



คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

เทคโนโลยีสุขภาพ เครื่องสำอางและการชะลอวัย

HEALTH, COSMETIC & ANTI-AGING TECHNOLOGY



ผศ.ดร.วรวิทย์ จันทรสุวรรณ

Asst.Prof. Woravith Chansuvarn,
Ph.D.

หน่วย 1 วิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี
บทเรียน 1.2

ส่วนประกอบของ เครื่องมือและเทคนิคการวัด (UV-Vis Components)



woravith



woravith



woravith.c@rmutp.ac.th



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

#แผนการเรียนรู้และการประเมินผลการเรียนรู้

1.2

ส่วนประกอบ ของเครื่องมือ และเทคนิค การวัด

บอกประเภทของสเปกโตรสโกปีแบบดูดกลืน
และเปล่งออก



บอกส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis



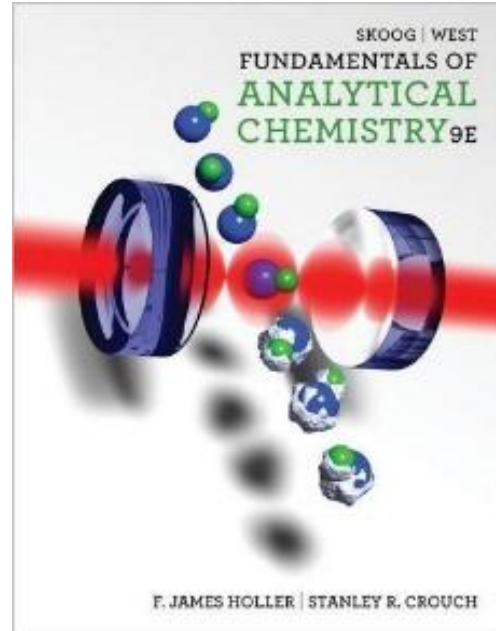
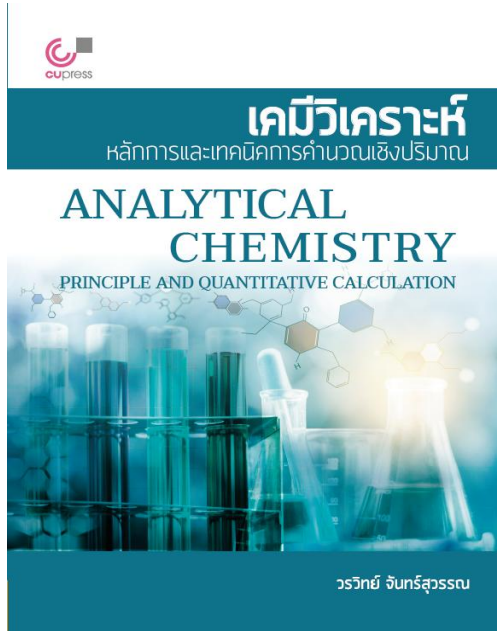
อธิบายการเตรียมตัวอย่างและการเจือจาง



ปฏิบัติการส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis



เอกสารประกอบการสอน



- วรวิทย์ จันทรสุวรรณ. 2565. *เคมีวิเคราะห์ (หลักการและเทคนิคการคำนวณเชิงปริมาณ)* พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



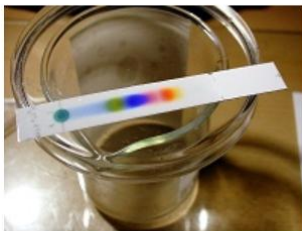
<http://sci.rmutp.ac.th/woravith>



ChemoGraphics



<http://www.slideshare.net/woravith>



Book: Analytical Chemistry 2.1
(Harvey)

