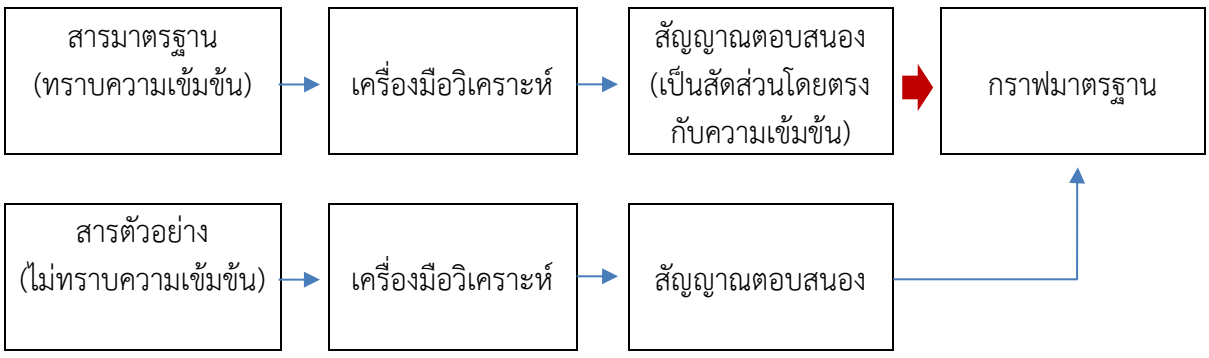
หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโดยอาศัยกราฟมาตรฐาน
(Principle of Instrumental Analysis based on Calibration Methods)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

หลักสำคัญของการวิเคราะห์หาปริมาณโดยการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ (instrumental analysis) เกือบทุกเทคนิค เมื่อทำการวิเคราะห์เครื่องมือจะรายงานสัญญาณตอบสนอง (responsible signal) ที่วัดได้ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง เราอาจจำแนกสัญญาณตอบสนองในเครื่องมือวิเคราะห์เป็น 2 โดเมนคือ

1. โดเมนทางไฟฟ้า (electrical domain) เช่น ศักย์ไฟฟ้า กระแสไฟฟ้า ประจุไฟฟ้า หรือความต้านทานไฟฟ้า ซึ่งสัญญาณในลักษณะนี้สามารถใช้วงจรอิเล็กทรอนิกส์วัดค่าหรือดำเนินการเก็บข้อมูลได้โดยตรง
2. โดเมนที่ไม่ใช่ทางไฟฟ้า (non-electrical domain) เช่น ความร้อน ความเข้มแสง พลังงาน ซึ่งสัญญาณในลักษณะนี้ต้องอาศัยตัวแปลงสัญญาณ (transducer) เพื่อแปลงสัญญาณจากโดเมนที่ไม่ใช่ทางไฟฟ้าให้อยู่ในโดเมนไฟฟ้า

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือในทางวิเคราะห์ทางเคมีมีหลายเทคนิคด้วยกัน แต่โดยหลักที่เหมือนกันคือตัวตรวจวัด (detectable unit, detector) จะทำการวัดสัญญาณตอบสนองหรือสัญญาณการเปลี่ยนแปลงตามแต่ละเทคนิคที่เกิดจากปริมาณสารที่สนใจ (analyte) ในสารตัวอย่าง แล้วจึงแสดงผลลัพธ์ (readout) โดยอาศัยส่วนประมวลสัญญาณ (signal processing) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณ บันทึก คำนวณ แปรผล และดำเนินการอื่น ๆ เกี่ยวกับสัญญาณตอบสนอง อย่างไรก็ตามสัญญาณตอบสนองที่วัดได้จากเครื่องมือวิเคราะห์จะเป็นสัญญาณที่ไม่อาจเชื่อได้ว่าเป็นความสัมพันธ์เชิงปริมาณที่แท้จริงระหว่างค่าที่เครื่องมือแสดงกับปริมาณของสารที่สนใจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการเทียบกับสารมาตรฐาน (standard reagent)



ภาพที่ 1 แนวคิดของการวิเคราะห์โดยอาศัยกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน (calibration curve) หรือกราฟมาตรฐานความเข้มข้น (concentration calibration curve) จัดเป็นวิธีการเทียบหาปริมาณสารที่สนใจกับสารมาตรฐานทางอ้อม ซึ่งกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นเป็นความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนองที่วัดได้จากเครื่องมือวัด (แกน y) กับความเข้มข้น (ปริมาณ) ของสาร

มาตรฐาน (แกน x) โดยสัญญาณตอบสนองที่วัดได้ต้องแปรผันตรงกับความเข้มข้น (ปริมาณ) สารมาตรฐาน การสร้างกราฟมาตรฐานจึงเป็นวิธีการสร้างความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (หรือปริมาณ) แน่นอนจากการเตรียมกับสัญญาณตอบสนองที่ได้จากเครื่องมือวิเคราะห์ ซึ่งสามารถสร้างกราฟมาตรฐานหลายวิธีด้วยกัน ดังนี้

1. วิธีสารมาตรฐานภายนอก (External standard)

