้าทาง draw-off valve อีกครั้ง พร้อมทั้งเปิดเครื่องสูบให้มีอัตราการไหลเป็น 9 - 9.9 มล. /นาที ให้สังเกตสารละลายที่ออกทางปลายท่อที่จะต่อเข้าคอลัมน์ ถ้าของเหลวไหลออกเป็นสายอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ แสดงว่าไม่มีฟองอากาศในเครื่องสูบ จึงต่อคอลัมน์เข้าในระบบ

หลังจากต่อคอลัมน์เข้าในระบบแล้ว การเพิ่มอัตราการไหลของสารละลายตัวชะ จะทำให้เกิดความดัน ความดันที่เกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์ สารละลายตัวชะ และอัตราการไหล จึงควรเพิ่มอัตราการไหลช้า ๆ ครั้งละ 0.1 มล./นาที เพื่อป้องกันไม่ให้หัวคอลัมน์เสียสภาพ

2.1.3 ระบบฉีดสาร เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่นำสารละลายตัวอย่างเข้าคอลัมน์ มีหลายแบบ ดังต่อไปนี้

2.1.3.1 ซีริงก์ (syringe injector) ใช้ซีริงก์ฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง การฉีดสารวิธีนี้มีทั้งแบบผ่านเซปตัม (septum) และไม่ผ่านเซปตัม แต่ไม่นิยมใช้ เนื่องจากความเที่ยง (precision) ในการฉีดสารต่ำ ในกรณีที่ใช้เซปตัมอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเซปตัมได้

2.1.3.2 วาล์ว (sampling injector) เป็นวิธีที่นิยมใช้มาก เนื่องจากความเที่ยงในการฉีดสูง วิธีการฉีดสารทำดังนี้ หมุนชุดฉีดสารตัวอย่างให้อยู่ในตำแหน่ง load ใช้ซีริงก์ขนาดที่เหมาะสม ดูดสารตัวอย่าง ฉีดสารเข้าใน sample loop สารตัวอย่างจะบรรจุใน loop จนเต็ม ส่วนที่เหลือจะล้นออกมา เมื่อต้องการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ ให้หมุนวาล์วของตัวฉีดมาอยู่ที่ตำแหน่ง inject สารละลายตัวชะจะเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ การฉีดสารแบบนี้มี 2 วิธีคือ

1) fixed sample loop เป็นการฉีดสารเต็ม loop ใช้ sample loop ขนาดต่างๆตามความเหมาะสมตั้งแต่ 5 10 20 50 100 ไมโครลิตร ถึง 1 มล. การใช้วาล์วแบบนี้ต้องฉีดสารตัวอย่างปริมาตรมากกว่าปริมาตรของ sample loop ประมาณ 3 เท่า

2) partial sample loop หรือ variable sample loop รายละเอียดเหมือนกับแบบแรกแต่การฉีดสารใช้ปริมาตรน้อยกว่าปริมาตรของ loop สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารตัวอย่างได้โดยไม่ต้องเปลี่ยน sample loop แต่มีข้อเสียคือ ควบคุมปริมาตรสารละลายที่ฉีดยาก

2.1.3.3 การฉีดสารแบบอัตโนมัติ (automatic injector) เป็นการฉีดสารตัวอย่างแบบอัตโนมัติควบคุมการทำงานด้วยไมโครโพรเซสเซอร์ หรือคอมพิวเตอร์ เหมาะสำหรับใช้กับงานวิเคราะห์ที่มีการฉีดสารตัวอย่างเป็นจำนวนมาก และการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างใช้เวลาเท่ากัน

2.1.4 คอลัมน์ เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่แยกสารผสม วัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์เป็นเหล็กไร้สนิม (stainless steel) สารที่บรรจุภายในคอลัมน์ (packing material) แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ใช้ คอลัมน์ที่ใช้ในเทคนิค HPLC มี หลายชนิด ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน เช่น ใช้แยกสาร ใช้ป้องกันหรือยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร เป็นต้น

2.1.4.1 คอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (analytical columns) เป็นคอลัมน์ที่ทำหน้าที่แยกสารผสม มีหลายขนาดกล่าวคือ ความยาว 10-35 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1-10 มม. สารที่บรรจุภายในคอลัมน์ขนาด 3-10 ไมครอน สารที่บรรจุในคอลัมน์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับงานที่วิเคราะห์ ด้านหัวและท้ายของคอลัมน์ปิดด้วยตะแกรงที่ทำจากเหล็กไร้สนิม เพื่อป้องกันไม่ให้สารภายในคอลัมน์หลุดออกมา และเพื่อป้องกันไม่ให้อนุภาคเล็กๆที่อาจปนเปื้อนมาเข้าไปในคอลัมน์ ปลายด้านนอกสวมด้วยแป้นเกลียว (nut) เพื่อต่อเข้ากับท่อของระบบ HPLC คอลัมน์ที่ดีควรมีอนุภาคที่บรรจุภายในคอลัมน์ขนาดเท่าๆกัน เรียงกันอย่างสม่ำเสมอ (uniform) และทนต่อความดันตามที่กำหนด

ก่อนใช้คอลัมน์ควรศึกษารายละเอียดในคู่มือเกี่ยวกับ วิธีเก็บคอลัมน์ ความดันสูงสุดที่คอลัมน์รับได้ ชนิดและขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์ จำนวนเพลต และวิธีทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ ก่อนต่อคอลัมน์เข้าในระบบให้สังเกตลูกศรแสดงทิศทางการไหลของของเหลวที่ด้านข้างของคอลัมน์ ต่อให้ถูกทิศทางและระวังอย่างให้คอลัมน์ตกหรือกระแทกพื้น

2.1.4.2 การ์ดคอลัมน์ เป็นคอลัมน์ที่มีขนาดสั้นต่ออยู่ด้านหน้าของคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร ภายในบรรจุด้วยอนุภาคชนิดเดียวกันกับสารที่บรรจุในคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร แต่มีขนาดของอนุภาคใหญ่กว่าเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความดันมากเกินไป การ์ดคอลัมน์ทำหน้าที่ช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์แยกสารโดยสามารถจับอนุภาคเล็กๆ และสารที่ยึดติด (retain) ในคอลัมน์ได้ดี นอกจากนี้ในเทคนิค Liquid-Liquid Chromatography (LLC) การ์ดคอลัมน์ยังทำให้สารละลายตัวชะอิ่มตัวด้วยสารที่เป็นเฟสนิ่ง เมื่อสารละลายตัวชะผ่านคอลัมน์ที่ใช้แยกสารทำให้เฟสนิ่งในคอลัมน์ไม่ละลายหลุดออกมาอีก

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ยังมีคอลัมน์อีกหลายชนิดที่ใช้ในเทคนิค HPLC แต่เป็นคอลัมน์เฉพาะและใช้ในการวิเคราะห์สารบางชนิดเท่านั้น เช่น pre-column post-column และ suppressor column

2.1.5 ดีเทกเตอร์ ในเทคนิค HPLC แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.1.5.1 Bulk property หรือ general detectors วัดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพของสารละลายทั้งหมด คือสารละลายตัวชะกับสารที่วิเคราะห์ เช่น การวัดค่าดรรชนีหักเหของสารละลาย (refractive index) และ คอนดักติวิตี (conductivity)

2.1.5.2 Solute property หรือ selective detector วัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสมบัติของสารที่วิเคราะห์เพียงอย่างเดียว เช่น ดีเทกเตอร์ชนิดอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล ฟลูออเรสเซนซ์ และอิเล็กโทรเคมิคัล

ดีเทกเตอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HPLC มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีหลักการแตกต่างกันจึงสามารถวิเคราะห์สารที่คุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างกัน

- ดีเทกเตอร์ชนิดอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล วัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วงยูวีและ วิสิเบิล วิเคราะห์ได้ทั้งสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ โดยที่สารละลายตัวชะไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่วิเคราะห์ จึงถูกนำมาใช้งานอย่างกว้างขวาง ยกเว้นบางกรณีที่ต้องการวิเคราะห์สารที่ไม่ดูดกลืนแสง เช่น แคทไอออนและแอนไอออน จะใช้สารละลายตัวชะที่ดูดกลืนแสงได้
- ดีเทกเตอร์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ วัดการวาวแสงของสารเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี เครื่องวัดชนิดนี้ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงจึงใช้กับสารบางชนิดเท่านั้น เช่น วิตามิน สารชีวเคมี (biochemical species) ยา (pharmaceuticals) เป็นต้น
- ดีเทกเตอร์ชนิดรีแฟรกโทมิเตอร์ วัดค่าดรรชนีหักเห ของสารละลาย ใช้ในการศึกษาสารประเภทน้ำตาล
- ดีเทกเตอร์ชนิดอิเล็กโทรเคมิคัล ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ปริมาณน้อยในน้ำ ของเหลว การตรวจวัดด้วยเครื่องวัดชนิดนี้มีหลายวิธี เช่น แอมเพอโรเมตรี โวลแทมมิตรี และคูลอมเมตรี

2.1.6 เครื่องควบคุมและประมวลผล เป็นเครื่องมือส่วนที่ควบคุมการทำงานของเครื่องมือส่วนอื่นๆ รวมทั้งการประมวลผลการวิเคราะห์ โดยรายงานผลเป็นโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และข้อมูลที่สนใจ ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ใช้ ในโครมาโทแกรมหนึ่งจะประกอบด้วยสัญญาณที่ได้จากการวัดสารละลายตัวชะ ซึ่งเป็นเส้นตรงสม่ำเสมอเรียกว่า baseline กับสัญญาณที่ได้จากการวัดสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างซึ่งมีลักษณะเป็นยอดแหลม เรียกว่า พีก (peak) ลักษณะของพีกอาจจะสูงหรือต่ำกว่า baseline ขึ้นอยู่กับผลต่างของสัญญาณจากการวัดสารละลายตัวชะ และสารที่วิเคราะห์ในสารละลายตัวอย่าง สารแต่ละชนิดให้พีกที่เวลาต่างกัน เวลาจากจุดเริ่มฉีดสารถึงยอดพีก เรียกว่า รีเทนชันไทม์ (retention time, t_R) ความสูงของพีก สัมพันธ์กับปริมาณของสารในสารละลายตัวอย่าง

2.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

เครื่อง HPLC ใช้ในการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารได้ทั้งสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้อง เตรียมให้เป็นของเหลว การใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สาร จำเป็นต้องเลือกคอลัมน์ องค์ประกอบของสารละลายตัวชะและอัตราการไหลของสารละลายตัวชะที่เหมาะสม เมื่อได้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์สารแล้ว ต้อง

ทดสอบความเหมาะสมของระบบก่อนนำไปใช้ในงาน ความเหมาะสมของระบบที่ทดสอบประกอบด้วย จำนวนเพลตตามทฤษฎี (number of theoretical plates ,n) ของคอลัมน์ ความสมมาตรของพีก (peak symmetry) ค่าการแยก (resolution,R_S) และความสามารถในการวัดซ้ำ(repeatability) ของพื้นที่พีก ความสูงของพีก และรีเทนชันไทม์ ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลงตามอายุการใช้งาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ยังคงมีความน่าเชื่อถือ

2.2.1 การประสิทธิภาพของคอลัมน์ แสดงด้วยค่าจำนวนเพลตตามทฤษฎี หาได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ใช้ทดสอบคอลัมน์ที่แนะนำในคู่มือ หรือตามที่ห้องปฏิบัติการเลือก คำนวณค่าเพลตจากโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานดังนี้

$$n = 16\,(t_R/w)^2$$

หรือ

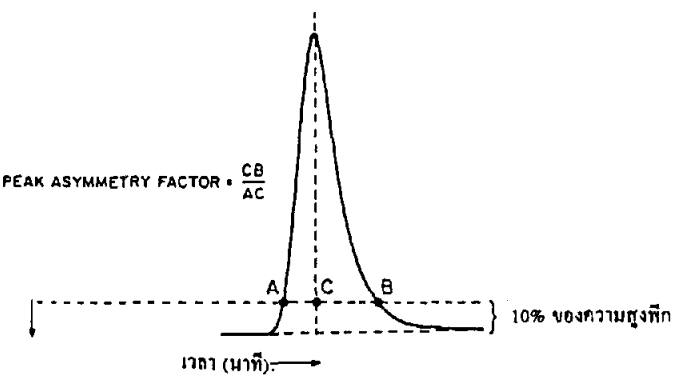
$$n = 5.54\,(t_R/w_{1/2})^2$$

t_R = รีเทนชันไทม์

w = ความกว้างของพีกที่ฐาน

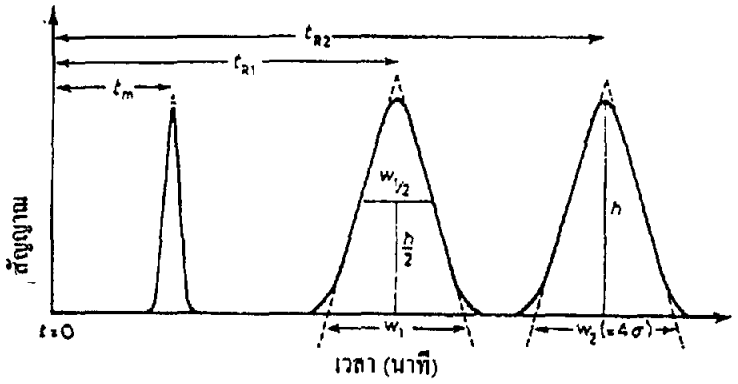
$w_{1/2}$ = ความกว้างของพีกที่ครึ่งของความสูง

2.2.2 ความสมมาตรของพีก หาได้จากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน วิธีการวัดค่าและการคำนวณแสดง*ในรูปที่ 2.3*



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของพีก และการคำนวณแฟกเตอร์ความไม่สมมาตรของพีก[15]

2.2.3 ค่าการแยก มีความสำคัญมากในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสารหลายชนิดผสมรวมกัน สารแต่ละชนิดควรแยกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ในกรณีการหาปริมาณ พีกของสาร 2 พีก ที่ติดกันต้องมีค่าการแยกมากกว่า 1.5 ค่าการแยกหาได้จากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ผสมกัน วิธีการวัดค่าและการคำนวณแสดง*ในรูปที่ 2.4*



รูปที่ 2.4 แสดงโครมาโทแกรมและรายละเอียดที่ใช้คำนวณหาค่าการแยกของพีก[8]

R_s = $2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2)$

R_s = ค่าการแยก

t_{R1} , t_{R2} = รีเทนชันไทม์ของสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

w_1 , w_2 = ความกว้างที่ฐานพีกของสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

2.2.4 ความสามารถในการวัดซ้ำ เป็นค่าที่แสดงความเสถียร (stable) ของระบบ หาได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน ประมาณ 3-5 ครั้ง คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ,RSD) ของพื้นที่พีก ความสูงของพีก และ รีเทนชันไทม์

2.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC ส่วนมากใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่าง แต่การวิเคราะห์หาปริมาณนั้นต้องยืนยันชนิดของสารในตัวอย่างก่อนเพื่อให้เตรียมสารละลายมาตรฐานได้ถูกต้อง โดยปกติเทคนิค HPLC ไม่นิยมใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยตรง สารที่นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ต้องทราบก่อนแล้วว่าเป็นสารประเภทใด ข้อมูลจาก HPLC จึงเป็นเพียงการยืนยันว่าเป็นพีกของสารอะไร การยืนยันพีกสารวิธีที่สะดวกและรวดเร็วมี 2 วิธีคือ

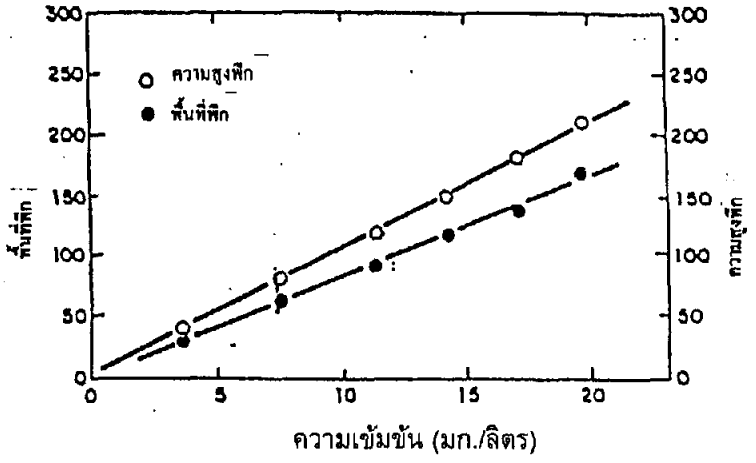
2.3.1 เปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ของสารในตัวอย่างกับสารมาตรฐาน สารชนิดเดียวกันวิเคราะห์ในสภาวะการทดสอบเดียวกันจะให้ค่ารีเทนชันไทม์เท่ากัน

2.3.2 เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายตัวอย่างเรียกว่าการ spike ถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันจะทำให้พื้นที่พีกหรือความสูงเพิ่มขึ้น

2.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่างนิยมใช้วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐาน การเตรียมกราฟมาตรฐาน มี 2 วิธีดังนี้

2.4.1 external standard เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเพราะให้ความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้อง การเตรียมกราฟมาตรฐานใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น

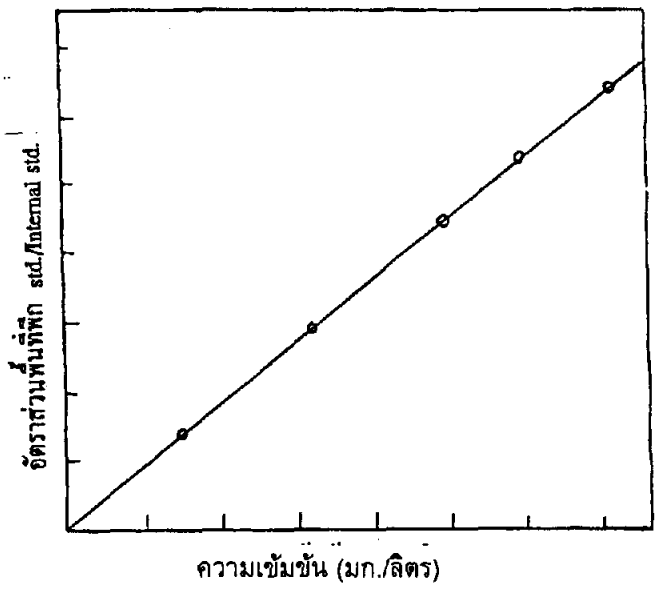
แตกต่างกัน 3 - 5 ค่า นำมาวิเคราะห์แล้วเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับพื้นที่พีก หรือความสูงของพีก (แกนตั้ง) ได้กราฟเส้นตรง ดังแสดง *ในรูปที่ 2.5*



รูปที่ 2.5 แสดงกราฟมาตรฐานของ external standard[1]

2.4.2 internal standard เตรียมกราฟมาตรฐานต้องเติมสารมาตรฐานชนิดที่ไม่มีในตัวอย่างเรียกว่า internal standard ลงในสารละลายมาตรฐานทุกขวด และในสารละลายตัวอย่างปริมาณเท่ากัน นำมาวิเคราะห์แล้วเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีกของสารมาตรฐานและพื้นที่พีกของ internal standard กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ดังแสดง *ในรูปที่ 2.6* การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ให้ความแม่นยำ และความเที่ยงสูง แต่มีความยุ่งยากในการเลือกสาร internal standard สาร internal standard ควรมีคุณสมบัติดังนี้

- เป็นสารที่ไม่มีในตัวอย่าง
- เป็นสารในกลุ่มเดียวกันและมีคุณสมบัติคล้ายกันกับสารตัวอย่าง
- ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารใด ๆ ในคอลัมน์ และสารละลายตัวชะ
- ให้พีกอยู่ระหว่างพีกของสารตัวอย่าง และแยกจากพีกของสารตัวอย่างได้สมบูรณ์



รูปที่ 2.6 แสดงกราฟมาตรฐานของInternal standard

2.5 ข้อควรปฏิบัติและการแก้ไขปัญหาเบื้องต้นในการใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ

การใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟในการวิเคราะห์สาร ผู้ใช้เครื่องมือจำเป็นต้องศึกษาคู่มือการใช้เครื่องอย่างละเอียด เพื่อให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างถูกวิธี และใช้เครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ก่อนทำการวิเคราะห์สาร ควรตรวจสอบเครื่องมืออย่างละเอียด ดังนี้

2.5.1 ตรวจสอบการรั่วของสารละลายตัวชะในระบบ ได้แก่ บริเวณรอยต่อของท่อนำสารละลายทุกจุด เครื่องสูบ คอลัมน์ และระบบฉีดสาร หากมีของเหลวไหลออกมาต้องแก้ไขทันที

2.5.2 ตรวจสายสัญญาณ และสายเคเบิลทุกสาย ต้องต่อให้แน่นและถูกต้อง

2.5.3 สารละลายตัวชะ ต้องกรองและไล่อากาศออกก่อนนำมาใช้

2.5.4 ตรวจสอบคอลัมน์ สารละลายตัวชะ ให้ถูกต้อง เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

2.5.5 เลือกดีเทกเตอร์ที่เหมาะสมกับสารตัวอย่าง

2.5.6 เปิด power on ของเครื่องมือทุกส่วนที่ต้องใช้งาน

2.5.7 ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายที่สภาพมีขั้ว (polarity) อยู่ระหว่างสารละลายตัวชะกับสารละลายที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ แล้วตามด้วยสารละลายตัวชะ จนกระทั่งคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล สังเกตจาก baseline เรียบ ไม่มีสัญญาณรบกวน วิธีการดังกล่าวเรียกว่าการปรับสภาวะ (condition) ของคอลัมน์ ให้เหมาะสม

2.5.8 หลังจากใช้งาน ควรเก็บคอลัมน์ตามวิธีที่แนะนำในคู่มือ ก่อนเก็บต้องล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายที่มีสภาพขั้วอยู่ระหว่างสารละลายตัวชะกับสารละลายที่ใช้สำหรับเก็บคอลัมน์ แล้วตามด้วยสารละลายที่ใช้สำหรับเก็บคอลัมน์

นอกจากนี้ผู้ใช้เครื่องมือควรสามารถแก้ปัญหาเบื้องต้น ที่อาจเกิดขึ้นขณะทำการวิเคราะห์ได้ ปัญหาที่มักเกิดขึ้นเสมอ สาเหตุของปัญหา และวิธีแก้ไข แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดง ปัญหา สาเหตุ และวิธีแก้ไข

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ไข
1. สารละลายตัวชะไม่ไหล	1.1 มีฟองอากาศในเครื่องสูบ	1.1 กำจัดฟองอากาศในเครื่องสูบโดยปิดวาล์วไม่ให้สารละลายเข้าในคอลัมน์ ฉีดสารละลายตัวชะเข้าทาง drawn-off valve พร้อมกับเปิดอัตราการไหลของสารละลาย 9.9 มล./นาที จนกระทั่งมีของเหลวไหลออกมา
	1.2 ของเหลวรั่วทางรอยต่อ	1.2 ตรวจหาจุดที่ของเหลวรั่ว แล้วต่อท่อจุดที่รั่วให้แน่น
2.ความดันสูงผิดปกติ	2.1 อัตราการไหลของสารละลายตัวชะมากเกินไป	2.1ปรับอัตราการไหลให้เหมาะสมกับคอลัมน์ที่ใช้
	2.2 อุดตันในบางส่วนของระบบ	2.2 ล้างส่วนที่อุดตัน ตามวิธีที่แนะนำในคู่มือ
	2.3 อุดตันในคอลัมน์	2.3 ล้างคอลัมน์
3. baseline ไม่คงที่	3.1 คอลัมน์ยังไม่ถึงสมดุล	3.1 ผ่านสารละลายตัวชะ เข้าในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมและใช้ เวลาให้มากขึ้น
	3.2 มีฟองอากาศในดีเทกเตอร์	3.2 ทำความสะอาดเซลล์ กำจัดฟองอากาศในเซลล์
	3.3 เครื่องสูบทำงานผิดปกติ	3.3 แก้ปัญหาของเครื่องสูบ ตามวิธีที่แนะนำในคู่มือเครื่องสูบ

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ไข
4. มีสัญญาณรบกวนที่ baseline	4.1 มีฟองอากาศในระบบ	4.1 กำจัดฟองอากาศออกจากระบบให้หมดและใช้สารละลายตัวชะที่กำจัดแก๊สแล้ว เท่านั้น
	4.2สารละลายตัวชะมีสารปนเปื้อน (contaminate)	4.2 เตรียมสารละลายตัวชะ โดยใช้สารเคมีชั้นคุณภาพรีเอเจนต์หรือโครมาโทกราฟี และใช้น้ำที่กำจัดไอออน
	4.3 เครื่องสูบทำงานผิดปกติ	4.3 แก้ปัญหาของเครื่องสูบตามวิธี ที่แนะนำในคู่มือเครื่องสูบ
5. ไม่มีพีก	5.1 สายสัญญาณหรือสายเคเบิลมีปัญหา เช่น ไม่ได้ต่อ ต่อไม่แน่น หรือต่อผิด	5.1 ตรวจสายสัญญาณจากดีเทกเตอร์ไปยังเครื่องบันทึกผล และแก้ไขให้ถูกต้อง โดยดูรายละเอียดจากคู่มือ ดีเทกเตอร์
	5.2 ตั้งพารามิเตอร์ไม่เหมาะสม	5.2 เปลี่ยนพารามิเตอร์บางค่าให้เหมาะสม
	5.3 รีเทนชันไทม์ นานเกินไป	5.3 เพิ่มเวลาการบันทึกผลให้นานขึ้นเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารตัวอย่างค้างอยู่ในคอลัมน์ แล้วจึงปรับสภาวะการวิเคราะห์ให้เหมาะสมเพื่อให้ รีเทนชันไทม์ลดลง

ที่กล่าวมาแล้วเป็นเพียงตัวอย่างของปัญหาที่มักเกิดขึ้นเสมอ ยังมีปัญหาอื่น ๆ อีกมากมายที่อาจเกิดขึ้นขณะทำการวิเคราะห์สาร เช่น รีเทนชันไทม์ ไม่คงที่ พื้นที่พีกไม่คงที่ พีกไม่แยก (loss of resolution) พีกแตก (split peaks) baseline เลื่อนขึ้นหรือลงตลอดเวลา (baseline drift) และ พีกกว้าง (broad peaks) เป็นต้น ปัญหาเหล่านี้สามารถศึกษาและหาวิธีแก้ไขได้จากตำราและเอกสารอ้างอิง

การทดลองที่ 2.1

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียในเครื่องสำอาง

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่องHPLCและให้รู้ถึงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นรวมแนวทางแก้ไข ซึ่งจะทำให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างถูกต้อง

2. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์สารโดยใช้เครื่อง HPLC

3. เพื่อศึกษาวิธีตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

4. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณสารกันเสียในโลชัน

การทดลอง

methylparaben ethylparaben และ propylparaben ใช้เป็นสารกันเสียใน ยา อาหาร และเครื่องสำอาง methylparaben เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ส่วน propylparaben เป็นสารที่ใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และฆ่าเชื้อรา (batericides and fungicides)

ทดลองหาสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ สารกันเสียในตัวอย่างโลชัน ได้แก่ methylparaben ,propylparaben และ ethylparaben หลังจากได้สภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ได้แก่ จำนวนเพลตของคอลัมน์ ความสมมาตรของพีก ค่าการแยก และความสามารถในการวัดซ้ำ แล้วหาปริมาณสารในตัวอย่างด้วยวิธี external standard และ internal standard

เครื่องมือ

เครื่อง HPLC ประกอบด้วย

เครื่องสูบ
เครื่องกำจัดแก๊สแบบใช้ระบบสุญญากาศ
ดีเทกเตอร์ ชนิดวัดการดูดกลืนแสงยูวี
คอมพิวเตอร์ และเครื่องพิมพ์ผล

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการแยก

คอลัมน์ ชนิด μ Bondapak C_{18} เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 30 ซม.
สารละลายตัวชะเมทานอละน้ำ 60:40 โดยปริมาตร
วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
อัตราการไหลของสารละลายตัวชะ 1.0 มล./นาที
ปริมาตรสารที่ฉีด 20 ไมโครลิตร

อุปกรณ์ / เครื่องแก้ว

เครื่องกรองสารละลายตัวชะ

ชุดกรองสารละลายตัวอย่าง

ไมโครซีริงก์ ขนาด 100 ไมโครลิตร

ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 50 และ 10 มล.

ปิเปตชนิดวัดปริมาตร ขนาด 1 และ 5 มล.

ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร

เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1 มก.

เครื่องกำจัดแก๊สแบบ อัลทราโซนิก

เมมเบรนสำหรับกรองสารอินทรีย์

ขวดขนาดเล็ก (vials)

สารเคมีและวิธีเตรียมสารละลาย

สารเคมี ชั้นคุณภาพรีเอเจนต์ ตัวทำละลายชั้นคุณภาพโครมาโกราฟี

1. methylparaben (methyl p-hydroxybenzoate) ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ชั่ง methylparaben 50 มก. ละลายใน methanol จนของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร
2. ethylparaben (ethyl p-hydroxybenzoate) ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ชั่ง ethylparaben 50 มก. ละลายใน methanol จนของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร
3. propylparaben (propyl p-hydroxybenzoate) ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ชั่ง propylparaben 50 มก. ละลายใน methanol จนของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร
4. methylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปิเปตสารละลาย methylparaben ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร
5. ethylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปิเปตสาร ethylparaben ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร
6. propylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปิเปตสารละลาย propylparaben ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร
7. เตรียมสารละลายผสมของ methylparaben ethylparaben และ propylparaben ความเข้มข้นเท่ากัน 3 ระดับความเข้มข้น 1 5 และ 10 มก./ลิตร โดยปิเปตสารละลายจากข้อ 4-6 มาชนิดละ 0.1 0.5 และ 1 มล. ใส่รวมกันลงในขวดปริมาตรขนาด

10 มล. จำนวน 3 ใบตามลำดับ เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร กรองสารละลายผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน บันทึกข้อมูลในตารางที่ 2.1.4

8. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ methylparaben กับ propylparaben จำนวน 3 ขวดแต่ละขวดมีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเท่ากันชนิดละ 1 5 และ 10 มก./ลิตร ตามลำดับ (วิธีเตรียมตามข้อ 7) เติม ethylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 0.5 มล. ทุกขวด เพื่อเป็น internal standard แต่ละขวดมี ethylparaben ความเข้มข้น 5 มก./ลิตร บันทึกข้อมูลในตารางที่ 2.1.4
9. เมทานอล
10. น้ำที่กำจัดไอออน

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างโลชัน

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โดยวิธี external standard ปิเปตโลชันปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มล. เติม methanol จนถึงขีดปริมาตร กรองสารละลายผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โดยวิธี internal standard ใช้ ethylparaben ความเข้มข้น 5 มก./ลิตร เป็น internal standard ปิเปตโลชันตัวอย่างปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มล. เติม ethylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 0.5 มล. เป็น internal standard เติมสารละลายตัวชะ จนถึงขีดปริมาตร

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายตัวชะ

กรอง methanol และ น้ำกลั่นหรือน้ำที่กำจัดไอออน ผ่านเมมเบรนขนาดของรู 0.45 ไมครอน ใส่ในขวดสำหรับบรรจุสารละลายตัวชะขนาด 1 ลิตร นำไปไล่อากาศ ด้วยอ่างอัลทราโซนิก นาน 3-5 นาที (สังเกตจากสารละลายอุ่นขึ้น)

2. เตรียมเครื่องมือ HPLC
   2.1 เปิดเครื่องมือทุกส่วน ได้แก่ เครื่องสูบ เครื่องกำจัดแก๊ส (ถ้ามี) ดีเทกเตอร์เครื่องพิมพ์ผล และเครื่องคอมพิวเตอร์ตามลำดับ
   2.2 กำจัดฟองอากาศออกจากระบบโดยใช้ ซีริงก์ ดูวิธีจากคู่มือการใช้เครื่องมือ
   2.3 ต่อคอลัมน์เข้าในระบบ ให้ปลายลูกศรชี้ตามทิศทางการไหลของสารละลาย
   2.4 ล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย ที่สภาพมีขั้วอยู่ระหว่างสารละลายตัวชะกับของเหลวที่อยู่ในคอลัมน์ (intermediate polarity) แล้วจึงผ่านสารละลายตัวชะ เข้าสู่คอลัมน์ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่า แอบซอร์แบนซ์ (absorbance)แสดงเป็นค่าคงที่ หรือ baseline คงที่
3. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ
   3.1 ฉีดสารละลายตัวอย่าง จากข้อ 1 เข้าคอลัมน์ บันทึกโครมาโทแกรม

3.2 แบ่งสารละลายจากข้อ 1 มาประมาณ 1 มล. เติมสารละลาย methylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ ลิตร ประมาณ 1หยด ฉีดสารละลายบันทึกโครมาโทแกรม

3.3 เติมสารละลาย ethylparaben ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ประมาณ 1 หยด ลงในสารละลายในข้อ 3.2 ฉีดสารละลาย บันทึกโครมาโทแกรม **หรือ** ทำซ้ำข้อ 3.2 แต่เติมสารละลาย ethylparaben แทน สารละลาย methylparaben

3.4 เปรียบเทียบโครมาโทแกรมข้อ 3.1-3.3 บันทึกผลลงในตารางที่2.1.1

4. ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ

4.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม methylparaben ethylparaben และ propylparaben ความเข้มข้นชนิดละ 10 มก./ลิตร ซ้ำไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง บันทึกโครมาโทแกรม

4.2 คำนวณหา จำนวนเพลต ความสมมาตรของพีก ค่าการแยก และความสามารถในการวัดซ้ำจาก พื้นที่พีกหรือความสูงของพีก และรีเทนชันไทม์ บันทึกผลลงในตารางที่ 2.1.2 และ 2.1. 3

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี external standard

5.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมmethylparaben ethylparaben และ propylparaben ความเข้มข้นชนิดละ 1 , 5 , และ 10 มก./ลิตร บันทึกโครมาโทแกรม

5.2 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ความเข้มข้น (แกนนอน) กับพื้นที่พีก (แกนตั้ง)

5.3 ฉีดสารละลายตัวอย่าง จากข้อ 1 บันทึกโครมาโทแกรม

5.4 หาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่าง โดยใช้พื้นที่พีก จากโครมาโทแกรมข้อ 5.3 หาความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานจากข้อ 5.2 บันทึกผลในตารางที่ 2.1.5

6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี internal standard (ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มี ethylparaben)

6.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของ methylparaben และ propylparaben ความเข้มข้นชนิดละ 1 5 และ 10 มก./ลิตร ที่มี ethylparaben ความเข้มข้น 5 มก./ลิตร เป็น internal standard บันทึกโครมาโทแกรม

6.2 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับอัตราส่วนพื้นที่พีกของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่พีก ethylparaben

6.3 วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่มี ethylparaben เป็น internal standard (จากข้อ 2) หาปริมาณโดย เทียบอัตราส่วนพื้นที่พีก ของสารที่วิเคราะห์กับพื้นที่พีก ethylparaben จากกราฟมาตรฐานในข้อ 6.2 บันทึกผลในตารางที่ 2.1.5

7. สามารถใช้โปรแกรมในเครื่องคอมพิวเตอร์ประมวลผล เขียนกราฟมาตรฐาน และคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง

8. ล้างและเก็บคอลัมน์ในเมทานอล ถ้าไม่ได้ใช้งานอย่างต่อเนื่องควรถอดคอลัมน์ออกจากระบบ ปิดจุกหัวท้ายให้แน่นแล้วเก็บในกล่อง

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 2.1.1 ชนิดและรีเทนชันไทม์ของสาร

สาร	รีเทนชันไทม์ (นาที)
methylparaben	
ethylparaben	
propylparaben	

ตารางที่ 2.1.2 ความสามารถในการวัดซ้ำ

สาร	%RSD		
	ความสูงพีก	พื้นที่พีก	รีเทนชันไทม์ (นาที)
methylparaben			
ethylparaben			
propylparaben			

ตารางที่ 2.1.3 ผลการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ

สาร	รีเทนชันไทม์ (นาที)	เพลต	ค่าการแยก	ค่าความสมมาตร
methylparaben				
ethylparaben				
propylparaben				

ตารางที่ 2.1.4 ข้อมูลปริมาตรและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน

สาร	ระดับความเข้มข้น	external standard		internal standard	
		ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)	ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)
methylparaben	1				
	2				
	3				
ethylparaben	1				
	2				
	3				
propylparaben	1				
	2				
	3				

ตารางที่ 2.1.5 สรุปผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สาร	ปริมาณ (%)	
	external standard	internal standard
methylparaben		
ethylparaben		
propylparaben		

การทดลองที่ 2.2
การวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนโดยใช้เครื่อง HPLC

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างโดยใช้เครื่อง HPLC
2. เพื่อศึกษาวิธีตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ
3. เพื่อหาปริมาณกาเฟอีนในตัวอย่าง

การทดลอง

กาเฟอีน เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ มีสูตรโมเลกุล $C_8H_{10}O_2N_4$ มีชื่อทางเคมี คือ 1,3,7-trimethylxanthine พบในธรรมชาติ ในใบชา เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ ผลโคล่า ฯลฯ และสามารถสังเคราะห์ในเชิงอุตสาหกรรมได้ โดยใช้ปฏิกิริยาเมธิเลชัน (methylation) ของสารทีโอโบรมีน (theobromine) กาเฟอีนละลายได้ดีมากในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเบนซีนและอีเทอร์ มีจุดหลอมเหลว 234-235 °ซ สามารถระเหิดได้ที่อุณหภูมิ 175 °ซ กาเฟอีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหัวใจ ผ่อนคลายกล้ามเนื้อ ทางการแพทย์นำมาใช้เป็นยาระงับปวด แก้พิษแอลกอฮอล์ แก้พิษยานอนหลับ เป็นต้น ผลเสียของกาเฟอีน คือ ถ้ารับเข้าในร่างกายมากเกินไป (200-500 มก.ต่อวัน)ทำให้ คลื่นไส้ ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ เคร่งเครียด และมีอาการมือสั่น คนปกติรับกาเฟอีนไม่ควรเกิน 200 มก.ต่อวัน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ควบคุมปริมาณกาเฟอีน ในเครื่องดื่ม ให้มีกาเฟอีนได้ไม่เกิน 50 มก.ต่อหน่วยบรรจุทุกขนาด

หาปริมาณกาเฟอีนในชา กาแฟ และน้ำอัดลม เตรียมตัวอย่างที่เป็นของแข็งโดยละลายด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งละลายหมด เติมสารละลาย potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate และสารละลาย zinc sulfate heptahydrate เพื่อตกตะกอนสารเจือปน กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 และกรองแยกอนุภาคเล็กๆด้วย เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน หาสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสม และตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ โดย หาจำนวนเพลต ค่าการแยกของพีกที่ติดกัน ความสมมาตรของพีก และความสามารถในการวัดซ้ำ

เครื่องมือ

เครื่อง HPLC ประกอบด้วย

เครื่องสูบ
เครื่องกำจัดแก๊สแบบใช้ระบบสุญญากาศ
ดีเทกเตอร์ชนิดวัดการดูดกลืนแสงช่วงยูวี
คอมพิวเตอร์และเครื่องพิมพ์ผล

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการแยก

คอลัมน์ ชนิด μ Bondapak C_{18} เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 30 ซม.