ประเภทของสเปกโทรสโกปีแบบดูดกลืนและเปล่งออก

ประเภทของสเปกโทรสโกปี

Spectroscopy Method

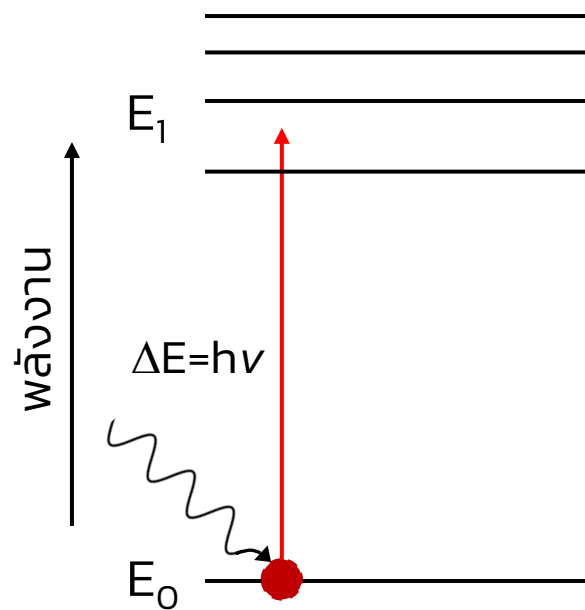
สเปกโทรสโกปีแบบดูดกลืน (absorption spectroscopy)

- การดูดกลืนระดับอะตอม (atomic absorption)
- การดูดกลืนระดับโมเลกุล (molecular absorption)

สเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก (emission spectroscopy)

- การเปล่งออกระดับอะตอม (atomic emission)
- การเปล่งออกระดับโมเลกุล (molecular emission)

การดูดกลืน (absorption)

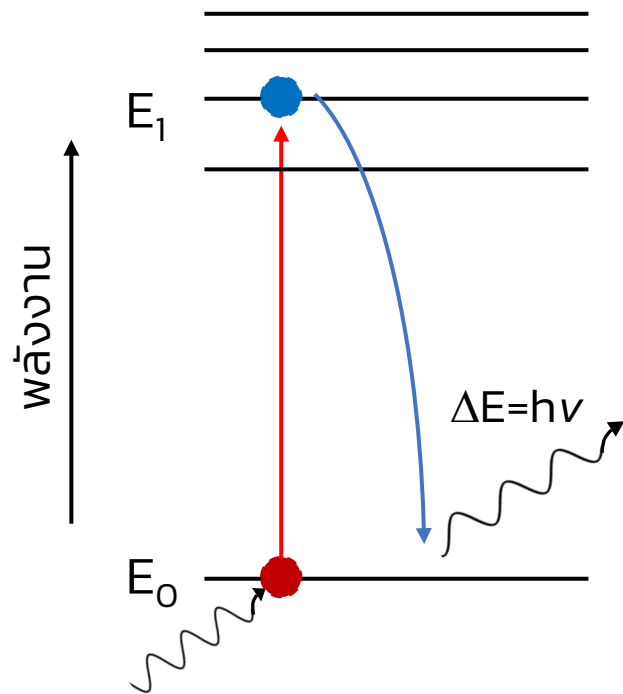


อนุภาค (อะตอมหรือโมเลกุล) อยู่ในระดับพลังงานต่ำที่สุด เรียกว่า **สถานะพื้น (E_0)**

อนุภาคได้รับพลังงานโฟตอน ($h\nu$) จากภายนอก อนุภาคเปลี่ยนไปอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงขึ้น เรียกว่า **สถานะกระตุ้น (E_1)**

เมื่อผลต่างระดับพลังงาน E_0 และ E_1 (ΔE) พอดีกับพลังงานโฟตอน อนุภาคนั้นจะเกิด **การดูดกลืน (absorption)** รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า

การเปล่งออก (emission)



อนุภาค (อะตอมหรือโมเลกุล) อยู่ในระดับพลังงานต่ำที่สุด เรียกว่า **สถานะพื้น (E_0)**

อนุภาคได้รับพลังงานจากภายนอก เช่น ความร้อน พลังงานไฟฟ้า หรือ ปฏิกิริยาเคมี อนุภาคนั้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงขึ้น เรียกว่า **สถานะกระตุ้น (E_1)**