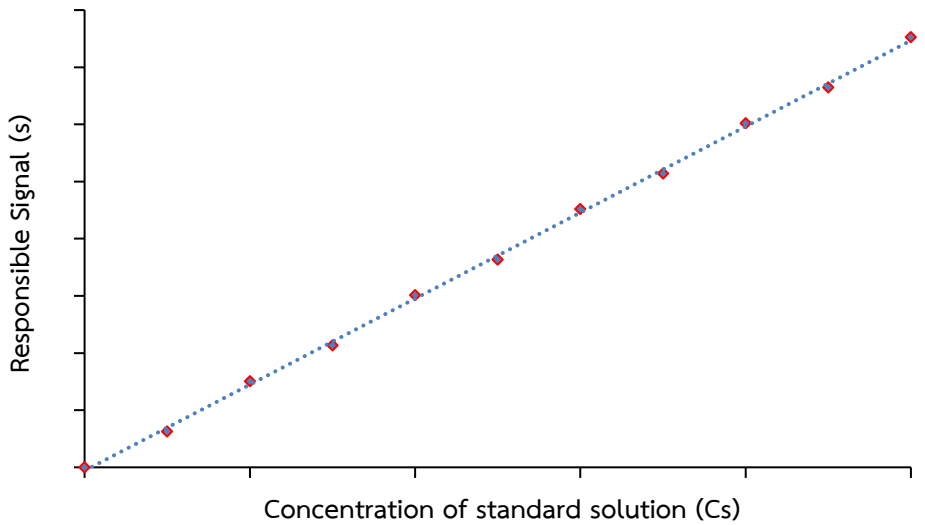
การสร้างกราฟมาตรฐานภายนอก จะต้องกำหนดช่วงความเข้มข้นให้เหมาะสม โดยควรเป็นช่วงความเข้มข้นที่สัมพันธ์กับสัญญาณที่วัดได้มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด เรียกว่า ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) โดยเครื่องมือบางประเภทอาจมีคู่มือ (cook book) ระบุสัญญาณตอบสนองที่ใช้สอบเทียบสภาพไว จึงอาจนำมาเป็นแนวทางในการเตรียมชุดสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานได้ ส่วนเครื่องมือที่ไม่มี cook book ผู้วิเคราะห์ต้องทดลองหาช่วงความเข้มข้นจากสัญญาณของเครื่องมือ วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานภายนอกมีขั้นตอนดังนี้

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 4-5 ความเข้มข้น (ตามลำดับ) และสารละลายแบลงค์ (blank) โดยอาจใช้ reagent blank ซึ่งเตรียมตามกระบวนการเดียวกับสารละลายมาตรฐานเพียงแต่ไม่มีสารที่สนใจ (analyte) เป็นองค์ประกอบ หรืออาจใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายแบลงค์

1.2) ทำการปรับศูนย์ (zero adjustment) ด้วยสารละลายแบลงค์และวัดสัญญาณตอบสนองของสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ นำสัญญาณตอบสนองมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนอง (แกน y) กับความเข้มข้น (แกน x) จะได้ลักษณะกราฟมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งสามารถหาสมการเส้นตรงของกราฟ

1.3) เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับกระบวนเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยอาจต้องทำละลาย ย่อย หรือเจือจางสารตัวอย่างก่อนเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1.4) วิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง แทนค่าผลลัพธ์หรือสัญญาณตอบสนองที่ได้ในสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

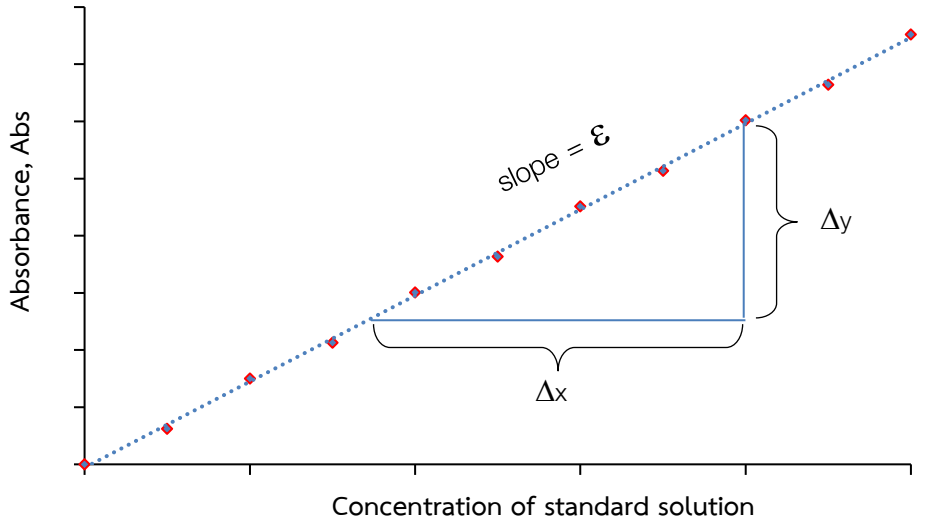


ภาพที่ 2 ลักษณะกราฟมาตรฐาน

เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ควรอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยสัญญาณที่วัดได้ต้องไม่ต่ำกว่าสัญญาณที่วัดได้ของความเข้มข้นของสารมาตรฐานตัวที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุด ในกรณีที่สารตัวอย่างมีสัญญาณต่ำกว่า อาจต้องทำการเพิ่มความเข้มข้น (pre-concentration) ก่อน แต่ถ้าสัญญาณสูงกว่าสัญญาณที่วัดได้ของความเข้มข้นของสารมาตรฐานตัวที่สูงที่สุด จะต้องทำการเจือจาง (dilution) ให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง

วิธีสารมาตรฐานภายนอกนิยมใช้กันมากที่สุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เนื่องจากทำได้ง่าย โดยใช้สารละลายมาตรฐานเพียงชุดเดียว จึงเหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ประจำ (routine analysis) ที่วิเคราะห์สารตัวอย่างจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม วิธีสารมาตรฐานภายนอกก็มีข้อจำกัดที่ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนเชิงระบบ เนื่องจากเมทริกซ์ของสารละลายตัวอย่างจะไม่เหมือนกับเมทริกซ์ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายแบลงค์ได้ทั้งหมดทุกส่วน และการเตรียมสารละลายตัวอย่างจากตัวอย่างจริงเพื่อให้เมทริกซ์ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานที่สุดอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนหรือสูญเสียสารที่สนใจวิเคราะห์จากสารตัวอย่าง