สารละลายตัวชะ เมทานอล : กรดอาซีติก1 เปอร์เซ็นต์ 30:70 โดยปริมาตร

วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อัตราการไหลของสารละลายตัวชะ 1.0 มล./นาที

ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร

อุปกรณ์ / เครื่องแก้ว

อ่างน้ำร้อน (water bath)

กระดาษกรองเบอร์ Whatman No. 1

เครื่องแก้วอื่นๆ เหมือนกับการทดลองที่ 2.1

สารเคมี และการเตรียมสารละลาย

ใช้สารเคมีชั้นคุณภาพรีเอเจนต์ หรือ โครมาโทกราฟี

1. สารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ชั่งกาเฟอีน 50 มก. ละลายในน้ำกลั่นที่ร้อนจนกระทั่งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. ทำให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
2. สารละลายมาตรฐาน ทีโอโบรมีน (theobromine) ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ชั่งทีโอโบรมีน 50 มก. ละลายในน้ำกลั่นที่ร้อนจนกระทั่งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. ทำให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
3. สารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปิเปตสารละลายกาเฟอีนความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 5 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
4. สารละลายมาตรฐานทีโอโบรมีน ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปิเปตสารละลายทีโอโบรมีน ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 5 มล. ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
5. สารละลายมาตรฐานผสมของกาเฟอีนกับทีโอโบรมีนความเข้มข้นชนิดละ100 มก./ลิตร ปิเปตสารละลายกาเฟอีนกับทีโอโบรมีนจากข้อ 1 และ 2 ชนิดละ 5 มล. ใส่รวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
6. เตรียมสารละลายผสมของกาเฟอีนกับทีโอโบรมีน ระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 5 10 20 40 และ 50 มก./ลิตร โดยปิเปตสารละลายจากข้อ 5 มาปริมาตร 0.5 1 2 4 และ 5 มล. ตามลำดับ ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จำนวน 5 ขวด เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร บันทึกข้อมูลในตารางที่ 2.2.4
7. เตรียมสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนความเข้มข้นต่างๆคือ 5 10 20 40 และ 50 มก./ลิตร โดยปิเปตสารละลายจากข้อ 3 มาปริมาตร 0.5 1 2 4 และ 5 มล. ตามลำดับ ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จำนวน 5 ขวด เติมสารละลายมาตร

ฐานทีโอโบรมีนจากข้อ 4. ปริมาตร 2 มล. เป็น internal standard ลงในสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนทุกขวด เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร บันทึกข้อมูลในตารางที่ 2.2.4

8. เตรียมสารละลาย A ชั่ง potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate หนัก 3.0กรัม ละลายในน้ำกลั่น ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมจนน้ำกลั่นถึงขีดปริมาตร
9. เตรียมสารละลาย B ชั่ง zinc sulfate heptahydrate หนัก 7.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมจนน้ำกลั่นถึงขีดปริมาตร
10. กรดอาซีติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ใช้ปิเปต กรดอาซีติกความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 5 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 500 มล. ที่มีน้ำที่กำจัดไอออนประมาณ 300 มล. เติมน้ำจนถึงขีดปริมาตร
11. เมทานอล
12. น้ำที่กำจัดไอออน หรือ น้ำกลั่น

ตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ กาแฟผงละลายทันที กาแฟผสมพร้อมดื่ม น้ำอัดลม / เครื่องดื่มชนิดขวด ชาผงละลายทันที ชาผสมพร้อมดื่ม การเตรียมตัวอย่างแตกต่างกันดังนี้

1. กาแฟ ชั่งกาแฟผงละลายทันที อย่างละเอียดประมาณ 0.1 กรัม ละลายในน้ำร้อนประมาณ 40 มล. จนละลายหมด เติมสารละลาย A และ B ชนิดละ 2 มล. ตั้งบนอ่างน้ำร้อน นาน 10 นาที ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน สำหรับกาแฟผสมสำเร็จรูป ใช้น้ำหนักตัวอย่าง 0.2 กรัม
2. น้ำอัดลม ตวงน้ำอัดลมทั้งขวดให้ได้ปริมาตรที่แน่นอน ปิเปต ประมาณ 10 มล. ไล่อากาศโดยใช้อ่างอัลทราโซนิก นาน 3-5 นาที เติมสารละลาย A และ B ชนิดละ 2 มล. ตั้งบน อ่างน้ำร้อน นาน 10 นาที ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มล. ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน
3. ชาผงสำเร็จรูป
   3.1 นำตัวอย่างชา 1 ซอง มาแช่ในน้ำร้อนประมาณ 40 มล. นานประมาณ 15 นาที ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำร้อนลงในตัวอย่างครั้งละ 15 มล. จำนวน 3 ครั้ง ถ่ายน้ำลงไปรวมกันในขวดปริมาตรใบเดิม ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
   3.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 3.1 ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่บีกเกอร์ขนาด 50-100 มล. เติมสารละลาย A และ B ชนิดละ 2 มล. ตั้งบน อ่างน้ำร้อน นาน 10 นาที ถ่ายใส่

ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน

4 เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยไม่เติมสารตกตะกอน ชั่งกาแฟผงละลายทันที อย่างละเอียดประมาณ 0.1 กรัม ละลายในน้ำร้อนประมาณ 40 มล. จนละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตร 100 มล. ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร กรองสารละลายผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน

5 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่มี ทีโอโบรมีนความเข้มข้น 20 มก./ลิตร เป็น internal standard การเตรียมตัวอย่างใช้วิธีตามข้อ 1 - 3 ก่อนปรับปริมาตรเติม ทีโอโบรมีนความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 20 มล. ลงในตัวอย่างกาแฟ และปริมาตร 5 มล. ตัวอย่างน้ำอัดลม

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายตัวชะ
   1.1 กรองเมทานอล ผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน ถ่ายใส่ขวดสำหรับบรรจุสารละลายตัวชะ ไล่อากาศ ด้วยอ่างอัลทราโซนิก นาน 3 - 5 นาที
   1.2 สารละลายกรดอาซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ถ่ายใส่ขวดสำหรับบรรจุสารละลายตัวชะ ไล่อากาศด้วยอ่างอัลทราโซนิก นาน 3 - 5 นาที
2. เตรียมเครื่องมือ HPLC
   2.1 เปิดเครื่องมือทุกส่วน ได้แก่ เครื่องสูบ เครื่องกำจัดแก๊ส(ถ้ามี) ดีเทกเตอร์ เครื่องพิมพ์ผล และเครื่องคอมพิวเตอร์ตามลำดับ
   2.2 กำจัดฟองอากาศออกจากระบบโดยการไล่ (purge) ด้วยสารละลายตัวชะ หรือตัวทำละลายชนิดเดียวกันกับที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ และอาจต้องใช้ซีริงก์ช่วยดูดของเหลว ออกทาง drown-off valve
   2.3 ต่อคอลัมน์เข้าในระบบ ให้ปลายลูกศรชี้ตามทิศทางการไหลของสารละลาย
   2.4 ล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย ที่สภาพมีขั้วอยู่ระหว่างสารละลายตัวชะกับของเหลวที่อยู่ในคอลัมน์ (intermediate polarity) แล้วจึงผ่านสารละลายตัวชะ เข้าสู่คอลัมน์ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าแอบซอร์แบนซ์ คงที่ หรือ baseline คงที่
3. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ
   3.1 ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ บันทึกโครมาโทแกรม
   3.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้น 5 มก./ลิตร เข้าสู่คอลัมน์ บันทึกโครมาโทแกรม

3.3 ฉีดสารละลายมาตรฐาน ทีโอโบรมีน ความเข้มข้น 5 มก./ลิตร เข้าสู่คอลัมน์ บันทึกโครมาโทแกรม

3.4 เปรียบเทียบรีเทนชันไทม์ ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน สารชนิดเดียวกันจะมีรีเทนชันไทม์เท่ากันเมื่อวิเคราะห์โดยใช้สภาวะเดียวกัน บันทึกค่ารีเทนชันไทม์ ลงในตารางที่ 2.2.1

3.5 แบ่งสารละลายตัวอย่างมาประมาณ 1 มล. เติมสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้น 100 มก./ลิตรลงในสารละลายตัวอย่าง 1 หยด ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ บันทึกโครมาโทแกรม เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมข้อ 3.1 เพื่อยืนยันชนิดของสาร

4. ทดสอบความเหมาะสมของระบบ

4.1 สารละลายมาตรฐานผสมของกาเฟอีนกันทีโอโบรมีน ความเข้นข้นชนิดละ 20 มล. ฉีดซ้ำไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำ บันทึกโครมาโทแกรม

4.2 คำนวณหา จำนวนเพลต ความสมมาตรของพีก ค่าการแยก และความสามารถในการวัดซ้ำของ พื้นที่พีก ความสูงของพีก และรีเทนชันไทม์ บันทึกผลลงในตารางที่ 2.2.2 และ 2.2.3

5. วิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีน ในสารละลายตัวอย่าง โดยวิธี external standard

5.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้นต่างๆ เข้าเครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่พีก (แกนตั้ง) กับความเข้มข้น (แกนนอน)

5.2 ฉีดสารละลายตัวอย่าง เข้าเครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม วัดพื้นที่พีก นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ กาเฟอีนในตัวอย่าง บันทึกผลการทดลองในตารางที่ 2.2.5

6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี internal standard (ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มี ทีโอโบรมีน)

6.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนที่มีทีโอโบรมีนเป็น internal standard ความเข้มข้นต่างๆ เข้าเครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม

6.2 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับอัตราส่วนของพื้นที่พีกของสารละลายมาตรฐาน กาเฟอีน กับพื้นที่พีกของทีโอโบรมีน

6.3 วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่มี ทีโอโบรมีนเป็น internal standard หาปริมาณโดยเทียบอัตราส่วนพื้นที่พีกกับกราฟมาตรฐานข้อ 6.2

7. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธี external standard และ internal standard บันทึกผลในตารางที่ 2.2.5

8. สามารถใช้โปรแกรมในเครื่องคอมพิวเตอร์ ในการประมวลผล เขียนกราฟมาตรฐาน คำนวณจำนวนเพลต RSD และคำนวณหาปริมาณสารในตัวอย่าง

9. ล้างคอลัมน์ ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนตามด้วย เมทานอล : น้ำ 50:50 และ เมทานอล เก็บคอลัมน์โดยบรรจุด้วย เมทานอล การเก็บให้ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

วิธีคำนวณ

ตัวอย่างของแข็ง

$$\text{caffeine},\% = \frac{C \times V \times 10^{-4}}{W} \times D$$

ตัวอย่างของเหลว

$$\text{caffeine},\% = C \times 10^{-4} \times D$$

C = ความเข้มข้น(มก./ลิตร)

V = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่เตรียมครั้งแรกก่อนการเจือจาง (มล.)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

D = อัตราการเจือจาง

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 2.2.1 ชนิดและรีเทนชันไทม์ของสาร

สาร	รีเทนชันไทม์(นาที)
caffeine	
theobromine	

ตารางที่ 2.2.2 ความสามารถในการวัดซ้ำ

สาร	%RSD		
	พื้นที่พีก	ความสูงพีก	รีเทนชันไทม์ (นาที)
caffeine			
theobromine			

ตารางที่ 2.2.3 บันทึกผลการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ

สาร	รีเทนชันไทม์ (นาที)	เพลต	ค่าการแยก	ความสมมาตร
caffeine				
theobromine				

ตารางที่ 2.2.4 ข้อมูลที่ใช้เขียนกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสาร

สาร	ระดับความเข้มข้น	external standard		internal standard	
		ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)	ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)
caffeine	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
theobromine	1				
	2				
	3				
	4				
	5				

ตารางที่ 2.2.5 สรุปผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร

สาร	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)		
	external standard		internal standard
	ตัวอย่างเติมสารตกตะกอน	ตัวอย่างไม่เติมสารตกตะกอน	
caffeine			
theobromine			

การทดลองที่ 2.3

การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ

(Method Validation)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ
2. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีหาปริมาณ

การทดลอง

การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ เป็นกระบวนการหนึ่งในการจัดทำการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการใช้วิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่มีความถูกต้อง ทำให้ผลการวิเคราะห์/ทดสอบมีความน่าเชื่อถือ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี ต้องทำในกรณีดังต่อไปนี้

1. เมื่อมีการกำหนดวิธีการใหม่
2. เมื่อมีการใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method)
3. เมื่อนำวิธีมาตรฐานไปใช้ ต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของวิธีมาตรฐานที่นำไปใช้ เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนด และวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ และเพื่อทดสอบว่าวิธีมาตรฐานนั้นมีความเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการหรือไม่ เพียงใด ทั้งในด้านเครื่องมือ/อุปกรณ์และผู้ปฏิบัติงาน

ในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่ห้องปฏิบัติการจัดทำขึ้น ต้องทำการทดสอบอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่สอดคล้องกับข้อกำหนดที่ต้องการ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ จะครอบคลุมตัวแปร ดังต่อไปนี้คือ

1. ความแม่น (accuracy)
2. ความเที่ยง (precision)
3. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection ,LOD)
4. ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (limit of quantitation ,LOQ)
5. ความจำเพาะของวิธี (selectivity & specificity)
6. ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (range)
7. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)
8. สภาพไว (sensitivity)
9. ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะการวิเคราะห์/ทดสอบ (ruggedness)
10. ความสามารถในการทำซ้ำในสภาวะที่แตกต่างกัน (robustness)

รายละเอียดเกี่ยวกับความหมายและการวิธีการหาของแต่ละตัวแปรอยู่ในเอกสารภาคผนวก ในการประยุกต์ใช้อาจจะไม่จำเป็นที่จะครอบคลุมทุกรายการ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีทดสอบระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบ และชนิดของตัวอย่าง การทดลองนี้จะทดลองหา ความแม่น ความเที่ยง ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ และ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้

หาความแม่นของการวิเคราะห์หาปริมาณ methylparaben และ propylparaben ในตัวอย่าง โลชัน โดยวิธีหาปริมาณที่ได้กลับคืน (recovery) หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (spike) methylparaben และ propylparaben ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 และ 5 มก./ลิตร ลงในตัวอย่างโลชัน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ซ้ำ อย่างน้อย 7 ซ้ำ

คำนวณ ปริมาณที่ได้กลับคืน หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

$$\text{recovery , \%} = \frac{C_{ss} - C_s}{C_{std}} \times 100$$

C_{ss} = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_s = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง

C_{std} = ปริมาณสารสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

หาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 7 ซ้ำคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x}{n}$$

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

n = จำนวนครั้งที่วัดซ้ำ

x_i = ค่าที่วัดได้

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยที่วัดได้

หา ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ และ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยเตรียมกราฟมาตรฐาน จากสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 5 และ 10 มก./ลิตร ทำการวิเคราะห์สารละลายตัว

อย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้น ทำซ้ำ 7 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เขียนกราฟระหว่าง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้น ลากกราฟตัดแกนตั้ง จุดตัดแกนตั้งเป็นค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ แบลงค์ (SD_{blk}) คำนวณหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบและปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้

จากสมการ

LOD	=	$3SD_{blk}$
LOQ	=	$10\ SD_{blk}$
SD_{blk}	=	ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง
LOD	=	คำนวณหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ
LOQ	=	ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้

เครื่องมือ/อุปกรณ์/เครื่องแก้ว/สารเคมี/สภาวะการทดสอบ เหมือนกับการทดลองที่ 2.1

วิธีทดลอง

การทดลองนี้ทำต่อเนื่องจากการทดลองที่ 2.1

1. การเตรียมสารละลายตัวชะ เครื่องมือ HPLC และสารละลายมาตรฐาน เตรียมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ใช้กราฟมาตรฐานและข้อมูลเชิงคุณภาพ จากการทดลองที่ 2.1 (กรณีที่ทำการวิเคราะห์ต่อเนื่องในวันเดียวกัน) บันทึกข้อมูลรีเทนชันไทม์ลงในตารางที่ 2.3.1 และข้อมูลสารละลายมาตรฐานลงในตารางที่ 2.3.2
2. หา ความแม่น ความเที่ยง ของวิธีวิเคราะห์
   2.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างโลชันจำนวน 7 ซ้ำ โดย ปิเปตโลชันปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มล. เติมเมทานอล จนถึงขีดปริมาตร กรองสารละลายผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน
   2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น แต่ละระดับความเข้มข้น ให้เตรียม 7 ซ้ำ โดยปิเปตโลชันปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มล. เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ methylparaben และ propylparaben ความเข้มข้นชนิดละ 100 มก./ลิตร ลงในตัวอย่างปริมาตร 0.1 0.2 และ 0.5 มล. เติม เมทานอล จนถึงขีดปริมาตร กรองสารละลายผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน
   2.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานในข้อ 2.1-2.2 บันทึกโครมาโทแกรม และอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน บันทึกในตารางที่ 2.3.3 และ 2.3.4
   2.4 คำนวณค่า ปริมาณที่ได้กลับคืน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกผลลงในตารางที่ 2.3.5

3. หา ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ และ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้
   3.1 ข้อมูลจากข้อ 2 คำนวณค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของแต่ละความเข้มข้น
   3.2 เขียนกราฟระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แกนตั้ง) กับความเข้มข้น (แกนนอน)
   3.3 ลากกราฟตัดแกนตั้ง เป็นค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์
   3.4 คำนวณหาค่าประมาณของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ จากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ บันทึกผลในตารางที่ 2.3.5
4. ยืนยันความถูกต้องของปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ที่หาได้จากการทดลอง โดยเตรียมสารละลายแบลงค์ที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น เท่ากับความเข้มข้นต่ำสุดที่หาปริมาณได้ ที่คำนวณได้จากข้อ 3.4 จำนวน 7 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์ คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และ ปริมาณที่ได้กลับคืน หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกผลการวิเคราะห์ลงในตารางที่ 2.3.6
5. สามารถใช้โปรแกรมจากคอมพิวเตอร์เขียนกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง คำนวณ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
6. ล้างและเก็บคอลัมน์ใน เมทานอล ถ้าไม่ได้ใช้งานอย่างต่อเนื่องควรถอดคอลัมน์ออกจากระบบ ปิดจุกหัวท้ายให้แน่นแล้วเก็บในกล่อง

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 2.3.1 รีเทนชันไทม์ของสารแต่ละชนิด

สาร	รีเทนชันไทม์ (นาที)
methylparaben	
ethylparaben	
propylparaben	

ตารางที่ 2.3.2 ปริมาณสารละลายมาตรฐานที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน

สาร	ระดับความเข้มข้น	ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)
methylparaben	1		
	2		
	3		
propylparaben	1		
	2		
	3		

ตารางที่ 2.3.3 ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากสารละลายตัวอย่างและสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นระดับที่ 1

ปริมาณสารในสารละลายตัวอย่าง (มก./ลิตร)		ปริมาณสารในสารละลาย S+STD1 (มก./ลิตร)	
methylparaben	propylparaben	methylparaben	propylparaben

ตารางที่ 2.3.4 ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นระดับที่ 2 และ 3

ปริมาณสารในสารละลาย S+STD2 (มก./ลิตร)		ปริมาณสารในสารละลาย S+STD3 (มก./ลิตร)	
methylparaben	propylparaben	methylparaben	propylparaben

ตารางที่ 2.3.5 สรุปผลการวิเคราะห์

รายการที่ทดสอบ	**S**	**S+STD1**	**S+STD2**	**S+STD3**
SD				
RSD , %				
recovery , %				
LOD				
LOQ(ประมาณ)				

ตารางที่ 2.3.6 ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากสารละลายแบลงค์ที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ LOQ โดยประมาณ

ปริมาณสารในสารละลายแบลงค์ (มก./ลิตร)		**ปริมาณสารในสารละลาย B+STD$_{LOQ}$ (มก./ลิตร)**	
methylparaben	**propylparaben**	**methylparaben**	**propylparaben**

S = สารละลายตัวอย่าง

S+STD1 = สารละลายตัวอย่าง ที่เติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นระดับ 1

S+STD2 = สารละลายตัวอย่าง ที่เติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นระดับ 2

S+STD3 = สารละลายตัวอย่าง ที่เติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นระดับ 3

B+STD$_{LOQ}$ = สารละลายแบลงค์ ที่เติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น เท่ากับ LOQ ที่ประมาณค่าในตารางที่ 2.3.5

B = สารละลายแบลงค์

บทที่ 3
แก๊สโครมาโทกราฟี
(Gas Chromatography)

แก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน หลักการวิเคราะห์สาร ต้องแยกสารผสมออกจากกันโดยที่สารแต่ละชนิดในตัวอย่างเกิด differential sorption ระหว่างเฟส 2 เฟสคือ เฟสนิ่ง (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยที่เฟสนิ่งเป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็ง บรรจุอยู่ในคอลัมน์ หรือเคลือบที่ผนังด้านในของคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ เป็นของแก๊ส เรียกว่าแก๊สพา (carrier gas) สารผสมจะแยกออกจากกันได้เนื่องจากสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสนิ่งโดยการนำพาของเฟสเคลื่อนที่ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน (differential migration) ซึ่งเป็นผลจากการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดบนเฟสนิ่งแตกต่างกัน สารตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยวิธีนี้ต้องเป็นสารที่เปลี่ยนเป็นสถานะแก๊สได้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 250 °ซ สำหรับสารที่เปลี่ยนเป็นแก๊สที่อุณหภูมิสูงมากๆ ก็สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้ แต่ต้องใช้เทคนิคอื่นช่วย เช่น เตรียมเป็นอนุพันธ์ (derivative) และการแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) เป็นต้น แก๊สโครมาโทกราฟี แบ่งเป็น 2 เทคนิค ตามชนิดของเฟสนิ่ง เป็น 2 ชนิด คือ

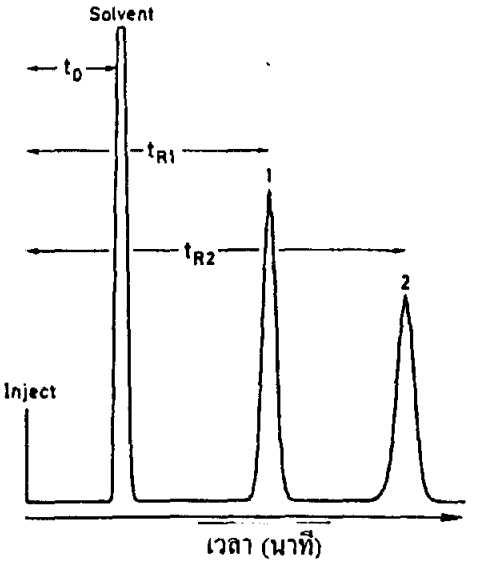
1. แก๊ส-โซลิดโครมาโทกราฟี (Gas Solid Chromatography, GSC) เฟสนิ่งเป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (adsorption) สารที่ต้องการแยกได้ เช่น molecular sieves, porous polymers, silica gel, alumina และ activated carbon

2. แก๊ส-ลิควิดโครมาโทกราฟี (Gas Liquid Chromatography, GLC) เฟสนิ่งเป็นของเหลวซึ่งเคลือบหรือยึดอยู่บนของแข็ง (supporting material) หรือของเหลวซึ่งเคลือบอยู่บนผนังของคอลัมน์ การแยกสารผสมใช้หลักการกระจายตัวของสารในชั้นของเหลว ได้แตกต่างกัน

การวิเคราะห์สารด้วย GC นิยมใช้เทคนิค GLC มากกว่า GSC เนื่องจากสารที่ใช้เป็นเฟสนิ่งมีมาก ทำให้เลือกใช้งานได้กว้าง นอกจากนี้ของเหลวสามารถเคลือบได้ดีในคอลัมน์ชนิดแคปิลลารี (capillary column) ซึ่งกำลังนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง

3.1 หลักการวิเคราะห์สาร

สารตัวอย่างถูกฉีด (inject) เข้าเครื่อง GC บริเวณช่องฉีดสาร (injection port)ที่มีอุณหภูมิสูง แล้วเปลี่ยนสถานะเป็นไอทันที ไอสารถูกนำผ่านระบบฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยแก๊สพา ซึ่งไหลผ่านคอลัมน์อยู่ตลอดเวลา สารแต่ละชนิดในตัวอย่างจะแพร่กระจายในเฟสนิ่งแตกต่างกัน สารจึงเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ในระยะทางที่แตกต่างกัน ทำให้สารผสมแยกออกเป็นแถบของสารแต่ละชนิด เคลื่อนที่เข้าสู่ดีเทกเตอร์ตามลำดับ รายงานผลเป็นกราฟระหว่างสัญญาณไฟฟ้ากับเวลา เรียกว่าโครมาโทแกรม ดังแสดงใน*รูปที่ 3.1* ขนาดของสัญญาณแปรผันโดยตรงกับปริมาณของสาร



รูปที่ 3.1 แสดงโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GC[8]

t_0 คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ตั้งแต่ระบบฉีดสารถึงถึงดีเทกเตอร์โดยไม่ถูกยึดด้วยคอลัมน์

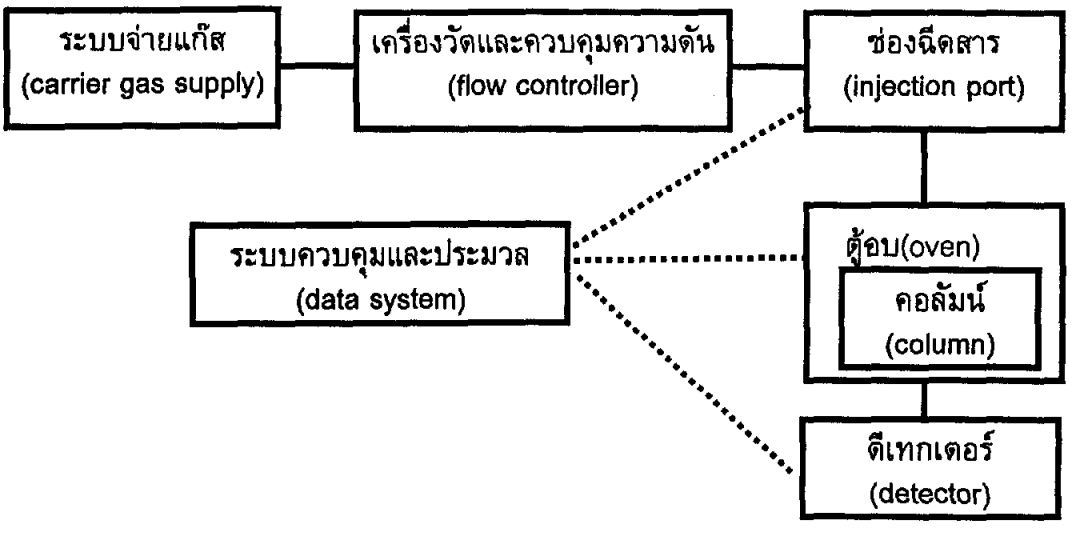
t_{R1} คือเวลาที่สารชนิดที่ 1 เคลื่อนที่ตั้งแต่ระบบฉีดสารถึงถึงดีเทกเตอร์

t_{R2} คือเวลาที่สารชนิดที่ 2 เคลื่อนที่ตั้งแต่ระบบฉีดสารถึงดีเทกเตอร์

การใช้เครื่อง GC สำหรับวิเคราะห์สารแต่ละชนิดต้องเลือกใช้คอลัมน์ และดีเทกเตอร์ให้เหมาะสม สามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม ใช้สารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องปริมาตรต่ำระดับไมโครลิตร

3.2 องค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

เครื่องมือมีส่วนประกอบที่สำคัญดังแสดงด้วยแผนภาพ *ในรูปที่ 3.2*



รูปที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

3.2.1 ถังบรรจุแก๊ส เป็นถังชนิดทนแรงดันได้สูงและ มีอุปกรณ์วัดความดันและควบคุมอัตราการไหลของแก๊สที่ใช้กับเครื่อง GC ได้แก่ แก๊สพา และแก๊สที่ใช้กับดีเทกเตอร์ แก๊สพาควรมีสมบัติดังนี้

3.2.1.1 ไม่ทำปฏิกริยากับสารที่วิเคราะห์ รวมถึงตัวทำละลาย และ สารในคอลัมน์

3.2.1.2 เป็นแก๊สที่มีการแพร่น้อย และมีมวลโมเลกุลต่ำ

3.2.1.3 หาง่าย ราคาไม่แพง มีความบริสุทธิ์สูง

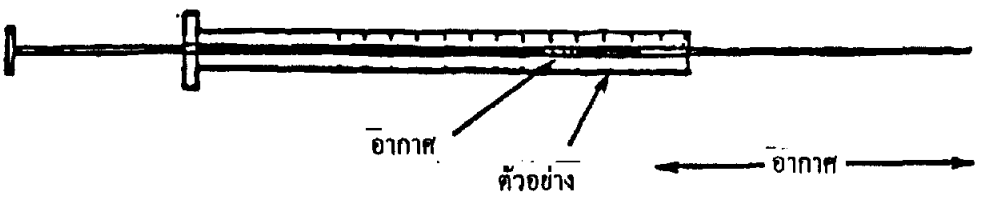
3.2.1.4 เหมาะสมกับดีเทกเตอร์ที่ใช้

ส่วนแก๊สที่ใช้กับดีเทกเตอร์ ชนิดและความบริสุทธิ์ขึ้นอยู่กับชนิดของดีเทกเตอร์

3.2.2. ช่องฉีดสาร อยู่ด้านบนของคอลัมน์ ส่วนบนสุดของช่องฉีดสารมีเซปตัม(septum) เป็นพอลิเมอร์ชนิดทนสารเคมีและความร้อน ด้านล่างเป็นระบบฉีดสาร ซึ่งมีหลายแบบตามชนิดของคอลัมน์ ได้แก่ ระบบฉีดสารสำหรับแพกคอลัมน์ (packed column) และระบบฉีดสารสำหรับคอลัมน์ชนิดแคปิลลารี ซึ่งยังแบ่งออกเป็นแบบที่ปล่อยไอสารบางส่วนทิ้ง (split) แบบที่ปล่อยไอสารบางส่วนทิ้งหรือนำเข้าคอลัมน์ทั้งหมด (split/splitless) และ แบบฉีดสารลงบนคอลัมน์โดยตรง (cool on column) การเลือกใช้ระบบฉีดสารแต่ละแบบขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง และปริมาณสารที่ฉีด วิธีฉีดสารเข้าเครื่อง GC มีหลายวิธีดังนี้

3.2.2.1 ใช้ซีริงก์ (syringe injection) เป็นวิธีที่ใช้ฉีดตัวอย่างที่เป็นของเหลว และแก๊ส โดยใช้ซีริงก์ดูดสารตัวอย่างฉีดสารผ่าน เซปตัม เข้าในระบบฉีดสาร แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1) การฉีดสารแบบไม่อัตโนมัติ (manual injection) ผู้ฉีดสารต้องมีความชำนาญ และใช้เทคนิคการฉีดสารที่ถูกต้อง เช่น การฉีดสารที่เป็นของเหลว ใช้วิธีดูดอากาศและสาร บรรจุในซีริงก์สลับกัน ดังแสดงใน*รูปที่ 3.3* ในส่วนปลายเข็ม (needle) เป็นอากาศ เมื่อเข้าสู่ช่องสารที่ร้อนยังคงไม่มีสารเข้าคอลัมน์ จนกว่าจะมีการกดกระบอกฉีด ทำให้ตัวอย่างเข้าสู่ระบบฉีดสารพร้อมกัน ทำให้สารเข้าสู่คอลัมน์ในเวลาสั้น



รูปที่ 3.3 แสดงซีริงก์ที่บรรจุสารละลายตัวอย่างที่ต้องการฉีด[9]

2) การฉีดสารแบบอัตโนมัติ (autosampler) เป็นการฉีดสารโดยใช้ไมโครซีริงก์ ซึ่งควบคุมการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ เหมาะสำหรับการฉีดสาร

ตัวอย่างที่มีเป็นจำนวนมาก การฉีดสารแบบนี้ให้ผลที่มีความเที่ยง (precision) สูง

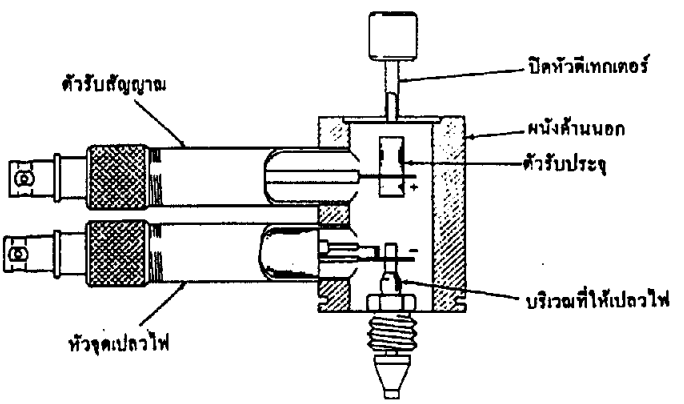
3.2.2.2 ใช้วาล์ว เป็นวาล์วที่มีขนาดต่างๆ ทำให้การฉีดสารมีความเที่ยง นิยมใช้กับตัวอย่างที่เป็นแก๊ส (gas sampling valve)

3.2.3. ตู้อบและคอลัมน์ ตู้อบเป็นส่วนของเครื่องมือที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์จึงต้องสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ถูกต้องและคงที่ มีระบบควบคุมการเพิ่ม-ลดอุณหภูมิได้รวดเร็ว คอลัมน์อยู่ในตู้อบ ปลายด้านหนึ่งต่อกับช่องฉีดสาร ปลายอีกด้านหนึ่งต่อเข้าดีเทกเตอร์ วัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์มีหลายชนิดเช่น เหล็กไร้สนิม แก้ว และฟิวส์ซิลิกา คอลัมน์ที่ใช้งานในเทคนิค GC มีหลายชนิดแตกต่างกันในเรื่องของขนาด และชนิดของสารที่บรรจุในคอลัมน์ ดูรายละเอียดเพิ่มเติมจากเอกสารภาคผนวก และเอกสารอ้างอิง

3.2.4. ดีเทกเตอร์ เป็นเครื่องวัดปริมาณสารที่ออกจากคอลัมน์ ให้ผลเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ดีเทกเตอร์ที่ใช้ในเครื่อง GC มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป มี 2 ชนิดคือ

3.2.4.1 Flame Ionize Detector (FID) ใช้สำหรับสารอินทรีย์ที่แตกตัวเป็นไอออนได้เมื่อให้ความร้อนจากเปลวไฟ การวัดปริมาณสารอาศัยหลักการนำไฟฟ้าของไอออนในสถานะแก๊ส FID มีส่วนประกอบดังแสดงใน*รูปที่ 3.4*

หลักการทำงานของ FID คือ ไอของสารถูกแก๊สพาเข้าสู่ดีเทกเตอร์ ภายในดีเทกเตอร์ มีเปลวไฟจากแก๊สไฮโดรเจนกับอากาศ สารถูกเผาเกิดเป็นไอออนในสถานะแก๊ส อยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้า ทำให้ความต้านทานระหว่างขั้วไฟฟ้าลดลง กระแสไฟฟ้าจึงไหลผ่านในวงจร ได้ ปริมาณของกระแสไฟฟ้าขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่เข้าสู่ดีเทกเตอร์

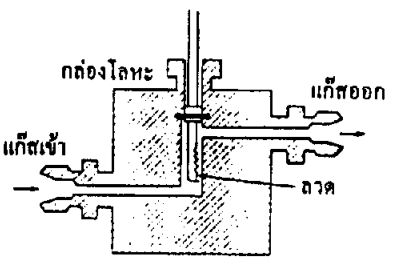


รูปที่ 3.4 แสดงดีเทกเตอร์ชนิด FID[6]

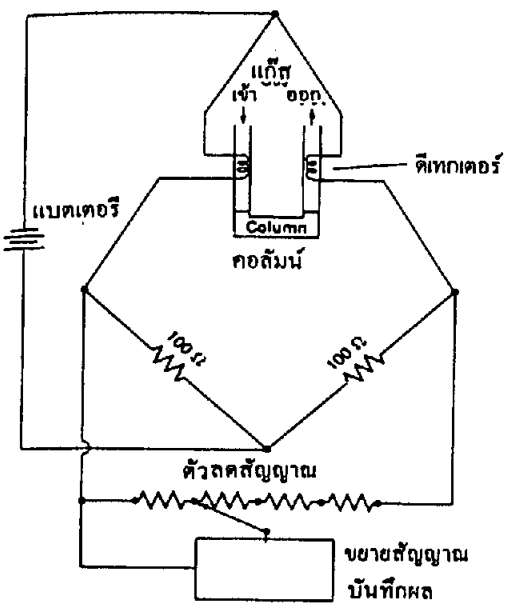
3.2.4.2 Thermal Conductivity Detector (TCD) ใช้สำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์โดยทั่วไป วัดปริมาณสารโดยอาศัยหลักการนำความร้อนของสาร TCD มีส่วนประกอบและวงจรไฟฟ้าแสดงใน*รูปที่ 3.5* และ*รูปที่ 3.6* ส่วนประกอบที่สำคัญของ TCD คือ เส้นลวดขนาดเล็กทำด้วยวัสดุชนิดที่ความต้านทานไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงอย่างมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง เส้นลวดบรรจุอยู่ภายในกล่องโลหะ (metal block) ที่ป้องกันการถ่ายเทความร้อนกับภายนอก

หลักการทำงานของ TCD คือ แก๊สพา เช่น ฮีเลียม หรือไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ผ่านเข้าสู่ดีเทกเตอร์ ด้วยอัตราการไหลคงที่ เมื่อให้กระแสไฟฟ้าที่มีค่าคงที่แก่เส้นลวด ทำให้ลวดร้อนขึ้นและถ่ายเทความร้อนให้แก่แก๊สพา จนกระทั่งถึงสภาวะสมดุลอุณหภูมิของเส้นลวดคงที่ เมื่อมีสารอื่นปนมากับแก๊สพา อุณหภูมิของเส้นลวดเปลี่ยนแปลง ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าของเส้นลวดเปลี่ยนแปลงด้วย และถูกวัดโดยวงจรของ wheat stone bridge แสดงผลเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า

ส่วนดีเทกเตอร์ชนิดอื่น ๆ มีรายชื่อและความหมายอย่างย่อๆ ในภาคผนวก จะไม่กล่าวรายละเอียดในที่นี้



รูปที่ 3.5 แสดงดีเทกเตอร์ชนิด TCD[6]



รูปที่ 3.6 แสดงวงจรไฟฟ้าและ TCD เซลล์[6]

3.2.5 ระบบประมวลผลและรายงานผล เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่บันทึกและ รายงานผล มีหลายแบบ

3.2.5.1 เครื่องบันทึกผล (recorder) ทำหน้าที่บันทึกโครมาโทแกรมเพียงอย่างเดียว

3.2.5.2 เครื่องบันทึกและประมวลผล (integrator) บันทึกโครมาโทแกรม คำนวณผลรายงานข้อมูลต่าง ๆ เช่น พื้นที่พีก ความสูงพีก รีเทนชันไทม์ และบันทึกข้อมูล