ระดับพลังงานสถานะกระตุ้นนั้นเป็นสถานะที่ไม่เสถียร อนุภาคจะกลับสู่สถานะพื้น แล้วจะเกิด **การเปล่งออก (emission)** ของพลังงานในรูปแบบต่าง ๆ

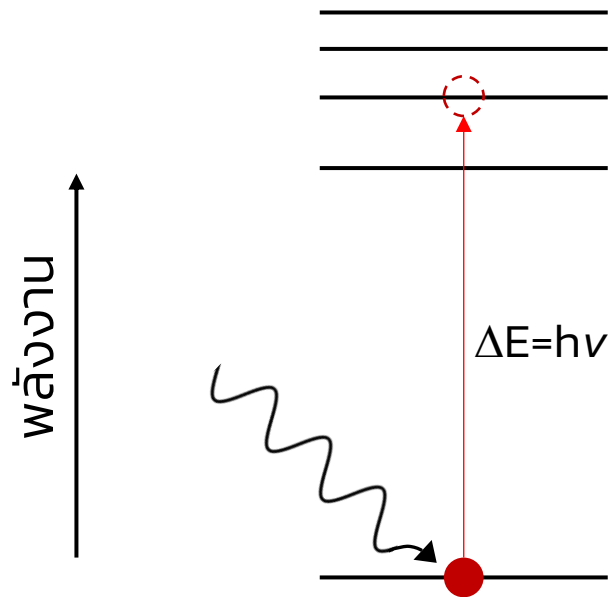
ความร้อน / โฟตอน
ปฏิกิริยาเคมี

โฟตอน > การเปล่งแสงด้วยแสง (photoluminescence)

- การวาวแสง (Fluorescence)
- การเรืองแสง (Phosphorescence)

ปฏิกิริยาเคมี > การเปล่งแสงด้วยเคมี (chemiluminescence)

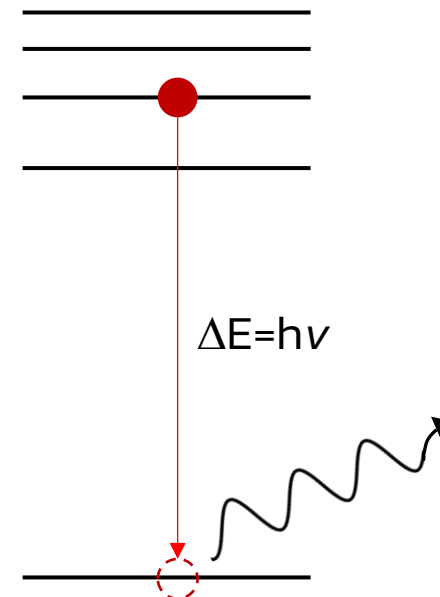
แบบดูดกลืน (absorption)



E_1
(excited state)

E_0
(ground state)

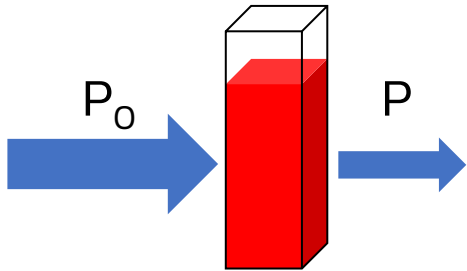
แบบเปล่งออก (emission)



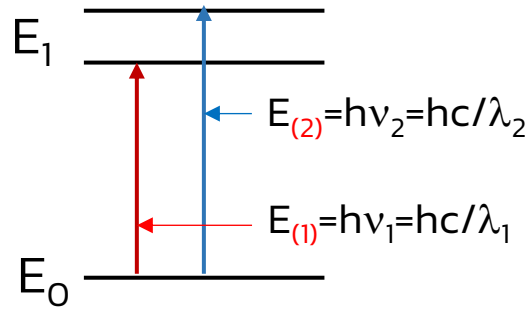
อะตอมหรือโมเลกุลใน E_0 ดูดกลืนพลังงาน ($h\nu$) และเปลี่ยนไปอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงกว่า (E_1)