ในที่นี้ขอยกตัวอย่างกราฟมาตรฐานของเทคนิคการวัดการดูดกลืนแสง จากกฎของเบียร์ “ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่สนใจที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (absorbing analyte species)” ดังนั้นเมื่อนำความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจและค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟ จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เรียกว่า กราฟมาตรฐานความเข้มข้น (calibration curve) เมื่อค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) เป็นแกน y และความเข้มข้น (concentration, C) เป็นแกน y จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ εb และเมื่อ b เท่ากับ 1 ความชันจึงเท่ากับ ε ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น (concentration calibration curve)

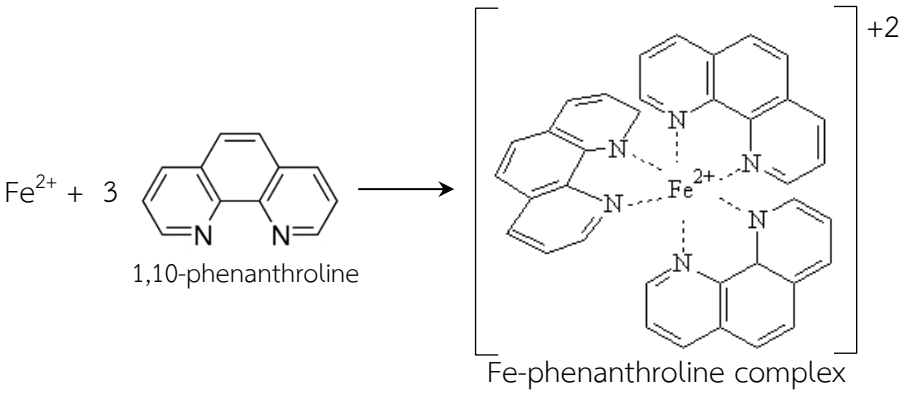
จุดประสงค์ที่สำคัญของการทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นเพื่อให้ได้สัญญาณการดูดกลืนแสงจากเครื่องมือวัดในขณะนั้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายนอก (external standard solution) ที่ความเข้มข้นต่างกันตามลำดับ (concentration series) สัญญาณการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์ และที่สำคัญกราฟมาตรฐานความเข้มข้นจะเป็นเครื่องมือในการหาความเข้มข้นของสารที่สนใจในสารตัวอย่าง โดยอาศัยสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานความเข้มข้น

วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้น ทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนอย่างน้อย 4-5 ความเข้มข้น มาวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นได้เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง จะได้กราฟมาตรฐานความเข้มข้น ส่วนสารตัวอย่างเราไม่ทราบความเข้มข้นของสารที่สนใจ เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกับวิธีการทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้น เครื่องมือจะรายงานค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยอาศัยสมการเส้นตรง เราจะทราบค่าความเข้มข้นของสารที่สนใจในสารตัวอย่างได้

ตัวอย่างการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำได้โดยให้เกิดไอออนเชิงซ้อนที่มีสี (สีแดงถึงส้ม) ระหว่าง Fe^{2+} กับ 1,10-phenanthroline ที่เรียกว่าไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรลีน (Fe-Phen) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยควบคุม pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ pH 3.5 เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดตะกอนเป็น $Fe(OH)_2$ และจะต้องเติมตัวรีดิวซ์เพื่อทำการรีดิวซ์เหล็กทั้งหมดในสารละลายให้เป็น Fe^{2+} เสียก่อนโดยใช้สารละลายไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride) สีของไอออนเชิงซ้อนระหว่างเหล็ก(II) กับฟีแนนโทรลีนจะเสถียรได้นาน (วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ, 2563)

$$4Fe^{3+} + 2NH_2OH \longrightarrow 4Fe^{2+} + N_2O + 4H^+ + H_2O$$

$$Fe^{2+}(aq) + 3PhH^+ \longrightarrow Fe(Ph)_3^{2+} + 3H^+$$



ภาพที่ 4 ไอออนเชิงซ้อนระหว่างเหล็ก(II) กับฟีแนนโทรลีน

การเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้นทำได้โดย เตรียมสารละลายเหล็กมาตรฐานให้มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นลำดับจำนวน 6 ความเข้มข้นในขวดวัดปริมาตร (ในการเตรียมชุดสารละลายมาตรฐานจะต้องไม่มีความคลาดเคลื่อนเกี่ยวกับการเตรียม เช่นปริมาตรที่ปิเปตและการปรับปริมาตรสุดท้าย) ความเข้มข้นของเหล็กที่เตรียมดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของเหล็ก(II) สำหรับทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้น

ขวดที่	ความเข้มข้น (mg/L)
1	0.20
2	0.40
3	0.60
4	0.80
5	1.00
6	1.20

จากนั้นเติมสารละลาย $NH_2OH{\cdot}HCl$ และแอซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) อย่างละ 1 mL ลงไป แล้วเติม 1,10-phenanthrolien ปริมาตร 2 mL แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนครบขีดปริมาตร (ขวดวัดปริมาตร 50 mL) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จะได้สารละลายสีส้มแดงของไอออนเชิงซ้อนดังภาพที่ 5 จากนั้นนำสารละลายแต่ละขวดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ได้ผลดังตารางที่ 2