3.2.5.3 คอมพิวเตอร์ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเครื่อง GC รวมทั้งบันทึก ประมวลผล และออกรายงาน

การใช้เครื่อง GC ในการวิเคราะห์สาร หลักสำคัญต้องเลือกคอลัมน์ให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่วิเคราะห์ รวมทั้งปรับสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ชนิดและอัตราการไหลของแก๊สพา อุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ และชนิดของดีเทกเตอร์ ก่อนทำการวิเคราะห์สารต้องตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) ประกอบด้วย จำนวนเพลตตามทฤษฎีของคอลัมน์ (number of theoretical plates ,n) ความสมมาตรของพีก (peak symmetry) ค่าการแยก (resolution,R_S) และความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) ของพื้นที่พีก ความสูงของพีก และ รีเทนชันไทม์ แสดงผลเป็นความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (RSD, %) ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารจะลดลงตามระยะเวลาการใช้งาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ยังคงมีความน่าเชื่อถือ การตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ และการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ มีรายละเอียดใน *บทที่ 2*

3.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเครื่อง GC ต้องทราบชนิดของสารในตัวอย่างก่อนจึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยปกติเทคนิค GC ไม่นิยมใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยตรง นอกจากเครื่อง GC ที่ดีเทกเตอร์เป็นชนิด Mass Spectrophotometer (MS) เรียกว่า GC/MS ซึ่งสามารถตรวจสอบโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ได้ การวิเคราะห์สารด้วยวิธี GC ที่ใช้ดีเทกเตอร์ ชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่ MS ต้องทราบประเภทของสารก่อน ข้อมูลจาก GC เป็นเพียงการยืนยันพีกของสารให้ตรงกับชื่อของกลุ่มสารที่ทราบแล้ว การยืนยันพีกสารวิธีที่สะดวกและรวดเร็วมี 2 วิธีคือ

3.3.1 เปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ ของสารในตัวอย่างกับสารมาตรฐาน สารชนิดเดียวกันวิเคราะห์ในสภาวะการทดสอบเดียวกันจะให้ค่ารีเทนชันไทม์เท่ากัน หรือเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นสูงปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายตัวอย่างเรียกว่า การ spike ถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์พร้อมกัน ทำให้พื้นที่พีกหรือความสูงเพิ่มขึ้น

3.3.2 เปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์สัมพัทธ์ (relative retention time) กำหนดสารอ้างอิงซึ่งไม่ใช่สารที่ต้องการวิเคราะห์ หาอัตราส่วนรีเทนชันไทม์ของสารที่วิเคราะห์กับสารอ้างอิง ดังสมการ

$$r_{(a,s)} = \frac{t_{R(a)} - t_M}{t_{R(S)} - t_M}$$

$r_{(a,s)}$ = รีเทนชันไทม์สัมพัทธ์

$t_{R(a)}$ = รีเทนชันไทม์ของสารที่วิคราะห์

$t_{R(s)}$ = รีเทนชันไทม์ของสารอ้างอิง

t_M = รีเทนชันไทม์ของตัวทำละลาย

นอกจากนี้การวิเคราะห์เชิงคุณภาพสามารถหาโดยวิธี retention Index ซึ่งไม่กล่าวรายละเอียดในที่นี้

3.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ มีหลายวิธี ดังนี้

3.4.1 วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐาน การเตรียมกราฟมาตรฐาน มี 2 วิธี คือ external standard และ internal standard ได้กล่าวรายละเอียดแล้วใน*บทที่ 2*

3.4.2 วิธีคำนวณเปอร์เซ็นต์พื้นที่พีก (% area) ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารในตัวอย่างเป็นเปอร์เซ็นต์ การคำนวณหาปริมาณสารที่วิเคราะห์เป็นเปอร์เซ็นต์โดยหาอัตราส่วนของพื้นที่พีกสารที่วิเคราห์กับผลรวมของพื้นที่ทั้งหมดคูณด้วย 100 ดังสมการ

$$\text{ปริมาณสาร (\%)} = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^{n} A_i} \times 100$$

A_i = พื้นที่พีกของสาร i

3.4.3. วิธีคำนวณเปอร์เซ็นต์พื้นที่พีกโดยใช้ response factor (% normalization) ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารในตัวอย่างเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยนำค่าการตอบสนองของดีเทกเตอร์ต่อสารแต่ละชนิดมาใช้ในการคำนวณ เรียกว่า response factor (R) หาโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดในตัวอย่าง คำนวณอัตราส่วนของปริมาณต่อพื้นที่พีกเป็นค่า R การคำนวณหาปริมาณสารที่วิเคราะห์เป็นเปอร์เซ็นต์ โดยหาอัตราส่วนของผลคูณพื้นที่พีกสารที่วิเคราะห์กับ R กับ ผลรวมของผลคูณพื้นที่พีกสารที่วิเคราะห์กับ R คูณด้วย 100 ดังสมการ

$$\text{ปริมาณสาร (\%)} = \frac{A_i \times R_i}{\sum_{i=1}^{n} (A_i \times R_i)} \times 100$$

A_i = พื้นที่พีกของสาร i

R_i = response factor ของสาร i

R = พื้นที่พีกของสาร /ความเข้มข้น

3.5 ข้อควรปฏิบัติและการแก้ปัญหาเบื้องต้นในการใช้เครื่อง

การวิเคราะห์สารโดยใช้เครื่อง GC ผู้ใช้เครื่องมือจำเป็นต้องศึกษาคู่มือการใช้เครื่องอย่างละเอียด เพื่อให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างถูกวิธี และใช้เครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ก่อนทำการวิเคราะห์สาร ควรตรวจสอบเครื่องมืออย่างละเอียด ดังนี้

3.5.1 ทดสอบการรั่วไหลของแก๊สในระบบ โดยเปิดแก๊สจากถังแก๊สเข้าระบบ แล้วใช้น้ำยาพิเศษที่เกิดฟองกับแก๊สได้ง่าย ทดสอบการรั่วของแก๊สบริเวณต่าง ๆ คือ

- รอยต่อของท่อนำแก๊สทุกจุด
- วาล์วที่ถังแก๊ส
- รอยต่อระหว่างคอลัมน์กับท่อนำแก๊ส และคอลัมน์เข้าดีเทกเตอร์

3.5.2 ตรวจสายสัญญาณ และสายเคเบิลทุกสาย ต้องต่อให้แน่นและถูกต้อง

3.5.3 กรณีใช้ดีเทกเตอร์ชนิด FID ทดสอบเปลวไฟและรักษาให้เปลวไฟติดอยู่ตลอดเวลาที่วิเคราะห์สาร

3.5.4 ตั้งค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ให้ถูกต้อง เช่น

- อุณหภูมิของบริเวณฉีดสาร คอลัมน์ และดีเทกเตอร์
- อัตราการไหลของแก๊สทุกชนิดต้องเหมาะสมและมีอัตราส่วนที่สัมพันธ์กัน

3.5.5 เลือกชนิดของแก๊สพาให้เหมาะสมกับสารที่วิเคราะห์

3.5.6 เลือกคอลัมน์ให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่วิเคราะห์

3.5.7 หากเก็บคอลัมน์ไว้เป็นเวลานาน ก่อนใช้งานต้องปรับสภาวะ (condition) ของคอลัมน์ให้พร้อมใช้งาน โดยให้แก๊สพาผ่านคอลัมน์ในเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม ศึกษารายละเอียดได้จากคู่มือของคอลัมน์

นอกจากนี้ผู้ทดลองควรแก้ปัญหาเบื้องต้นที่อาจเกิดขึ้นขณะทำการวิเคราะห์ได้ ปัญหาที่มักเกิดขึ้นเสมอ สาเหตุของปัญหา และวิธีแก้ไข แสดงในตารางที่ 3.1

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ไข
1.ไม่มีพีก	1.1 ไม่ได้เปิด(power on)ดีเทกเตอร์	1.1 เปิดดีเทกเตอร์
	1.2 แก๊สพาไม่ไหล	1.2ตรวจสอบการรั่วไหลของแก๊สบริเวณบริเวณข้อต่อ ตรวจความดันแก๊ส
	1.3 การต่อสายสัญญาณไม่ถูกต้อง	1.3 ต่อสายสัญญาณให้ถูกต้อง
	1.4 อุณหภูมิของบริเวณฉีดสารต่ำเกินไป สารตัว อย่างไม่กลายเป็นไอ	1.4 เพิ่มอุณหภูมิของบริเวณ ฉีดสาร แล้วทดสอบการกลายเป็นไอของสารบางชนิด เช่น acetone และ air
	1.5 เซปตัมรั่ว	1.5 เปลี่ยนเซปตัม
	1.6 มีการรั่วไหลของแก๊ส บริเวณ	1.6 ต่อคอลัมน์ให้แน่น ทดสอบการรั่ว

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ไข
	รอยต่อของคอลัมน์ 1.7 เปลวไฟของ FID ดับ 1.8 อุณหภูมิของคอลัมน์ ต่ำเกินไป ทำให้สารตัวอย่างกลั่นตัว	ไหลของแก๊ส 1.7จุดเปลวไฟตั้งอุณหภูมิของดีเทกเตอร์ให้เหมาะสม 1.8 เพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์
2. ได้พีกหัวกลับ	2.1ต่อสายสัญญาณเข้าเครื่องบันทึกผลไม่ถูกต้อง 2.2 ใช้คอลัมน์ผิดประเภท 2.3 ตั้ง mode หรือ polarity ของดีเทกเตอร์ผิด ตำแหน่ง	2.1 ต่อสายสัญญาณให้ถูกต้อง 2.2 เปลี่ยนมาใช้คอลัมน์ให้เหมาะสม 2.3 ปรับ mode หรือ polarity ของดีเทกเตอร์ให้ถูกต้อง
3.พีกโย้หลัง (tailing peaks)	3.1 ตั้งอุณหภูมิช่องฉีดสารสูง หรือต่ำเกินไป 3.2 หลอดแก้วในระบบฉีดสาร (injector tube) สกปรก 3.3 อุณหภูมิของคอลัมน์ต่ำเกินไป 3.4 เทคนิคการฉีดสารไม่ดี 3.5 ใช้คอลัมน์ผิดประเภท ทำให้เกิดอันตรกิริยาของสารตัวอย่างกับเฟสนิ่ง	3.1 ปรับตั้งอุณหภูมิให้ เหมาะสม 3.2 ล้างทำความสะอาดหลอดที่อยู่ในระบบฉีดสาร ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม 3.3 เพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ 3.4 ศึกษาและฝึกวิธีฉีดสารที่ถูกต้อง 3.5 เปลี่ยนมาใช้คอลัมน์ ที่เหมาะสม
4. พีกโย้หน้า (leading peaks)	4.1ฉีดสารตัวอย่างมากเกินไป 4.2 สารตัวอย่างเกิดการกลั่นตัวเป็นของเหลวในระบบ 4.3 เทคนิคการฉีดสารไม่ดี	4.1 ลดปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด 4.2 ปรับอุณหภูมิของระบบให้เหมาะสม คือ ระบบฉีดสาร คอลัมน์ และดีเทกเตอร์ 4.3ศึกษาและฝึกวิธีฉีดสารที่ถูกต้อง

ที่กล่าวมาเป็นเพียงตัวอย่างของปัญหาที่มักเกิดขึ้นเสมอ ยังมีปัญหาที่อาจเกิดขึ้นอีกมากมายขณะทำการวิเคราะห์สาร เช่น เกิดสัญญาณรบกวนที่ baseline สูง (baseline noise) baseline เลื่อนขึ้นตลอดเวลา (baseline drift) baseline ไม่อยู่ที่ศูนย์ พีกไม่แยก พีกกว้าง เป็นต้น ปัญหาเหล่านี้สามารถศึกษาหาวิธีแก้ไขได้จากตำรา และเอกสารอ้างอิง

การทดลองที่ 3.1
เทคนิคพื้นฐานการใช้แก๊สโครมาโทกราฟ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของเครื่อง GC และให้รู้ถึงปัญหาที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งแนวทางแก้ไข ซึ่งจะทำให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างถูกต้อง
2. เพื่อศึกษาวิธีหาจำนวนเพลต และ การหาอัตราการไหลของแก๊สพาที่เหมาะสม
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการไหลของแก๊สพากับ Height Equivalent of a Theoretical Plate (HETP)

การทดลอง

แก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ สารตัวอย่างที่วิเคราะห์ต้องสามารถทำให้กลายเป็นไอได้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 250 °ซ ตัวอย่างที่วิเคราะห์เตรียมให้เป็นของเหลว หรือแก๊ส การใช้เครื่อง GC ในการวิเคราะห์สารจำเป็นต้องเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสมและยังคงใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แก๊สพาที่ใช้เป็นแก๊สเฉื่อย เช่น ไนโทรเจน ฮีเลียม อาร์กอน เป็นต้น การเลือกแก๊สพาต้องคำนึงถึงชนิดของดีเทกเตอร์ที่ใช้ นอกจากนี้อัตราการไหลของแก๊สพามีผลต่อการแยกสารมาก ดังนั้น ในการวิเคราะห์สารจึงจำเป็นต้องหาอัตราการไหลของแก๊สพาที่เหมาะสม และตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่น และความเที่ยง

ศึกษาองค์ประกอบของเครื่อง GC และฝึกเทคนิคการใช้เครื่องมือ จนกระทั่งสามารถใช้เครื่องมือได้ ทดลองหาจำนวนเพลต และ HETP ของคอลัมน์ โดยทดลองที่อัตราการไหลของแก๊สพาหลาย ๆ ค่า คำนวณหาจำนวนเพลต และ HETP จากสมการ

$$n = 16 (t_R / w_b)^2$$

$$HETP = L/n$$

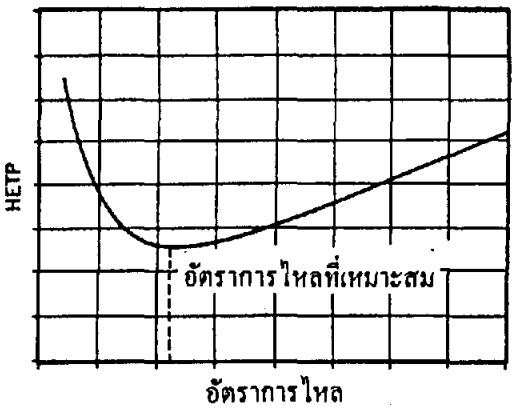
n = จำนวนเพลต

L = ความยาวของคอลัมน์

t_R = รีเทนชันไทม์

w_b = ความกว้างของฐานพีก

หาอัตราการไหลของแก๊สพาที่เหมาะต่อการวิเคราะห์ (optimum flow rate) โดยเขียนกราฟระหว่าง HETP (แกนตั้ง) กับอัตราการไหล (แกนนอน) ได้กราฟดังแสดงใน*รูปที่ 3.7*



รูปที่ 3.7 แสดงการหาอัตราการไหลที่เหมาะสม[14]

เครื่องมือ/อุปกรณ์

เครื่อง GC ประกอบด้วย

- ดีเทกเตอร์ชนิด FID
- คอลัมน์ชนิดแคปปิลารี : HP 5 ความยาว 25 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มม. ความหนาของสารที่เคลือบภายใน 0.25 ไมครอน
- คอมพิวเตอร์ และเครื่องพิมพ์ผล

อุปกรณ์วัดอัตราการไหลของแก๊ส (flow meter)

ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มล.

ขวดขนาดเล็ก (vial)

เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.0001 กรัม

ซีริงก์ ขนาด 10 ไมโครลิตร

กระดาษกราฟ

สภาวะของGC ในการวิเคราะห์

อุณหภูมิของคอลัมน์	60 °ซ
อุณหภูมิของดีเทกเตอร์	150 °ซ
อุณหภูมิของช่องฉีดสาร	250 °ซ

แก๊สพา He

แก๊สสำหรับดีเทกเตอร์ H_2 และ Air

แก๊สช่วย (makeup gas) N_2

สารเคมี ชั้นคุณภาพรีเอเจนต์ หรือ โครมาโทกราฟี

เฮปเทน (heptane) ความเข้มข้น 99.95 เปอร์เซนต์

เมทานอล (methanol) ความเข้มข้น 99.95 เปอร์เซนต์

น้ำยาทดสอบแก๊สรั่ว

วิธีทดลอง

1. เปิดเครื่อง GC (ดูรายละเอียดจากคู่มือการใช้เครื่อง) โดยไม่จุดเปลวไฟของดีเทกเตอร์ชนิด FID
2. ตรวจการรั่วของแก๊สบริเวณข้อต่อทุกสายด้วยน้ำยาพิเศษสำหรับทดสอบแก๊สรั่ว ถ้าพบแก๊สรั่วต้องแก้ไขทันที
3. วัดอัตราการไหลของแก๊สพา แก๊สช่วย และแก๊สที่ใช้สำหรับดีเทกเตอร์ ด้วย Flow meter บันทึกข้อมูลในตารางที่ 3.1.1
4. จุดเปลวไฟเครื่อง FID (ดูรายละเอียดจากคู่มือการใช้เครื่อง) ตรวจสอบเปลวไฟ โดยใช้กระจกหรือวัสดุที่มีความมัน อังเหนือดีเทกเตอร์ เพื่อตรวจสอบการติดไฟ ถ้ามีไอน้ำจับที่กระจกหรือวัสดุแสดงว่ามีเปลวไฟ ขณะทำการวิเคราะห์ต้องมีเปลวไฟตลอดเวลา
5. เตรียมสารละลายของ เฮปเทน 2-3 หยด ลงในเมทานอล ประมาณ 10 มล.
6. ปรับอัตราการไหลของแก๊สพาเป็น 0.5 มล./นาที
7. ฉีดสารละลายในข้อ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บันทึกโครมาโทแกรม
8. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 6-7 โดยปรับอัตราการไหลของแก๊สพา เป็น 1 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 มล./นาที ตามลำดับ บันทึกโครมาโทแกรม
9. หาจำนวนเพลต และ HETP จากโครมาโทแกรม ข้อ 7. และข้อ 8.บันทึกผลในตารางที่ 3.1.2
10. เขียนกราฟระหว่าง HETP (แกนตั้ง) กับอัตราการไหล (แกนนอน)
11. คำนวณหาอัตราการไหลของ แก๊สพา ที่เหมาะสม

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 3.1.1 อัตราการไหลของแก๊สชนิดต่างๆที่ใช้

แก๊ส	อัตราการไหล (มล./นาที)
แก๊สพา(He)	
makeup gas(N_2)	
Air	
H_2	

ตารางที่ 3.1.2 บันทึกข้อมูลที่ใช้คำนวณ HETP

อัตราการไหล (มล./นาที)	รีเทนชันไทม์ (นาที)	ความกว้างฐานพีก	จำนวนเพลต	HETP

สรุปผลการทดลอง

อัตราการไหลของแก๊สพาที่เหมาะสม..... มล./นาที

อัตราการไหลของแก๊สพาที่ใช้งาน.....มล./นาที

อัตราการไหลของแก๊สพาที่ใช้งาน= อัตราการไหลของแก๊สพาที่เหมาะสม x 1.25

การทดลองที่ 3.2
การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารในทินเนอร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ
2. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ
3. เพื่อหาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่าง

การทดลอง

เครื่อง GC ใช้ในการวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมรวมกัน วิเคราะห์ ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาว่าตัวอย่างที่ วิเคราะห์ประกอบด้วยสารอะไรบ้าง โดยปกติสารที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC จะต้องทราบก่อน ว่าเป็นสารประเภทใด มีสารอะไรบ้างเป็นองค์ประกอบ ในกรณีนี้การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ จึงเป็นเพียงการยืนยันชื่อสารให้ตรงกับพีกสารในโครมาโทแกรม ถ้าเป็นสารตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูลมาก่อน การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบอกชนิดของสารได้อย่างมั่นใจ จำเป็นต้องใช้วิธีการหรือเครื่องมือชนิดอื่นมายืนยันด้วย การยืนยันชนิดของสารวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ใช้วิธีเปรียบเทียบรีเทนชันไทม์ของสารที่วิเคราะห์กับสารมาตรฐาน และวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง

วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ในทินเนอร์ โดยใช้เครื่อง GC การหาชนิดของสาร ใช้วิธีเติมสารมาตรฐานที่เป็นส่วนประกอบของทินเนอร์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 496-2526 ทินเนอร์สำหรับแลกเกอร์ และมอก. 520-2527 ทินเนอร์สำหรับสีพ่นรถยนต์แห้งเร็วไนโตรเซลลูโลส หาค่า response factor ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด เพื่อนำมาหาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบในทินเนอร์ โดยวิธีคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จากพื้นที่พีกและ response factor (% normalization) ทดสอบความเหมาะสมของระบบ โดยหาค่าความเที่ยงของ รีเทนชันไทม์ และพื้นที่พีก รายงานค่าเป็น ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ รวมทั้งหาค่าความสมมาตรของพีก และค่าการแยก

เครื่องมือ / อุปกรณ์

เครื่อง GC ประกอบด้วย

ดีเทกเตอร์ ชนิด FID

คอลัมน์ : HP- 5 ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มม. ความยาว 30 เมตร ความหนาของสารที่เคลือบในคอลัมน์ 0.25 ไมครอน

เครื่องคอมพิวเตอร์ และเครื่องพิมพ์ผล

ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล.

ซีริงก์ขนาด 10 ไมโครลิตร

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 มก.

ไมโครปิเปตขนาด 1,000 200 และ 10 ไมโครลิตร

สภาวะของเครื่อง GC

อุณหภูมิของคอลัมน์	40 ^{o}ซ คงที่ 5 นาที เพิ่มในอัตรา 10 ^{o}ซ /นาทีถึง200 ^{o}ซ
อุณหภูมิดีเทกเตอร์.	250 ^{o}ซ
อุณหภูมิช่องฉีดสาร	150 ^{o}ซ
แก๊สพา	He
แก๊สดีเทกเตอร์	H_2 และAir
แก๊สช่วย	N_2
อัตราการไหล	2.0 มล./นาที

สารเคมี ชั้นคุณภาพรีเอเจนต์หรือโครมาโทกราฟี

toluene

butylacetate

iso-butanol

methyl isobutyl ketone

2-n-butoxy-1-ethanol

isopropanol

methyl ethyl ketone

ตัวอย่าง ทินเนอร์สำหรับแลกเกอร์ และ ทินเนอร์สำหรับสีพ่นรถยนต์แห้งเร็วไนโตรเซลลูโลส (ฉีดเข้าเครื่อง GC โดยตรงไม่ต้องผ่านการเตรียมตัวอย่าง)

วิธีทดลอง

1. เปิดแก๊สทุกชนิดที่ใช้งาน ทดสอบการรั่วไหลของแก๊ส และเปิดเครื่อง GC ตั้งค่าอุณหภูมิ และอัตราการไหลของแก๊ส ตามสภาวะที่กำหนดในวิธีการวิเคราะห์ รอจนกระทั่งเครื่องพร้อมใช้งาน
2. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ
   2.1 ฉีดทินเนอร์ตัวอย่าง บันทึกโครมาโทแกรม
   2.2 เติมสารมาตรฐาน toluene butylacetate iso-butanol methyl isobutyl ketone 2-n-butoxy-1-ethanol isopropanol และ methyl ethyl ketone ลงในสารละลายตัวอย่างครั้งละชนิด ฉีดสารตัวอย่างและสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC เปรียบเทียบโครมาโทแกรมของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกับก่อนเติมสารมาตรฐาน พีกที่มีพื้นที่เพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน เป็นพีกของสาร ที่เติมลงไป ทำซ้ำจนสามารถบ่งชี้สารครบทุกชนิด บันทึกผลลงใน*ตารางที่ 3.2.1*
3. ทดสอบความเหมาะสมของระบบ

3.1 ฉีดตัวอย่างทินเนอร์ 3 ซ้ำ โดยใช้ตัวอย่างและสภาวะการทดสอบเดียวกัน คำนวณค่าการแยก ความสมมาตรของพีก และความเที่ยง ของ รีเทนชันไทม์ และ พื้นที่พีก คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกผลใน *ตารางที่ 3.2.1และ3.2.2*

4. วิเคราะห์เชิงปริมาณ

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ butylacetate iso-butanol methyl isobutyl ketone 2-n-butoxy-1-ethanol isopropanol และ methyl ethyl ketone ปริมาตรชนิดละ 1 มล. ใส่รวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. เติม toluene จนถึงขีดปริมาตร

4.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ข้อ 4.1 คำนวณค่า response factor ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด บันทึกผลใน *ตารางที่ 3.2.3*

4.3 ฉีดสารตัวอย่าง หาปริมาณโดยวิธี % normalization ได้ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบโดยประมาณ บันทึกผลใน *ตารางที่ 3.2.3*

4.4 วิเคราะห์ซ้ำ ข้อ 4.2-4.3 โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ toluene, butylacetate iso-butanol methyl isobutyl ketone 2-n-butoxy-1-ethanol isopropanol และ methyl ethyl ketone ปริมาตรเท่ากับ หรือใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ของสารในองค์ประกอบของตัวอย่างที่ คำนวณได้จากข้อ 4.3

4.5 บันทึกผลการทดลองลงใน *ตารางที่ 3.2.4*

ตารางบันทึกผลการทดลอง

รายละเอียดเครื่องมือและสภาวะการวิเคราะห์

คอลัมน์ .....

แก๊สพา..... อัตราการไหล .....

อุณหภูมิช่องฉีดสาร ..... อุณหภูมิคอลัมน์ .....

ดีเทกเตอร์ ..... อุณหภูมิดีเทกเตอร์. .....

ตารางที่ 3.2.1 บันทึกผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และ ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ

สาร	รีเทนชันไทม์ (นาที)	จำนวนเพลต	ค่าการแยก	ความสมมาตร

ตารางที่ 3.2.2 บันทึกข้อมูลการหาความเที่ยงของพื้นที่พีกและรีเทนชันไทม์

ค่าที่วัด	ครั้งที่	สาร 1	สาร 2	สาร 3	สาร 4	สาร 5	สาร 6	สาร 7
พื้นที่พีก	1							
	2							
	3							
	เฉลี่ย							
	%RSD							
รีเทนชันไทม์	1							
	2							
	3							
	เฉลี่ย							
	%RSD							

สาร 1..... สาร 2.....

สาร 3..... สาร 4.....

สาร 5..... สาร 6.....

สาร 7..... สาร 8.....

ตารางที่ 3.2.3 บันทึกข้อมูลการหา response factor และ ปริมาณสารในตัวอย่างโดยประมาณ

สาร	response factor	พื้นที่พีก	ปริมาณสาร(เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 3.2.4 บันทึกผล การวิเคราะห์หาปริมาณสาร

สาร	response factor	พื้นที่พีก	ปริมาณสาร(เปอร์เซ็นต์)

การทดลองที่ 3.3
การหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทินเนอร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร
2. เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทินเนอร์
3. เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นของช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน

การทดลอง

ในกระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้เครื่องมือ (instrumental methods) ต้องทำการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่ให้สัญญาณสัมพันธ์กับความเข้มข้นเป็นเส้นตรง จึงจะได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่น ยกเว้นการใช้เครื่องมือบางชนิด หรือการวิเคราะห์สารบางชนิด ดังนั้นการวิเคราะห์สารโดยใช้เครื่องมือที่การตอบสนองของสัญญาณกับปริมาณสารเป็นเส้นตรง ต้องหาช่วงความเข้มข้นของสารที่สามารถให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (linear range)และ ทดสอบหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) จึงจะทำให้ผลการวิเคราะห์ทดสอบมีความน่าเชื่อถือ รายละเอียดของวิธีทดสอบอยู่ในภาคผนวก

หาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน ของการวิเคราะห์หาปริมาณทินเนอร์ที่ใช้สำหรับสีพ่นรถยนต์ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นใกล้เคียงที่กำหนดใน มอก.520-2527 ไม่ต่ำกว่า 6 ระดับความเข้มข้น เขียนกราฟมาตรฐาน หาค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) และทดสอบหาความเป็นเส้นตรง โดยการวิเคราะห์ซ้ำ ไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ คำนวณ RSD และ recovery หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

เครื่องมือ/อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 3.2

สภาวะการทดลอง

เหมือนการทดลองที่ 3.2

สารเคมี

เหมือนการทดลองที่ 3.2

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม ของ butyl acetate (สาร 1) iso-butanol (สาร 2) methyl isobutyl ketone (สาร 3) 2-n-butoxy-1-ethanol (สาร 4) isopropanol (สาร 5) methyl ethyl ketone (สาร 6) ความเข้มข้นต่างๆ 6 ระดับความเข้มข้นโดยใช้ปริมาตรสารมาตรฐานรายละเอียดตามตารางที่ 3.2 เติม toluene เป็นตัวทำละลาย จนปริมาตรครบ 1

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาตรของสารมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน

ระดับความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)						
	สาร 1	สาร 2	สาร 3	สาร 4	สาร 5	สาร 6	Toluene
1	20	10	20	10	10	10	920
2	40	20	40	20	20	20	840
3	50	40	50	40	40	40	740
4	100	50	100	50	50	50	600
5	150	100	150	100	100	100	300
6	200	150	200	150	150	150	00

ตัวอย่าง

ตัวอย่างทินเนอร์ที่ใช้สำหรับสีพ่นรถยนต์

วิธีทดลอง

1. เตรียมเครื่องมือ ตั้งสภาวะของเครื่องมือ รอจนเครื่องพร้อมใช้งาน
2. ฉีดสารที่เตรียมตามตารางที่ 3. 2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC เขียนกราฟมาตรฐาน คำนวณค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ หากค่าที่ได้ไม่อยู่ในช่วง 1- 0.995 เนื่องจากความเข้มข้นสูงเกินไปให้ตัดความเข้มข้นที่มีค่าสูงออก และคำนวณค่าอีกครั้ง จนได้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นอยู่ในช่วงที่ต้องการ บันทึกผลใน*ตารางที่ 3.3.1*
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ที่ความเข้มข้นใกล้จุดต่ำสุด ความเข้มข้นกลางช่วง และ ความเข้มข้นใกล้จุดสูงสุด โดยใช้ข้อมูลจากข้อ 2. บันทึกผลใน*ตารางที่ 3.3.2*
4. ฉีดสารเข้าเครื่อง เขียนกราฟระหว่างปริมาณสารที่วัดได้ (แกน y) กับ ปริมาณสารมาตรฐานที่เตรียม (แกน x)
5. เตรียมสารละลายตัวอย่างทินเนอร์ ที่เติมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 3 ระดับความเข้มข้น ในช่วงกราฟมาตรฐานที่เตรียมในข้อ 3 แต่ละความเข้มข้นเตรียม 7 ซ้ำ
6. ฉีดตัวอย่างทินเนอร์ และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเข้าเครื่อง อ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานข้อ 4. บันทึกผลใน*ตารางที่ 3.3.3*
7. คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณสารที่วัดได้ และ คำนวณปริมาณที่ได้กลับคืนหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกผลใน *ตารางที่ 3.3.4*

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 3.3.1 บันทึกช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน

สาร	C_{min}	C_{max}	r

ตารางที่ 3.3.2 ปริมาณสารที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน

สาร	ปริมาณสาร (ไมโครลิตร/มล.)		
	C1	C2	C3

ตารางที่ 3.3.3 ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่เติมลงในตัวอย่างและผลจากการวิเคราะห์

สาร	C1		C2		C3	
	C1add	C1exp	C2add	C2exp	C3add	C3exp

ตารางที่ 3.3.4 บันทึกผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง

สาร	RSD, %			recovery ,%		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3

C_{min} คือความเข้มข้นต่ำที่สุด

C_{max} คือความเข้มข้นสูงที่สุด

C1 คือความเข้มข้นระดับที่ 1

C2 คือความเข้มข้นระดับที่ 2

C3 คือความเข้มข้นระดับที่ 3

Cadd คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

Cexp คือผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

คือสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

บทที่ 4
อัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิตรี
(Ultraviolet Visible Spectrophotometry)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ โดยการใช้เครื่องมือวิเคราะห์สมัยใหม่มีหลายวิธี การหาปริมาณสารโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี เป็นวิธีที่นิยมกันมาก เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำ ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง วิธีการวิเคราะห์ง่าย เครื่องมือราคาไม่แพงนัก และใช้งานได้ง่าย การวิเคราะห์โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี แบ่งตามลักษณะของการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างแสงกับสาร ที่สำคัญมี 3 แบบคือ

1. การดูดกลืนแสง (absorption)
2. การคายคลื่นแสง (emission)
3. การวาวแสง (fluorescence)

การวิเคราะห์สารโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสงของโมเลกุลในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตหรือยูวี (ultraviolet) และวิสิเบิล (visible) อาศัยหลักการที่โมเลกุลของสารสามารถดูดกลืนแสงในช่วงยูวีหรือวิสิเบิล แล้วทำให้อิเล็กตรอนเลื่อนระดับพลังงาน (transition) จากสภาวะพื้น (ground state)ไปสู่สภาวะเร้า (excited state) สารที่ดูดกลืนแสงในช่วงนี้ ได้แก่

1. สารที่มีอิเล็กตรอนในซิกมา (σ) ออร์บิทัล ไพ (π) ออร์บิทัล และมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว
2. สารที่มีอิเล็กตรอนใน d และ f ออร์บิทัล
3. สารประกอบที่สามารถเกิดการถ่ายโอนประจุ (charge transfer) ได้แก่ สารประกอบเชิงซ้อนที่อะตอมกลาง และลิแกนด์ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันได้

การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์นั้น ใช้กฎของเบียร์ และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) กล่าวคือ แอบซอร์แบนซ์ (absorbance, A) แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร (concentration, C)

$$A = \varepsilon bC$$

A = แอบซอร์แบนซ์

ε = โมลาร์แอบซอปติวิตี

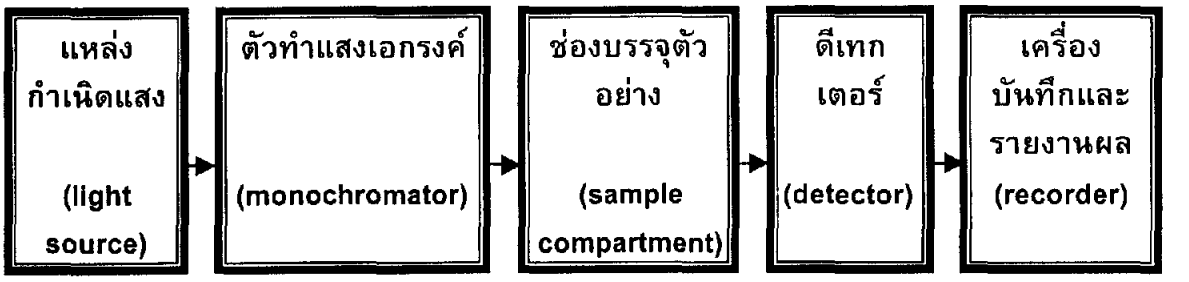
b = ความกว้างของตัวอย่างที่แสงผ่าน (ซม.)