อะตอมหรือโมเลกุลในสถานะที่มีพลังงานสูงกว่า (E_1) คายพลังงาน ($h\nu$) ออกมา และกลับไปยังอยู่ใน E_0

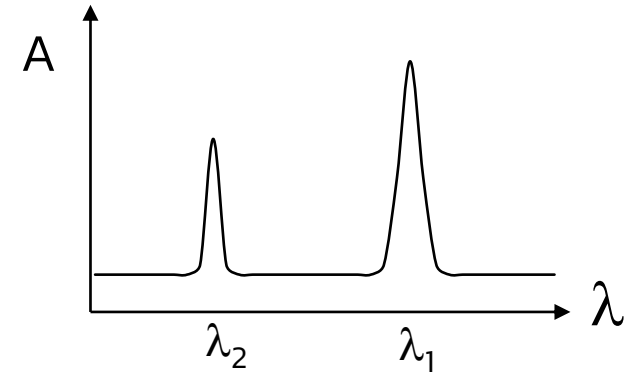
สเปกโทรสโกปีแบบดูดกลืน (absorption spectroscopy)



เมื่อให้พลังงานในรูปรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าแก่ตัวกลางที่มีอนุโมเลกุลที่สนใจที่ดูดกลืนแสงได้ (absorbing species)

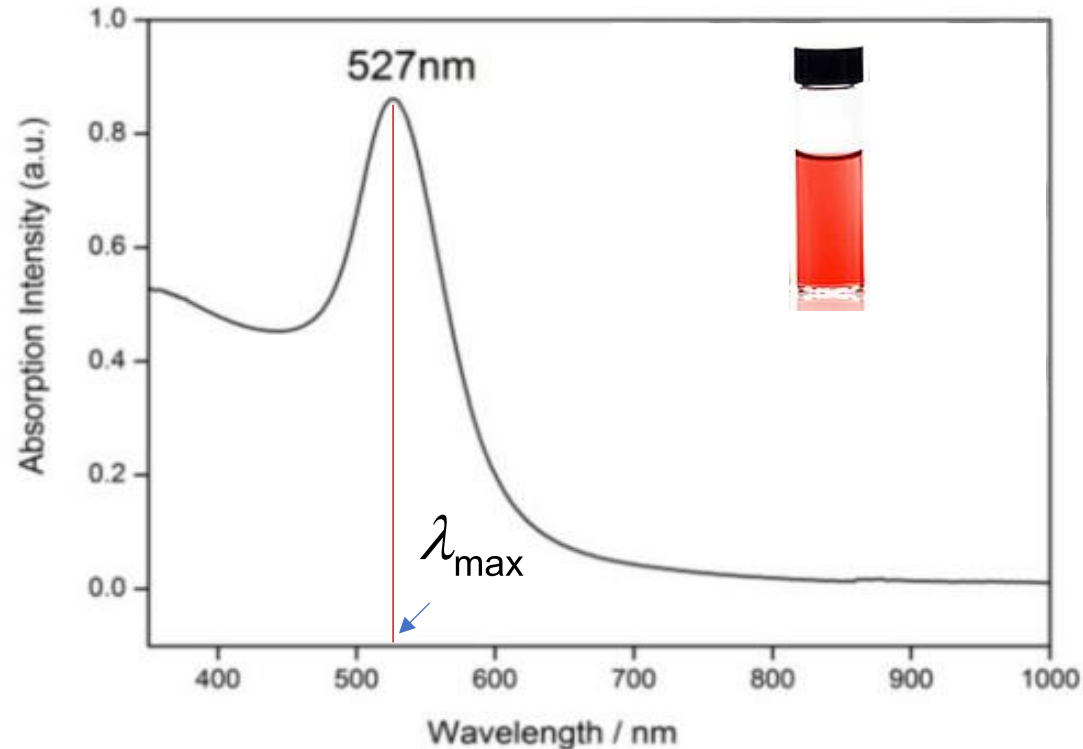


พลังงานโฟตอนกระตุ้นให้อนุภาคเปลี่ยนระดับพลังงานจาก E_0 ไปยัง E_1 เมื่อพลังงานโฟตอนเท่ากับ ΔE อนุภาคจะดูดกลืนรังสี