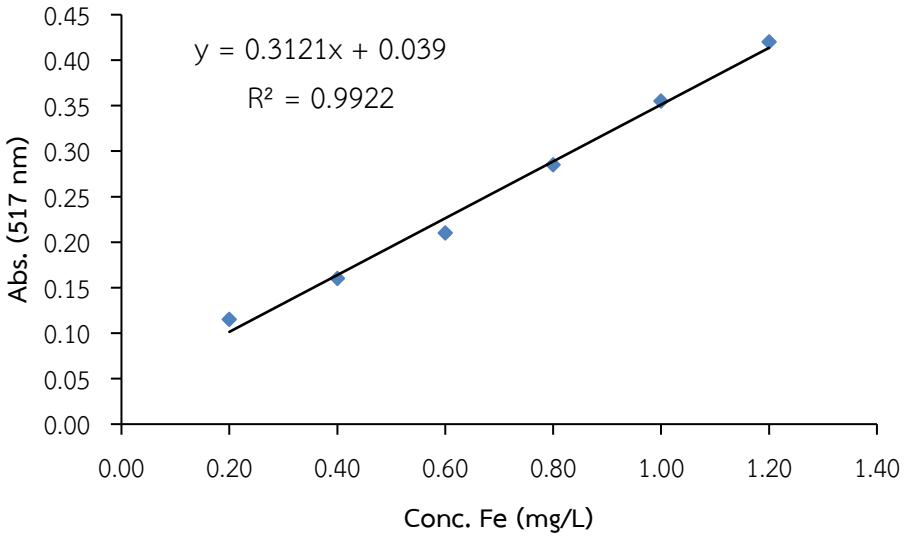
ความเข้มข้น 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 mg/L

ภาพที่ 5 สีของไอออนเชิงซ้อนเหล็ก-ฟีแนนโทรลีน

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรลีน

ขวดที่	ความเข้มข้น (mg/L)	Abs ที่ 517 nm
1	0.20	0.115
2	0.40	0.160
3	0.60	0.210
4	0.80	0.285
5	1.00	0.355
6	1.20	0.420

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของเหล็กกับค่าการดูดกลืนแสงของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรลีน จะได้กราฟเส้นตรงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรลีน
(เส้นกราฟนี้สร้างโดยใช้โปรแกรม MS Excel)

กราฟมาตรฐานที่สร้างโดยประยุกต์ใช้โปรแกรม MS Excel จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับสมการเส้นตรงที่บอกค่าความชัน (slope) และจุดตัดแกน y (intercept-y) และยังสามารถบอกความเป็นเส้นตรงว่ากราฟนั้นมีความเป็นเส้นตรงมากน้อยเพียงใด ถ้าค่า R^2 ใกล้ 1 แสดงว่ากราฟนั้นมีความเป็นเส้นตรงสูง โดยทั่วไปในการวิเคราะห์เชิงปริมาณค่า R^2 ต้องมากกว่า 0.99 ซึ่งจากกราฟเส้นตรงของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรลีน พบว่า ค่าความชัน = 0.3121 จุดตัดแกน y = 0.039 และ R^2 = 0.9925

จากตัวอย่างกราฟมาตรฐานของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรลีน (ภาพที่ 6) ถ้าสมมตินำสารตัวอย่างน้ำบาดาล ปริมาตร 5.00 mL เติมสารละลายเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ได้เท่ากับ 0.380 เราสามารถคำนวณปริมาณเหล็กในสารตัวอย่างเทียบกับเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้น โดยอาศัยสมการเส้นตรง

$$y = 0.3121x + 0.039 \qquad \text{.....(1)}$$

$$x = \frac{y - 0.039}{0.3121} \qquad \text{.....(2)}$$

เมื่อ y คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่สนใจในตัวอย่าง เท่ากับ 0.380 ดังนั้น

$$x = \frac{0.380 - 0.039}{0.3121} = 1.09 \text{ mgFe/L} \qquad \text{.....(3)}$$

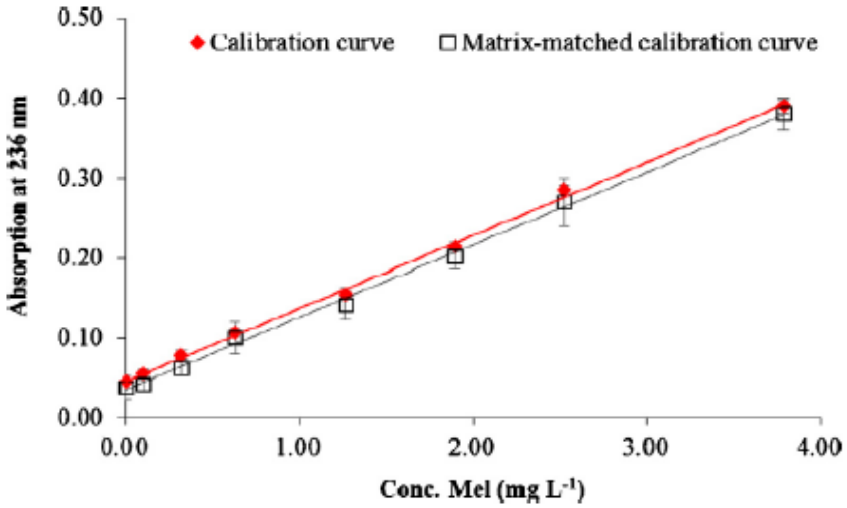
แต่สารละลายตัวอย่างที่วิเคราะห์นี้ ได้จากการเจือจางสารตัวอย่าง 5.00 mL ให้ได้สารละลาย 50.00 mL (dilution factor = 10) ดังนั้น ความเข้มข้นของเหล็กในตัวอย่าง