C = ความเข้มข้น (โมลาร์)

สารตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องเตรียมให้เป็นสารละลายที่ใส ไม่มีความขุ่น ไม่มีตะกอน ไม่แยกชั้น และควรมีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.01 โมลาร์

4.1 องค์ประกอบของเครื่องยูวี –วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องยูวี –วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีส่วนประกอบที่สำคัญดังแสดงใน*รูปที่ 4.1*



รูปที่ 4.1 แสดงส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

แหล่งกำเนิดแสงจะทำหน้าที่ให้แสงแบบต่อเนื่องผ่านตัวทำแสงเอกรงค์เพื่อแยกและเลือกแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวที่เหมาะสมให้ผ่านสารตัวอย่าง ตัวอย่างจะดูดกลืนแสงส่วนหนึ่งไว้ แสงส่วนที่ผ่านสารตัวอย่างออกมาจะเข้าสู่ดีเทกเตอร์ซึ่งจะทำหน้าที่วัดสัญญาน และรายงานผลออกมาโดยเครื่องบันทึกและรายงานผล

ที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นหน้าที่โดยสังเขปของส่วนประกอบสำคัญต่าง ๆ ข้างต้น

4.1.1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) แหล่งกำเนิดแสงเป็นส่วนของเครื่องมือซึ่งทำหน้าที่ให้คลื่นแสงแบบต่อเนื่องที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 160 ถึง 2,500 นาโนเมตร แหล่งกำเนิดแสงที่นิยมใช้มีดังนี้

4.1.1.1 หลอดไฮโดรเจนหรือหลอดดิวเทอเรียม มีลักษณะเป็นหลอดแก้วที่มีหน้าต่าง (window) ทำด้วยควอตซ์ ภายในบรรจุแก๊สไฮโดรเจนหรือดิวเทอเรียมในสภาวะความดันต่ำ มีไส้หลอดเคลือบด้วยออกไซด์ และขั้วไฟฟ้าเป็นโลหะ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 40 โวลต์ ระหว่างขั้วไฟฟ้าและไส้หลอดจะเกิดการอาร์คขึ้น ทำให้ไส้หลอดร้อนและมีอิเล็กตรอนหลุดออกมา ซึ่งเมื่อชนกับโมเลกุลของแก๊สไฮโดรเจน หรือดิวเทอเรียม จะถ่ายเทพลังงานทำให้เกิดโมเลกุลในสภาวะเร้า อิเล็กตรอนในโมเลกุลของแก๊สไฮโดรเจนมีพลังงานสูงขึ้น และเมื่อกลับสู่สถานะปกติ จะคายแสงที่มีความยาวคลื่นเป็นช่วงกว้างแบบต่อเนื่อง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสำหรับหลอดไฮโดรเจนคือ

$$H_2 + E_e \rightarrow H_2^{*} \rightarrow H' + H'' + h\nu$$
$$E_e = E_{H2^*} = E_{H'} + E_{H''} + h\nu$$

E_{H2^*} = fixed quantized energy

E_e = พลังงานไฟฟ้าซึ่งถูกดูดกลืนโดยโมเลกุลของไฮโดรเจน

$E_{H'}$, $E_{H''}$ = พลังงานจลน์ของไฮโดรเจนอะตอม

ผลรวมของ $E_{H'}$ และ $E_{H''}$ มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง$E_{H2^{\cdot}}$ ดังนั้นค่า $h\nu$ จึงเปลี่ยนแปลงด้วย คลื่นแสงที่ได้จากหลอดชนิดนี้มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 160-375 นาโนเมตร

4.1.1.2 หลอดทังสเตน เป็นหลอดเช่นเดียวกับหลอดไฟฟ้า ประกอบด้วยไส้หลอดที่ทำด้วยลวดทังสเตน อยู่ในหลอดแก้วสุญญากาศ เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าทำให้ไส้หลอดร้อน จนอุณหภูมิสูงถึง 3,000 เคลวิน ไส้ทังสเตนจะแผ่รังสีออกมาเป็นคลื่นแสงแบบต่อเนื่อง ที่มีความยาวคลื่นในช่วง 350 - 2,500 นาโนเมตร มักมีการเติมไอของธาตุฮาโลเจน เช่น โบรมีน ไอโอดีน เข้าในหลอดปริมาณเล็กน้อยเพื่อยืดอายุการใช้งานของหลอด ในกรณีที่ใช้ไอโอดีนจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างไอโอดีนและทังสเตนในสภาวะแก๊สเกิด WI_2 ซึ่งสามารถจับอยู่ที่ไส้หลอด เมื่อเกิดการสลายตัว I_2 หลุดออกมา ทังสเตนจะเกาะติดที่ไส้หลอด

4.1.2 ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator) เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่แยก และเลือกคลื่นแสงเพื่อให้ได้แสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านเข้าสู่สารตัวอย่าง ตัวทำแสงเอกรงค์ประกอบด้วยช่องให้แสงผ่านเข้า (entrance slit) เลนส์หรือกระจกปริซึมหรือเกรตติง และช่องให้แสงผ่านออก (exit slit) สามารถพิจารณาคุณภาพของตัวทำแสงเอกรงค์ได้จากความบริสุทธิ์ของคลื่นแสง (spectral purity) ความสามารถในการแยก (resolution) และความสามารถในการรวมแสง (light gathering power) จะกล่าวพอสังเขปดังต่อไปนี้

4.1.2.1 ความบริสุทธิ์ของแสง คือแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว ไม่มีแสงความยาวคลื่นอื่นที่ไม่ต้องการปนมา แสงที่ไม่บริสุทธิ์นั้นเกิดจากการมีแสงความถี่อื่นปน (stray light) อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การกระเจิงแสงของอนุภาคในสารละลาย การสะท้อนที่ผิวภายใน และผิวของอุปกรณ์ต่างๆ เนื่องจากความไม่เหมาะสมของเครื่องมือเป็นต้น

4.1.2.2 ความสามารถในการแยก คือ ความสามารถที่จะแยกแสงที่มีความยาวคลื่นติดกัน เขียนแสดงความสัมพันธ์ได้ด้วยสมการ

$R = \lambda/\Delta\lambda$

R = ความสามารถในการแยก

λ = ค่าเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ติดกัน

$\Delta\lambda$ = ผลต่างความยาวคลื่นที่ติดกัน

ความสามารถในการแยกของเกรตติงขึ้นอยู่กับจำนวนร่องบนเกรตติง (N) และอันดับของการเลี้ยวเบน (diffraction ,n) ซึ่งแสดงด้วยสมการ

$R = nN$

ความสามารถในการแยกของปริซึมแปรผันโดยตรงกับความยาวของฐานปริซึม (b) และความสามารถในการ กระจาย ($dn/d\lambda$) ซึ่งแสดงด้วยสมการ

$R = b\ (dn/d\lambda)$

4.1.2.3 ความสามารถในการรวมแสง เป็นการเพิ่มความเข้มหรือกำลังของแสงที่เข้าสู่ดีเทกเตอร์ทำให้เพิ่มอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญานรบกวน (signal to noise ratio , S/N) ดังนั้นสำหรับในเครื่องมือจึงมีการเพิ่มกำลังของแสงโดยการใช้เลนส์รวมแสง ประสิทธิภาพในการรวมแสงของตัวทำแสงเอกรงค์จึงขึ้นอยู่กับสมบัติของเลนส์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กันดังสมการ

$f = F/d$

f = ความสามารถในการรวมแสง

F = ความยาวโฟกัส

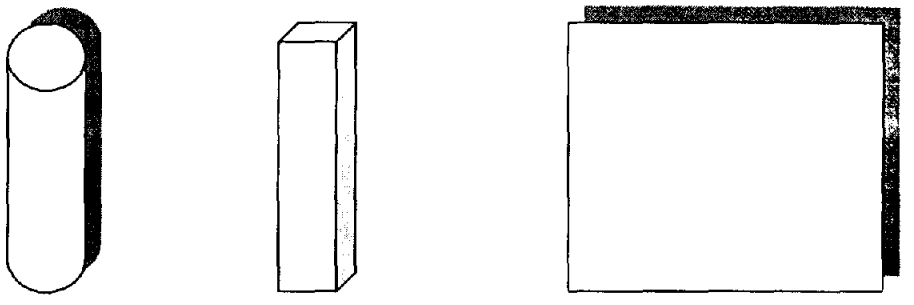
d = ความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของเลนส์

4.1.3 ช่องใส่เซลล์บรรจุตัวอย่าง (sample compartment) เป็นช่องสำหรับใส่เซลล์ที่บรรจุสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ตัวอย่างต้องเตรียมเป็นสารละลายโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม บรรจุในเซลล์ที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงที่ใช้งาน และมีขนาดรูปทรงที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีต้องมีสมบัติดังต่อไปนี้

1 ละลายสารตัวอย่างได้ดี
2 ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกับตัวอย่าง
3 ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง
4 ไม่ไวไฟหรือเป็นพิษจนเกินไป
5 ราคาถูกพอสมควร

ก่อนจะเลือกใช้ตัวทำละลาย ต้องตรวจดูค่าความยาวคลื่นโดยประมาณที่ตัวทำละลายมีค่าการส่งผ่านแสงเพียงร้อยละ 10 ของการส่งผ่านแสงของน้ำกลั่นบริสุทธิ์ วัดโดยใช้เซลล์กว้าง 1 ซม. เรียกว่า cut-off-point เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายเพื่อการวิเคราะห์ในช่วงยูวี ทำด้วยควอตซ์ หรือฟิวส์ซิลิกา ส่วนเซลล์ที่ใช้ในช่วงวิสิเบิล ทำด้วยแก้วหรือพลาสติก ลักษณะของเซลล์เป็นหลอดกลม หรือสี่เหลี่ยมมีความหนาของผนังเซลล์อยู่ในช่วง 0.1 - 0.2 ซม. ความกว้างขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งานเช่นความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ดังแสดงใน*รูปที่ 4.2* เซลล์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือเซลล์ที่มีความกว้าง 1 ซม. การเลือกเซลล์ พิจารณาจากค่าการส่งผ่านแสงของวัสดุที่ใช้ทำเซลล์ดังแสดงใน*รูปที่ 4.3* เซลล์ที่มีคุณภาพดี จะต้องมีผิวเรียบ ความหนาของผนังสม่ำเสมอ เกิดการสะท้อนแสงน้อยที่สุดหรือไม่เกิดเลย การทำความสะอาดเซลล์ ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น หรือตัวทำ

ละลายอินทรีย์ตามความเหมาะสม เช็ดผิวภายนอกด้วยกระดาษเช็ดเซลล์หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ



เซลล์ทรงกลม เซลล์ทรงสี่เหลี่ยมความกว้าง 1 และ 10 ซม.

รูปที่ 4.2 แสดงเซลล์รูปร่าง และขนาดต่างๆที่ใช้กับเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

4.1.4 ดีเทกเตอร์ (Detector) เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่ตรวจวัดกำลังของแสง โดยการเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้าซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ด้วยสมการดังนี้

$S = kP$

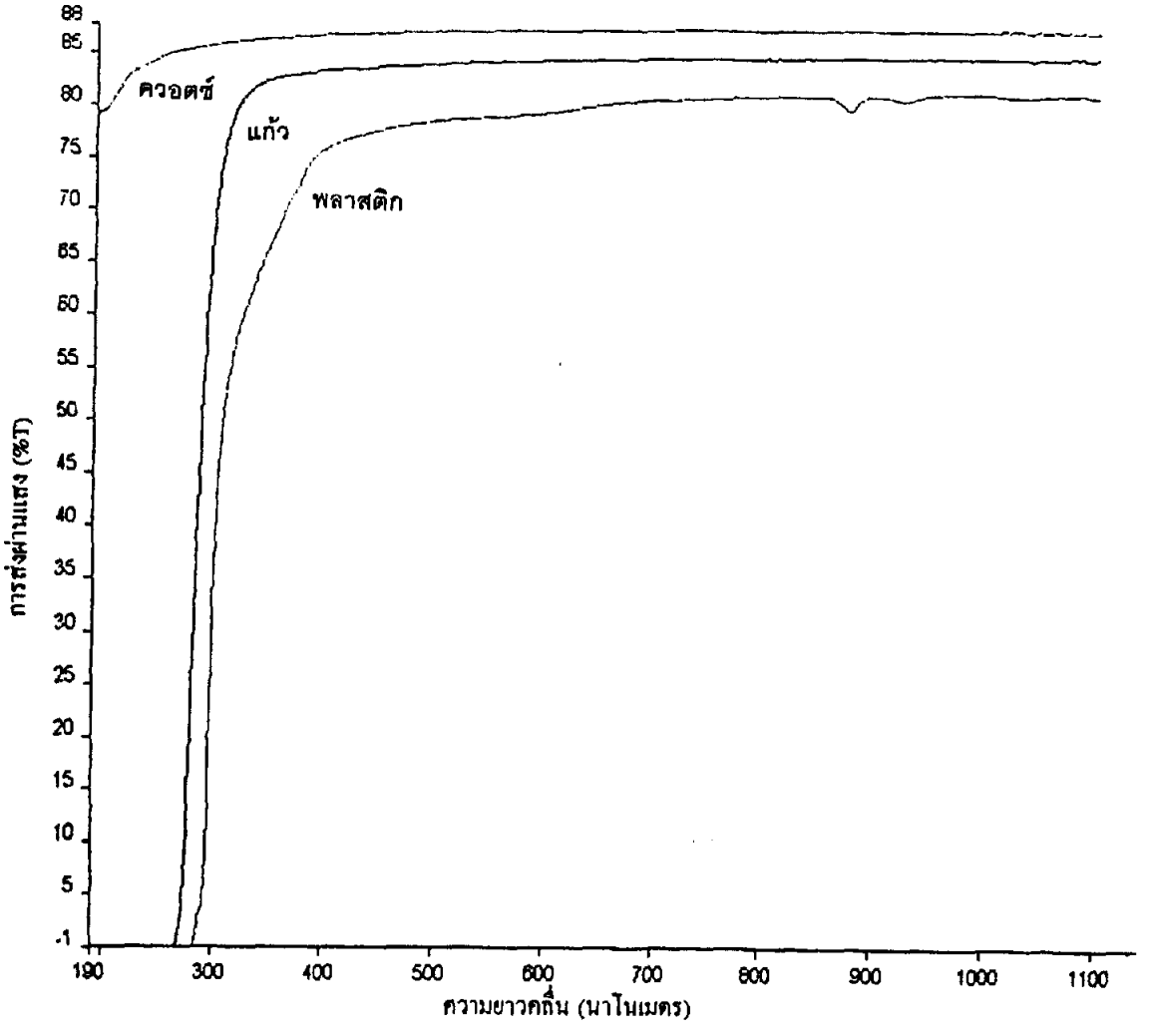
S = สัญญาณไฟฟ้า (กระแส ความต้านทาน และแรงเคลื่อนไฟฟ้า)

P = กำลังของแสง

k = ค่าคงที่ ขึ้นกับความไวของเครื่อง

ดีเทกเตอร์ ที่ดีจะต้องมีความสามารถตอบสนองต่อแสงในช่วงความยาวคลื่นกว้าง มีความไวต่อคลื่นแสงในเวลาสั้นดีเทกเตอร์ที่ใช้ในเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีหลายแบบคือ โฟโตวอลเตอิกเซลล์ (photovoltaic cell) โฟโตทิวบ์ (photo tubes) โฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์ (photomultiplier- tubes) เครื่องวัดกึ่งตัวนำ (semiconductor) ซิลิคอนไดโอด (silicon diode) vidicons และ silicon diode arrays สองชนิดหลังมีช่องสำหรับรับแสงหลายช่อง ดังนั้นจึงสามารถรับสัญญาณแสง และวัดพร้อม ๆ กันหลายความยาวคลื่นเรียก multi channel photon detector ในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดเฉพาะตัววัดบางชนิดเท่านั้น

4.1.4.1 โฟโตวอลเตอิกเซลล์ ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าเป็นแผ่นบางๆ ทำด้วยทองแดง หรือเหล็ก ด้านบนมีวัตถุกึ่งตัวนำทำจาก ซิลีเนียม หรือคอปเปอร์ออกไซด์ และชั้นบนสุดมีแผ่นโลหะบางโปร่งแสงทำจากโลหะทอง เงิน หรือตะกั่ว ต่อขั้วไฟฟ้าเข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณ ดังแสดงใน*รูปที่ 4.4* เมื่อแสงผ่านเข้าสู่เซลล์ถึงวัตถุกึ่งตัวนำ จะทำลายพันธะโควาเลนท์



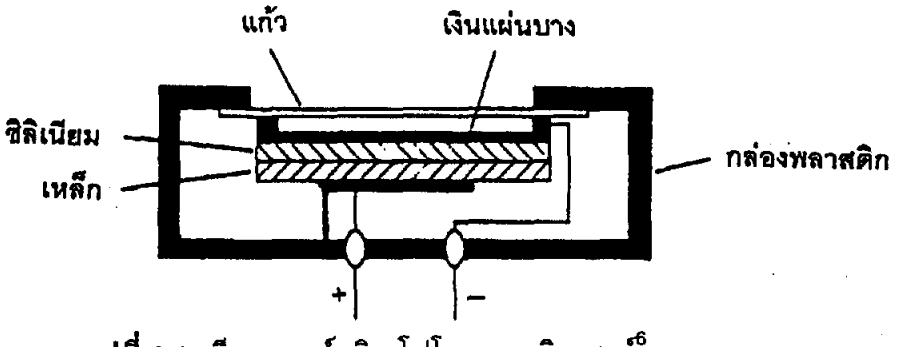
รูปที่ 4.3 แสดงการส่งผ่านแสงของเซลล์ 3 ชนิด
เซลล์พลาสติก
เซลล์แก้ว
เซลล์ควอตซ์

ของวัตถุกึ่งตัวนำ เกิดอิเล็กตรอนและประจุบวกขึ้น จากนั้นอิเล็กตรอนจะเคลื่อนเข้าสู่ขั้วไฟฟ้าด้านบน ส่วนประจุบวกเคลื่อนสู่ขั้วด้านล่าง ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้า ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณแสงที่เข้าสู่เซลล์

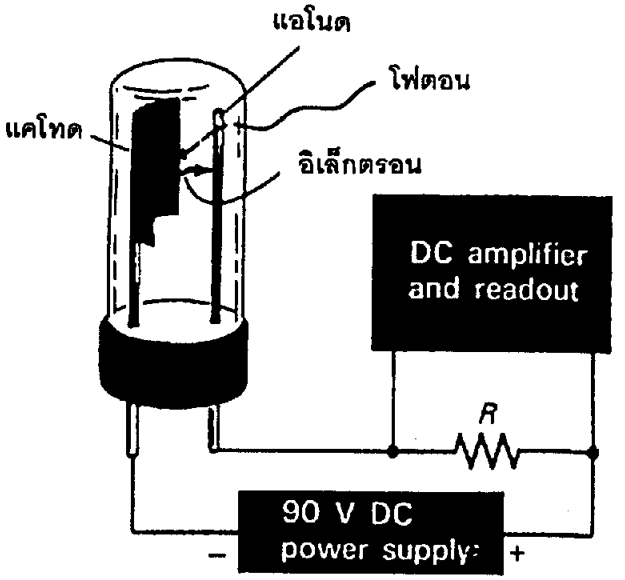
4.14.2 โฟโตทิวบ์ ประกอบด้วยขั้วแคโทดและแอโนดในหลอดสุญญากาศ ดังแสดงใน *รูปที่ 4.5* ที่ผิวของแคโทดเคลือบด้วยสารที่ไวต่อแสง เช่น โลหะผสม Na/K/Cs/Sb หรือ Ag/O/Cs เป็นต้น เมื่อแสงตกกระทบบนผิวของแคโทด จะเกิดอิเล็กตรอนขึ้น เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในปริมาณคงที่ ที่เหมาะสมจากภายนอก อิเล็กตรอนจะเคลื่อนเข้าสู่แอโนด ทำให้เกิดกระแส (photo current) ขึ้น ถ้าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่หลอดเป็นค่าสูงสุดแล้ว ปริมาณของกระแสที่เกิดจะขึ้นกับปริมาณของแสง

4.1.4.3 โฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์ มีหลักการคล้ายกับโฟโตทิวบ์ แต่มีไดโนด (dynode) 9-16 อัน ต่ออนุกรมกัน ดังแสดงใน*รูปที่ 4.6* ซึ่งมีไดโนด 9 ตัว ตัวแรกจะมีศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกมากกว่าแคโทด 90 โวลต์ ดังนั้น อิเล็กตรอนจากแคโทดจะถูกเร่งมาสู่ไดโนดตัวที่ 1 ทำให้เกิดอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นอีกหลายอิเล็กตรอน ไดโนดตัวที่ 2 จะมีศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกมากกว่าตัวที่ 1 90 โวลต์ จากนั้นก็จะเกิดเหตุการณ์ทำนองเดียวกันจนครบวงจร อิเล็กตรอนจากไดโนดตัวที่ 9 จึงเคลื่อนเข้าสู่ แอโนด ซึ่งกระบวนการผ่านไดโนด 9 ตัวนั้น ทำให้ปริมาณอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นถึง 10^6 - 10^7 เท่า สัญญาณที่วัดได้จึงมีความเข้มสูง

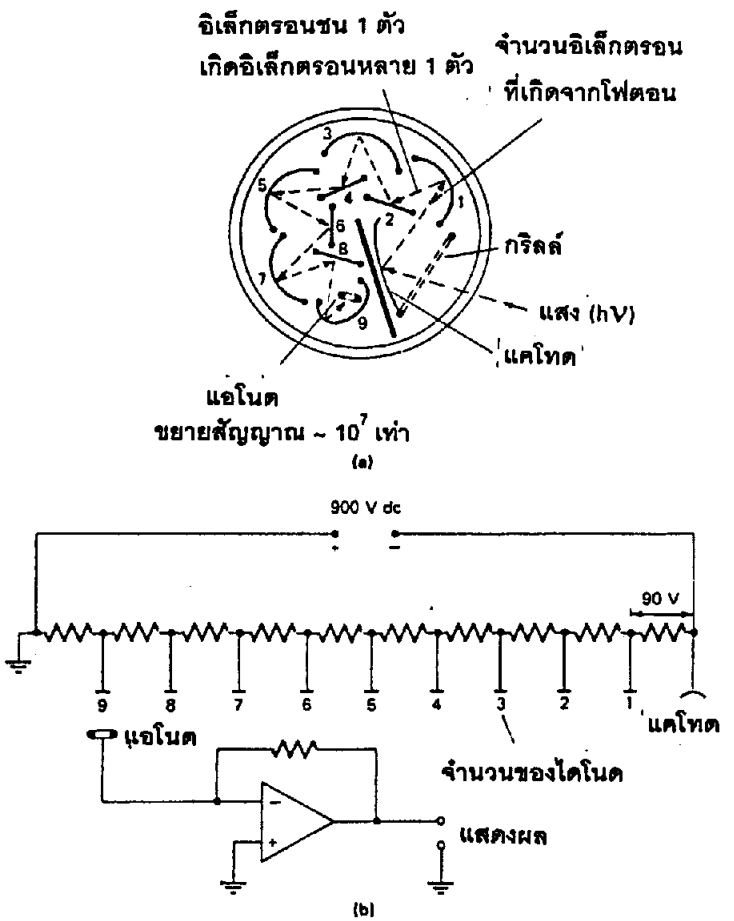
ข้อได้เปรียบของโฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์คือ มีความไวสูงต่อแสงในช่วง ยูวี-วิสิเบิล และมีการตอบสนองเร็ว ส่วนข้อเสียคือจะเกิด dark current



รูปที่ 4.4 ดีเทกเตอร์ชนิด โฟโตวอลเตอิกเซลล์[6]



รูปที่ 4.5 ดีเทกเตอร์ชนิด โฟโตทิวบ์ [6]



รูปที่ 4.6 ดีเทกเตอร์ชนิดโฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์ [6]

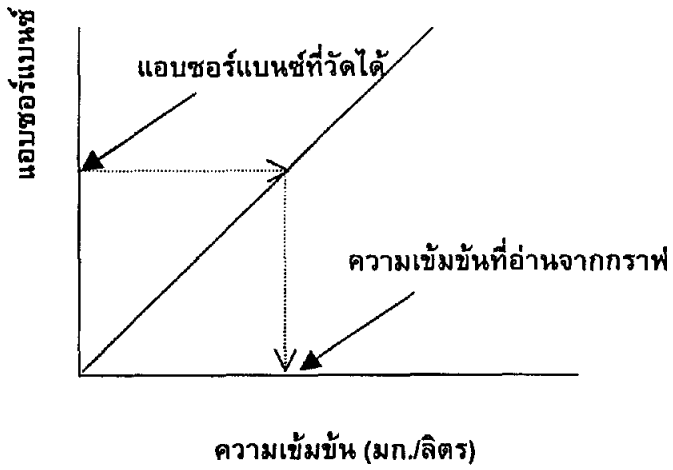
(a) แสดงภาพตัดขวาง

(b) แสดงวงจรไฟฟ้า

4.1.5 เครื่องบันทึกและรายงานผล (recorder / read out) การรายงานผลมีหลายแบบ เช่น แสดงเป็นตัวเลขที่หน้าเครื่อง บันทึกสเปกตรัมและพิมพ์ผล ประมวลผลข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ เป็นต้น สำหรับเครื่องมือที่ควบคุมการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ สามารถประมวลผล เขียนกราฟมาตรฐาน และอาจมีโปรแกรมสำหรับตรวจสอบคุณลักษณะของเครื่องมือ (instrument validation)

4.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงในช่วง ยูวีและวิสิเบิล ของโมเลกุลสาร ใช้วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐาน (external standard) ในการหาปริมาณสารในตัวอย่าง ต้องเตรียมกราฟจากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 – 5 ค่า นำมาวัด แอบซอร์แบนซ์ เขียนกราฟระหว่างแอบซอร์แบนซ์ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกนนอน) วัดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณสาร ได้ค่าแอบซอร์แบนซ์ นำมาหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน *ดังแสดงในรูปที่ 4.7*



รูปที่ 4.7 แสดงกราฟมาตรฐาน external standard

4.3 การบำรุงรักษาเครื่องมือ

การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทุกชนิด ผู้ใช้ต้องมีความรู้ในการบำรุงรักษาและแก้ปัญหาเบื้องต้น เพื่อให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากเกิดปัญหาที่ไม่สามารถแก้ไขได้ต้องติดต่อ ช่างมาซ่อมบำรุงทันที ข้อควรระวังในการใช้เครื่องมือ

4.3.1 ตรวจสอบระบบไฟฟ้าก่อนเสียบปลั๊ก ต้องใช้ไฟฟ้าที่มีความถี่เท่ากัน มีกำลังไฟฟ้าเพียงพอ และกระแสไฟฟ้านิ่ง ควรใช้เครื่องควบคุมแรงเคลื่อนไฟฟ้าให้คงที่ (stabilizer) หรือเครื่องควบคุมและสำรองไฟฟ้า (UPS)

4.3.2 เปิดเครื่องมือตามขั้นตอนที่แนะนำในคู่มือการใช้เครื่องอย่างเคร่งครัด

4.3.3 เครื่องมือต้องอยู่ในสภาพที่พร้อมใช้งาน สะอาด ไม่มีฝุ่นหรือสารเคมี

4.3.4 ตรวจสอบช่องใส่ตัวอย่างให้สะอาดอยู่เสมอ หากมีสารเคมีหกต้องรีบเช็ดทำความสะอาดทันที

4.3.5 หลีกเลี่ยงการทำให้โต๊ะวางเครื่องมือสั่นสะเทือน เพราะอาจทำให้ระบบแสงคลาดเคลื่อน

4.3.6 ปิดแหล่งกำเนิดแสงทันทีเมื่อเลิกใช้ เพื่อยืดอายุการใช้งาน

4.3.7 ปิดเครื่องมือเมื่อเลิกใช้งาน รอจนกระทั่งเครื่องมือเย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง ใช้ผ้าคลุมเครื่องมือเพื่อป้องกันฝุ่น

4.3.8 หากไม่ได้ใช้เครื่องมือต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ควรเปิดเครื่องเพื่อให้ส่วนต่างๆ ของเครื่องมือได้ทำงาน อย่างน้อย เดือนละครั้ง

4.3.9 ในกรณีที่ใช้เครื่องมือเป็นประจำ ควรกำหนดโปรแกรมการซ่อมบำรุง การสอบเทียบ และต้องปฏิบัติตามโปรแกรมที่กำหนด ไว้อย่างเคร่งครัด

การทดลองที่ 4.1
ตรวจสอบความแม่นของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
(Checking the Photometric and Wavelength Accuracy of a Spectrophotometer)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบและศึกษาวิธีใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. เพื่อศึกษาวิธีตรวจสอบความแม่นของการวัดความเข้มแสงและความยาวคลื่น

การทดลอง

การวิเคราะห์ทดสอบ/วิจัย โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่น (accuracy) สูง จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ได้รับการตรวจสอบ ให้อยู่ในสภาพใช้งานได้ดี (validation) และการเทียบมาตรฐาน (calibration) ให้ได้มาตรฐานตามคุณลักษณะของเครื่องมือที่ดี ผู้ใช้เครื่องมือจำเป็นต้องทำการตรวจสอบเครื่องมืออย่างสม่ำเสมอ หากพบปัญหาหรือไม่อยู่ในมาตรฐานที่กำหนดต้องดำเนินการปรับตั้งทันที พารามิเตอร์ที่จำเป็นต้องตรวจสอบสำหรับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีดังนี้

1. ความแม่นของการวัดความเข้มแสง (photometric accuracy) เป็นการวัดความแม่นในการวัดความเข้มแสงรายงานผลเป็นแอบซอร์แบนซ์ (absorbance , A) หรือการส่งผ่านแสง (transmittance , % T)
2. ความแม่นของการแสดงค่าความยาวคลื่น (wavelength accuracy) เป็นการวัดความแม่นของความยาวคลื่น รายงานผลเป็นสเปกตรัม ความสัมพันธ์ ของ สัญญาณ (แกนตั้ง) กับ ความยาวคลื่น (แกนนอน)

นอกจากนี้ยังมีการวัดค่าอื่น ๆ อีก หลายค่า ซึ่งจำเป็นต้องตรวจสอบในกรณีที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์/ทดสอบนั้นๆ ซึ่งไม่กล่าวรายละเอียดในที่นี้ แต่มีในเอกสารอ้างอิง ได้แก่

- แสงรบกวน (stray radiation)
- ความคงที่ของ baseline (baseline stability)
- ความเที่ยงของการวัดความเข้มแสง (photometric repeatability)
- ความเที่ยงของการแสดงค่าความยาวคลื่น (wavelength repeatability)
- สัญญาณรบกวน (noise level)

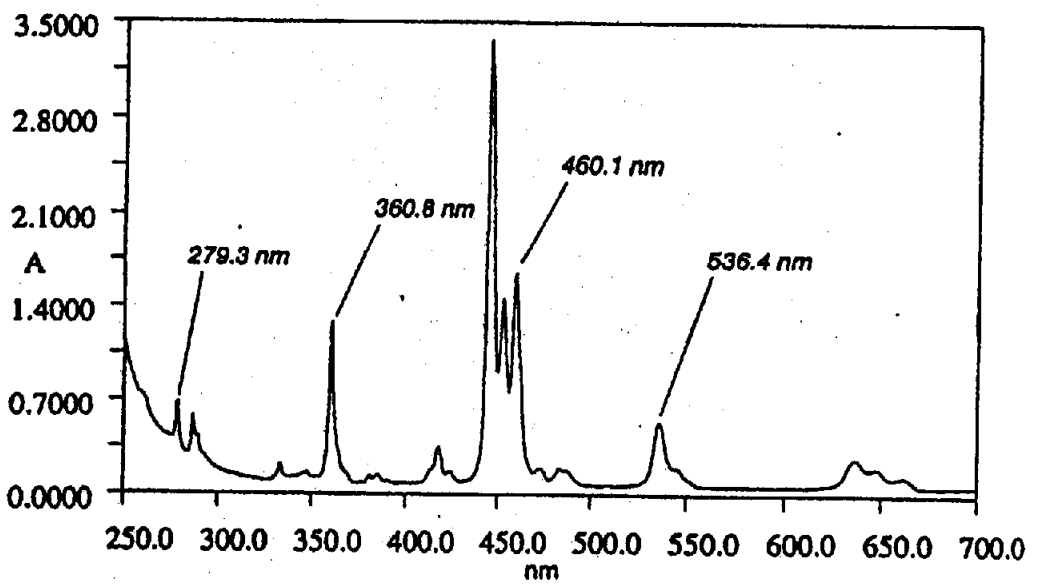
ตรวจสอบความแม่นของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยการวัดการดูดกลืนแสงของฟิลเตอร์มาตรฐาน (secondary calibration standards) ที่มีใบรับรองผลการสอบเทียบและสามารถสอบย้อนได้ถึงมาตรฐานระดับสากล ตัวอย่างฟิลเตอร์มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ Gray Glass Filters ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ Schott of Mainz , Germany มีค่ามาตรฐานดังแสดงในตาราง ที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงตัวอย่างข้อมูลค่าแอบซอร์แบนซ์ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆของฟิลเตอร์มาตรฐาน

Standard	Number	Originate Reading (absorbance) at the following wavelengths				
		440 nm*	546.1 nm	635 nm	1700 nm	2300 nm
G1	1486	0.3341	0.3012	0.3264	0.3735	0.2916
G2	1634	0.9864	0.9456	0.9403	0.5735	0.4198
G3	1049	0.5007	0.4767	0.4997	0.3919	0.2941

* nm คือหน่วยวัดความยาวคลื่นเป็น นาโนเมตร

ตรวจสอบความแม่นของความยาวคลื่น โดยใช้ Holmium Oxide Filters secondary calibration standards ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ ของ Corning ให้สเปกตรัมมาตรฐานดังแสดงใน*รูปที่ 4.8*



รูปที่ 4.8 แสดงสเปกตรัมของ Holmium Oxide มาตรฐาน

ฟิลเตอร์มาตรฐานที่ใช้ ในการตรวจสอบเครื่องมือ ต้องมีใบรับรองผลการสอบเทียบ และยังอยู่ในช่วงเวลาที่ใช้งานได้ ผลการวิเคราะห์ที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานในเอกสารรับรองการสอบเทียบซึ่งแนบมาพร้อมกับฟิลเตอร์มาตรฐาน ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.1 และใน *รูปที่ 4.8* หาผลต่าง นำผลต่างไปเปรียบเทียบกับข้อกำหนดมาตรฐานของเครื่องมือ หรือข้อกำหนดสำหรับการวิเคราะห์แต่ละเรื่อง หากผลต่างเกินข้อกำหนด จำเป็นต้องดำเนินการปรับตั้งเครื่องมือ หรือใช้ค่าแก้เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้อง

เครื่องมือ/อุปกรณ์

เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ฟิลเตอร์มาตรฐาน G1 G2 G3

ฟิลเตอร์มาตรฐาน Holmium Oxide

วิธีทดลอง

1. ตรวจสอบความแม่นของการวัดความเข้มแสง

1.1 เปิดเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ก่อนใช้งานไม่น้อยกว่า 30 นาที

1.2 ตั้งพารามิเตอร์ของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังนี้

ช่องแสง (slit)	2 นาโนเมตร
เวลาที่ตอบสนอง (response time)	5 วินาที
ค่าที่วัด (mode)	แอบซอร์แบนซ์

1.3 ตั้งความยาวคลื่น ดังรายละเอียดในตารางที่ระบุค่ามาตรฐานที่ความยาวคลื่นต่างๆ

1.4 ปรับให้เครื่องมืออ่านค่าศูนย์ (autozero) โดยให้ช่องใส่ตัวอย่างและช่องใส่สารอ้างอิงว่าง

1.5 วัดการดูดกลืนแสง ของฟิลเตอร์มาตรฐาน G1 G2 และ G3 ตามลำดับ บันทึกข้อมูลในตารางที่ 4.1.1 เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับค่ามาตรฐานในเอกสารรับรองการสอบเทียบที่แนบมา หาค่าความคลาดเคลื่อน ตรวจสอบค่าความคลาดเคลื่อนว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้หรือไม่ ตามที่กำหนดในมาตรฐานที่ผู้ใช้เครื่องมือใช้อ้างอิง

2. ตรวจสอบความแม่นของความยาวคลื่น

2.1 เปิดเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ก่อนใช้งานไม่น้อยกว่า 30 นาที

2.2 ตั้งพารามิเตอร์ของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังนี้

ช่องแสง	2 นาโนเมตร
ความเร็ว	30 นาโนเมตร/นาที
การกรองสัญญาณรบกวน(smooth)	0.2 นาโนเมตร
เวลาที่ตอบสนอง	0.2 วินาที
ช่วงการวัดค่า (data interval)	0.1 นาโนเมตร
ความยาวคลื่น	250-700 นาโนเมตร
ค่าที่วัด	แอบซอร์แบนซ์
วิธีวัดค่า	สแกน (scan)

2.3 ใส่ฟิลเตอร์มาตรฐาน Holmium Oxide ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง

2.4 บันทึกสเปกตรัม และบันทึกข้อมูลในตารางที่ 4.1.2เปรียบเทียบตำแหน่งพีกที่ได้จากการทดสอบ กับตำแหน่งพีกในสเปกตรัมมาตรฐาน ที่แนบมากับเอกสารรับรองการสอบเทียบ ตรวจสอบค่าความคลาดเคลื่อนว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้หรือไม่ ตามที่กำหนดในมาตรฐานที่ผู้ทดลองใช้อ้างอิง

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 4.1.1 บันทึกข้อมูลการหาความแม่นของการวัดความเข้มแสง

รายการ	แอบซอร์แบนซ์ของฟิลเตอร์มาตรฐาน (A)วัดที่ความยาวคลื่น(λ)								
	G1			G2			G3		
	λ_{440}	$\lambda_{546.1}$	λ_{635}	λ_{440}	$\lambda_{546.1}$	λ_{653}	λ_{440}	$\lambda_{546.1}$	λ_{635}
ค่ามาตรฐาน									
ค่าที่วัดได้									
ค่าความคลาดเคลื่อน									
เกณฑ์ยอมรับ									
สรุปผล									

ตารางที่ 4.1.2 บันทึกข้อมูลการหาความแม่นของความยาวคลื่นของฟิลเตอร์มาตรฐาน Holmium oxide

ลำดับที่	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)				
	λ_{std}	λ_{obs}	λ_{err}	λ_{acc}	สรุป
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

λ_{std} = ค่าความยาวคลื่นของฟิลเตอร์มาตรฐาน

λ_{obs} = ค่าความยาวคลื่นของฟิลเตอร์มาตรฐานที่วัดได้

λ_{err} = ค่าความยาวคลื่นที่คลาดเคลื่อน

λ_{acc} = ความยาวคลื่นที่ยอมรับให้แตกต่างจากค่าจริง

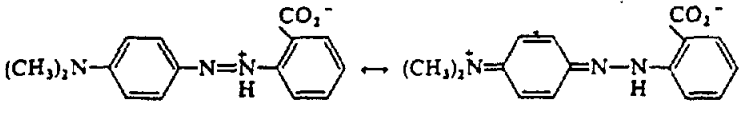
การทดลองที่ 4.2
การหาค่าคงที่การแตกตัวของเมธิลเรด
(Determination of the K_a value of methyl red)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์สารโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์สารดูดกลืนแสง 2 ชนิดที่ผสมรวมกัน
3. เพื่อศึกษาวิธีหาค่าคงที่ การแตกตัวของกรดอ่อนโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง

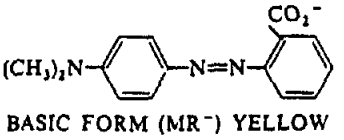
การทดลอง

เมธิลเรด (MR) เป็นกรดอ่อน สารละลายของ เมธิลเรดในน้ำหรือน้ำผสมเอทานอล (ethanol) อยู่ในรูปกรดกับคู่เบสที่มีสีที่แตกต่างกัน จึงมีประโยชน์โดยนำมาใช้เป็น อินดิเคเตอร์ในการไทเทรตเรื่องกรด เบส การหาค่าคงที่การแตกตัวของ MR ใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสง เนื่องจากเมธิลเรดในรูปกรดเขียนแทนด้วย HMR และ เมธิลเรดรูปเบสเขียนแทนด้วย MR^- ดูดกลืนแสงได้ดีมาก และดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ดังแสดงในสเปกตรัม *รูปที่ 4.9* การแตกตัวของ เมธิลเรดแสดงโดยปฏิกิริยาเคมี และสมการทั่วไปดังนี้



ACID FORM (HMR) RED

$HO^- \downarrow\uparrow H^+$



BASIC FORM (MR^-) YELLOW

$$HMR \longleftrightarrow H^+ + MR^- \qquad (1)$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[MR^-]}{[HMR]} \qquad (2)$$

$$pK_a = -\log K_a \qquad (3)$$

HMR = methyl red ในรูปกรด มีสีแดง

MR^- = methyl red ในรูปเบส มีสีเหลือง

K_a = ค่าคงที่การแตกตัวของกรด

การหาค่าคงที่การแตกตัวของกรดอ่อนโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง ต้องเตรียมสารละลายของเมธิลเรดให้มี พีเอช (pH) ในช่วง 4 - 6 วัดพีเอชให้ได้ค่าที่แน่นอน นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ยูวี - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาความเข้มข้นของ HMR และMR^- แทนค่าลงในสมการ (2) หาค่า pK_a และ K_a ตามลำดับ

การหาความเข้มข้นของ HMR และ MR^- โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มี 3 ขั้นตอนคือ

1. หาความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λ_{max}) โดยการสแกน สารละลาย HMR ได้ λ_A และสารละลาย MR^- ได้ λ_B
2. เตรียมกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

   2.1 กราฟมาตรฐานของ HMR ที่ ความยาวคลื่น λ_A และ λ_B

   2.2 กราฟมาตราฐานของ MR^- ที่ λ_A และ λ_B

   ได้กราฟมาตรฐานเป็นกราฟเส้นตรงจำนวน 4 เส้น ดังแสดงใน *รูปที่ 4.10*
3. หาปริมาณของ HMR และ MR^- ที่ผสมรวมกันอยู่ในสารละลายที่ทราบพีเอชแล้ว การหาปริมาณ ใช้กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต ดังสมการ

$$A_A = d_{A.HMR}[HMR] + d_{A.MR^-}[MR] \quad (4)$$

$$A_B = d_{B.HMR}[HMR] + d_{B.MR^-}[MR] \quad (5)$$

A_A = แอบซอร์แบนซ์ของสารผสมที่ λ_A

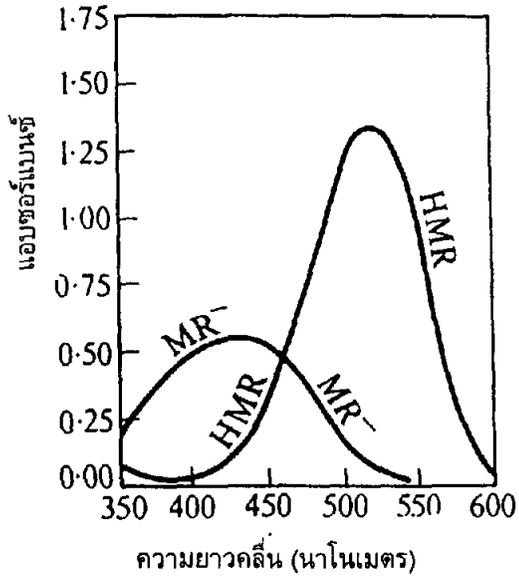
A_B = แอบซอร์แบนซ์ของสารผสมที่ λ_B

$d_{A.HMR}, d_{A.MR^-}$= ความชันของกราฟมาตรฐานของ HMR และ MR^- ตามลำดับวัดที่ความยาวคลื่นλ_A

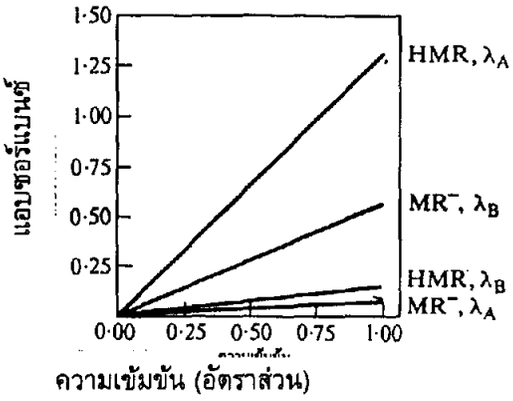
$d_{B.HMR}, d_{B.MR^-}$= ความชันของกราฟมาตรฐานของ HMR และ MR^- ตามลำดับวัดที่ความยาวคลื่นλ_B

สแกนหา λ_A และ λ_B ของสารละลาย HMR และสารละลาย MR^-ตามลำดับ เตรียมสารละลาย HMR โดยปรับพีเอชของสารละลาย ให้เท่ากับ 2 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเตรียมสารละลาย MR^- โดยปรับพีเอชของสารละลาย ให้เท่ากับ 8 ด้วย สารละลายโซเดียมอาซีเทต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ นำสารละลาย HMR และ MR^- ไปสแกนเพื่อหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุด เตรียมกราฟมาตรฐานของ สารละลาย HMR และ MR^- ความเข้มข้น 0.8 0.5 และ 0.2 เท่าของความเข้มข้นดั้งต้นตามลำดับ นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_A และ λ_B หาความชันของกราฟมาตรฐานของ HMR และ MR^- ที่ความยาวคลื่น λ_A และ λ_B

ส่วนการหาปริมาณของ HMR และ MR^- ในสารละลายผสมนั้นใช้วิธีเตรียมสารละลายให้มีพีเอช ในช่วง 4-6 โดยใช้สารละลายอาซีเทตบัฟเฟอร์ นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ λ_A และ λ_B คำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้สมการ (4) และ (5) แทนค่าความเข้มข้น และพีเอชลงในสมการที่ (2) เพื่อหา pK_a และ K_a ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 แสดงสเปกตรัมของ HMR และ MR^- [10]



รูปที่ 4.10 แสดงกราฟมาตรฐานของ HMR และ MR^- วัดที่ λ_A และ λ_B [10]

เครื่องมือ/อุปกรณ์

ยูวี - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

พีเอชมิเตอร์

ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 100 และ 250 มล.