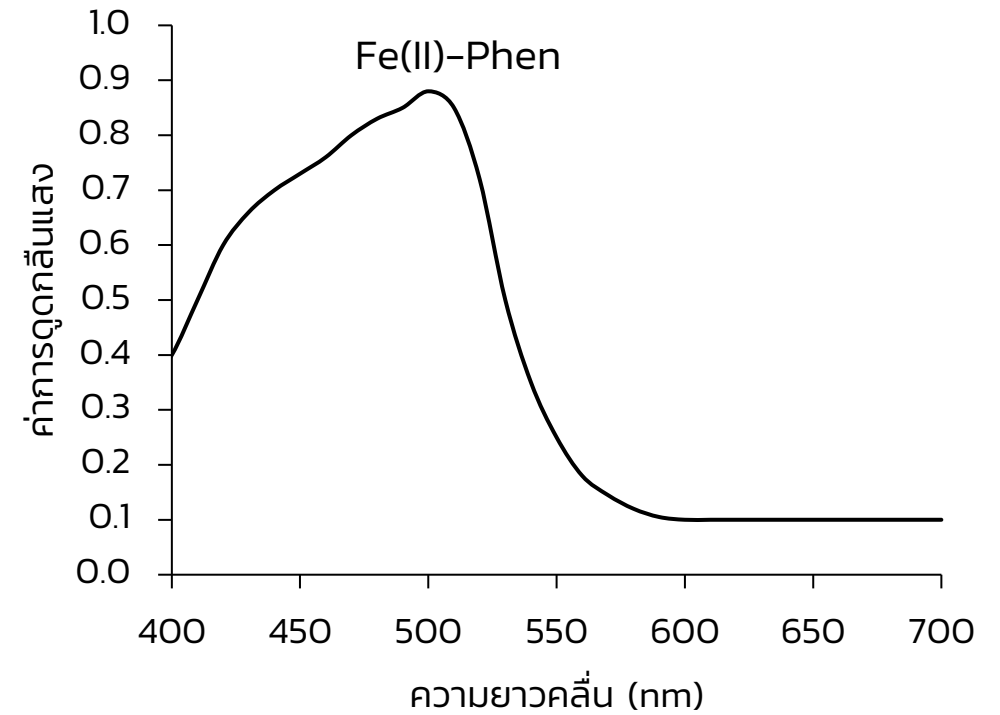
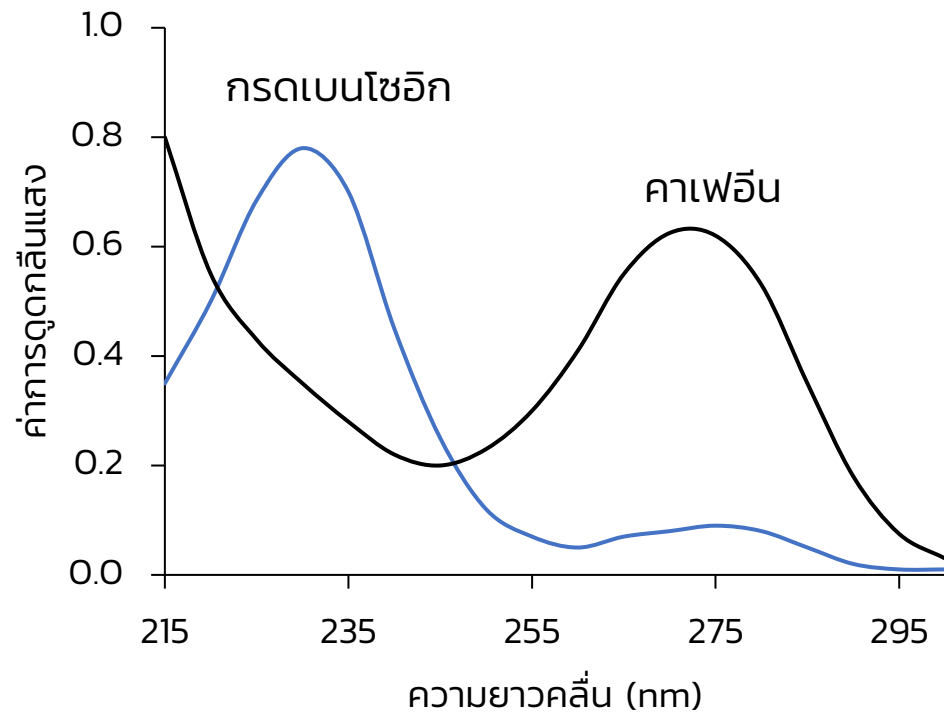
ค่าการดูดกลืนในแต่ละช่วงความยาวคลื่นเกิดขึ้นได้ไม่เท่ากัน เรียกว่า **สเปกตรัมการดูดกลืน**

ความสามารถในการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (absorption ability) ของสารที่ความยาวคลื่นต่างกัน จะดูดกลืนได้ไม่เท่ากัน



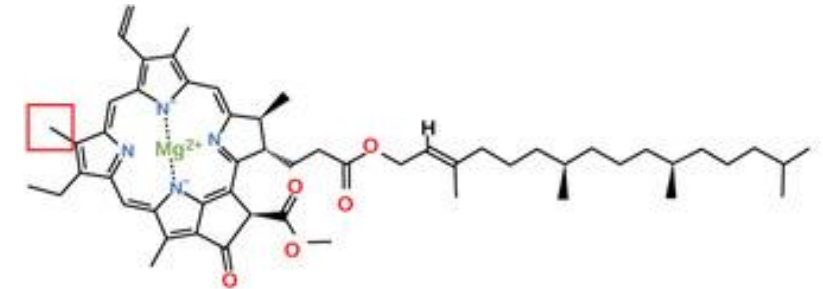
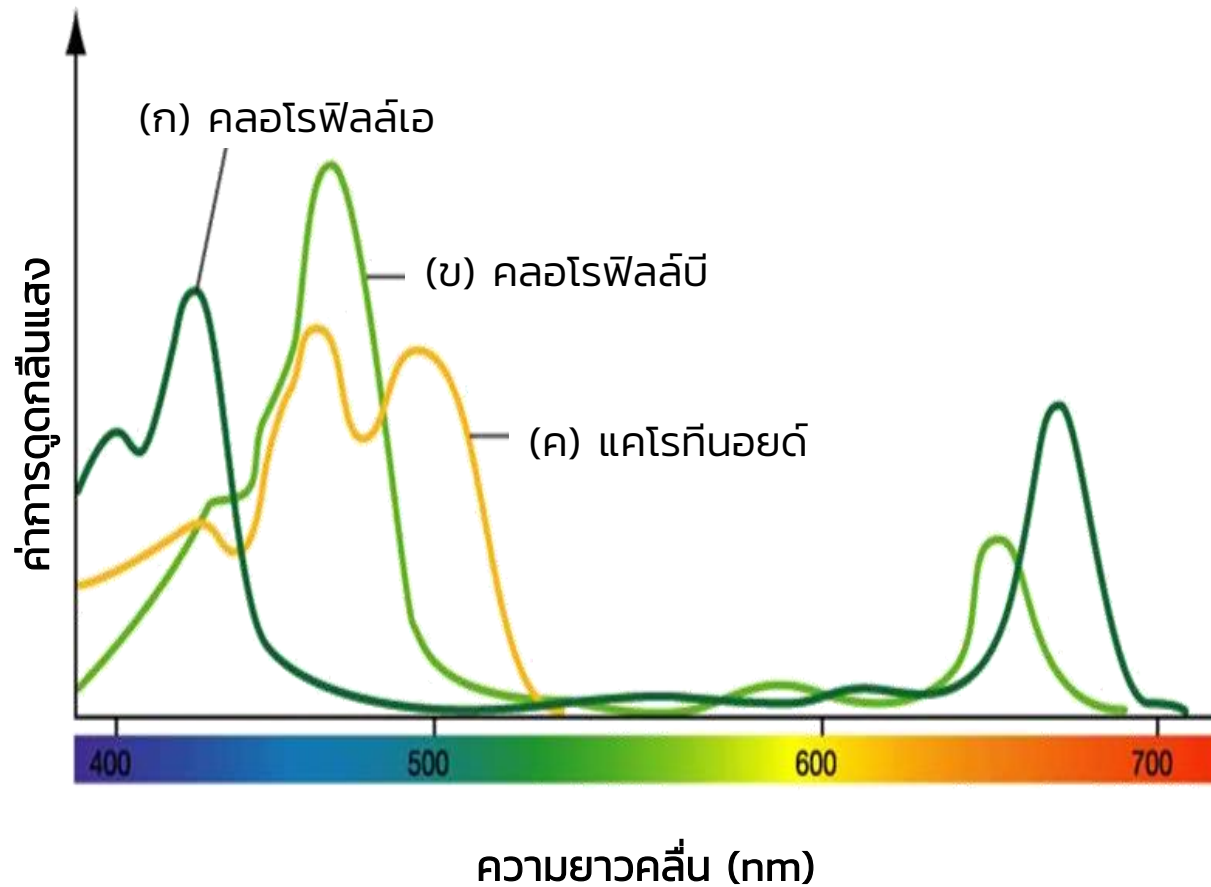
สเปกตรัมการดูดกลืนของอนุภากระดับนาโนเมตรของทองคำ