$$Fe = 1.09 \text{ mgFe/L} \times 10 = 10.9 \text{ mg/L}$$

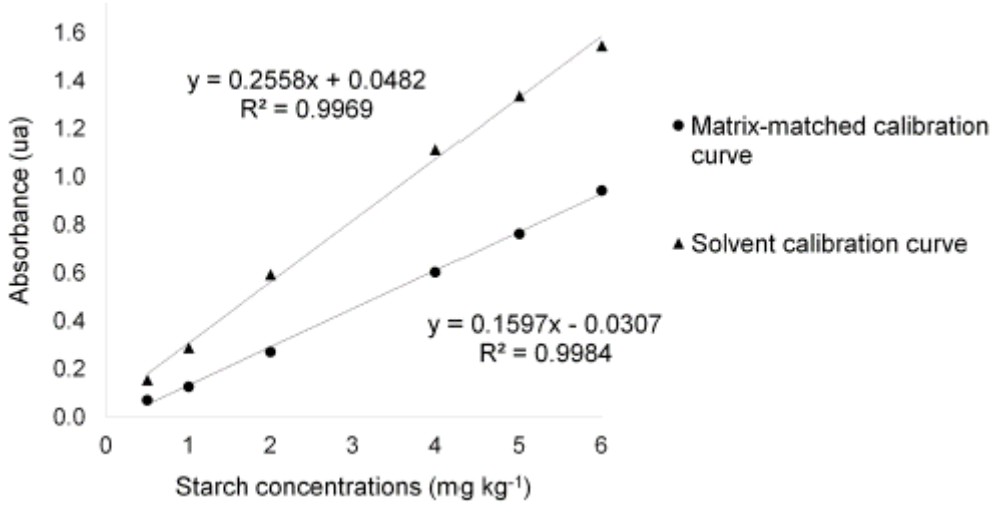
ดังนั้น สรุปได้ว่าในสารตัวอย่างมีปริมาณเหล็กเท่ากับ 10.9 mg/L (ppm)

แต่ในกรณีที่ตัวอย่างอาจสิ่งรบกวน (matrix) หรือสิ่งเจือปนที่ทำให้องค์ประกอบส่วนใหญ่นั้นแตกต่างจากสารมาตรฐาน และสิ่งรบกวนเหล่านั้นอาจมีผลต่อการดูดกลืนแสงทั้งบวกหรือทางลบ เราสามารถทำการเติมสารมาตรฐานแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง เรียกว่าวิธี matrix-matched calibration โดยวิธีนี้สามารถบ่งชี้ถึงผลของสิ่งรบกวนโดยดูจากกราฟเส้นตรง โดยถ้ากราฟระหว่างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นกับ

matrix-matched calibration มีความชันเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เส้นกราฟจะขนานกัน อธิบายได้ว่าผลของสิ่งรบกวนในสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ เช่นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เมลามีนในนมผง (Chansuvarn et al., 2013) ดังภาพที่ 7 แต่ถ้าความชันไม่เท่ากันหรือไม่ใกล้เคียงกัน เส้นกราฟจะไม่ขนานกัน (Silva, et al., 2017) ดังภาพที่ 8 อธิบายได้ว่าสิ่งรบกวนหรือสารเจือปนในสารตัวอย่างมีผลต่อการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 7 ผลการทำ matrix-matched calibration. (Chansuvarn et al.,2013).



ภาพที่ 8 ผลการทำ matrix-matched calibration. (Silva et al., 2017).

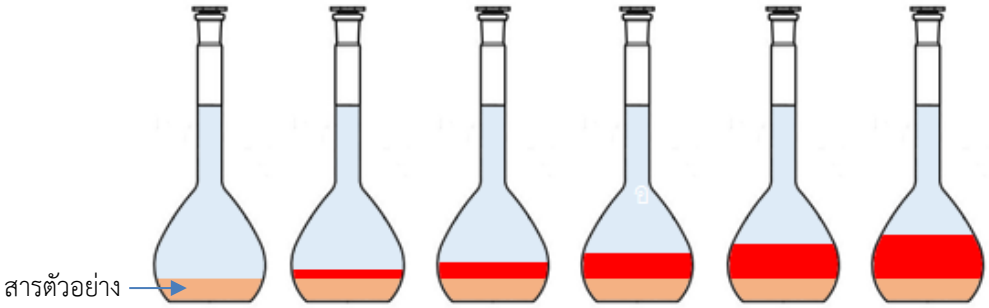
2) วิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition)

วิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition) หรือเรียกอีกอย่างว่า spiked method เป็นอีกวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่สนใจที่มีสารที่มีเมทริกซ์เจือปนมาก (matrix effect) ซึ่งอาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ได้ และไม่อาจใช้วิธี matrix-matched calibration ได้ โดยหลักการของวิธีนี้คือการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์สารที่สนใจ โดยขั้นตอนวิธีเติมสารละลาย ทำได้ดังนี้

2.1) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น (C_x) ปริมาตรแน่นอน (V_x) เท่ากัน ในขวดวัดปริมาตรอย่างน้อย 5 ขวด (ภาพที่ 9)

2.2) เติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (C_s) ปริมาตรที่แตกต่างกันเป็นลำดับ (V_s)

2.3) เติมสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา ให้เท่ากันทุก ๆ ขวด และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย (ปริมาตรรวม V_t)



ภาพที่ 9 วิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition)