ปิเปตวัดปริมาตรขนาด 1 5 10 และ 25 มล.

กระบอกตวง ขนาด 50 มล.

บีกเกอร์ ขนาด 50 100 250 มล.

เซลล์ทำด้วยแก้วแบบสี่เหลี่ยมกว้าง 1 ซม.

สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

สารเคมีชั้นคุณภาพรีเอเจนต์

1. โซเดียมอาซีเทตความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ ชั่งโซเดียมอาซีเทต หนัก 0.328 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น คนจนของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
2. โซเดียมอาซีเทตความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ชั่งโซเดียมอาซีเทต หนัก 0.205 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นคนจนกระทั่งของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
3. กรดอาซีติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้ปิเปตดูด กรดอาซีติกความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้ว 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
4. กรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ใช้ปิเปตดูด กรดอาซีติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จากข้อ 3 ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
5. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้ปิเปตดูด กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้วปริมาตร 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
6. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ใช้ปิเปตดูด กรดไฮโดรคลอริกจากข้อ 5 ปริมาตร 25 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
7. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบและวิธีเตรียม

1. สารละลายเมธิลเรดความเข้มข้น0.2 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง เมธิลเรด 0.10 กรัมละลายในเอทานอล ปริมาตร 30 มล. คนจนกระทั่งของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
2. สารละลายเมธิลเรดความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตสารละลาย เมธิลเรดจากข้อ 2.1 มา ปริมาตร 5 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมเอทานอล ปริมาตร 50.มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
3. เตรียมสารละลายเมธิลเรดในรูปกรด HMR ความเข้มข้นประมาณ 0.001 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปิเปตดูดสารละลายเมธิลเรดความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
4. เตรียมสารละลายเมธิลเรดในรูปเบส MR$^-$ ความเข้มข้นประมาณ 0.001 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปิเปตดูดสารละลายเมธิลเรดความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล. เติมสารละลายโซเดียมอาซีเทต ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ ปริมาตร 25 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

5. เตรียมสารละลาย HMR ความเข้มข้น 0.8 0.5 และ 0.2 เท่าของสารละลาย HMR เข้มข้นประมาณ 0.001 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย HMR ข้อ 3 ปริมาตร 40 25 และ 10 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. จำนวน 3 ใบ ตามลำดับ เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จนถึงขีดปริมาตร
6. เตรียมสารละลาย MR^- ความเข้มข้น 0.8 0.5 และ 0.2 เท่าของสารละลาย MR เข้มข้น โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย MR^- จากข้อ 2.4 ปริมาตร 40 25 และ 10 มล ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มล. จำนวน 3 ใบ ตามลำดับ เติมสารละลายโซเดียมอาซีเทต ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จนถึงขีดปริมาตร
7. เตรียมสารละลายตัวอย่างเมธิลเรดที่อยู่ในรูปของ HMR และ MR^- โดยเตรียมสารละลายให้มีพีเอชต่าง ๆ ในช่วง 4-6 โดยใช้สารละลายชนิดและปริมาตรดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. จำนวน 4 ขวด

ตารางที่ 4.2 รายละเอียดสารชนิดและปริมาตรต่าง ๆที่เตรียมสารละลายเมธิลเรดในรูปกรดและเบส

สาร	ปริมาตร (มล.)			
	1	2	3	4
สารละลายมาตรฐานเมธิลเรด 0.01 เปอร์เซ็นต์	10.0	10.0	10.0	10.0
สารละลายโซเดียมอาซีเทตความเข้มข้น 0.04 โมลาร์	25.0	25.0	25.0	25.0
กรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 โมลาร์	50.0	25.0	10.0	5.0
น้ำกลั่น (จนถึงขีดปริมาตร)	15.0	40.0	55.0	60.0

วิธีทดลอง

1. นำสารละลาย HMR และ MR^- ความเข้มข้นประมาณ 0.001 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ 3 และข้อ 4 ไปสแกนเพื่อหาความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงได้มากที่สุด(λ_{max})บันทึกผลในตารางที่ 4.2.1 เป็น λ_A และ λ_B ตามลำดับ
2. สารละลายมาตรฐาน HMR และ MR^- จากข้อ 5 และข้อ 6 นำไปวัดค่าแอบซอร์แบนซ์ที่ 2 ความยาวคลื่นคือ λ_A และ λ_B บันทึกผลในตารางที่ 4.2.2
3. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับแอบซอร์แบนซ์ (แกนตั้ง) ได้กราฟมาตรฐานจำนวน 4 กราฟ หาความชันของกราฟบันทึกผลในตารางที่ 4.2.3
4. สารละลายจากเมธิลเรดที่เตรียมจากข้อ 7 จำนวน 4 ขวด นำไปวัดพีเอช และวัดแอบซอร์แบนซ์ ที่ความยาวคลื่น λ_A และ λ_B บันทึกผลในตารางที่ 4.2.4
5. คำนวณหาความเข้มข้นของ HMR และ MR^- ในสารละลายทั้ง 4 ขวด โดยใช้สมการที่ (4) และ (5) บันทึกผลในตารางที่ 4.2.4
6. คำนวณหาค่าคงที่การแตกตัวของเมธิลเรด pK_a และ K_a โดยใช้สมการที่ (2)และ(3)

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 4.2.1 บันทึกข้อมูลรายละเอียดของสารละลายเมธิลเรดในรูปกรดและรูปเบส

สารละลาย	สี	pH	λ_{max}
HMR			
MR^-			

ตารางที่ 4.2.2 บันทึกข้อมูลการเตรียมกราฟมาตรฐาน

สารละลาย	ความเข้มข้น (จำนวนเท่าของค่าเริ่มต้น)	แอบซอร์แบนซ์ (A)	
		λ_A	λ_B
HMR	0.2		
	0.4		
	0.8		
MR^-	0.2		
	0.4		
	0.8		

ตารางที่ 4.2.3 บันทึกค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

สารละลาย	ความชัน	
	λ_A	λ_B
HMR		
MR^-		

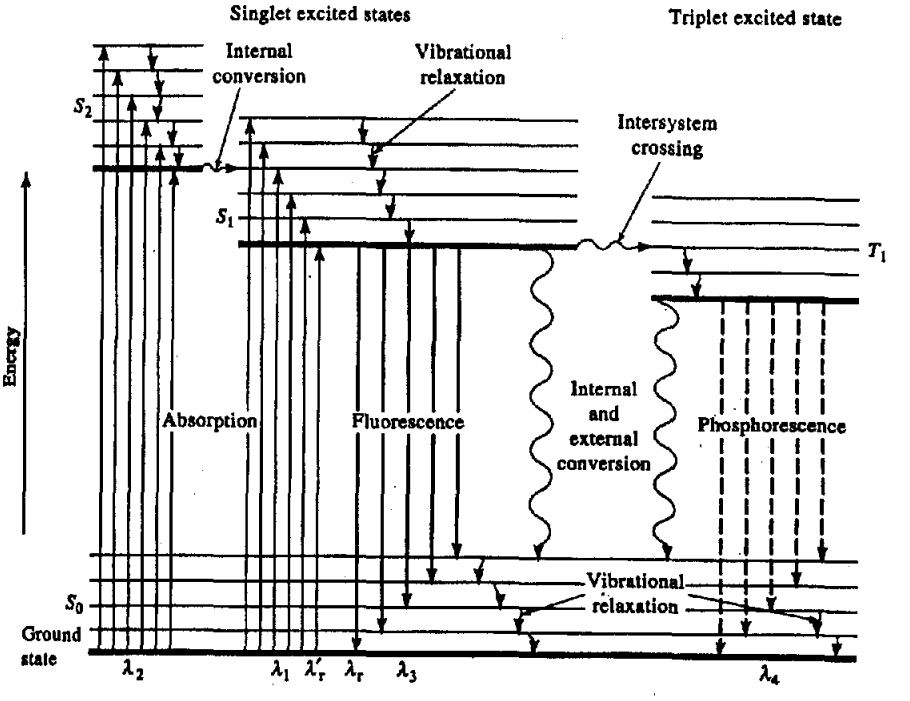
ตารางที่ 4.2.4 บันทึกข้อมูลการวัดสารละลายตัวอย่าง

สารละลาย	pH	แอบซอร์แบนซ์ (A)		ความเข้มข้น	
		λ_A	λ_B	HMR	MR^-
1					
2					
3					
4					

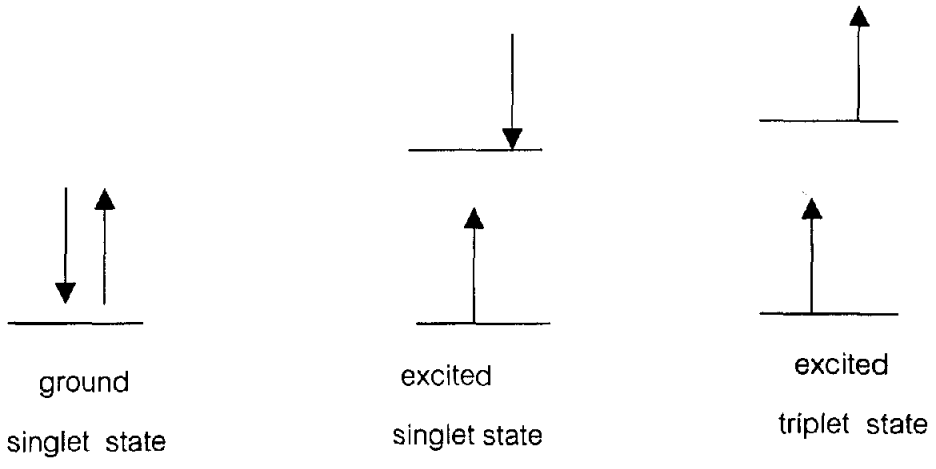
สรุปผล ค่าคงที่การแตกตัว = ...

บทที่ 5
โมเลกุลาร์ลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรมิตรี
(Molecular Luminescence Spectrometry)

การวิเคราะห์สารโดยวิธีวัดการวาวแสงของโมเลกุล ใช้หลักการที่โมเลกุลของสารดูดกลืนแสงแล้วทำให้อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลเลื่อนระดับพลังงานจากสถานะพื้น (ground state) ไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงขึ้น เรียกว่าสถานะกระตุ้น (excited state) อิเล็กตรอนในสถานะกระตุ้นไม่เสถียร ต้องลดพลังงานเพื่อกลับสู่สถานะพื้นภายในเวลารวดเร็ว กลไกของการกลับสู่สถานะพื้นเกิดได้หลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและสิ่งแวดล้อมของโมเลกุล การวาวแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) และการวาวแสงฟอสฟอเรสเซนซ์ (phosphorescence) เป็นขั้นตอนหนึ่งที่เกิดขึ้นในกระบวนการคายพลังงาน *ดังแสดงในรูปที่ 5.1* การเกิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ เป็นการเลื่อนระดับพลังงานจากสถานะกระตุ้น (S_2) มาสู่ สถานะพื้น (S_0) เกิดขึ้นภายในเวลาสั้น 10^{-12} – 10^{-9} วินาที อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน S_0 ,S_1 และ S_2 มีการจัดสปินในทิศทางตรงกันข้าม เรียกว่า singlet state (S) หากอิเล็กตรอนจัดสปินในทิศทางเดียวกัน เกิดสภาวะ triplet state (T) *ดังแสดงในรูปที่ 5.2* การเลื่อนระดับพลังงานของอิเล็กตรอน จากสถานะกระตุ้น (T) มาสู่สถานะพื้น (S_0) ให้แสงแบบฟอสฟอเรสเซนซ์ เกิดขึ้นในเวลาประมาณ 10^{-8} วินาที ซึ่งช้ากว่าการเกิดแสงฟลูออเรส เซนซ์



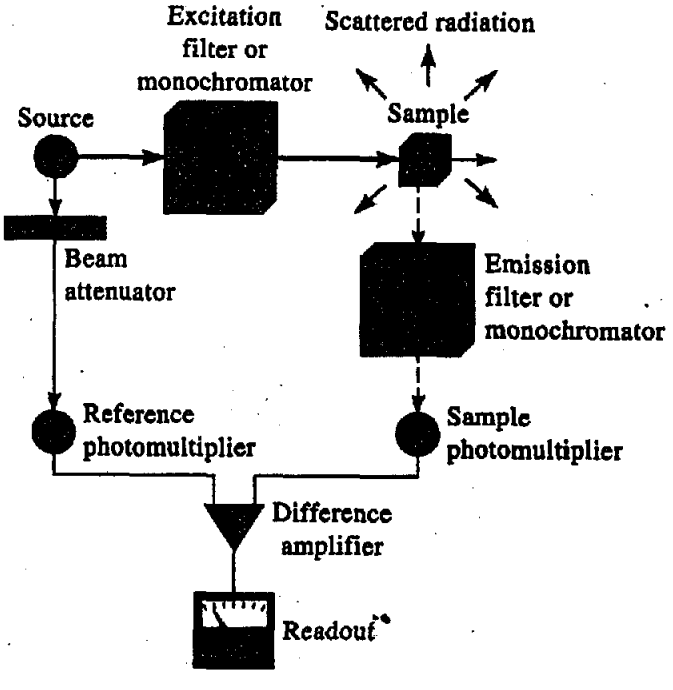
รูปที่ 5.1 แสดงกลไกการคายพลังงานของโมเลกุลเพื่อเลื่อนระดับพลังงานสู่สถานะพื้น[6]



รูปที่ 5.2 แสดงการจัดสปินของอิเล็กตรอนแบบ singlet state และ triple state[6]

5.1 ส่วนประกอบของสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

เครื่องมือที่ใช้วัดการวาวแสงเรียกว่า โฟโตฟลูออโรมิเตอร์ หรือ สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ มีรายละเอียด*ดังแสดงในรูปที่ 5.3*



รูปที่ 5.3 แสดงเครื่องมือสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์[6]

5.1.1 แหล่งกำเนิดแสง (light source) ให้แสงแบบต่อเนื่อง (continuous radiation) ต้องให้แสงที่มีความเข้มสูง แหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ ได้แก่ หลอดเมอร์คิวรี (mercury vapor lamps) หลอดซีนอน (xenon – arc lamp) และแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ (lasers)

- หลอดเมอร์คิวรี ให้แสงที่มีความเข้มสูง ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ได้แก่ 254 302 313 546 578 691 และ 773 นาโนเมตร แหล่งกำเนิดแสงแบบนี้เหมาะสำหรับเครื่องมือที่ใช้ฟิลเตอร์เป็นอุปกรณ์เลือกแสง แต่มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์สารบางชนิด ที่ใช้แสงในช่วงความยาวคลื่นอื่น ๆ นอกจากความยาวคลื่นที่กล่าวแล้วข้างต้น

- หลอดซีนอน นิยมใช้มากที่สุด ให้คลื่นแสงแบบต่อเนื่องที่ความยาวคลื่นในช่วง 300 – 1300 นาโนเมตร หลอดซีนอน ต้องแหล่งจ่ายไฟฟ้า (power supply) ที่มีกำลังสูง สามารถจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงขนาด 5 – 20 แอมแปร์ ที่ความต่างศักย์ 15 – 30 โวลต์

- แสงเลเซอร์ เป็นแสงที่มีความเข้มสูง นิยมใช้ในเครื่องมือที่วัดสารที่มีปริมาตรน้อย เช่น ดีเทกเตอร์ของเครื่อง HPLC หรือใช้วัดตัวอย่างในระยะไกล เช่น การตรวจวัดสารในร่างกาย

5.1.2 ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator) เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่ แยกและเลือกแสงเพื่อให้ได้แสงที่มีความยาวคลื่นแคบมากๆ เรียกว่าแสงความยาวคลื่นเดียว (monochromatic light) ผ่านเข้าสู่สารตัวอย่าง และเข้าสู่ดีเทกเตอร์ ตัวทำแสงเอกรงค์ ในเครื่อง สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ มี 2 ชุด อยู่ด้านหน้าและด้านหลังช่องใส่สารตัวอย่าง ชุดที่อยู่ด้านหน้าของช่องใส่ตัวอย่าง ทำหน้าที่เลือกแสง ให้เหมาะสม ที่จะทำให้โมเลกุลของสารดูดกลืนแสงแล้วให้เกิดอิเล็กตรอนในสภานะกระตุ้น ชุดที่อยู่ด้านหลังช่องใส่ตัวอย่างทำหน้าที่เลือกแสงที่คายออกมาจากโมเลกุลเนื่องจากการเลื่อนระดับลงมาสู่สถานะพื้น เพื่อส่งไปวัดที่ ดีเทกเตอร์ต่อไป รายละเอียดอื่น ๆ เหมือนกับตัวทำแสงเอกรงค์ ที่ใช้ในเครื่อง ยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งกล่าวแล้วในบทก่อน

5.1.3 ช่องใส่เซลล์บรรจุตัวอย่าง (sample compartment) ใช้สำหรับใส่เซลล์ที่บรรจุสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัด เซลล์ทำด้วยวัสดุที่ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงใช้งาน ได้แก่ ควอตซ์ ลักษณะของเซลล์ขนาดมาตรฐานเป็นทรงลูกบาศก์ขนาดความกว้าง 1 ซม. ผนังเซลล์มีคุณสมบัติเหมือนกันทั้ง 4 ด้าน เพราะแสงต้องผ่านทั้ง แนวตรงและแนวตั้งฉากกับแหล่งกำเนิดของแสง จึงมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ใช้ในเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งอีก 2 ด้านสามารถใช้วัสดุที่ไม่เหมือนกัน หรือมีลักษณะเป็นฝ้า

5.1.4 ดีเทกเตอร์ (detector) ทำหน้าที่วัดความเข้มแสงที่ออกจากสารตัวอย่างแล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า แสงที่ปล่อยออกมาจากตัวอย่างมีความเข้มต่ำ จึงจำเป็นต้องใช้ดีเทกเตอร์ที่มีสภาพไว (sensitivity) สูง ดีเทกเตอร์ที่ใช้ ได้แก่ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ และโฟโตไดโอด รายละเอียดการทำงานเหมือนกับดีเทกเตอร์ที่ใช้ในเครื่องยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แต่มีความพิเศษที่ต้องมีสภาพไวสูงกว่ามาก

5.1.5 เครื่องบันทึกและรายงานผล ทำหน้าที่ในการรับสัญญาณไฟฟ้า แล้วทำหน้าที่รายงานผล เป็นตัวเลข หรือ กราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณกับความเข้มข้น หรือความเข้มของสัญญาณกับความยาวคลื่นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน ในปัจจุบันเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มักควบคุมการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ ดังนั้นคอมพิวเตอร์จึงทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเครื่องมือส่วนต่าง ๆ เช่น แหล่งกำเนิดแสง ตัวทำแสงเอกรงค์ ดีเทกเตอร์ รวมทั้งการประมวลผลและรายงานผลออกทางเครื่องพิมพ์

5.2 การประยุกต์ใช้งาน

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ นำมาใช้ในการวิเคราะห์สารหาปริมาณสารในตัวอย่าง โดยใช้กฎของเบียร์และเลมเบิร์ตมาประยุกต์ใช้ดังนี้

$$F = K'(P_o - P) \quad (1)$$

F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์

P_o = ความเข้มของแสงที่ตกกระทบตัวอย่าง

P = ความเข้มแสงที่ส่งผ่านหลังจากผ่านสารตัวอย่างที่มีความกว้าง b

K′ = ค่าคงที่

จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต

$$P/P_o = 10^{-\varepsilon bc} \quad (2)$$

ε = โมลาร์แอบซอร์พติวิตี ของโมเลกุลสารที่วิเคราะห์

จากสมการ (1) , (2)

$$F = K'P_o(1-10^{-\varepsilon bc}) \quad (3)$$

$$F = 2.303\, K'\varepsilon bc\, P_o \quad (4)$$

ถ้า P_o เป็นค่าคงที่

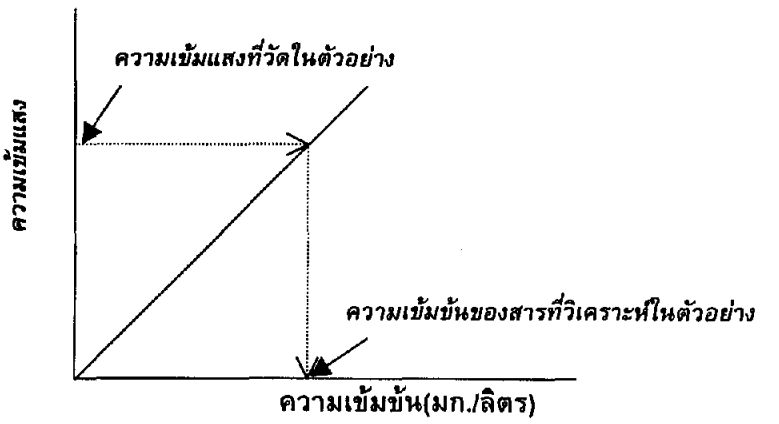
$$F = KC \quad (5)$$

ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร

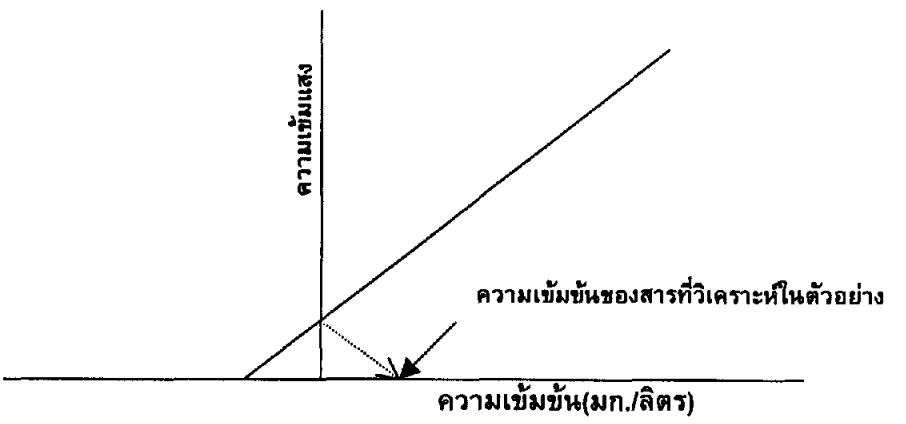
การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีวัดความวาวแสง ใช้วิธีการวัดเทียบกับกราฟมาตรฐาน (external standard) และการเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง (standard addition)

5.2.1 การหาปริมาณโดยวิธีเทียบกับกราฟมาตรฐาน ต้องเตรียมกราฟจากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 – 5 ค่า นำมาวัดความเข้มแสง เขียนกราฟระหว่างความเข้มแสง (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกนนอน) วัดสารละลายตัวอย่างได้ค่าความเข้มแสง นำมาหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน *ดังแสดงในรูปที่ 5.4*

5.2.2 การหาปริมาณสารโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยแบ่งสารละลายตัวอย่างปริมาตรเท่ากัน 3-5 ส่วน เติมสารละลายมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกันลงในสารละลายตัวอย่าง ทำให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากัน นำสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานมาวัดความเข้มแสง เขียนกราฟระหว่างความเข้มแสง (แกนตั้ง) กับความเข้มข้น/ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน หาปริมาณของสารที่วิเคราะห์ในสารละลายตัวอย่าง ได้จากการลากเส้นจากจุดตัดแกน Y มายังแกน X *ดังแสดงในรูปที่ 5.5*



รูปที่ 5.4 แสดงกราฟมาตรฐานแบบ external standard



รูปที่ 5.5 แสดงกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์วิธี standard addition

นอกจากนี้การหาปริมาณสารโดยวิธีเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง สามารถทำโดยการเติมสารมาตรฐานเพียงระดับความเข้มข้นเดียว (one point calibration) ใช้ในการประมาณค่าหรือหาเปอร์เซ็นต์สารในองค์ประกอบที่ไม่ต้องการความถูกต้องมากซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

5.3 การบำรุงรักษาเครื่องมือ

การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทุกชนิด ผู้ใช้ต้องมีความรู้ในการบำรุงรักษาและแก้ปัญหาเบื้องต้น เพื่อให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากเกิดปัญหาที่ไม่สามารถแก้ไขได้ต้องติดต่อ ช่างมาซ่อมบำรุงทันที ข้อควรระวังในการใช้เครื่องมือ

5.3.1 ตรวจสอบระบบไฟฟ้าก่อนเสียบปลั๊ก ต้องใช้ไฟฟ้าที่มีมีกำลังไฟฟ้าเพียงพอ และควรใช้เครื่องปรับแรงเคลื่อนไฟฟ้าให้คงที่

5.3.2 เปิดเครื่องมือตามขั้นตอนที่แนะนำในคู่มือการใช้เครื่องอย่างเคร่งครัด

5.3.3 เครื่องมือต้องอยู่ในสภาพที่พร้อมใช้งาน สะอาด ไม่มีฝุ่นหรือสารเคมี

5.3.4 ตรวจสอบช่องใส่ตัวอย่างให้สะอาดอยู่เสมอหากมีสารเคมีหกต้องรีบเช็ดทำความสะอาดทันที

5.3.5 หลีกเลี่ยงการทำให้โต๊ะวางเครื่องมือสั่นสะเทือนเพราะอาจทำให้ระบบแสงคลาดเคลื่อน

5.3.6 ปิดแหล่งกำเนิดแสงทันทีเมื่อเลิกใช้ เพื่อยืดอายุการใช้งาน

5.3.7 ปิดเครื่องมือเมื่อเลิกใช้งาน รอจนกระทั่งเครื่องมือเย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง ใช้ผ้าคลุมเครื่องมือเพื่อป้องกันฝุ่น

5.3.8 หากไม่ได้ใช้เครื่องมือต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ควรเปิดเครื่องเพื่อให้ส่วนต่างๆ ของเครื่องมือได้ทำงาน อย่างน้อย เดือนละครั้ง

5.3.9 ในกรณีที่ใช้เครื่องมืออย่างต่อเนื่อง ควรทำโปรแกรมการบำรุงรักษา และการสอบเทียบ และปฏิบัติตามโปรแกรมที่ทำไว้อย่างเคร่งครัด

การทดลองที่ 5.1
การวิเคราะห์หาปริมาณควินีนด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก
(Determination of Quinine by fluorometric method)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณสารด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก
2. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณควินีนในตัวอย่าง

การทดลอง

ควินีน (quinine , $C_{20}H_{24}N_2O_2$ MW = 324.43) เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ มีในธรรมชาติ สะกัดจากต้น cincona มีคุณสมบัติทางยาใช้ในการต่อต้านเชื้อมาเลเรีย โดยเตรียมอยู่ในรูปควินีนซัลเฟต และ ควินีนไดไฮโดรคลอไรด์ ควินีนเป็นสารที่ไวต่อการวาวแสงโดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสารละลายกรด จึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีฟลูออโรเมตริก ถึงแม้มีในปริมาณต่ำ

หาสภาวะการวิเคราะห์ โดยการสแกนหา ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation) และความยาวคลื่นที่ใช้วัดการคายแสง (emission) นำค่าที่หาได้มาใช้ในการวิเคราะห์ หาปริมาณ ควินีนในตัวอย่าง น้ำโทนิก โดยวิธี external standard และ standard addition

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์
เครื่องชั่งไฟฟ้าความ ละเอียด 0.0001 กรัม

ขวดวัดปริมาตร	ขนาด 50 100 250 และ 1,000 มล.
ปิเปตวัดปริมาตร	ขนาด 1 5 10 และ 25 มล.
บิวเรต	ขนาด 50 มล.
บีกเกอร์	ขนาด 25 100 500 และ 1,000 มล.
ไมโครปิเปต	ขนาด 1 มล.

อ่างอัลทราโซนิก (ultrasonic bath)

สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

ใช้สารเคมีชั้นคุณภาพรีเอเจนต์

1. สารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปิเปต กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3.0 มล.ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. ที่มีน้ำอยู่แล้ว 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

2. สารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ตวงกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระบอกปริมาตร 55.5 มล.ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. ที่มีน้ำอยู่แล้ว 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
3. สารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ชั่งควินีนซัลเฟต 0.1207 กรัม ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ละลายด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล.เขย่าจนของแข็งละลายหมด เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
4. สารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 10 มก./ลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร จากข้อ 3 ปริมาตร 1 มล.ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
5. สารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 0.10 0.30 0.50 0.75 และ 1.00 มก./ลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 10 มก./ลิตร จากข้อ 4 ปริมาตร 1 3 5 7.5 และ 10 มล.ตามลำดับ ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร 100 มล. จำนวน 5 ขวด เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
6. สารละลายมาตรฐานควินีนที่มีตัวอย่างปริมาณเท่ากันสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี standard addition ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่กำจัดแก๊สแล้วปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล.จำนวน 5 ขวด เติมสารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 10 มก./ลิตร ที่เตรียมจากข้อ 5 ปริมาตร 0.50 1.00 3.00 5.00 และ 7.50 มล.ตามลำดับ เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนถึงขีดปริมาตร

ตัวอย่างและการเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำโทนิก

นำน้ำโทนิกมากำจัดแก๊ส (degas) ด้วยเครื่องอัลทราโซนิกนาน 3-5 นาที ปิเปตน้ำโทนิกที่กำจัดแก๊สแล้ว 2 มล. ถ่ายลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล. เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

วิธีทดลอง

1 หาความยาวคลื่น excitation และ emission

1.1 ตั้งค่าความยาวคลื่น emission ที่ 450 นาโนเมตร เลือกความกว้างช่องแสง 2.5 นาโนเมตร และใช้สารละลายมาตรฐาน 0.50 มก./ลิตร สแกนหาความยาวคลื่น excitation ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลาร์ เป็นสารละลายแบลงค์

1.2 ตั้งค่าความยาวคลื่น excitation ที่ได้จาก ข้อ 1.1 เลือกความกว้างช่องแสง 2.5 นาโนเมตร ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.50 มก./ลิตร สแกนหาความยาวคลื่น emission ใช้สารละลายกรด ซัลฟิวริก 0.05 โมลาร์ เป็นสารละลายแบลงค์

2. หาปริมาณสารโดยวิธี external standard

2.1 วัดความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานควินีนความเข้มข้น 0.10 0.30 0.50 0.75 และ 1.00 มก./ลิตร จากข้อ 5 ที่ความยาวคลื่น excitation และ emission ตามที่หาได้จากข้อ 1 โดยเลือกความกว้างช่องแสง 2.5 นาโนเมตร บันทึกข้อมูลในตารางที่ 5.1.1

2.2 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มแสง (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลาย (แกนนอน)

2.3 วัดความเข้มแสงของสารละลายตัวอย่างน้ำโทนิกที่เจือจางแล้ว หาปริมาณสารโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานบันทึกข้อมูลในตารางที่ 5.1.3

3. วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี standard addition

3.1 วัดความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานที่เติมสารละลายตัวอย่าง จากข้อ 6 บันทึกข้อมูลในตารางที่ 5.1.2

3.2 เขียนกราฟระหว่างความเข้มแสง (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกนนอน) หาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่าง บันทึกข้อมูลในตารางที่ 5.1.3

4. เปรียบเทียบปริมาณสารที่วิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี external standard และ standard addition

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 5.1.1 บันทึกข้อมูลสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน วิธี external standard

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้น(มก./ลิตร)	ความเข้มแสง	r
1			
2			
3			
4			
5			

ตารางที่ 5.1.2 บันทึกข้อมูลสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน วิธี standard addition

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)	ความเข้มแสง	r
1			
2			
3			
4			
5			

ตารางที่ 5.1.3 บันทึกข้อมูลการหาปริมาณ ควินีนในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อัตราการเจือจาง (เท่า)	ความเข้มแสง	ปริมาณในตัวอย่าง	
			วิธี external standard	วิธี standard addition

r = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

การทดลองที่ 5.2

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน บี2 ด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก

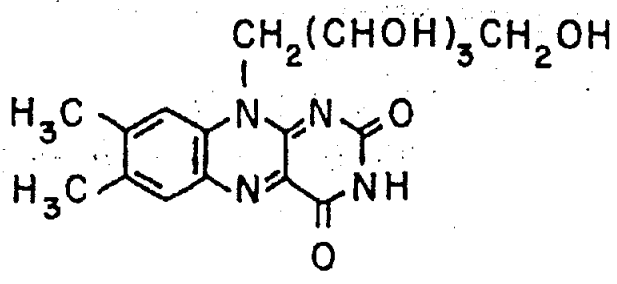
(Determination of Riboflavin by Fluorometric method)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณสารด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก
2. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณวิตามิน บี2 ในตัวอย่างยา

การทดลอง

วิตามิน บี2 หรือ ไรโบเฟลวิน (riboflavin) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสีซึ่งเรืองแสงเป็นสีเหลืองอมเขียว (yellow-green fluorescence) มีชื่อทางเคมี 6,7 -Dimethyl-9-D-ribityl-isoalloxazine ($C_{17}H_{20}N_4O_6$, MW 376.4) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



วิตามิน บี2 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ เป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย การขาดวิตามิน บี2 อาจทำให้มีรอยแผลเป็นที่มุมปากหรือปากนกกระจอก มีคราบไขมันที่ซอกจมูก เป็นต้น วิตามิน บี2 มีในอาหาร จากสัตว์ และจากพืช อาหารที่มีวิตามิน บี2 ปริมาณสูงได้แก่ เครื่องในสัตว์

เนื่องจากวิตามิน บี2 เป็นสารเรืองแสง ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยวิธีกระตุ้นสารด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร

หาปริมาณวิตามิน บี2 ในตัวอย่างเม็ดยาวิตามิน บี2 และวิตามิน บีรวม เตรียมตัวอย่างโดยการกลั่นไหลกลับ (reflux) ในตัวทำละลายที่เหมาะสมนาน 1 ชม. นำมาเติมสารออกซิไดส์เพื่อทำลายสารมีสีชนิดอื่น แล้ววัดความเข้มแสงด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ หาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไรโบเฟลวิน

เครื่องมือ/อุปกรณ์

สเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์
เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.0001 กรัม
ชุดเครื่องมือกลั่นไหลกลับ

ขวดกลั่นขนาด 100 มล.

ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 และ 250 มล.

ปิเปตวัดปริมาตร ขนาด 1 และ 10 มล.

ปิเปตแกรดูเอต ขนาด 1 และ 10 มล.

บีกเกอร์ ขนาด 100 250 และ 1,000 มล.

กระบอกตวงขนาด 50 และ 500 มล.

สารเคมี และการเตรียมสารละลาย

ใช้สารเคมีชั้นคุณภาพรีเอเจนต์

1. กรดอาซีติก ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายกรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 นอร์แมล ตวงกรดอาซีติก ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่บีกเกอร์ขนาด 1000 มล. เติมน้ำกลั่นอีก 999 มล.
3. สารละลายมาตรฐานไรโบเฟลวิน ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ชั่ง ไรโบเฟลวิน 10 มก. ละลายในกรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 นอร์แมล คนจนของแข็งละลายหมด ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 นอร์แมล จนถึงขีดปริมาตร
4. สารละลายมาตรฐานไรโบเฟลวิน ความเข้มข้น 10 มก./ลิตร ใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 นอร์แมล จนถึงขีดปริมาตร
3. สารละลายมาตรฐานไรโบเฟลวิน ที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน (working solution) ความเข้มข้น 1 มก./ลิตร ปิเปตสารละลายจากข้อ 2 ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
4. เมทานอล (methanol)
5. ไพริดีน (pyridine)
6. โซเดียมไดไทโอไนต์ ($Na_2S_2O_4$)
7. เตรียมสารละลายสำหรับสกัดตัวอย่าง (extraction solution) *ต้องเตรียมสารละลายในตู้ดูดควัน* ใช้กระบอกตวง ตวงเมทานอล 300 มล. ถ่ายใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติม ไพริดีน 100 มล. เติมน้ำกลั่น 100 มล. และเติมกรดอาซีติกความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ 10 มล. คนสารละลายให้ผสมเข้ากัน
8. สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ชั่งโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จนละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล.

9. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ดวงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มล. ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่น 100 มล.
10. สารละลายกรดอาซีติกความเข้มข้น 0.02 นอร์แมล ใช้ปิเปตแกรดูเอต ดูด กรดอาซีติกความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.2 มล. ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้ว 1000 มล.

ตัวอย่างและการเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ยาเม็ดวิตามินบีรวม
   1.1ชั่งน้ำหนักยาตัวอย่างจำนวน 10 เม็ด คำนวณค่าเฉลี่ยต่อเม็ด แล้วมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ละลายด้วยสารละลายสำหรับสกัดจากข้อ 4 ปริมาตร 50 มล. นำไปกลั่นไหลกลับ ด้วยไฟอ่อนๆ นาน 1 ชม. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล และเติมสารละลายเติมจนถึงขีดวัดปริมาตร
   1.2 กรณีของแข็งละลายไม่หมดให้วางทิ้งไว้จนกระทั่งตกตะกอน หรือกรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
   1.3 เจือจางสารละลายตัวอย่างโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
2. ตัวอย่างยาเม็ดวิตามิน บี2
   2.1 ชั่งน้ำหนักยาตัวอย่างจำนวน 10 เม็ด คำนวณค่าเฉลี่ยต่อเม็ด แล้วมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ละลายด้วยสารละลายสำหรับสกัดจากข้อ 4 ปริมาตร 50 มล. นำไป reflux ด้วยไฟอ่อนๆ นาน 1 ชม. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล และเติมสารละลายเติมจนถึงขีดวัดปริมาตร
   2.2 กรณีของแข็งละลายไม่หมดให้วางทิ้งไว้จนกระทั่งตกตะกอน หรือกรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
   2.3 เจือจางสารละลายตัวอย่างโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 2.1 ปริมาตร 0.1 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายเพื่อวัดหาปริมาณวิตามิน บี2
   1.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วจากข้อ 1.3 หรือ 2.3 ปริมาตร 5 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จำนวน 4 ขวด เขียนหมายเลขข้างขวด 1-4
   1.2 เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มก./ลิตร ปริมาตร 1 มล.ลงในขวดที่ 1 และ 2 ขวด

1.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล.ลงในขวดที่ 3 และ 4 ขวด

1.4 เติมสารละลายดังต่อไปนี้ ตามลำดับ ลงในสารละลายทั้ง 4 ขวด

1.4.1 สารละลายกรดอาซีติก ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มล.

1.4.2 สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าขวดให้สารละลายผสมกัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที สารละลายเป็นสีม่วง

1.4.3 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าขวดให้สารละลายผสมกันจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี

1.4.4 เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

3. เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยวิธีเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่าง แต่ใช้สารละลายที่ใช้สกัดแทนสารละลายตัวอย่าง
4. ปรับเครื่องมือให้แสดงค่าความเข้มแสงเป็นศูนย์ โดยให้ช่องใส่ตัวอย่างและช่องใส่สารอ้างอิงว่าง
5. นำสารละลายแบลงค์ใส่ในช่องตัวอย่างและช่องอ้างอิงสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ปรับเครื่องมือให้แสดงค่า ศูนย์ อีกครั้ง
6. วัดความเข้มแสงของสารละลาย ขวดที่ 1 และ 2 บันทึกค่าความเข้มแสง เป็น X
7. วัดความเข้มแสงของสารละลายขวดที่ 3 และ 4 บันทึกค่าความเข้มแสง เป็น B
8. เติมโซเดียมไดไทโอไนต์ (ของแข็ง) ลงในสารละลายขวดที่ 3 และ 4 ขวดละประมาณ 20 มก. เขย่าจนของแข็งละลายหมด นำไปวัดอีกครั้ง บันทึกค่าความเข้มแสง เป็น C
9. คำนวณผลการทดลอง สรุปผลลงในตารางที่ 5.2.1

วิธีคำนวณ

$R = [(B-C)/(X-B)] \times 0.10 \times 0.001$

โดยที่ $(B-C)/(X-B)$ มีค่าอยู่ในช่วง ≥ 0.66 และ ≤ 1.5

$R_t = (R \times V \times D \times W_t)/ W_a$

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 5.2.1 บันทึกข้อมูลการหาปริมาณวิตามิน บี2

ตัวอย่าง/แบลงค์	W_a	D	R	W_t	R_t
แบลงค์					

D = อัตราการเจือจาง (เท่า)

R = ปริมาณไรโบเฟลวินที่วัดได้จากเครื่องมือ (มก./มล.)

W_a = น้ำหนักตัวอย่างที่ชั่งมาวิเคราะห์ (กรัม)

W_t = น้ำหนักตัวอย่างยา 1 เม็ด (กรัม)

R_t = ปริมาณไรโบเฟลวินในตัวอย่างยา 1 เม็ด (มก.)

บทที่ 6
อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรสโกปี
(Atomic Absorption Spectroscopy)

อะตอมมิกสเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุโดยอาศัยหลักการที่อะตอมของธาตุเกิดอันตกริยา (interaction) กับคลื่นแสง (photon) ได้แก่การดูดกลืนแสง (absorption) การปล่อยแสง (emission) การวาวแสง (fluorescence /phosphorescence) โดยแสงที่เกี่ยวข้องมีความยาวคลื่นอยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลตหรือยูวี (ultraviolet , UV) วิสิเบิล (visible , VIS) และเอ็กซ์เรย์ การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคอะตอมมิกสเปกโทรสโกปี จะต้องผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดอะตอม (atomization) เป็นการให้ธาตุในสารละลายตัวอย่างซึ่งอยู่ในรูปไอออน โมเลกุลหรือสารประกอบ สลายตัวแล้วเปลี่ยนไปเป็นอะตอมอิสระ อะตอมอิสระที่เกิดขึ้นอาจอยู่ในสถานะพื้น (ground state) และสถานะกระตุ้น (excited state) อัตราส่วนของอะตอมในแต่ละสถานะขึ้นอยู่กับชนิดของสารและกระบวนการที่ทำให้เกิดอะตอม นอกจากนี้ในกระบวนการทำให้เกิดอะตอมอาจจะเกิดไอออน โมเลกุลและสารประกอบออกไซด์ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการจึงต้องควบคุมให้เกิดในปริมาณน้อยที่สุดหรือไม่เกิด

6.1 เทคนิคที่ใช้ในอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิตรี

การวิเคราะห์ธาตุด้วยวิธีการดูดกลืนแสงของอะตอม เป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ธาตุในตัวอย่างต่างๆ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ ซึ่งมีข้อดีหลายประการ คือ ใช้ง่าย วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่างต่ำ เทคนิคที่ใช้ในอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิตรีแบ่งตามกระบวนการที่ทำให้เกิดอะตอมได้ 4 วิธี ดังนี้

6.1.1 การทำให้เกิดอะตอมโดยใช้เปลวไฟ (flame AAS) ใช้สำหรับวิเคราะห์ธาตุโดยทั่วไป

6.1.2 การทำให้ธาตุเป็นสารประกอบไฮไดรด์ที่มีจุดเดือดต่ำ (hydride generation AAS) แล้วทำให้เกิดอะตอมโดยใช้เปลวไฟ ใช้สำหรับการวิเคราะห์ ธาตุบางชนิด เช่น อาร์เซนิก (As) บิสมัท (Bi) ซีลิเนียม (Se) ตะกั่ว (Pb) พลวง (Sb) ดีบุก (Sn) เป็นต้น

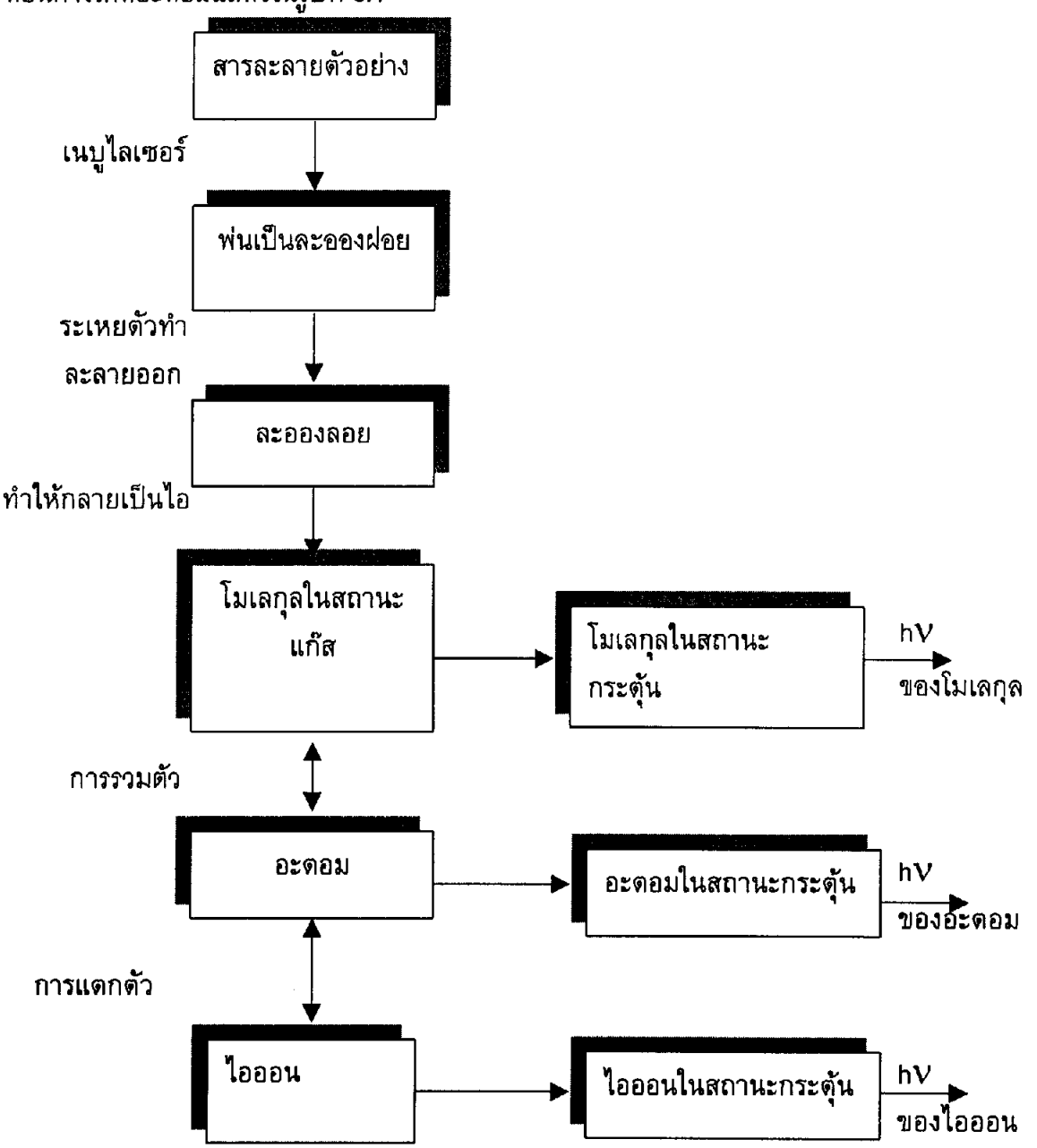
6.1.3 การทำให้เกิดอะตอมโดยใช้ความร้อนจากเตาเผาไฟฟ้า (furnace AAS) วิธีนี้ใช้สารละลายตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย ในระดับไมโครลิตร

6.1.4 การทำให้เกิดอะตอมโดยใช้วิธีรีดิวซ์ ไอออนของสารเกิดเป็นอะตอมในสถานะแก๊ส (cold vapour generation) ใช้เครื่องสูบ (pump) ดูดไอของอะตอมเข้าสู่เซลล์ เป็นวิธีเฉพาะในการวิเคราะห์ปรอท

การเลือกใช้วิธีใดในการวิเคราะห์ธาตุขึ้นอยู่กับความเหมาะสมหลายประการ ได้แก่ ชนิดของสารตัวอย่าง ปริมาณของตัวอย่าง ปริมาณของธาตุที่จะวิเคราะห์ในสารตัวอย่างและชนิดของธาตุที่วิเคราะห์ ในบทเรียนนี้ กล่าวรายละเอียดเฉพาะเทคนิคการทำให้เกิดอะตอมโดยใช้เปลวไฟ (flame AAS และ การทำให้เกิดอะตอมโดยใช้เตาเผาไฟฟ้า (furnace AAS)

6.2 อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบใช้เปลวไฟ

การทำให้เกิดอะตอมอิสระโดยใช้ความร้อนจากเปลวไฟจากหัวเผา (burner) การเกิดเปลวไฟใช้แก๊สเชื้อเพลิงและแก๊สออกซิแดนท์ ชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสม การนำสารละลายเข้าสู่เปลวไฟ ใช้หลักการดูดสารละลายแล้วปล่อยเป็นละอองเล็กๆ ด้วยเนบูไลเซอร์ (nebulizer) ขั้นตอนการเกิดอะตอมแสดงใน*รูปที่ 6.1*



รูปที่ 6.1 แสดงขั้นตอนการทำให้เกิดอะตอมในเทคนิค Flame AAS

6.3 อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบใช้เตาเผาไฟฟ้า

การทำให้เกิดอะตอมอิสระโดยใช้ความร้อนจากไฟฟ้า บริเวณที่ผลิตอะตอม เป็นเตาเผาทำด้วยแกรไฟต์ (graphite furnace) การนำสารละลายเข้าสู่ furnace ใช้วิธีฉีด (inject) ด้วยไมโครปิเปต (micropipet) หรือเครื่องฉีดสารละลายแบบอัตโนมัติ (auto injector) การให้ความร้อนแก่เตาเผาแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนต้องตั้งโปรแกรมเพื่อควบคุมเวลา และอุณหภูมิให้เหมาะสมกับชนิดของธาตุที่วิเคราะห์ และชนิดของสารตัวอย่าง ดังนี้

6.3.1 การอบแห้ง (drying) เป็นขั้นตอนที่ให้ความร้อนแก่สารตัวอย่างเพื่อระเหยตัวทำละลาย โดยปกติอุณหภูมิประมาณ 100 °ซ

6.3.2 เผาเป็นเถ้า (ashing) เป็นขั้นตอนที่ให้ความร้อนแก่ตัวอย่างสูงขึ้นใช้อุณหภูมิในช่วง 350 ถึง 1,200 °ซ อาจจะสูงถึง 1,500 °ซ เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ โดยโมเลกุลของสารเหล่านี้จะแตกสลายออกไป (decompose) เหลือแต่สารอนินทรีย์ที่เสถียรเท่านั้น โดยทั่วไปอยู่ในรูปของโลหะออกไซด์

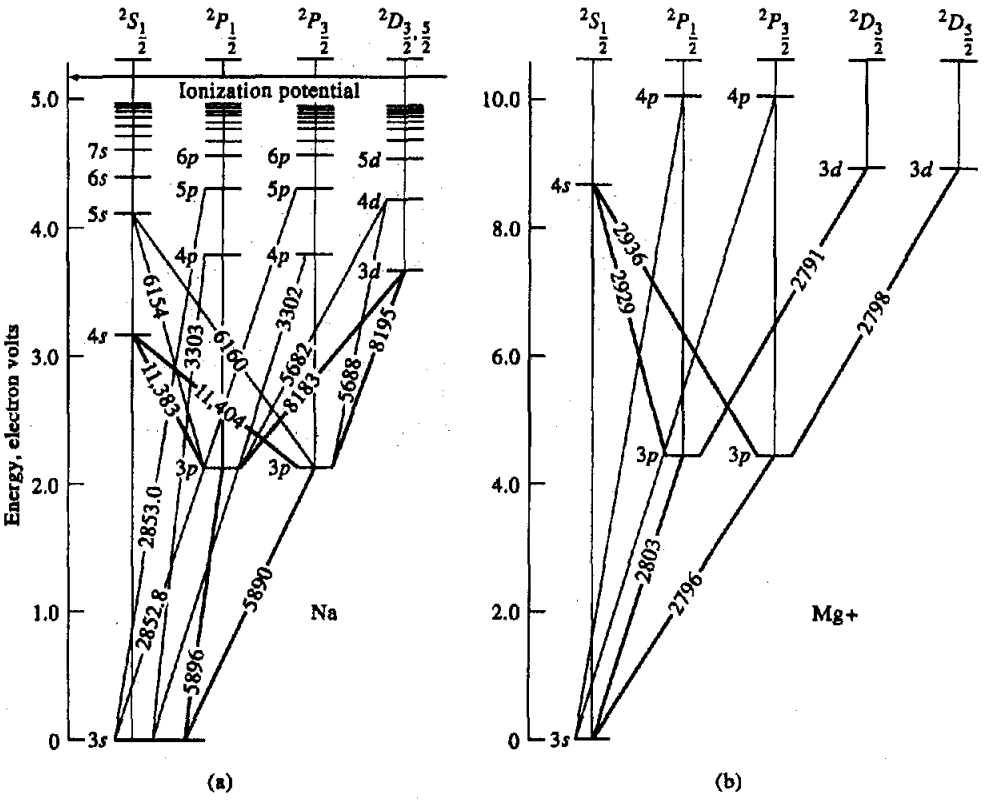
6.3.3 ทำเป็นอะตอม (atomization) เป็นขั้นตอนที่ สารที่เหลือถูกเผาที่อุณหภูมิสูงอาจจะถึง 3,000 °ซ เพื่อให้สลายเป็นอะตอมอิสระ เมื่อให้แสงผ่านอะตอมสามารถวัดสัญญาณของการดูดกลืนแสงได้ออกมาเป็นพีก ความสูงของพีกแปรผันโดยตรงกับปริมาณของธาตุในสารตัวอย่างนั้น

การใช้เตาเผาแกรไฟต์ เป็นตัวทำให้เกิดอะตอมนั้น จะเกิดความร้อนขึ้นในระบบมาก สารตัวอย่างสัมผัสกับเตาเผาโดยตรง วัสดุที่ใช้ทำเตาเผา ส่วนมากเป็นแกรไฟต์ที่เคลือบผิวเพื่อกำจัดรูพรุน เรียกว่าไพโรลิติกแกรไฟต์ (pyrolytic graphite) ในการวิเคราะห์สารหลายตัวอย่างติดต่อกันต้องทำให้เตาเผาเย็นลงก่อนที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป ดังนั้นในระบบจึงมีน้ำหล่อเย็นอยู่ภายนอก นอกจากนี้จะต้องผ่านแก๊สเฉื่อย เช่น ไนโทรเจน หรือ อาร์กอนเข้าไป เพื่อทำให้สภาวะในการเผาการนั้นไม่มีอากาศ และแก๊สเฉื่อยยังช่วยพาไอของสารที่เกิดจากการสลายตัวของ สารอื่นๆ ที่ปนอยู่ในตัวอย่าง (matrix) ออกจากเตาเผา ในกระบวนการทำให้เกิดอะตอมของเทคนิคนี้ ต้องจัดโปรแกรมเพื่อกำหนดอุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอนสำหรับสารแต่ละชนิด ดังแสดงใน*ตารางที่ 6.1*

ตารางที่ 6.1 แสดงขั้นตอนกระบวนการทำให้เกิดอะตอมโดยเทคนิค Furnace AAS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (วินาที)		อัตราการไหลของแก๊สเฉื่อย (มล./นาที)
		การเพิ่มอุณหภูมิ	อุณหภูมิคงที่	
Drying	100-130	1-5	20-30	250
Ashing	ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร	5-10	15-25	250
Atomize	ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร	0	2-5	0
Clean-out	2400	1-2	2-5	250

แหล่งกำเนิดอะตอมมิกสเปกตรา (sources of atomic spectra) เกิดจากอะตอมของธาตุในสถานะพื้น มีอิเล็กตรอนในอะตอมอยู่ในออร์บิทัล (orbital) ที่มีระดับพลังงานต่ำสุด ตัวอย่าง เช่น อะตอมของโซเดียม (Na) มีการจัดอิเล็กตรอนในออร์บิทัลต่าง ๆ ดังนี้ คือ IS 2S 2P 3S เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยการให้พลังงานจากแหล่งต่าง ๆ เช่น พลังงานจากแสง พลังงานความร้อนจากเปลวไฟ จากกระแสไฟฟ้า และจากการสปาร์ค ทำให้อิเล็กตรอนชั้นนอกสุดเกิดการเปลี่ยนแปลง (transition) ไปอยู่ในออร์บิทัลที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เกิดเป็นอะตอมในสถานะกระตุ้น ในกรณีอะตอมของโซเดียม อิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นจะเลื่อนระดับพลังงานจาก ออร์บิทัล 3S ไปอยู่ในออร์บิทัล 3P 4P และ 5P ดังแสดงใน***รูปที่ 6.2***



รูปที่ 6.2 แสดงเส้นสเปกตรา (a) อะตอมโซเดียม (b) อะตอม Mg^{+1}

อะตอมในสถานะกระตุ้นไม่เสถียร เมื่อกลับสู่สถานะพื้น จะปล่อยแสงเป็นเส้นมีความกว้างประมาณ 10 อังสตรอม (°A) เรียกว่า เส้นสเปกตรา(line spectra) ธาตุแต่ละชนิดอาจจะให้เส้นสเปกตรามากกว่า 1 เส้น จึงเป็นชุดของเส้นสเปกตรา (spectral lines) ที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน เนื่องจากอิเล็กตรอนสามารถเลื่อนระดับพลังงานไปอยู่ในออร์บิทัลที่มีระดับพลังงานสูงกว่าได้หลายออร์บิทัล เส้นสเปกตราที่เกิดจากการเลื่อนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจากสถานะกระตุ้นต่ำสุดสู่สภานะพื้นที่มีความเข้มมากที่สุด เรียกว่าเส้น เรโซแนนซ์ (resonance line) สำหรับอะตอมโซเดียมมีเส้นเรโซแนนซ์ ที่ความยาวคลื่น 589.0 นาโนเมตร ธาตุแต่ละชนิดมีเส้น

เรโซแนนซ์แตกต่างกัน เช่นทองแดง(Cu) มีเส้นเรโซแนนซ์ที่ความยาวคลื่น 324.8 นาโนเมตร เหล็ก (Fe) มีเส้นเรโซแนนซ์ที่ความยาวคลื่น 248.3 นาโนเมตร ทั้งนี้เนื่องจากระดับพลังงานในแต่ละออร์บิทัลของธาตุแต่ละชนิดแตกต่างกัน

ในการวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม วัดกำลังของแสงส่วนที่ส่งผ่าน (transmitted) หลังจากอะตอมดูดกลืนแสงแล้ว ขนาดของการดูดกลืนจะแปรตามความเข้มข้นของธาตุในสารละลายตัวอย่าง อธิบายได้โดยใช้ กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต

$A = \log (P/P_0) = \varepsilon bC$

P_0 = กำลังแสงเริ่มต้น

P = กำลังแสงที่เหลือหลังจากผ่านอะตอมออกมา

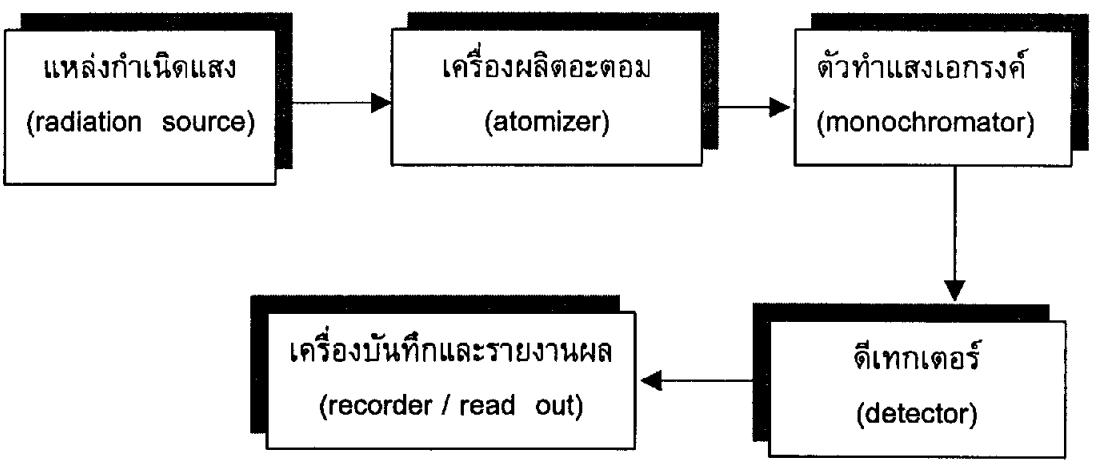
ε = โมลาร์แอบซอร์พติวิตีเป็นคุณสมบัติเฉพาะของอะตอม

b = ความยาวของเซลล์ในที่นี้คือความยาวของช่องผลิตอะตอม (ซม.)

C = ความเข้มข้นของธาตุในสารละลายตัวอย่าง (โมลาร์)

6.4 ส่วนประกอบของอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีส่วนประกอบสำคัญ แสดงใน*รูปที่ 6.3*

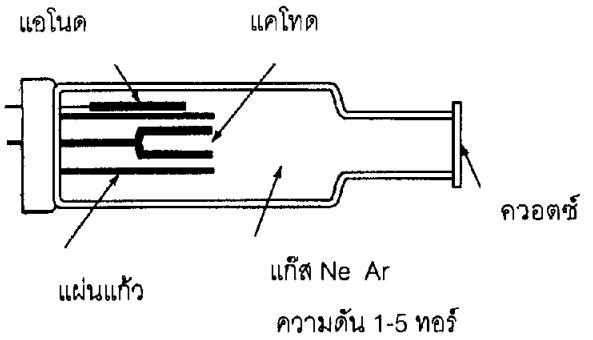


รูปที่ 6.3 แสดงองค์ประกอบของเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

6.4.1 แหล่งกำเนิดแสง (radiation source) เนื่องจากการดูดกลืนแสงของอะตอมนั้นต้องการแสงที่มีความยาวคลื่นแคบมากในลักษณะเป็นเส้นสเปกตรา ดังนั้นแหล่งกำเนิดแสง จะต้องให้แสงเป็นเส้นสเปกตราที่มีความยาวคลื่นพอดีกับเส้นเรโซแนนซ์ของธาตุตัวอย่างเรียกว่าแหล่งกำเนิดแสงที่ให้แสงแบบเส้น แหล่งกำเนิดแสงแบบเส้น มีส่วนประกอบที่ทำจากธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วทำให้พลังงานแก่อะตอมของธาตุนั้นจนอยู่ในสถานะกระตุ้น เมื่อกลับสู่สถานะพื้นจะปล่อยแสง

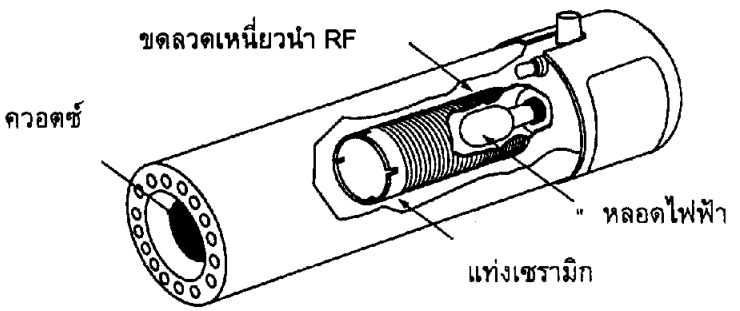
เป็นเส้นสเปกตราออกมา ดังตัวอย่างของอะตอมโซเดียมแสดงในรูปที่ 6.2 จะเห็นได้ว่าแหล่งกำเนิดแสงดังกล่าวไม่ได้ให้แสงที่มีความยาวคลื่นเดียวแต่เส้นสเปกตรา แต่ละเส้นมีความยาวคลื่นแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงสามารถแยกด้วยฟิลเตอร์ (filter) หรือตัวทำแสงเอกรงค์ได้ ข้อเสียของการใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบนี้คือ ต้องใช้หลอดเฉพาะในการวิเคราะห์ธาตุแต่ละชนิด ทำให้ต้องมีหลอดเท่ากับชนิดของธาตุที่วิเคราะห์ และวิเคราะห์ธาตุได้ครั้งละชนิด แหล่งกำเนิดแสงในเทคนิค AAS มีหลายชนิดแต่ในที่นี้จะกล่าวถึงเพียง 2 ชนิด เท่านั้นดังต่อไปนี้

6.4.1.1 หลอดฮอล์โลว์แคโทด (Hollow Cathode Lamps ,HCL) เป็นแหล่งกำเนิดของแสงที่ใช้มากที่สุดในเทคนิค AAS ลักษณะของ HCL แสดงใน *รูปที่ 6.4* มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ขั้วไฟฟ้า แอโนดทำด้วยทังสเตนหรือนิกเกิล แคโทดทำด้วยโลหะ หรือสารประกอบของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ หน้าต่าง (window) เป็นทางที่ให้แสงผ่านทำด้วยควอตซ์ (quartz) เป็นวัสดุที่ไม่ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง ยูวี และวิสิเบิล ภายในหลอดบรรจุแก๊สเฉื่อยเช่น นีออน (Ne) หรือ อาร์กอน (Ar) ความดัน 1–5 ทอร์ แสงเกิดขึ้นเนื่องจากการที่ให้ศักย์ไฟฟ้าระหว่างแคโทดและแอโนดต่างกันประมาณ 300 – 400 โวลต์ ทำให้แก๊สนีออนหรืออาร์กอนแตกตัว (ionization) ได้แคตไอออนและอิเล็กตรอน ไอออนทั้ง 2 ชนิด เคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าประมาณ 5 – 10 มิลลิแอมแปร์ ถ้าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่หลอดสูงพอเพียง ทำให้แคตไอออนมีพลังงานจลน์มากขึ้น เคลื่อนที่เข้าชนโลหะที่แคโทด แคตไอออนจะถ่ายเทพลังงานให้กับธาตุที่แคโทดหลุดออกมา เกิดกลุ่มหมอกอะตอมมากมายในบริเวณนั้น กระบวนการเกิดอะตอมนี้เรียกว่า Sputtering อะตอมที่เกิดขึ้นมีส่วนหนึ่งที่อยู่ในสภาวะกระตุ้น เมื่อกลับสู่สถานะพื้น จะปล่อยแสงออกมา อะตอมที่อยู่ในสถานะพื้นอาจจะกลับไปที่แคโทด หรือที่ผนังภายในหลอด ดังนั้นเมื่อใช้งานนานๆ HCL จะเสื่อมคุณภาพ และหมดอายุการใช้งานตามเหตุผลข้างต้น ประสิทธิภาพของ HCL ขึ้นอยู่กับรูปร่างของหลอดและศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่หลอด ถ้าให้ศักย์ไฟฟ้าสูง ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้ามาก เป็นผลให้แสงที่ออกมาจากหลอดมีความเข้มสูง แต่ถ้ากระแสไฟฟ้าที่ให้มากเกินไป จะเกิดผลเสียทำให้แสงที่ออกจาก HCL มีความกว้างและความเข้มต่ำ เนื่องจากในกลุ่มหมอกอิเล็กตรอน มีอิเล็กตรอนที่สถานะพื้นมากขึ้น อะตอมเหล่านี้จะดูดกลืนแสงที่ปล่อยออกมา ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า seft – absorption ปัจจุบัน HCL มีทั้งแบบที่ทำจากธาตุชนิดเดียว และหลายชนิดผสมกัน



รูปที่ 6.4 แสดงส่วนประกอบของ HCL[6]

6.4.1.2 หลอดอิเล็กโทรดเลสดิสชาร์จ (Electrodeless Discharge Lamps , EDL) เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ทำให้เกิดกำลังแสงมากกว่า HCL จึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์ธาตุบางชนิดได้ดี เช่น อาร์เซนิก ซีลิเนียม เทลลูเนียม (Te) และ ปรอท เป็นต้น ลักษณะของ EDL แสดงใน*รูปที่ 6.5*

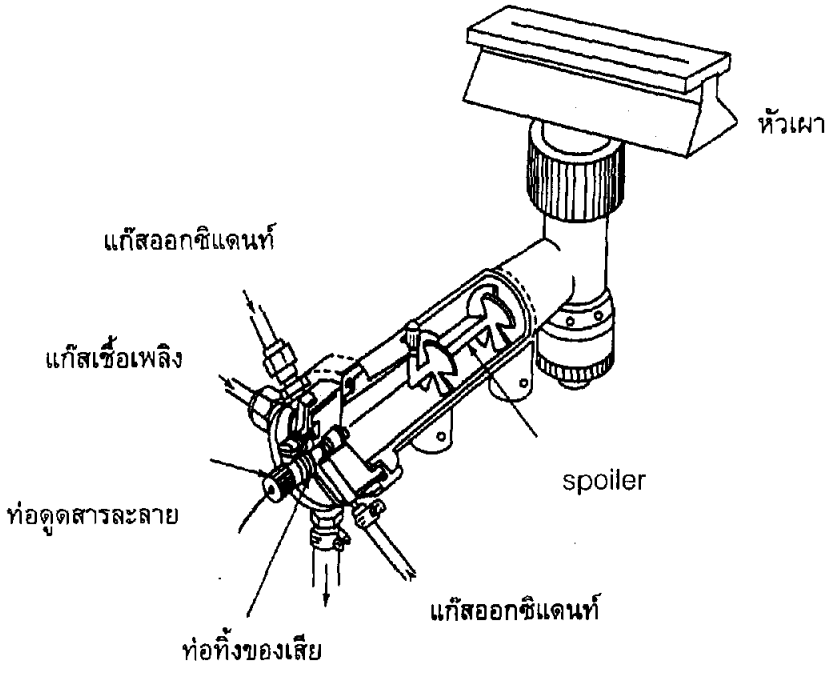


รูปที่ 6.5 แสดงส่วนประกอบของ EDL[6]

หลอด EDL ลักษณะเป็นหลอดกลวงปิดสนิทหน้าต่างทำด้วยควอตซ์ ภายในบรรจุโลหะ หรือเกลือของโลหะ ชนิดที่สามารถให้แสงที่มีความยาวคลื่นที่ต้องการใช้งานวิเคราะห์ และบรรจุแก๊สเฉื่อยความดันประมาณ 2 – 3 ทอร์ หลอดชนิดนี้ไม่มีขั้วไฟฟ้า แต่ใช้พลังงานจาก(radio – frequency ,RF) หรือ คลื่นไมโครเวฟ (microwave) ที่มีความเข้มสูง ทำให้แก๊สเฉื่อยแตกตัว ได้แคตไอออนกับอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นถูกเร่งด้วย RF ทำให้มีพลังงานจลน์สูงพอที่จะชนอะตอมของแก๊สเฉื่อยที่เหลือ ให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนและอิเล็กตรอนจำนวนมากเรียกว่าพลาสมา (plasma) การเกิดพลาสมาทำให้อุณหภูมิภายในหลอดสูงเพียงพอที่จะทำให้โลหะเกิดเป็นอะตอมในสถานะแก๊สและสถานะกระตุ้น ซึ่งสามารถปล่อยแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ตามที่ต้องการ

6.4.2 ในเทคนิค AAS ตัวทำให้เกิดอะตอมมี 2 แบบ คือแบบที่ใช้กับเปลวไฟ (Flame Atomizer) และ แบบกับไม่ใช้เปลวไฟ (Flameless Atomizer)

6.4.2.1 เครื่องผลิตอะตอมแบบที่ใช้เปลวไฟประกอบด้วยเนบูไลเซอร์ (nebulizer) ห้องสเปรย์ (spray chamber) และหัวเผา (burner) ดังแสดง*ในรูป 6.6*

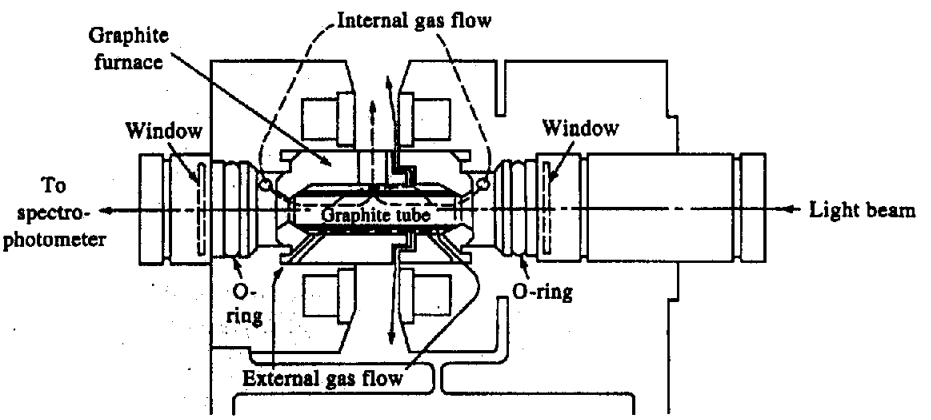


รูปที่ 6.6 แสดงส่วนประกอบของเครื่องทำให้เกิดอะตอมแบบใช้เปลวไฟ[6]

1) เนบูไลเซอร์ เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่ในการดูดสารละลายตัวอย่างแล้วทำให้เกิดเป็นละอองเล็ก ๆ โดยที่แก๊สออกซิแดนท์ถูกปล่อยให้ผ่านเข้าไปในเนบูไลเซอร์ แล้วผ่านออกสู่ห้องสเปรย์ทางท่อเล็ก ๆ ทำให้แก๊สไหลออกด้วยแรงดันสูง แล้วลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ห้องสเปรย์ จึงทำให้ดูด (suction) สารละลายเข้าสู่เนบูไลเซอร์ หลักการนี้เรียกว่า venturi effect ส่วนปลายของเนบูไลเซอร์เล็กมากจึงทำให้สารละลายที่ออกเป็นละอองเล็ก ๆ
2) ห้องสเปรย์ ทำจากพลาสติกแข็งชนิดที่ทนสารเคมีและกรด ภายในมีลูกแก้ว (glass bead) ทำหน้าที่กำจัดละอองที่ไม่ได้ขนาด ให้รวมตัวเป็นหยดใหญ่ขึ้นแล้วออกสู่ท่อน้ำทิ้ง ละอองของสารละลายจะผสมกับออกซิแดนท์ และแก๊สเชื้อเพลิงซึ่งถูกส่งเข้ามาตามท่อสู่ห้องสเปรย์ก่อนจะเข้าสู่หัวเผา

3) หัวเผา เป็นส่วนของเครื่องมือที่เกิดเปลวไฟ และเกิดอะตอมในบริเวณนี้ ทำด้วยโลหะที่ทนกรด และทนความร้อน ส่วนใหญ่ทำจากไทเทเนียมหรือโลหะผสมไทเทเนียม ด้านบนเป็นช่องที่ให้เปลวไฟออกมา มีความยาว 2 ขนาดคือ 5 และ 10 ซม. หัวเผาขนาด 5 ซม. ใช้ สำหรับเปลวไฟที่ใช้แก๊ส ไนตรัสออกไซด์ / อะเซทิลีน ซึ่งให้ความร้อนสูงถึง 2950 °ซ และการเผาไหม้เกิดเร็วมาก ถ้าใช้หัวเผาที่มีช่องยาวอาจจะเกิดการระเบิดได้ (flash back)