2.4) ทำการปรับศูนย์ด้วยสารละลายแบลงค์และวัดสัญญาณสารละลายมาตรฐานที่เติมสารตัวอย่าง (spiked sample) ด้วยเครื่องมือ ได้สัญญาณตอบสนองเป็น S นำสัญญาณตอบสนอง (S) มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนอง (แกน y) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (แกน x) จะได้ลักษณะกราฟมาตรฐานจากวิธีเติมสารมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 10

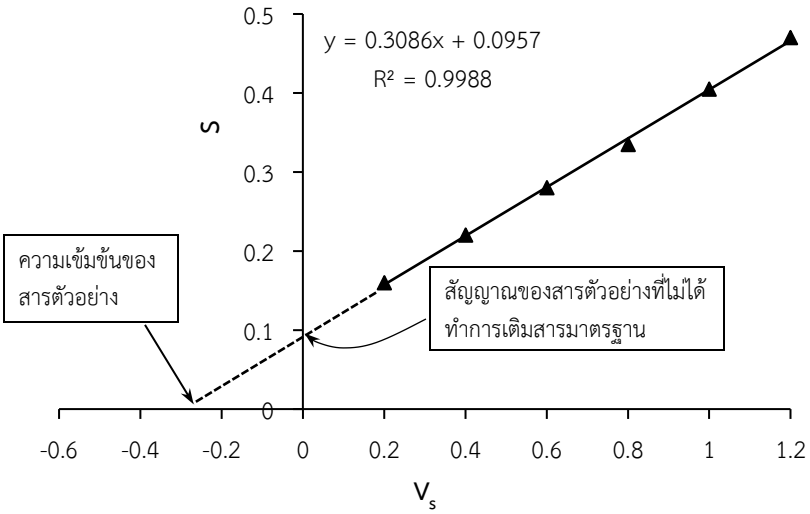
สัญญาณตอบสนอง (S) ที่ได้จะเป็นผลรวมของสัญญาณจากสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่เติมลงไป ดังนี้

$$S = \frac{V_s C_s}{V_t} + \frac{V_x C_x}{V_t} \qquad \text{.....(4)}$$

จากสมการ (4) ถ้าเขียนกราฟระหว่าง S กับ V_s จะได้กราฟเส้นตรง ดังภาพที่ 8 โดยมี

ความชัน คือ $m = \frac{C_s}{V_t}$ .....(5)

จุดตัดแกน y คือ $b = \frac{V_x C_x}{V_t}$ .....(6)



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานของวิธีการเติมสารมาตรฐาน. (วรวิทย์, 2563).

สารตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น (C_x) สามารถหาความเข้มข้น ได้ดังนี้

$$\frac{b}{m} = \left(\frac{V_x C_x}{V_t}\right)\left(\frac{V_t}{C_s}\right) \qquad \text{.....(7)}$$

$$C_x = \frac{bC_s}{mV_x} \qquad \text{.....(8)}$$

จากกราฟภาพที่ 10 เมื่อลากเส้นต่อจากเส้นตรงไปตัดแกน y ที่จุดตัดแกน y จะเป็นสัญญาณของสารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการเติมสารมาตรฐาน (S_x) และที่จุดตัดแกน x จะเป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (C_x) ดังนั้น สมการ (4) เมื่อสัญญาณรวมเป็นศูนย์ เราสามารถคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ดังสมการ (10)

$$S = \frac{V_s C_s}{V_t} + \frac{V_x C_x}{V_t} = 0 \qquad \text{.....(9)}$$

$$C_x = -\frac{(V_s)_0 C_s}{V_x} \qquad \text{.....(10)}$$

ข้อดีวิธีเติมสารมาตรฐาน คือสามารถลดผลรบกวนจากเมทริกซ์และตัวรบกวนอื่น ๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากในสารละลายมาตรฐานแต่ละขวดที่ใช้เตรียมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานนั้นจะมีผลของเมทริกซ์ของสารตัวอย่างที่เติม (spike) ลงไปอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น แต่ก็มีข้อจำกัดเช่นกันคือความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติม (spike) ลงไปต้องอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงใช้งาน (linear working range) และอนุมูลของสารตัวอย่างที่เติม (spike) และสารที่สนใจต้องเหมือนกัน (Fortunato, et al., 2015) นอกจากนี้สารละลายมาตรฐานหนึ่งชุดที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐานจะใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้เพียงตัวอย่างเดียว จึงทำให้สิ้นเปลืองสารเคมีและเวลาอย่างมาก แต่ในบางกรณีที่ไม่ต้องการความถูกต้องมากนัก อาจใช้วิธีการเติมแบบสารเดี่ยว (single addition) ในการวิเคราะห์ ซึ่งทำได้ง่ายกว่าและประหยัดทั้งเวลาและสารเคมีมากกว่า โดยวิเคราะห์

สารละลายตัวอย่าง ได้สัญญาณ S_1 จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์อีกครั้งหนึ่ง ได้สัญญาณ S_2 นำผลที่ได้จากทั้งสองครั้งมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

$$C_x = -\frac{S_1 V_s C_s}{(S_2 - S_1)V_x} \qquad \text{.....(11)}$$

3. วิธีสารมาตรฐานภายใน (Internal standard)

สารมาตรฐานภายใน (internal standard) คือสารที่ถูกเติมในสารมาตรฐานการสอบเทียบ แบลงค์ และสารตัวอย่างทุกตัวในปริมาณที่เท่า ๆ กัน โดยสารมาตรฐานภายในต้องเป็นสารคนละชนิดกับสารที่สนใจวิเคราะห์ โดยต้องพิจารณาคุณสมบัติของสารที่จะใช้เป็น สารละลายมาตรฐานภายใน ดังนี้