6.4.2.2 ส่วนที่ทำให้เกิดอะตอมโดยใช้ความร้อนจากกระแสไฟฟ้า มีลักษณะเป็นเตาเผา (furnace) รูปแบบขึ้นอยู่กับการออกแบบของผู้ผลิต เพื่อให้เกิดความร้อนในเตาได้ทั่วและรวดเร็ว ดังแสดงใน*รูปที่ 6.7*



รูปที่ 6.7 แสดงลักษณะของ graphite furnace [6]

6.4.3 ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator) เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำให้เกิดแสงเอกรงค์ หรือ แสงที่มีความยาวคลื่นเดียว (monochromatic light) ในเครื่องมือ AAS จำเป็นจะต้องมีส่วนนี้เนื่องจากแสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงมีหลายความยาวคลื่น และเมื่อผ่านอะตอมแล้วยังเกิดปรากฏการณ์อื่น ๆ อีกมาก เป็นสาเหตุให้แสงที่ออกจากอะตอมมีหลายความยาวคลื่น ตัวทำแสงเอกรงค์เป็นส่วนของเครื่องมือที่ส่งผลถึงประสิทธิภาพของเครื่องมือ กล่าวคือถ้าตัวทำแสงเอกรงค์มีประสิทธิภาพสูงสามารถแยกคลื่นแสงได้บริสุทธิ์ทำให้ผลการวิเคราะห์มีสภาพไวสูง และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ต่ำ

6.4.4 ดีเทกเตอร์ (detector) เป็นส่วนของเครื่องมือที่ใช้ในการวัดกำลังของแสงที่ผ่านออกมาจากอะตอม ในเครื่อง AAS เป็นชนิด หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultipliertube, PM tube) ดัง *แสดงในรูปที่ 4.6* หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า แคโทด แอโนด และไดโนด (dynode) หลายตัวต่ออนุกรมกัน อยู่ในหลอดสูญญากาศ ใน*รูปที่ 4.6 (a)* แสดงโฟโตมัลติพลายเออร์

ทิวบ์ที่มีไดโนด 9 ตัว ที่ผิวของแคโทดเคลือบด้วยสารที่ไวต่อแสง เมื่อแสงตกกระทบบนผิวของแคโทดจะเกิดอิเล็กตรอนขึ้นปริมาณหนึ่ง ถ้าให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ไดโนดตัวที่ 1 เป็นบวกมากกว่าแคโทด 90 โวลต์ดังแสดงใน*รูปที่ 4.6 (b)* อิเล็กตรอนจากแคโทดจะถูกเร่งมาสู่ไดโนดตัวที่ 1 ทำให้เกิดอิเล็คตรอนเพิ่มขึ้นอีกหลายอิเล็กตรอน ในทำนองเดียวกันถ้าให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ไดโนดตัวที่ 2 เป็นบวกมากกว่าไดโนดตัวที่ 1 90 โวลต์ จะเกิดเหตุการณ์ทำนองเดียวกันจนครบวงจรไดโนดตัวที่ 9 จะมีปริมาณอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นถึง 10^6–10^7 เท่า และอิเล็กตรอนจากไดโนดตัวที่ 9 จะเคลื่อนไปสู่แอโนด ทำให้เกิดกระแส (photo current) ขยายสัญญาณ และวัดกระแสที่เกิดขึ้น ถ้าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่หลอดมีค่าสูงสุดและคงที่ปริมาณของกระแสจะขึ้นกับปริมาณอิเล็กตรอน หรือปริมาณแสงที่เข้าสู่แคโทดนั่นเอง ข้อได้เปรียบของหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์คือ มีความไวสูงต่อแสงที่มีความยาวคลื่น ในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล มีการตอบสนองเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ จะเกิด dark current

6.4.5 เครื่องบันทึกและรายงานผล เป็นส่วนของเครื่องมือที่แสดงผลการวัดกำลังของแสงแสดงผลเป็นความดูดกลืนแสง (A) หรือ ค่าความส่งผ่านแสง (transmittance , T) หรือ ความเข้มข้น (C) อาจจะแสดงผลเป็นตัวเลขบนจอ หรือพิมพ์ในเครื่องบันทึก ขึ้นอยู่กับแบบของเครื่องมือ เครื่องมือที่ใช้ในปัจจุบันส่วนมากใช้คอมพิวเตอร์ในการควบคุมการทำงานของเครื่อง ประมวลผล รายงานผลและออกรายงาน

6.5 การประยุกต์ใช้

เครื่อง AAS ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณธาตุในตัวอย่างประเภทต่างๆ เช่น อาหาร ยา อากาศ ดิน น้ำดื่ม น้ำทิ้ง แร่ โลหะ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ผลิตภัณฑ์จากพืช และวัสดุต่างๆ เป็นต้น การเตรียมตัวอย่างมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง และชนิดของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ วิธีเตรียมตัวอย่างที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่

6.5.1 การย่อยด้วยกรด ใช้สำหรับตัวอย่างที่มีสารอนินทรีย์ ใช้กรดเข้มข้นเป็นตัวทำละลายและให้ความร้อนช่วยในการย่อยสลายสาร กรดที่ใช้เช่น กรดซัลฟิวริก กรดไนทริก กรดกัดทอง (กรดไฮโดรคลอริก : กรดไนทริก 3:1 โดยปริมาตร) เป็นต้น

6.5.2 การเผาให้เป็นเถ้า ใช้สำหรับตัวอย่างที่มีสารอินทรีย์ โดยการเผาที่อุณหภูมิสูงเพื่อทำลายสารอินทรีย์ แล้วนำมาละลายในกรด

6.5.3 การหลอม ใช้สำหรับตัวอย่างสารอนินทรีย์ที่ละลายในกรดยาก ใช้ด่างเป็นตัวหลอม เช่น alkali carbonate และ alkali hydroxide เป็นต้น การหลอมใช้ตัวหลอมผสมกับตัวอย่าง นำไปเผาที่อุณหภูมิสูง แล้วนำมาละลายด้วยกรด

6.5.4 การสะกัดด้วยตัวทำละลาย ใช้สำหรับตัวอย่างที่ธาตุที่วิเคราะห์อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ (organometalic compounds) และสามารถสะกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

วิธีเตรียมตัวอย่าง สามารถหารายละเอียดเพิ่มเติมจากเอกสารอ้างอิง และวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างเฉพาะเรื่อง

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่าง ใช้วิธีกราฟมาตรฐาน และวิธีเติมสารมาตรฐาน ซึ่งมีรายละเอียดในบทที่ 5

6.6 ข้อควรปฏิบัติและการแก้ปัญหาเบื้องต้นในการใช้เครื่อง AAS

การวิเคราะห์สารโดยใช้อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ผู้ใช้เครื่องมือจำเป็นต้องศึกษาคู่มือการใช้เครื่องอย่างละเอียด เพื่อให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างถูกวิธี และมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ก่อนทำการวิเคราะห์สาร ควรตรวจสอบเครื่องมืออย่างละเอียด ดังนี้

6.6.1 ตรวจสอบระบบแก๊ส ต้องมีแก๊สเพียงพอสำหรับใช้งาน ในกรณีที่ใช้อากาศจากเครื่องอัดอากาศ ก่อนใช้งานต้องเปิดวาล์วเพื่อไล่ไอน้ำที่ตกค้างในเครื่องอัด

6.6.2 ทดสอบการรั่วไหลของแก๊สในระบบ โดยเปิดแก๊สจากถังแก๊สเข้าระบบ แล้วใช้น้ำยาพิเศษที่เกิดฟองกับแก๊สได้ง่าย ทดสอบการรั่วของแก๊สบริเวณต่าง ๆ คือ

- รอยต่อของท่อนำแก๊สทุกจุด
- วาล์วที่ถังแก๊ส
- รอยต่อระหว่างท่อนำแก๊ส เข้าส่วนของเครื่องมือ

6.6.3 เลือกชนิดของแก๊สเชื้อเพลิง และแก๊สออกซิแดนท์ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง โดยศึกษาคำแนะนำจากคู่มือ พร้อมทั้งปรับอัตราการไหลของแก๊สทุกชนิดให้ได้เปลวไฟที่เหมาะสม

6.6.4 ตรวจสายสัญญาณ และสายเคเบิลทุกสาย ต้องต่อให้แน่นและถูกต้อง

6.6.5 ตรวจสอบระบบดูดไอสาร (hood) ให้อยู่ในสภาพใช้งานได้

6.6.6 ตรวจระบบน้ำทิ้ง ท่อน้ำทิ้งสะอาด ไม่อุดตัน ช่องน้ำทิ้งสะอาด

6.6.7 หัวเผา ต้องสะอาด และอยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง

6.6.8 ติดตั้งหลอดที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ถูกต้องตามชนิดของธาตุที่วิเคราะห์ พร้อมทั้งตรวจสอบสายสัญญาณ และจุดเชื่อมต่อให้แน่น ตรวจสอบอายุการใช้งานของหลอดและพลังงานจากหลอด

6.6.9 ตั้งค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ให้ถูกต้องโดยดูรายละเอียดในคู่มือการใช้เครื่อง

นอกจากนี้ผู้ใช้เครื่องมือควรแก้ปัญหาเบื้องต้นที่อาจเกิดขึ้นขณะทำการวิเคราะห์ได้ ปัญหาที่มักเกิดขึ้นเสมอ สาเหตุของปัญหา และวิธีแก้ไข แสดงในตาราง

ตารางที่ 6.2 ตารางแสดง ปัญหา สาเหตุ และวิธีแก้ปัญหา

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ปัญหา
1. การเปิดเครื่องล้มเหลว	1.1 ไม่มีหลอดกำเนิดแสงอยู่ใน turret หรือหลอดกำเนิดแสงไม่ต่อไม่ถูกต้อง 1.2 ใช้โปรแกรมไม่ถูกต้อง หรือลำดับการเปิดเครื่องไม่ถูกต้อง	1.1 ติดตั้งหลอดกำเนิดแสง และต่อสายไฟฟ้าให้ถูกต้อง 1.2 ออกจากโปรแกรม ปิดเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ แล้วเปิดเครื่อง อีกครั้งให้เครื่องตรวจสอบระบบเรียบร้อยก่อน จึงเปิด คอมพิวเตอร์ เข้าโปรแกรมอีกครั้งตามขั้นตอนในคู่มือ
2. ติดตั้ง หลอดที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง (HCL/EDL)ไม่ได้	2.1 หลอดที่ใช้ อาจมีคุณลักษณะไม่ตรงตามที่ระบุในคู่มือ เช่น รุ่น	2.1 ตรวจสอบชนิดของหลอด มีคุณลักษณะตรงกับเครื่องมือหรือไม่
3. เปิดหลอดที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงได้ แต่ไม่มีแสง	3.1สายสัญญาณ และสายเคเบิล อาจต่อผิด หรือต่อไม่แน่น 3.2 จ่ายกระแสแก่หลอดน้อยเกินไปหรือหลอดหมดอายุ	3.1ตรวจสายสัญญาณ และสายเคเบิลทุกสาย ต้องต่อให้แน่นและถูกต้อง 3.2 ตรวจสอบกระแสที่จ่ายให้แก่หลอดและปรับให้ถูกต้อง
4. กำลังของแสงจากแหล่งกำเนิดแสงต่ำ (low energy)	4.1 หลอดเพิ่งเริ่มเปิดระบบการทำงานยังไม่คงที่ 4.2 จ่ายกระแสน้อยกว่าที่กำหนด 4.3 เปิดช่องแสง (slit) ผิด 4.4 การปรับตั้งตำแหน่งของหลอด (lamp alignment) ไม่เหมาะสม 4.5 หน้าต่างของหลอด(window) สกปรก	4.1 เปิดหลอดก่อนใช้งานประมาณ 30นาที 4.2 ตรวจสอบกระแสที่จ่ายให้แก่หลอด แล้วปรับให้ถูกต้อง 4.3 ตรวจสอบช่องแสง แล้วปรับให้ถูกต้อง 4.4 ทำการปรับตั้งหลอดจนกระทั่งได้พลังงานสูงสุด 4.5 ทำความสะอาดโดยการเช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์
5. กำลังของแสงเป็นศูนย์	5.1 ตั้งความยาวคลื่นไม่ถูกต้อง	5.1 ตรวจสอบความยาวคลื่นและตั้งค่าให้ถูกต้อง

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ปัญหา
	5.2 ต่อขั้วไฟฟ้าไม่ถูกต้อง	5.2 ตรวจสอบขั้วไฟฟ้าและแก้ไขให้ถูกต้อง
6. จุดเปลวไฟไม่ติด	6.1 ไม่มี แก๊สเชื้อเพลิงหรือแก๊สออกซิแดนท์ 6.2 ติดตั้งหัวเผาไม่ถูกต้อง	6.1 ตรวจสอบแก๊สเชื้อเพลิงและแก๊สออกซิแดนท์ เปิดและปรับความดันที่ปล่อยเข้ามาให้เหมาะสม ถูกต้อง 6.2 ตรวจสอบหัวเผา และปรับตั้งให้ถูกต้อง
7. เกิดเปลวไฟย้อนกลับในส่วน spray chamber (flashback of flame)	7.1 มีการรั่วของระบบแก๊ส 7.2 ใช้ออกซิเจนหรืออากาศมากเกินไป 7.3 บริเวณท่อเข้าสู่หัวเผา อุดตัน	7.1 ตรวจสอบระบบแก๊ส แก้ไขบริเวณที่มีแก๊สรั่ว 7.2 ใช้ อากาศ จากเครื่องอัด 7.3ทำความสะอาด burner slot
8. เปลวไฟไม่นิ่ง	8.1 การควบคุมความดันของระบบแก๊สผิดปกติ 8.2 ระบบระบายน้ำทิ้งทำงานผิดปกติ 8.3 แก๊สที่ใช้มีสิ่งปนเปื้อน 8.4 หัวเผาสกปรก 8.5 เนบูไลเซอร์ สกปรก	8.1 ตรวจสอบความดันและระบบควบคุมความดัน แก้ไขให้ถูกต้อง 8.2 ตรวจสอบระบบท่อน้ำทิ้ง ล้าง และกำจัดสิ่งที่อุดตัน 8.3 ตรวจสอบที่กรองน้ำมัน/น้ำของเครื่องอัดอากาศ หรือเปลี่ยน gas supply ใหม่ 8.4 ทำความสะอาดหัวเผา 8.5 ทำความสะอาด เนบูไลเซอร์
9. มีสัญญาณรบกวนสูง	9.1 หัวเผา หรือ เนบูไลเซอร์สกปรก 9.2 ท่อดูดสารอุดตัน 9.3 แหล่งกำเนิดแสงเสื่อมหรือหมดอายุ	9.1 ทำความสะอาดหัวเผาและเนบูไลเซอร์ 9.2 ตรวจสอบท่อดูดสาร ทำความสะอาดหรือเปลี่ยน ใหม่ 9.3 ตรวจสอบแหล่งกำเนิดแสง ปรับกระแสที่ให้แก่หลอด และอาจเปลี่ยนหลอดถ้าจำเป็น
10. ค่า CC แตกต่างจากที่กำหนดในคู่มือมากกว่า	10.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน/แบลงค์ผิด	10.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน/แบลงค์ ใหม่

ปัญหา	สาเหตุที่เป็นไปได้	วิธีแก้ปัญหา
20 เปอร์เซ็นต์	10.2 ตั้งสภาวะการวิเคราะห์ผิ 10.3 เนบูไลเซอร์ และ/หรือหัวเผา อุดตันหรือสกปรก 10.4 หลอดกำเนิดแสง เก่าหรือ เสื่อมสภาพ	10.2 ตั้งสภาวะการวิเคราะห์ใหม่ 1.03 ทำความสะอาด เนบูไล เซอร์ และหัวเผา 1.04 เปลี่ยนหลอดกำเนิดแสง ใหม่

ที่กล่าวมาเป็นเพียงตัวอย่างของปัญหาเบื้องต้นที่มักเกิดขึ้นเสมอ ยังมีปัญหาที่อาจเกิดขึ้นอีกมากมายขณะทำการวิเคราะห์สาร ผู้ทำการวิเคราะห์ต้องศึกษาหาวิธีแก้ไขได้จากคู่มือการใช้เครื่อง ตำรา และเอกสารอ้างอิง

การทดลองที่ 6.1
การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Flame AAS

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีปรับตั้งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flame AAS
2. เพื่อศึกษาวิธีหาสภาพไวของเครื่อง Flame AAS
3. เพื่อศึกษาวิธีหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เครื่องมือตรวจพบ
4. เพื่อศึกษาวิธีหาช่วงความเข้มข้นที่ให้ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกับความเข้มข้นเป็นเส้นตรง

การทดลอง

เครื่องมือ AAS มีข้อกำหนดคุณลักษณะเกี่ยวกับความสามารถในการวิเคราะห์ คือสภาพไวของเครื่องมือ (sensitivity) ต่อสารที่วิเคราะห์ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดได้ (Instrument Detection Limit ,IDL) และ ช่วงการใช้งานที่ให้ความสัมพันธ์ ระหว่างสัญญาณกับความเข้มข้นเป็นเส้นตรง(Linear Dynamic Range) เป็นค่าที่แตกต่างกันสำหรับสารที่วิเคราะห์แต่ละชนิด การใช้เครื่องมือ AAS ในการหาปริมาณสาร ต้องทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องให้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตามข้อกำหนดคุณลักษณะของเครื่องมือนั้น เพื่อให้สามารถใช้เครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

Sensitivity เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์แต่ละชนิดที่ให้ค่าแอบซอร์แบนซ์ (absorbance ,A) = 0.0044 A เรียกว่า Characteristic Concentration (CC) ค่าดังกล่าวแสดงไว้ในคู่มือการใช้เครื่องมือ ก่อนวิเคราะห์สารทุกครั้งต้องทำการตรวจสอบ

Detection Limit หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถรายงานได้ว่ามีอยู่ในตัวอย่างแต่ไม่จำเป็นต้องหาปริมาณได้ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ได้โดยประมาณ หาจากการคำนวณความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่ให้ค่าสัญญาณ (signal) เป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) หรือ S/N = 3 โดยที่สัญญาณรบกวนหาได้จากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของสารละลายแบลงค์

Linear Dynamic Range เป็นช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ที่ทำการวิเคราะห์ในช่วงที่กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง การเขียนกราฟเส้นตรงใช้วิธี Least square และหาความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยการคำนวณค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient ,r)

ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว (Pb) ในสารละลายด้วยเทคนิค Flame AAS โดยวิธี external standard และ standard addition เริ่มตั้งแต่การหาสภาพไวของเครื่องมือ โดยใช้สารละลายมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้นประมาณ 4 เท่า ของสภาพไวที่กำหนดในคู่มือ ปรับสภาวะเครื่องมือ ให้ได้แอบซอร์แบนซ์สูงสุด ทำการวัดแอบซอร์แบนซ์ของสารละลาย คำนวณผลที่ได้ การหาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบด้วยเครื่องมือ โดยวัด

แอบซอร์แบนซ์ของสารละลายแบลงค์ จำนวน 10 ครั้ง คำนวณค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบ หาช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง และหาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่าง

เครื่องมือ/อุปกรณ์

อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 และ100 มล.

ปิเปตวัดปริมาตรขนาด 10 และ มล.

บีกเกอร์ ขนาด 100 มล.

สารเคมีและวิธีเตรียมสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานของตะกั่ว (Pb) ความเข้มข้น 1000 มก/ลิตร (stock solution)
2. สารละลายกรดไนทริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ดวงกรดไนทริกความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 35 มล. ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดไนทริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนถึงขีดปริมาตร
4. เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 20 มก./ลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติม กรดไนทริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนถึงขีดปริมาตร
5. เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 1.0 5.0 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 และ 100 มก./ลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐาน ตะกั่วความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 1.0 5.0 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 และ100.0 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มล. จำนวน 8 ใบ ตามลำดับ เติมกรดไนทริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนถึงขีดปริมาตร

วิธีทดลอง

1. เปิดเครื่องและปรับตั้งสภาวะการวิเคราะห์
   1.1 เปิดเครื่องมือส่วนต่างๆคือ แก๊สอะเซธิลลีน (C_2H_2) เครื่องดูดไอสาร (hood) เครื่องอัดอากาศ เครื่อง AAS เครื่องคอมพิวเตอร์และเครื่องพิมพ์ผล
   1.2 ใส่หลอดกำเนิดแสง (Lamp) ชนิดสำหรับวิเคราะห์ตะกั่ว
   1.3 เปิดโปรแกรมที่ใช้ควบคุมการทำงาน
   1.4 ตั้งค่าพารามิเตอร์ ต่างๆ เช่น สภาวะการวิเคราะห์ ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน ปรับตั้งตำแหน่งของหลอดกำเนิดแสงเพื่อให้แสงเข้าถึงดีเทกเตอร์มากที่สุดโดยดูจากค่าความเข้มแสง และตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ให้แก่หลอด ตามค่าที่กำหนดในคู่มือ ปรับตำแหน่งของหัวเผา และเนบูไลเซอร์

1.5 จุดเปลวไฟ สังเกตสีของเปลวไฟต้องเป็นไปตามที่กำหนดในคู่มือการวิเคราะห์ธาตุ หากไม่เป็นตามที่กำหนด ให้ปรับสัดส่วนของแก๊สเชื้อเพลิงและแก๊สออกซิแดนท์ (อากาศ) จนกระทั่งได้ลักษณะเปลวไฟตามที่ระบุในคู่มือ ฯ

2. หาสภาพไวของการวิเคราะห์ตะกั่ว

2.1 ปรับสภาวะของเครื่องมือ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว โดยดูรายละเอียดจากคู่มือการใช้เครื่อง

2.2 วัดค่าแอบซอร์แบนซ์ ของสารละลายละลายมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้น 20 มก./ลิตร

2.3 คำนวณค่าสภาพไว บันทึกผลในตารางที่ 6.1.1

3. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือตรวจพบโดยใช้สารละลายมาตรฐานตะกั่ว

3.1 ใช้สภาวะการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับสภาวะการวิเคราะห์ ในข้อ 2

3.2 วัดแอบซอร์แบนซ์ ของสารละลายมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้น 1.0 5.0 10.0 20.0 30.0 และ 50.0 มก./ลิตร บันทึกผลในตารางที่ 6.1.2

3.3 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างแอบซอร์แบนซ์ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้น (แกนนอน)

3.4 วัดแอบซอร์แบนซ์ ของสารละลายกรดไนทริก 0.05 โมลาร์ ซ้ำ 10 ซ้ำ

3.5 คำนวณหาเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบโดยเครื่องมือ บันทึกผลในตารางที่ 6.1.3

4. การหาช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง

4.1 ใช้สภาวะการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับสภาวะการวิเคราะห์ ในข้อ 2 วัดแอบซอร์แบนซ์ ของสารละลายมาตรฐานตะกั่วความเข้มข้น 1.0 5.0 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 100.0 มก./ลิตร บันทึกผลในตารางที่ 6.1.4

4.2 เขียนกราฟระหว่าง แอบซอร์แบนซ์ (A) กับความเข้มข้น (C) คำนวณความชันของกราฟ และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ถ้ามีค่าใกล้ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้น

4.3 หรือเขียนกราฟมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมจากเครื่องคอมพิวเตอร์ ใช้สมการเส้นตรง คำนวณค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

4.4 ในกรณีที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ไม่ใกล้ 1 ให้ตัดจุดที่มีความเข้มข้นสูงออกครั้งละ 1 จุด แล้วคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ อีกครั้ง จนกระทั่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ อยู่ในช่วง 1 - 0.995

4.5 บันทึกความเข้มข้นสูงสุดที่ให้กราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เกิน 0.995 (Limit Of Linearity, LOL)

หมายเหตุ กรณีที่ต้องการเก็บสารละลายมาตรฐานไว้ใช้ในห้องทดลองครั้งต่อไป ควรเตรียมในตัวกลางที่เป็นกรด ไนทริก ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 โมลาร์

การคำนวณ

คำนวณหาค่าสภาพไว

$$CC = 0.0044 \times C_{STD} / A$$

C_{STD} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มก./ลิตร)

A = แอบซอร์แบนซ์ (A)

CC = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน(มก./ลิตร)ที่ดูดกลืนแสงได้ 0.0044 A

= สภาพไวของเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์สารที่ทดสอบ

คำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบ และสามารถหาปริมาณ

$$IDL = 3 \times SD / m$$

$$LOQ = 10 \times SD / m$$

m = ความชันของกราฟมาตรฐาน (A/(มก./ลิตร))

SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank (A)

IDL = ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบ (มก./ลิตร)

LOQ = ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ (มก./ลิตร

หาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน

ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน = LOQ – LOL

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 6.1.1 แสดงผลการทดสอบหาสภาพของการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว

ความเข้มข้น (มก./ลิตร)	แอบซอร์แบนซ์ (AU)	ค่า CC ที่วัดได้ (มก./ลิตร)	ค่า CC ที่กำหนดจากคู่มือ (มก./ลิตร)	ความคลาดเคลื่อน(%)

ตารางที่ 6.1.2 บันทึกข้อมูลการทำกราฟมาตรฐานตะกั่ว

ความเข้มข้น(มก./ลิตร)	แอบซอร์แบนซ์ (A)	ความชัน	r

ตารางที่ 6.1.3 ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบ และหาปริมาณ

ครั้งที่	แอบซอร์แบนซ์ (A)	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
ค่าเฉลี่ย		
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
IDL (มก./ลิตร)		
LOQ (มก./ลิตร)		

ตารางที่ 6.1.4 บันทึกข้อมูลการหาความเข้มข้นสูงสุดที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง

ความเข้มข้น(มก./ลิตร)	แอบซอร์แบนซ์(A)	r
IDL		
LOL		

IDL = ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบ (มก./ลิตร)

LOQ = ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ (มก./ลิตร)

LOL = ความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (มก./ลิตร)

r = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

CC = สภาพไว

การทดลองที่ 6.2
การวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงด้วยเทคนิค Flame AAS

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารโดย เทคนิค Flame AAS
2. เพื่อศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างโลหะสำหรับการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค Flame AAS
3. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงในตัวอย่างโลหะ

การทดลอง

Aluminium Alloys เป็นโลหะ Aluminium (Al) ที่มีธาตุอื่นอีกหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ เพื่อให้มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้งาน เช่น โครเมียม (Cr) ทองแดง (Cu) เหล็ก (Fe) แมกนีเซียม (Mg) แมงกานีส (Mn) นิกเกิล (Ni) สังกะสี (Zn) เป็นต้น ปริมาณของธาตุแต่ละชนิดที่เติมลงไปขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งาน การหาปริมาณของธาตุต่างๆ สามารถวิเคราะห์ได้ทุกธาตุจากสารละลายเดียวกันด้วยเทคนิค AAS โดยปรับสภาวะ การวิเคราะห์ให้เหมาะสมสำหรับธาตุแต่ละชนิด

การวิเคราะห์หาปริมาณทองแดง ในตัวอย่าง Aluminium Alloys เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการละลายในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1+1 นำสารละลายตัวอย่างมาหาปริมาณทองแดง ด้วยวิธีเทียบกับกราฟมาตรฐาน และวิธีเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง

เครื่องมือ/อุปกรณ์

อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ตะกั่ว
ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 และ 100 มล.
ปิเปตวัดปริมาตรขนาด 10 มล.
บีกเกอร์ ขนาด 100 มล.

สารเคมีและวิธีเตรียมสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 1000 มก/ลิตร (stock solution)
2. สารละลายกรดไนทริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ตวงกรดไนทริกความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 35 มล. เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร
3. สารละลายกรดไนทริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตวงกรดไนทริกความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มล. เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

4. เตรียมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มก./ลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร ปริมาตร 10 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดไนทริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จนถึงขีดปริมาตร
5. สารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มก./ลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 1 2 3 4 และ 5 มล. ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมกรดไนทริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จนถึงขีดปริมาตร
6. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1+1 โดยปริมาตร ตวงกรดกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มล. เทใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 50 มล.
7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร
8. น้ำที่กำจัดไอออน (deionized water)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง Aluminium Alloys

1. นำตัวอย่าง Aluminium Alloys มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 มล.
2. เติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1+1 ปริมาตร 20 มล. ลงในตัวอย่าง ช้าๆ ระวังไม่ให้สารละลายกระเนออกนอกบีกเกอร์
3. เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทีละหยด พร้อมทั้งให้ความร้อนเล็กน้อยจนของแข็งละลายหมด
4. ทำให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำปราศจากไอออน จนถึงขีดปริมาตร
5. ปิเปตสารละลายจากข้อ 4 ปริมาตร 5 มล. ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำปราศจากไอออน จนถึงขีดปริมาตร
6. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้นต่างๆ โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 4 ปริมาตร 5 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล. จำนวน 6 ขวดเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มก./ลิตรปริมาตร 0.5 1 2 3 และ 4 มล. ลงไปในสารละลายตัวอย่างจำนวน 5 ขวด

วิธีทดลอง

1. เปิดเครื่อง AAS คอมพิวเตอร์ และปรับตั้งสภาวะการวิเคราะห์ ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 6.1 แต่ใช้สภาวะสำหรับการวิเคราะห์ ทองแดง ซึ่งมีรายละเอียดในคู่มือการใช้เครื่อง
2. หาสภาพไวของการวิเคราะห์ทองแดงโดยวิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 6.1 บันทึกผลในตารางที่ 6.2.1
3. หาปริมาณทองแดงในตัวอย่างโดยวิธีเทียบกับกราฟมาตรฐาน (external standard)
   3.1 วัดแอบซอร์แบนซ์ของสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มก./ลิตร
   3.2 เขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้น กับแอบซอร์แบนซ์ บันทึกผลในตารางที่ 6.2.2
   3.3 วัดแอบซอร์แบนซ์ของสารละลายตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความว่าเข้มข้นอยู่ในช่วงกราฟมาตร หากความเข้มข้นสูงกว่าช่วงกราฟมาตรฐานให้เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยกรดไนทริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน หากความเข้มข้นของตัวอย่างต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณ ต้องทำการเพิ่มขนาดตัวอย่างจนกระทั่ง มีความเข้มข้นอยู่ในกราฟมาตรฐาน
   3.4 คำนวณความเข้มข้นของทองแดงในตัวอย่าง หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก บันทึกผลในตารางที่ 6.2.4
4. การหาปริมาณทองแดงด้วยวิธีการเติมสารละลายมาตรฐาน (standard addition)
   4.1 วัดแอบซอร์แบนซ์ของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารลละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 3.0 และ4.0 มก./ลิตร บันทึกผลในตารางที่ 6.2.3
   4.2 เขียนกราฟระหว่าง แอบซอร์แบนซ์ (A) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทองแดง จุดตัดบนแกน X เป็นความเข้มข้นของทองแดงในสารละลายที่นำมาวัด
   4.3 คำนวณหาปริมาณของทองแดงในตัวอย่างเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก บันทึกผลในตารางที่ 6.2.4

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 6.2.1 แสดงสภาวะของเครื่องมือการวิเคราะห์

รายการ	ค่าที่วัดได้
Lamp Energy	
CC	
IDL	
ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์	

ตารางที่ 6.2.2 บันทึกข้อมูลสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐานวิธี external standard

ความเข้มข้น(มก./ลิตร)	แอบซอร์แบนซ์(A)	r

ตารางที่ 6.2.3 บันทึกข้อมูลสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐานวิธี standard addition

ความเข้มข้น(มก./ลิตร)	ค่าแอบซอร์แบนซ์(A)	r

ตารางที่ 6.2.4 แสดงผลการวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์	ปริมาณของ Cu ในตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์)	ความชัน
external standard		
standard addition		

การทดลองที่ 6.3

การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ทองแดงด้วยเทคนิค Flame AAS

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ
2. เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงโดยเทคนิค Flame AAS

การทดลอง

การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ เป็นขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการจัดทำการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการใช้วิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่มีความถูกต้อง ทำให้ผลการวิเคราะห์/ทดสอบมีความน่าเชื่อถือ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี ต้องทำในกรณีดังต่อไปนี้

1. เมื่อมีการกำหนดวิธีการใหม่
2. เมื่อมีการใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (Modified Method)
3. เมื่อนำวิธีมาตรฐานไปใช้ ต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของวิธีมาตรฐานที่นำไปใช้ เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนด และวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้และเพื่อทดสอบว่าวิธีมาตรฐานนั้นมีความเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการหรือไม่เพียงใด ทั้งในด้านเครื่องมือ/อุปกรณ์และผู้ปฏิบัติงาน

ในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่ห้องปฏิบัติการจัดทำขึ้น ต้องทำการทดสอบอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบที่สอดคล้องกับข้อกำหนดที่ต้องการ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์/ทดสอบ จะครอบคลุมตัวแปร ต่อไปนี้คือ ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบโดยวิธีทดสอบ (method detection limit,MDL) ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (limit of quantitation ,LOQ) ความจำเพาะของวิธี (selectivity & specificity) ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (range) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) สภาพไว (sensitivity)ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะการวิเคราะห์/ทดสอบ (ruggedness) และความสามารถในการทำซ้ำในสภาวะที่แตกต่างกัน (robustness) รายละเอียดเกี่ยวกับความหมายและการวิธีการหาของแต่ละตัวแปรอยู่ในเอกสารภาคผนวก ในการประยุกต์ใช้อาจจะไม่จำเป็นที่จะครอบคลุมทุกรายการ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีทดสอบระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบ และชนิดของตัวอย่าง การทดลองนี้จะทดลองหา ความแม่น ความเที่ยง ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน และ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

หาความแม่นของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงในตัวอย่าง Aluminium Alloys โดยวิธีหาปริมาณที่ได้กลับคืน (recovery) จากการเติมสารละลายมาตรฐาน (spike) ลงในตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นใกล้กับปริมาณต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณ กลางช่วงกราฟมาตรฐาน และ ใกล้ค่าปริมาณสูง

สุดที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน โดยทำซ้ำจุดละอย่างน้อย 7 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณที่ได้กลับคืน

$$\text{recovery , \%} = \frac{(C_{ss} - C_s)}{C_{std}} \times 100$$

C_{SS} = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_S = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง

C_{STD} = ปริมาณสารสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

หาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ใช้ข้อมูลที่วิเคราะห์หา ปริมาณที่ได้กลับคืน คำนวณค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

RSD ,% = SD / ค่าเฉลี่ย x 100

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x}{n}$$

SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

n = จำนวนครั้งที่วัดซ้ำ

x_i = ค่าที่วัดได้

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของค่าที่วัดได้

หาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบโดยวิธีทดสอบโดยการประมาณค่าจากปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบโดยเครื่องมือที่หาได้จากการทดลองที่ 6.2 ส่วนปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ ค่าประมาณ 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ ทำการยืนยันค่า โดยหา ความแม่น และความเที่ยง ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่ากับปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ ที่ได้จากการคำนวณ

$$MDL = 3SD_{blk}$$

LOQ = 10 SD_{blk}

SD_{blk} = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง

หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยใช้ข้อมูลที่วิเคราะห์หาปริมาณที่ได้กลับคืน โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient , r)

เครื่องมือ/อุปกรณ์/เครื่องแก้วเหมือนกับการทดลองที่ 6.2

สารเคมีและการเตรียมสารละลายเหมือนกับการทดลองที่ 6.2

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง Aluminium Alloys มาตัวอย่างตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 มล. เติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1+1 ปริมาตร 20 มล. ลงในตัวอย่าง ช้าๆ ระวังไม่ให้สารละลายอกนอกบีกเกอร์ เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทีละหยด พร้อมทั้งให้ความร้อนเล็กน้อยจนของแข็งละลายหมด ทำให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำปราศจากไอออน จนถึงขีดปริมาตร เจือจางให้ตัวอย่างให้มีความเข้มข้น ประมาณ 0.1 มก./ลิตร เตรียมตัวอย่างจำนวน 7 ซ้ำ
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทองแดง ปริมาณเท่ากับปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ ซึ่งหาได้จากการทดลองที่ 6.2 จำนวน 7 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 1 มล. ลงในตัวอย่าง Aluminium Alloys ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ทำการวิเคราะห์เหมือนข้อ 1.
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทองแดง ประมาณ 2 มก./ลิตร จำนวน 7 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 10 มล. ลงในตัวอย่าง Aluminium Alloys ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ทำการวิเคราะห์เหมือนข้อ 1.
4. เตรียมสารละลายแบลงค์ที่เติมสารละลายมาตรฐาน ประมาณ 4 มก./ลิตร จำนวน 7 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ปริมาตร 20 มล. ลงในตัวอย่าง Aluminium Alloys ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ทำการวิเคราะห์เหมือนข้อ 1.

วิธีทดลอง

1. เปิดเครื่อง AAS คอมพิวเตอร์ และปรับตั้งสภาวะการวิเคราะห์ เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 6.2
2. ใช้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบโดยเครื่องมือที่ได้จากการทดลองที่ 6.2 มาประมาณค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ทองแดงในตัวอย่าง และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ
3. ใช้ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ที่ได้จากการทดลองที่ 6.2 เป็นข้อมูลประกอบในการหาปริมาณที่ได้กลับคืน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

4. เตรียมกราฟมาตรฐานตามรายละเอียดในการทดลองที่ 6.2
5. วัดค่าแอบซอร์แบนซ์ของสารละลายตัวอย่าง และสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทองแดง บันทึกผลในตารางที่ 6.3.1
6. คำนวณปริมาณที่ได้กลับคืน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกผลในตารางที่ 6.3.1
7. สรุปผลการทดลองในตารางที่ 6.3.2

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 6.3.1 บันทึกข้อมูลการหา ปริมาณที่ได้กลับคืน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

Cs	ครั้งที่	A	Ca	Cm	RSD	recovery
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					

ตารางที่ 6.3.2 บันทึกผลการทดลอง

ข้อมูล	ปริมาณ(มก./ลิตร)
SD_{blk}	
MDL	
LOQ	
LOL	
Linearity	

Cs = ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติม

Ca = ความเข้มข้นสารละลายที่วัดได้

Cm = ความเข้มข้นสารละลายที่วัดได้เฉลี่ย

A = แอบซอร์แบนซ์

บทที่ 7
สรุปและวิจารณ์

7.1 ผลการพัฒนาคู่มือการทดลอง

เอกสารการเรียนการสอนวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงเดิมมีเนื้อหา การทดลองเป็นเพียงหลักการเบื้องต้นของการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ ทำให้ผู้เรียน ได้รับความรู้และประสบการณ์ในการฝึกใช้เครื่องมือเพียงพื้นฐานเบื้องต้น แต่ในสภาวะปัจจุบัน ผลจากการวิเคราะห์/ทดสอบ ต้องมีหลักฐานแสดงความน่าเชื่อถือ จึงสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบจึงต้องนำระบบประกันคุณภาพมาใช้ในการทำงานเพื่อให้การวิเคราะห์ทดสอบน่าเชื่อ จากปัญหาดังกล่าวทำให้เนื้อหาในหลักสูตรการเรียนการสอนต้องพัฒนาปรับปรุง เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของบุคลากรด้านปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาครัฐและเอกชน คู่มือการทดลองวิชาปฏิบัติการเคมีขั้นสูงที่พัฒนานี้ มีเนื้อหาเกี่ยวกับทฤษฎีเกี่ยวกับหลักการวิเคราะห์สาร หลักการและองค์ประกอบของเครื่องมือ ข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องมือและการแก้ปัญหาเบื้องต้นทำให้ผู้เรียนได้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับทฤษฎีมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเครื่องมือที่ดี สามารถแก้ไขปัญหาพื้นฐานที่มักเกิดกับเครื่องมือได้ ทำให้การปฏิบัติการทดลองโดยการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้เทคโนโลยีชั้นสูงมีประสิทธิภาพที่ดียิ่ง นอกจากนี้การเพิ่มเนื้อหาเรื่องการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ/เครื่องมือ และเรื่องการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี ซึ่งเป็นเรื่องที่จำเป็นสำหรับการดำเนินงานด้านการประกันคุณภาพการวิเคราะห์ทดสอบ จึงเป็นเรื่องที่สำคัญมากในการผลิตบุคลากรด้านปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นความต้องการของหน่วยงานด้านวิทยาศาสตร์ทั้งภาครัฐและเอกชน ทำให้ผู้เรียน นำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานได้ทันที ใช้ประกอบการฝึกอบรมในหัวข้อที่เกี่ยวข้อง และเอกสารคู่มือการทดลองนี้ยังใช้ศึกษาค้นคว้าในการเรียนในชั้นที่สูงขึ้น ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย เพราะก่อนการจัดทำคู่มือผู้พัฒนาคู่มือซึ่งเป็นผู้สอนในรายวิชาด้วยได้ทำการทดลองใช้วิธีการเหล่านี้ จนได้ผลดีและสามารถทำการทดลองได้ภายในเวลาที่จำกัด

7.2 ประโยชน์ที่ได้รับ

7.2.1 ได้คู่มือการทดลองเป็นภาษาไทย ที่มีข้อมูลครบถ้วน ถูกต้องตามหลักวิชา ใช้เป็นคู่มือประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง

7.2.2 คู่มือการทดลองได้จัดการทดลองที่มีความปลอดภัย หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย จัดมีคำเตือนด้านความปลอดภัยสำหรับผู้ดำเนินการทดลองโดยที่ผู้ควบคุมการปฏิบัติงานอาจเพิ่มเติมมาตรการด้านความปลอดภัยเท่าที่เห็นว่าจำเป็น

7.2.3 ใช้เป็นสื่อการสอนแก่นักศึกษาของสถานศึกษาเคมีปฏิบัติ และการฝึกอบรมในหลักสูตรการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ ทดสอบ และวิจัย

7.2.4 ผู้ปฏิบัติงานด้านวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทดสอบโดยใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ สามารถนำไปใช้ศึกษาหลักทฤษฎี หลักการใช้เครื่องมือ และการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือ และใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน

7.2.5 ผู้ทดลองใช้อ่านประกอบการเรียนวิชาเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง ภาคทฤษฎี เพื่อให้เข้าใจเนื้อหา ภาคทฤษฎี มากยิ่งขึ้น

7.2.6 ส่งเสริมการดำเนินงานการจัดทำระบบประกันคุณภาพการศึกษา

7.3 สรุป

คู่มือการทดลองวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงเล่มนี้ ใช้ประกอบการสอนนักศึกษาของสถานศึกษาเคมีปฏิบัติมาแล้วประมาณ 5 รุ่น รวม 150 คน ผลการเรียนนักศึกษาผ่านการประเมินผลตามวัตถุประสงค์ และยังสามารถนำเอกสารประกอบการเรียนไปใช้ในการเรียนชั้นสูงขึ้น นอกจากนี้คู่มือการทดลองนี้ยังนำไปใช้ประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการใช้เครื่องมือในงานวิเคราะห์ทดสอบและวิจัย ในหลักสูตรที่เกี่ยวข้องโดยที่ผู้พัฒนาหลักสูตรเป็นผู้สอน ได้แก่ หลักสูตรการใช้แก๊สโครมาโทกราฟในงานวิเคราะห์ทดสอบ การใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในงานวิเคราะห์ทดสอบ การใช้อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในงานวิเคราะห์ทดสอบ และการใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟในงานวิเคราะห์ทดสอบ โดยนำมาใช้สอนในภาคปฏิบัติ หลักสูตรละ 4 รุ่น ผู้เข้าอบรมประมาณ 640 คน ผลการใช้เอกสารประกอบการฝึกอบรม ได้ผลตอบรับจากผู้เข้ารับการฝึกอบรมในเกณฑ์ ดี

ภาคผนวก 1

การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีทดสอบ

(Method Validation)

วิธีทดสอบ (test methods) ที่ห้องปฏิบัติการใช้ มาจากแหล่งต่าง ๆดังนี้

1. วิธีมาตรฐานระดับระหว่างประเทศ หรือระดับประเทศฉบับล่าสุดซึ่งระบุเป็นวิธีมาตรฐาน
2. วิธีมาตรฐานของชาติหรือจากเอกสารสิ่งตีพิมพ์ขององค์การทางวิชาการที่มีชื่อเสียงและเป็นที่ยอมรับ เอกสารหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง
3. วิธีที่ระบุโดยผู้ผลิตเครื่องมือ (manufacturer)
4. วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method)
5. วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง (inhouse method)

การเลือกวิธีทดสอบ เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการนั้น ห้องปฏิบัติการควรเลือกโดยพิจารณาดังนี้

1. เป็นวิธีที่ยอมรับโดยองค์การระดับนานาประเทศ
2. เป็นวิธีที่มีการจัดทำเป็นเอกสารสามารถเชื่อถือได้ เนื่องจากได้ผ่านการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี (validated) แล้ว โดยห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ที่เข้าร่วมในการจัดทำวิธีทดสอบ
3. เป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากมีการทดสอบหรือ ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งาน และสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชนิดต่าง ๆ
4. เป็นที่นิยมใช้ทั่วไป
5. รวดเร็ว ง่าย และเสียค่าใช้จ่ายน้อย

การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี เป็นกระบวนการหนึ่งในการจัดทำการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการใช้วิธีวิเคราะห์ทดสอบที่มีความเหมาะสมทำให้ผลการวิเคราะห์ทดสอบมีความน่าเชื่อถือ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี ต้องทำในกรณีดังต่อไปนี้

1. เมื่อมีการกำหนดวิธีการใหม่
2. เมื่อมีการใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน
3. เมื่อนำวิธีมาตรฐานไปใช้ ต้องตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของวิธีมาตรฐานที่นำไปใช้ เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนด และวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้และเพื่อทดสอบว่าวิธีมาตรฐานนั้นมีความเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการหรือไม่เพียงใด ทั้งในด้านเครื่องมือ/อุปกรณ์และผู้ปฏิบัติงาน

ในการศึกษาความเหมาะสมของวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการจัดทำขึ้น ต้องทำการทดสอบอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบที่สอดคล้องกับข้อกำหนดที่ต้องการ การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีทดสอบ จะครอบคลุมตัวแปร ดังต่อไปนี้คือ

1. ความแม่น (Accuracy)
2. ความเที่ยง (Precision)
3. ปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่ตรวจพบ (Limit of detection ,LOD)
4. ปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถหาปริมาณได้ โดยที่มีความแม่น และความเที่ยงที่ยอมรับ (Limit of quantitation, LOQ)
5. ความจำเพาะ (Selectivity & Specificity)
6. ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ (Range)
7. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)
8. สภาพไว (Sensitivity)
9. ความแข็งของวิธี (Ruggedness & Robusness)

ในการประยุกต์ใช้อาจจะไม่จำเป็นที่จะครอบคลุมทุกรายการ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีทดสอบระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบ และชนิดของตัวอย่าง

Accuracy

Accuracy หรือความแม่น หมายถึง ความใกล้เคียงกันของผลการวัดกับค่าจริง ถ้าผลการวัดมีความใกล้เคียงค่าจริง แสดงว่ามีความแม่นสูง ถ้าผลการวัดต่างจากค่าจริงมาก แสดงว่าการวัดมีความแม่นต่ำ ระดับของความแม่นแสดงด้วยค่าความคลาดเคลื่อน (error) ซึ่งหาได้จากผลต่างของค่าที่วัดได้กับค่าจริง ความแม่นแสดงถึงคุณภาพของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบรวมถึงผู้วิเคราะห์ทดสอบด้วย ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ซึ่งเราไม่ทราบค่าที่แท้จริง จึงไม่สามารถหาความแม่นโดยตรงได้ แต่สามารถหาความแม่นของวิธีได้ โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certified Reference Material,CRM) และการหา recovery หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

1. ทำการวิเคราะห์ CRM หาเกณฑ์ตัดสินผลการวิเคราะห์โดยใช้การทดสอบแบบที (T-test)

$$t = (\bar{x} - \mu)\frac{\sqrt{n}}{s}$$

$t =$ ค่า t จากการคำนวณ

$\bar{x} =$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด CRM

$\mu =$ ค่ากำหนดของ CRM

$n =$ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์ซ้ำ

$s =$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวัดซ้ำ

ค่า t ที่ได้จากการคำนวณกับค่า t_c จากตาราง ที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด

ยอมรับที่ $t \leq t_c$

2. หา recovery โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเข้มข้นปริมาณที่ทราบแน่นอน (spike) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณที่แท้จริงของสารโดยคำนวณเป็น recovery หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ การเติมสารมาตรฐานควรจะทำที่ ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับ MDL ที่ความเข้มข้นสูงสุดของช่วงที่ทำการวิเคราะห์ได้ และใกล้จุดกลางของช่วงการวิเคราะห์ เกณฑ์การยอมรับ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง และปริมาณสารในตัวอย่าง

การหาความแม่นโดยวิธีหา recovery มีข้อจำกัดคือ สารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างไม่ได้เป็นสารที่เหมือนกับตัวอย่าง (สารที่มีในธรรมชาติ) ส่วนมากจะใช้สารที่หาได้ง่าย ดังนั้นจึงอาจจะทำให้ค่า recovery ดีเกินความเป็นจริงเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์สารที่มีในตัวอย่างธรรมชาติ วิธีการที่จะแก้ข้อจำกัดข้างต้นคือทำการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิง (Certified Reference Material ,CRM) ซึ่งมีค่ารับรอง (certified value) หรือค่าที่ตกลงยอมรับ (concensus value) ในกรณีที่ recovery ที่ได้อาจจะแตกต่างจากค่าที่ตกลงยอมรับ เนื่องจากวิธีการต่างกัน NATA ได้ให้ข้อแนะนำว่าในการรายงานผลไม่ควรจะใช้ค่าแก้ของ recovery ควรจะรายงานเป็นค่าที่ทดสอบ แล้วระบุค่า recovery หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ไว้ (นอกจากวิธีทดสอบจะระบุให้ใช้ค่าแก้จาก recovery)

Precision

Precision หรือความเที่ยงของวิธีทดสอบ เป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงของกลุ่มค่าที่ทดสอบหลายครั้ง หรือทดสอบกับตัวอย่างหลายตัวอย่าง ถ้าผลการวัดมีความใกล้เคียงกัน แสดงว่าความเที่ยงสูง ถ้าผลการวัดมีค่าแตกต่างกันมาก แสดงว่าการวัดนั้น ความเที่ยงต่ำ ความเที่ยงแสดงด้วย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation ,SD) หรือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ,RSD) หรือ coefficient of variation (CV) เกณฑ์การยอมรับค่า CV ในการทดสอบ หาจากกราฟ และการคำนวณ แสดงใน*รูปที่ A1*

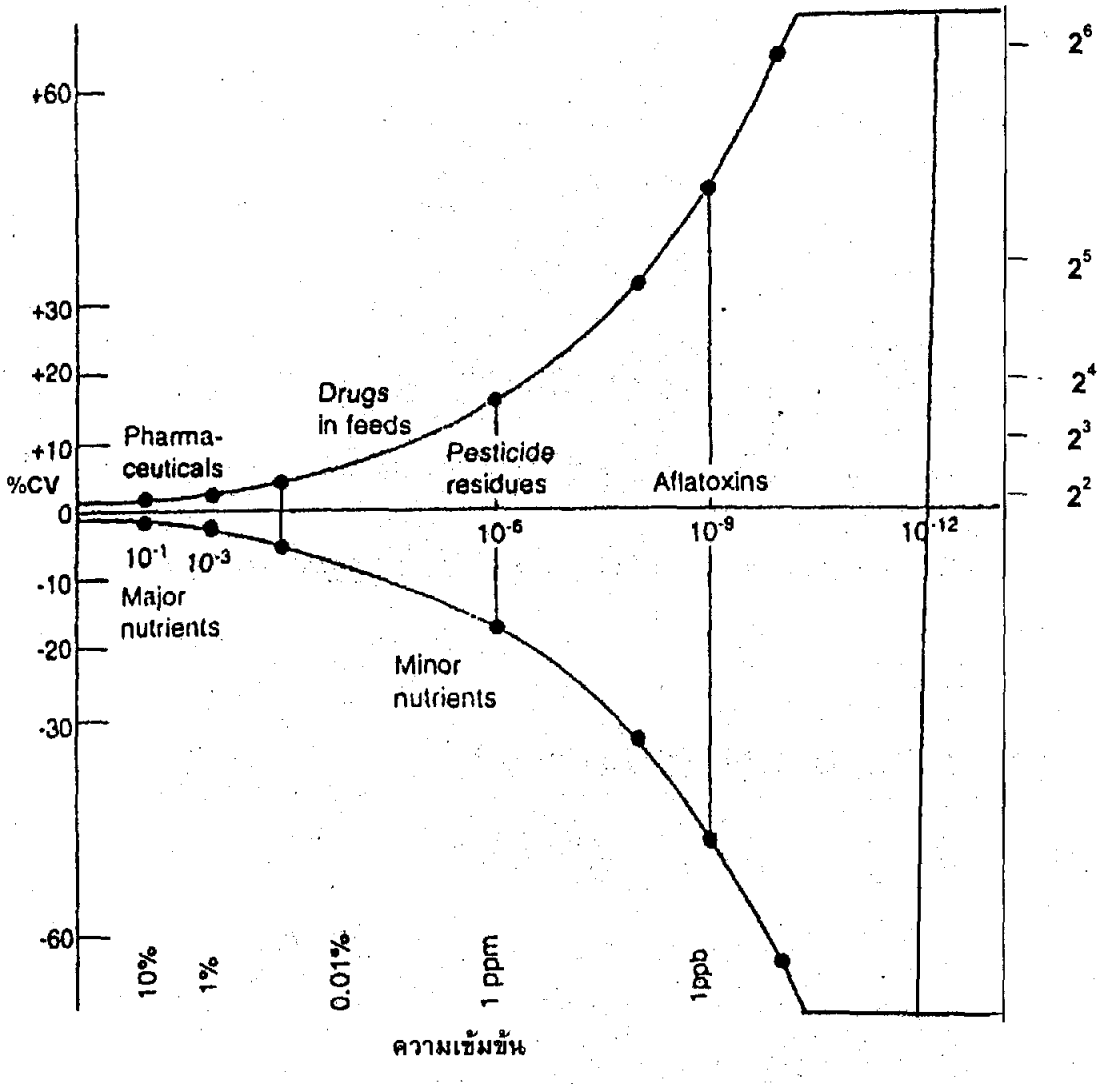
ค่า Precision อาจแสดงด้วยแผนภูมิควบคุม (statistic control chart) ซึ่งเป็นการเขียนกราฟ ระหว่างผลการทดสอบและลำดับครั้งที่ทดสอบ ซึ่งจะทำให้เห็นความเป็นปกติหรือเกณฑ์การยอมรับได้ง่าย

ความเที่ยงของผลการทดสอบ อาจแสดงด้วยค่าอีก 2 ค่า คือ repeatability และ reproducibility

Repeatability เป็นความเที่ยงที่สัมพันธ์กับการทำการวัดภายใต้สภาวะที่คงที่ ได้แก่ ใช้วิธีทดสอบ ตัวอย่าง ผู้ทดสอบ และห้องปฏิบัติการเดียวกัน ในช่วงเวลาสั้น ๆ

Reproducibility เป็นความเที่ยงของการวัดตัวอย่างเดียวกัน ใช้วิธีทดสอบเดียวกัน ใช้วิธีทดสอบเดียวกัน ภายใต้สภาวะอย่างใดอย่างหนึ่งที่แตกต่างกัน ได้แก่ แต่ทำโดยผู้ทดสอบคนละคน

ต่างห้องปฏิบัติการ เครื่องมือที่ใช้ต่างกัน ในช่วงเวลาที่ห่างกัน reproducibility จะเป็นการทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ โดยผ่านการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory studies)



รูปที่ A1 *แสดงความสัมพันธ์ของ coefficient of variation*[5]
(แสดงด้วยหน่วยเป็น % ซ้ายมือ และหน่วยเป็น % ของ 2 ยกกำลัง)
และค่า concentration (หน่วยเป็น 10 ยกกำลัง)
จุดอ้างอิงคือที่ 1 ppm (10^{-6}) ค่า CV = 2^4 = 16 %

ค่า CV สามารถคำนวณได้จากสมการ

$cv = 2^{(1-0.5\log C)}$ วัดซ้ำจากหลายห้องปฏิบัติการ

$cv = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$ วัดซ้ำจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน

เกณฑ์การยอมรับ ค่า CV จากการทดลองต้องน้อยกว่า CV จากการคำนวณ

Limit of detection (LOD) and Limit of quantitation (LOQ)

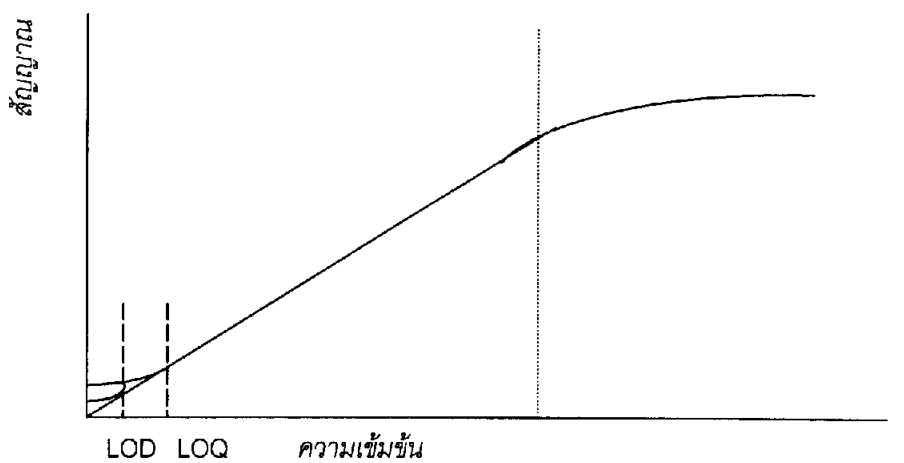
LOD เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยไม่จำเป็นต้องหาปริมาณได้ โดยทั่วไป LOD คือปริมาณสารที่ให้สัญญาณ (signal,S) เป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise ,N) ค่าLOD หาได้ 2 แบบคือ instrumental detection limit (IDL) และ method detection limit (MDL)

IDL เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยเครื่องมือวัด หาโดยการวัดค่าสารละลายแบลงค์ของสารละลายมาตรฐานไม่น้อยกว่า 10 ครั้ง คำนวณค่า SD_{blk}

MDL เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยวิธีทดสอบนั้น กระบวนการหา MDL ต้องวัดค่าสารละลายแบลงค์ของตัวอย่างที่ดำเนินการเตรียมตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการวิเคราะห์

LOQ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถหาปริมาณได้ โดยที่มีความแม่นและความเที่ยง เป็นที่ยอมรับ โดยทั่วไป LOQ คือปริมาณสารที่ให้สัญญาณ ประมาณ 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

ความสัมพันธ์ของ LOD LOQ และ LOL แสดงใน*รูปที่ A2*



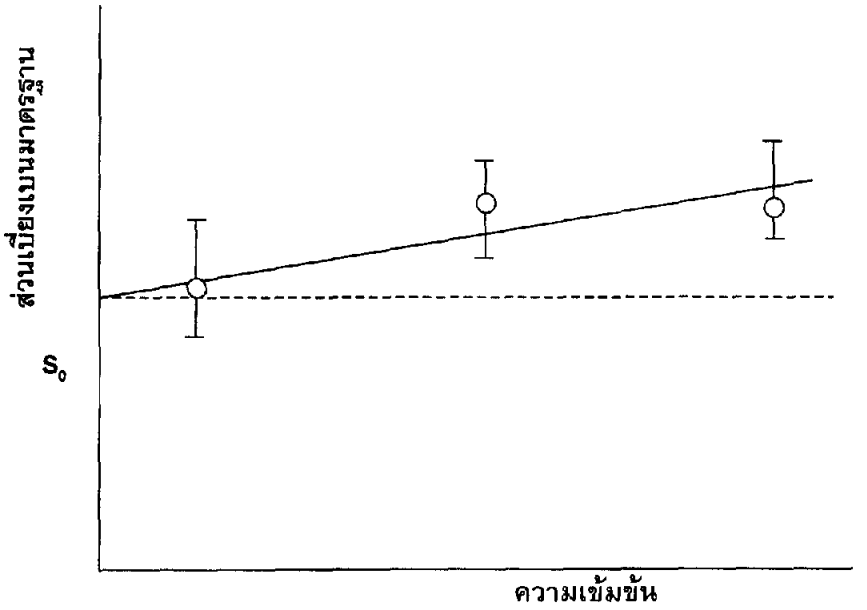
รูปที่ A2 แสดงตำแหน่งของ LOD LOQ และLOL[5]

MDL และ LOQ สามารถหาได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวิธีการหาสัญญาณรบกวนดังนี้

1. โดยการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank) ซ้ำ 7-10 ซ้ำ อ่านค่าเป็นความเข้มข้นหรือปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD_{blk}) ประมาณค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ จาก 3 เท่าของ SD_{blk} ส่วนค่าประมาณของปริมาณต่ำสุดที่

วิเคราะห์หาปริมาณได้ จาก 10 เท่าของ SD_{blk} ในการรายงานค่า LOQ ต้องยืนยันความถูกต้องของค่าที่หาได้โดยการ ตรวจสอบความแม่น (recovery) และความเที่ยง (RSD) ของตัวอย่างที่มีปริมาณสารเท่ากับค่า LOQ ผลที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

2. การเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง 3 ความเข้มข้น คือความเข้มข้น ที่ใกล้เคียงกับ LOD ที่ความเข้มข้นสูงสุดของช่วงการวิเคราะห์ที่ทำได้ และใกล้จุดกลางของช่วงการวิเคราะห์ ของกราฟมาตรฐานที่ใช้งาน ทำการวัดซ้ำจุดละ 7-10 ซ้ำ คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เขียนกราฟระหว่าง ค่า SD กับความเข้นข้นที่วัดได้ ลากเส้นตัดแกน Y ค่า SD ที่อ่านจากจุดตัดแกน Y คือ SD ของสารละลายแบลงค์ ดังแสดง*ในรูป A3*



รูปที่ A3 *แสดงการหาค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์ (S_0)*[5]

3. การเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง ความเข้มข้นใกล้เคียงกับ ค่า LOD ทำการวัดซ้ำ 7-10 ซ้ำ คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เป็นค่าสัญญาณรบกวน ก่อนการสรุปค่า LOD LOQ ต้องยืนยันผล ดังนี้

MDLx10 > สารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

MDL < สารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

MDL < ปริมาณต่ำสุดในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์(PAL)

S/N $\geq$ 3

recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

RSD อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

4. การวัดความสูงของสัญญาณจากฐานถึงจุดสูงสุด (peak to peak) เติมสารละลายมาตรฐานจนให้สัญญาณสูงกว่าสัญญาณรบกวน 2-3 เท่า ทดสอบความแม่นและความเที่ยงให้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

Selectivity & Specificity

Selectivity และ Specificity ของวิธีทดสอบ หมายถึงความสามารถในการวิเคราะห์สารที่ต้องการในตัวอย่างที่มีสารอื่นเจือปน (sample matrix)

Range & Linear Range

Range คือช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้โดยที่ให้ความแม่นและความเที่ยงตามที่ยอมรับได้ หรือเรียกว่าช่วงการใช้งาน หาโดยทำการเติมสารที่ต้องการหาปริมาณลงในสารละลายแบลงค์ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน ทำการวิเคราะห์แบลงค์และแบลงค์ที่เติมสารมาตรฐาน และคำนวณหาความแม่นโดยการหา recovery และหาความเที่ยงโดยการคำนวณค่า RSD ทั้งสองค่าต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ช่วงการใช้งานอาจจะกว้างกว่าช่วงที่ให้กราฟมาตรฐานเส้นตรง (linear range)

Linear Range คือช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ที่มีความสัมพันธ์กับสัญญาณที่วัดได้เป็นเส้นตรง หาโดยการวิเคราะห์สารที่ต้องการหาปริมาณที่ความเข้มข้นต่างๆ เขียนกราฟระหว่างสัญญาณ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้น (แกนนอน) โดยใช้สมการเส้นตรง ใช้วิธี Method of least squares ในการเขียนกราฟเส้นตรง

Linearity

Linearity เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้จากการวิคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำสุดจนถึงสูงสุด ตามช่วงที่วิธีวิเคราะห์/ทดสอบสามารถใช้งานได้ ตัวแปรที่เกิดจากการวิเคราะห์อาจมีมากกว่าหนึ่งชนิด การศึกษาว่าตัวแปรต่างๆมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ ถ้ามี ความสัมพันธ์นั้นเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น หรือความสัมพันธ์ชนิดอื่น ถ้าเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นสมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัวซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง คือ

$$y = a + bx$$

ผลการทดสอบจะถูกนำมาคำนวณ ค่า ความชัน (slope ,b) และจุดตัดแกน (intercept, a) โดยสมการถดถอย (regression lion)

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sum x_i^2 - \sum y_i^2}$$

สหสัมพันธ์ (correlation) คือตัววัดความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปว่ามีความสัมพันธ์กันมากน้อยเพียงใด ค่าที่ใช้วัดคือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่าระหว่าง -1 ถึง 1 ค่า

สัมประสิทธิ์ที่ใกล้ 1 หรือ -1 แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันมาก ถ้าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าสัมพันธ์กันน้อยมาก โดยทั่วไปยอมรับที่ ค่า r อยู่ในช่วง 1-0.995

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}}$$

Sensitivity

Sensitivity ของวิธีทดสอบ เป็นความแตกต่างของสัญญาณต่อความเข้มข้น ซึ่งแสดงด้วยความชันของกราฟมาตรฐาน การรายงาน Sensitivity จะต้องระบุช่วงความเข้มข้นด้วย

Ruggedness

Ruggedness หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน ภายใต้ตัวแปรของสภาวะการทำงานปกติ ได้แก่เครื่องมือที่มีคุณลักษณะ ต่างกัน ผู้ทดสอบมีประสบการณ์ต่างกัน สารเคมีสารมาตรฐานต่าง supplier หรือต่าง batch สภาวะแวดล้อมของการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรด-เบส ที่ต่างกัน เป็นต้น เนื่องจากในการทดสอบมักจะมีปัจจัยทำให้ผลการวิเคราะห์แตกต่างกันอยู่ตลอดเวลา ไม่ว่าจะเป็นห้องปฏิบัติการเดียวกันหรือต่างกัน การทดสอบ ruggedness จึงเป็นการทดสอบโดยตั้งใจที่จะเปลี่ยนตัวแปรของวิธีปฏิบัติการ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจะทดสอบความแข็งของวิธีทดสอบภายใต้ภาวะการทำงานปกติที่มีตัวแปรตัวใดตัวหนึ่งหรือหลายตัวแปรที่เปลี่ยนแปลง โดยปกติ การทดสอบ ruggedness ของวิธีทดสอบมักจะทำโดยห้องปฏิบัติการแห่งแรกที่พัฒนาวิธีทดสอบนั้นก่อนที่จะนำวิธีทดสอบไปให้ห้องปฏิบัติการอื่น ๆ นำไปใช้ร่วมกัน

Robutsness

Robutsness หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง ที่แตกต่างกัน ภายใต้ตัวแปรของสภาวะการทำงานปกติ เพื่อทดสอบทดสอบความแข็งของวิธีทดสอบภายใต้ภาวะการทำงานปกติ

ภาคผนวก 2

ตัวทำละลาย คอลัมน์ และดีเทกเตอร์ที่ใช้สำหรับ เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีและแก๊สโครมาโทกราฟี

ตารางที่ A1 แสดงสมบัติทางฟิสิกส์และการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายอินทรีย์

SOLVENT	POLARITY INDEX	REFRACTIVE INDEX	UV (nm) CUTOFF	BOILING POINT (°C)	VISCOSITY	SOLUBILITY IN WATER (% w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118.1	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56.2	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	210	81.6	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80.2	0.65	0.18
n-Butanol	3.9	1.399	215	117.7	2.98	7.81
Butyl Acetate	4.0	1.394	254	125.0	0.73	0.43
Carbon tetrachloride	1.6	1.466	265	76.8	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.443	245	61.3	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.427	210	80.7	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane[1]	3.5	1.445	230	84.1	0.79	0.81
1,2- Dichloromethane[2]	3.1	1.424	245	40.7	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.428	310	155.0	0.90	100
Dimethyl sulfoxide[3]	7.2	1.478	268	189.0		100
Dioxane	4.8	1.422	220	101.3	1.54	100
Ethanol	5.2	1.361	210	78.4	1.20	100
Ethyl Acetate	4.4	1.370	260	77.2	0.45	8.7
di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	34.6	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.388	200	98.0	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.378	210	69.0	0.32	0.001
Methanol	5.1	1.329	210	64.6	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether[4]	2.5	1.369	210	54.5	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone[5]	4.7	1.379	329	80.0	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	210	36.1	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.385	210	97.2	2.30	100
iso-Propanol[6]	3.9	1.377	205	82.4	2.40	100
di-iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	67.8	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	280	64.7	0.51	100
Toluene	2.4	1.489	280	110.8	0.52	0.051
Trichloroethylene	1.0	1.477	273	86.9	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100.0	1.00	
Xylene	2.5	1.500	290	139.1	0.61	0.018

ตารางที่ A2 แสดงสภาพขั้วของตัวทำละลาย

Relative Polarity	Compound Formula	Group	Representative Solvent Compounds
Nonpolar	R - H	Alkanes	Petroleum ethers, ligroin, hexanes
	Ar - H	Aromatics	Toluene, benzene
Increasing Polarity ↓	R - O - R	Ethers	Diethyl ether
	R - X	Alkyl halides	Tetrachloromethane, chloroform
	R - COOR	Esters	Ethyl acatate
	R - CO - R	Aldehydes ketones	Acetone, methyl ethyl ketones
	$R - NH_2$	Amines	Pyridine, triethylamine
	R - OH	Alcohols	Methanol, ethanol, isopropanol, butanol
	$R - COHN_2$	Amides	Dimethylformamide
Polar	R - COOH	Carboxylic Acids	Ethanoic acid
	H - OH	Water	Water

ตารางที่ A3 แสดงหน่วยวัดความดัน

psi	Kg/cm^3	kPa	Bar
100	7.0	689	6.9
500	35.2	3447	34.5
1000	70.3	6895	69.0
150	105	10342	103
2000	141	13790	138
3000	211	20684	207
4000	281	27579	276

ตารางที่ A4 แสดงสารบางชนิดที่ใช้เป็นเฟสนิ่ง และช่วงอุณหภูมิที่ใช้งาน

Typical Temperature Limits

Phase	Temperature limit*
Polysiloxanes:	
100% dimethyl	-60 to 325/350°C
100% dimethyl (high temp.)	-60 to 400°C
5% diphenyl-95% dimethyl	-60 to 325/350°C
5% diphenyl-95% dimethyl (high temp.)	-60 to 400°C
20% diphenyl-80%dimethyl	40 to 290/310°C
35% diphenyl-65%dimethyl	40 to 280/300°C
50% diphenyl-50%dimethyl	40 to 280/300°C
50% diphenyl-50%dimethyl (high temp.)	40 to 340/365°C
6% cyanopropylphenyl-94% dimethyl	-20 to 280/300°C
14% cyanopropylphenyl-86% dimethyl	-20 to 280/300°C
50% cyanopropylphenyl-50% dimethyl	45 to 220/240°C
50% cyanopropyl-50% dimethyl	40 to 250/260°C
50% trifluoropropyl-50% dimethyl	45 to 240/260°C
Polyethylene glycols:	
PEG ("WAX")	40 to 250/260°C
Acid treated PEG ("FFAP")	40 to 250/260°C
Base treated PEG ("CAM")	40 to 250/260°C

*Upper limits are usually about 20°C less for d_f > 1 μm.

*Temperature limits may be slightly different for capillary columns from various manufacturers. Actual temperature limits should be confirmed by the specific column manufacturer.

ตารางที่ A5 แสดงคุณลักษณะของคอลัมน์ของแก๊สโครมาโทกราฟ

	FSOT	**WCOT**	**SCOT**	**Packed**
Length, m	10-100	10-100	10-100	1-6
Inside diameter,mm	0.1-0.53	0.25-0.75	0.5	2-4
Efficiency, plates/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Sample size,ng.	10-75	10-1000	10-1000	$10\text{-}10^6$
Relative pressure	Low	Low	Low	High
Relative speed	Fast	Fast	Fast	Slow
Chemical inertness	Best	→	→	Poorest
Flexible	Yes	No	No	No

FSOT : Fused-silica, open tubular column.

WCOT : Wall-coated, open tubular column.

SCOT : Support-coated, open tubular column.

ดีเทกเตอร์ที่ใช้ในแก๊สโครมาโทกราฟ

Thermal Conductivity Detector (TCD)

Flame Ionization Detector (FID)

Electron Capture Detector (ECD)

Nitrogen Phosphorus Detector (NPD)

Flame Photometric Detector (FPD)

Photo-ionization Detector (PID)

Electrolytic Conductivity Detector (ELCD,HALL)

Mass Selective Detector (MSD)

Infrared Detector (IRD)

หลักการของดีเทกเตอร์ที่ใช้ในแก๊สโครมาโทกราฟ

TCD	Filament temperature increases as analytes present in the carrier gas pass over it . Causing the resistance to increase.
FID	Components burn in a flame producing ions which are collected and converted into a current
ECD	As electronegative species pass through the detector , they capture low energy thermal electrons causing a decrease in cell current
NPD	Nitrogen and phosphorous compounds produce increased currents in a flame enriched with vaporized alkali metal salt.
FPD	Sulfur and phosphorous compounds burn in a flame producing chemiluminescent species which are monitored at selective wave lengths.
ELCD	Halogens , sulfur , or nitrogen compounds are mixed with a reaction gas in a reaction tube . The products are mixed with a suitable liquid which produces a conductive solution.
PID	Molecule are ionized by excitation with photons from a UV lamp. The charged particles are then collected , producing a current.
MSD	Molecules are bombarded with electrons producing ion fragments which pass into the spectrometers mass filter . The ions are filtered based on their mass / charge ratio.
IRD	Molecules absorb infrared energy , the frequencies of which are characteristic of the bonds within that molecule.

ภาคผนวก 3

หน่วยวัดปริมาณตามศัพท์วิทยาศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน

หน่วย	ศัพท์บัญญัติ	สัญลักษณ์	ปริมาณ
angstrom	อังสตอม	°A	ความยาว
ampere	แอมแปร์	-	กระแสไฟฟ้า
celsius	เซลเซียส	°ซ	อุณหภูมิ
centimetre	เซนติเมตร	ซม.	ความยาว
degree	องศา	°	อุณหภูมิ
gram	กรัม	-	มวล
kelvin	เคลวิน	-	อุณหภูมิ
litre	ลิตร	-	ปริมาตร
milligram	มิลลิกรัม	มก.	มวล
microgram	ไมโครกรัม		มวล
micrometre	ไมโครเมตร	ไมครอน	ความยาว
millilitre	มิลลิลิตร	มล.	ปริมาตร
microlitre	ไมโครลิตร	-	ปริมาตร
minute	นาที	-	เวลา
second	วินาที	-	เวลา
volt	โวลต์	-	ศักย์ไฟฟ้า

เอกสารอ้างอิง

1. แม้น อมรสิทธิ์ ,อมร เพชรสม, **Principles and Techniques of Instrumental Analysis** ห้างหุ้นส่วนจำกัดโรงพิมพ์ชวนพิมพ์, ครั้งที่ 1, 2534.
2. คณาจารย์ในภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **ความน่าจะเป็นและสถิติ** กรุงเทพ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2535.
3. Analytical Education Centre Australia , **Techniques of GC** Hewlett –Packard company, 1991.
4. AOAC , **Official Methods of Analysis** Official Methods 970.65 Riboflavin (vitamin B_2) in food and Vitamin Preparations , Fluorometric Method. Chapter 45 p9-p10 , 1995.
5. Bassett, R.C. Denney, G.H. Jeffery , J. Mendham , **Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis** 5th Edition , John Wiley & Sons, Inc. , New York , 1989.
6. Douglas A. Skoog , **Principles of Instrumental Analysis** 4th Edition , Saunders College Publishing , United States , 1992.
7. Douglas A. Skoog, Donald M. West , F. Jamees Holler , **Fundamentals of Analytical Chemistry** 7th Edition ,Saunders College Publishing , USA , 1996.
8. Galen W. Ewing , **Instrumental Methods of Chemical Analysis** 5th Edition, McGraw-Hill, Inc., Singapore, 1985.
9. **HPLC Applicatio Support Catalog** , Phenomenex , 1991.
10. James D. Ingle, JR and Stanley R. Crouch , **Spectrochemical analysis** Prentice-Hall, Inc., United States, 1988.
11. James P. Dux , **Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory** , 2nd Edition, Van Nostrand Reinhold , New York ,1990.
12. John Keenan Taylor, **Quality Assurance of Chemical Measurements,** 6 th Edition Lewis Publishers, Inc., USA, 1989
13. J.C. Miller and J.N. Miller, **Statistics for Analytical Chemistry** 4thEdition, ELLIS HORWOOD LIMITED, England ,2000
14. J.E. Willett , **Gas Chromatography** John Wiley & Sons, Inc., Singapore, 1991.
15. L.R. Snyder , J.J. Kirkland , **Introduction to Modern Liquid Chromatography** 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., United States , 1979.

16. Matthias Otto , **Chemometrics**, WILEY-VCH Verlag Gmbh,D Weinheim, 1999

17. Robert D. Braun , **Introduction to Intrumental Analysis** McGraw-Hill , Inc ., Singapore, 1987.

18. Roland Caulcutt and Richard Boddy, **Statistic for Analytical Chemists** ,Chapman and Hall Ltd., New York ,1983.

19. Ronald C. Denney , Roy Sinclair , **Visible and Ultraviolet Spectroscopy** John Wiley & Sons, Inc., Singapore, 1991.

20. Sandy Lindsay , **High Performance Liquid Chromatography** John Wiley & Sons, Inc., Singapore , 1991.

21. W.J. Youden and E. H. Steiner, **Statistical Manual of the AOAC** , AOAC, Arlington, VA 22209 ,1975.