- ต้องไม่เป็นองค์ประกอบหรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง
- ต้องแยกออกจากตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์
- ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง
- ต้องมีความบริสุทธิ์สูง
- เมื่อนำมาใช้ต้องมีปริมาณใกล้เคียงกับสารตัวอย่างที่ต้องการหา
- สารที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานภายในต้องมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์

วิธีพื้นฐานสำหรับการทำวิธีสารละลายมาตรฐานภายใน มีขั้นตอนดังนี้

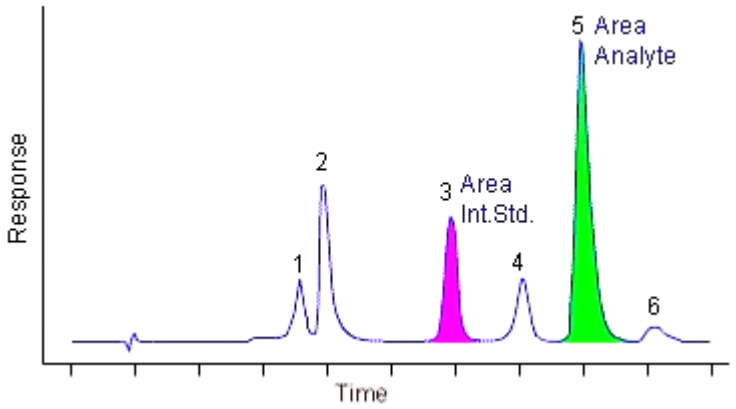
1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีสารที่สนใจวิเคราะห์ (analyte) ซึ่งทราบความเข้มข้นหลายความเข้มข้นและแบลงค์ ก่อนปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายให้เติมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ความเข้มข้นเท่ากันในทุกขวด

2) วิเคราะห์แบลงค์และสารละลายมาตรฐาน จากนั้นเขียนกราฟโดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ และแกน y เป็นอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารที่สนใจต่อสัญญาณของสารมาตรฐานภายใน และหาสมการเส้นตรง

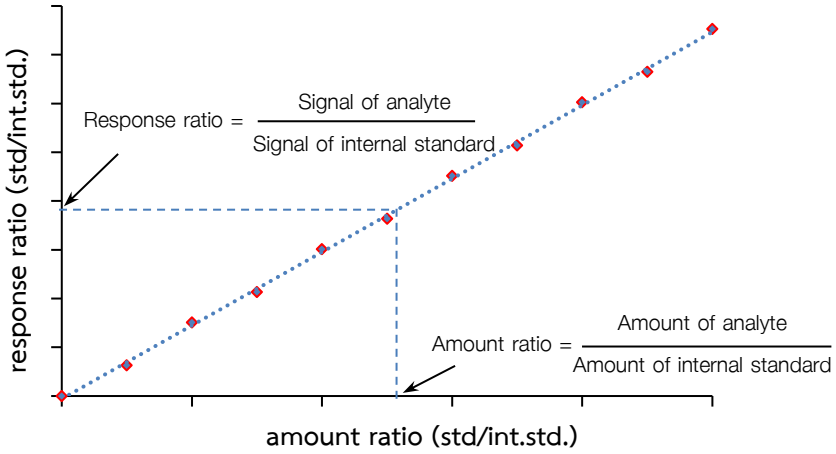
3) เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยกระบวนเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และเติมสารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับที่เติมในสารละลายมาตรฐาน

4) วิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง หาอัตราส่วนของสัญญาณของสารที่สนใจวิเคราะห์ต่อสัญญาณของสารมาตรฐานภายใน แล้วแทนค่าในสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง แล้วแปลงกลับเป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ในตัวอย่าง

การวิเคราะห์แบบสารมาตรฐานภายใน ต้องเติมสารที่เลือกใช้ เป็นสารมาตรฐานลงไปทั้งในตัวอย่างและสารมาตรฐานด้วยความเข้มที่เท่ากัน ดังนั้นเมื่อนำสัญญาณที่วัดได้มาเขียนกราฟจะเป็นการเปรียบเทียบเป็นสัดส่วน (ratio) ระหว่างสัญญาณของสารมาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (ภาพที่ 10) ดังนั้นถ้าสัญญาณของสารที่สนใจทดสอบลดลง สัญญาณของสารมาตรฐานภายในก็จะลดลงไปด้วย ดังนั้น สัญญาณของสารมาตรฐานภายในเป็นตัวเปรียบเทียบ ช่วยลดควบคุมความผิดพลาดที่เกิดขึ้น ลักษณะกราฟมาตรฐานเป็นสัดส่วนสัญญาณ (แกน x) และสัดส่วนปริมาณสารที่สนใจ (แกน y) ระหว่างสารมาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานของวิธีสารมาตรฐานภายใน



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานของวิธีสารมาตรฐานภายใน

การเลือกใช้สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมสามารถแก้ไขทั้งความคลาดเคลื่อนแบบสุ่มและเชิงระบบ เมื่อสารมาตรฐานภายในเป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่างและสารมาตรฐานสามารถใช้เพื่อแก้ไขความคลาดเคลื่อนด้านต่าง ๆ ที่มาจากการเตรียมตัวอย่าง สารละลาย และการทำความสะอาด (cleanup) ข้อดีของวิธีสารมาตรฐานภายใน คือสามารถลดความคลาดเคลื่อนจาก instrumental drift และผลของเมทริกซ์ได้ หากสารที่สนใจวิเคราะห์กับสารมาตรฐานภายในตอบสนองต่อเครื่องมือหรือเมทริกซ์ในทิศทางเดียวกัน เพราะการ drift ดังกล่าว แม้จะทำให้การตอบสนองเปลี่ยนไป แต่อัตราส่วนของสัญญาณระหว่างสารที่สนใจวิเคราะห์กับสารมาตรฐานภายใน จะยังคงมีค่าเท่าเดิม ส่วนข้อจำกัดคือการหาสารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมนั้นทำได้ยาก เพราะจะต้องไม่มีในสารตัวอย่าง และต้องตอบสนองต่อเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์คล้ายคลึงกับสารที่สนใจวิเคราะห์ที่เราพิจารณา และไม่รบกวนหรือถูกรบกวนจากสารที่สนใจวิเคราะห์

โดยส่วนใหญ่วิธีสารมาตรฐานภายในนิยมใช้กับวิธีวิเคราะห์เทคนิคการแยก (separation analytical methods) เช่น GC และ HPLC มากกว่าทางเทคนิคสเปกโทรสโกปี อย่างไรก็ตามสารที่เป็น internal standard ควรต้องมีสมบัติคล้ายกับสารที่สนใจวิเคราะห์ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง และต้องสารนั้นต้องมีความบริสุทธิ์

4. วิธี Standard dilution analysis

วิธี standard dilution analysis (Jones, et al., 2015) เป็นวิธีสร้างกราฟมาตรฐานแบบใหม่โดยเป็นการรวมหลักการของวิธี standard addition และวิธี internal standard เข้าด้วยกัน ซึ่งจะมีข้อเด่นในการขจัดปัญหารบกวนจากผลของเมทริกซ์และความคลาดเคลื่อนจาก instrumental drift ได้ในขณะเดียวกัน ทั้งนี้ยังไม่จำเป็นต้องเตรียมชุดความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐานแบบภายนอกอีก ในขั้นการทดลองโดยเป็นการรวมสารละลายสองชนิดในขวดเดียว โดยสารที่สนใจ (A) ในสารตัวอย่าง ถูกนำมาผสมรวมกับสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานและสปีชีส์ของ internal standard (I)

สัญญาณสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (S_A) ได้มาจากสัญญาณของสารตัวอย่าง (sam) และสัญญาณของสารมาตรฐาน (std) ที่ถูกวัดที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ส่วนสัญญาณของ internal standard จะได้จากสาร internal standard เท่านั้น ดังนั้นสัญญาณสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (S_A) จึงเป็นผลคูณระหว่างสภาพไว (calibration sensitivity, m_A) และความเข้มข้น (C_A)

$$S_A = m_A C_A \qquad \text{.....(12)}$$

เมื่อ m_A คือ calibration sensitivity ของสารที่สนใจ

C_A คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจ

ในทำนองเดียวกัน สัญญาณของสาร internal standard (S_I)

$$S_I = m_I C_I \qquad \text{.....(13)}$$

เมื่อ m_I คือ calibration sensitivity ของสาร internal standard

C_I คือ ความเข้มข้นของสาร internal standard

อัตราส่วนระหว่างสัญญาณสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (S_A) กับสัญญาณของสาร internal standard (S_I) เป็นดังนี้

$$\frac{S_A}{S_I} = \frac{m_A C_A}{m_I C_I} = \frac{m_A (C_A^{std} + C_A^{sam})}{m_I C_I} = \frac{m_A C_A^{std}}{m_I C_I} + \frac{m_A C_A^{sam}}{m_I C_I} \qquad \text{.....(14)}$$

$$\frac{S_A}{S_I} = \frac{m_A C_A^{std}}{m_I C_I} + \frac{m_A C_A^{sam}}{m_I C_I} \qquad \text{.....(15)}$$

จากสมการ (15) เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{S_A}{S_I}$ เป็นแกน y และ $\frac{1}{C_I}$ เป็นแกน x จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน (slope) และจุดตัดแกน (intercept) ดังนี้

$$\text{slope} = \frac{m_A C_A^{sam}}{m_I} \qquad \text{.....(16)}$$

$$\text{intercept} = \frac{m_A C_A^{std}}{m_I C_I} \qquad \text{.....(17)}$$

เมื่อ C_A^{std}/C_I เป็นค่าคงที่ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสาร internal standard ที่ทราบอย่างแน่นอนจากการเตรียม ส่วน m_A/m_I เป็นค่าคงที่ เนื่องจากเป็นสภาพไวของสารมาตรฐานและสาร internal standard ในสภาวะเดียวกัน ดังนั้น

$$C_A^{sam} = \frac{slope}{intercept} x \frac{C_A^{std}}{C_I} \quad .....(18)$$

เอกสารอ้างอิง

1. วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ. (2565). *เคมีวิเคราะห์: หลักการและเทคนิคการคำนวณเชิงปริมาณ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

2. Chansuvarn, W., Panich, S., & Imyim, A. (2013). Simple spectrophotometric method for determination of melamine in liquid milks based on green Mannich reaction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. *113*, 154-158.

3. Fortunato, F.M., Bechlin, M.A., Neto, J.A.N., Donati, G.L., & Jones, B.T. (2015). Internal standard addition calibration: Determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry, *Microchemical J.*, *122*, 63-69.

4. Jones, W.B., Donati, G.L., Calloway, C.P., & Jones, B.T. (2015). Standard Dilution Analysis. *Anal. Chem.*, *87*(4), 2321–2327.

5. Silva, G.R., Menezes, L.D.M., Lanza, I.P., Oliveira, D.D. Silva, C.A., Klein R.W.T., Assis, D.C.S., & Cançado S.V. (2017). Evaluation of the alpha-amylase activity as an indicator of pasteurization efficiency and microbiological quality of liquid whole eggs. *Poultry Science*, *96*(9), 3375–3381.

6. Skoog, D.A., Holler, F.J., & Crouch S.R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Thomson Brooks/Cole.