ค่าการดูดกลืนสูงสุด
(maximum absorbance)
จะปรากฏที่ความยาวคลื่น
ของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าความ
ยาวคลื่นหนึ่ง เรียกว่า ความ
ยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืน
สูงสุด (maximum
absorptivity
wavelength, λ_{max})

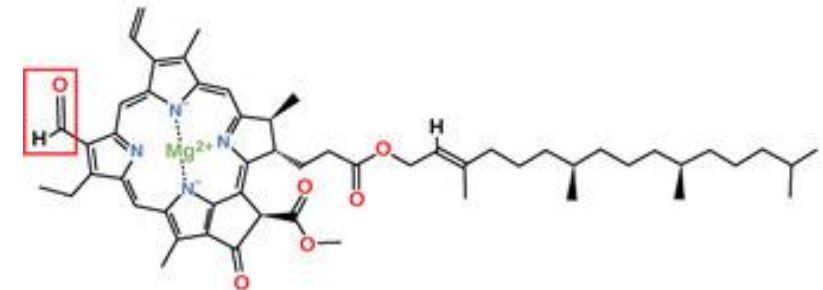


สารบางชนิดอาจปรากฏ $\lambda_{\max}$ ได้สองค่าหรือมากกว่าขึ้นอยู่กับโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชัน

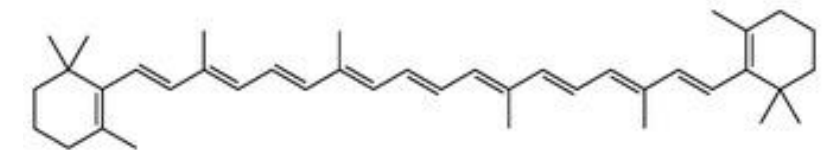
- chlorophyll A จะปรากฏ $\lambda_{\max}$ ที่ 430 nm และ 662 nm
- chlorophyll B จะปรากฏ $\lambda_{\max}$ ที่ 453 nm และ 642 nm



(ก) คลอโรฟิลล์เอ

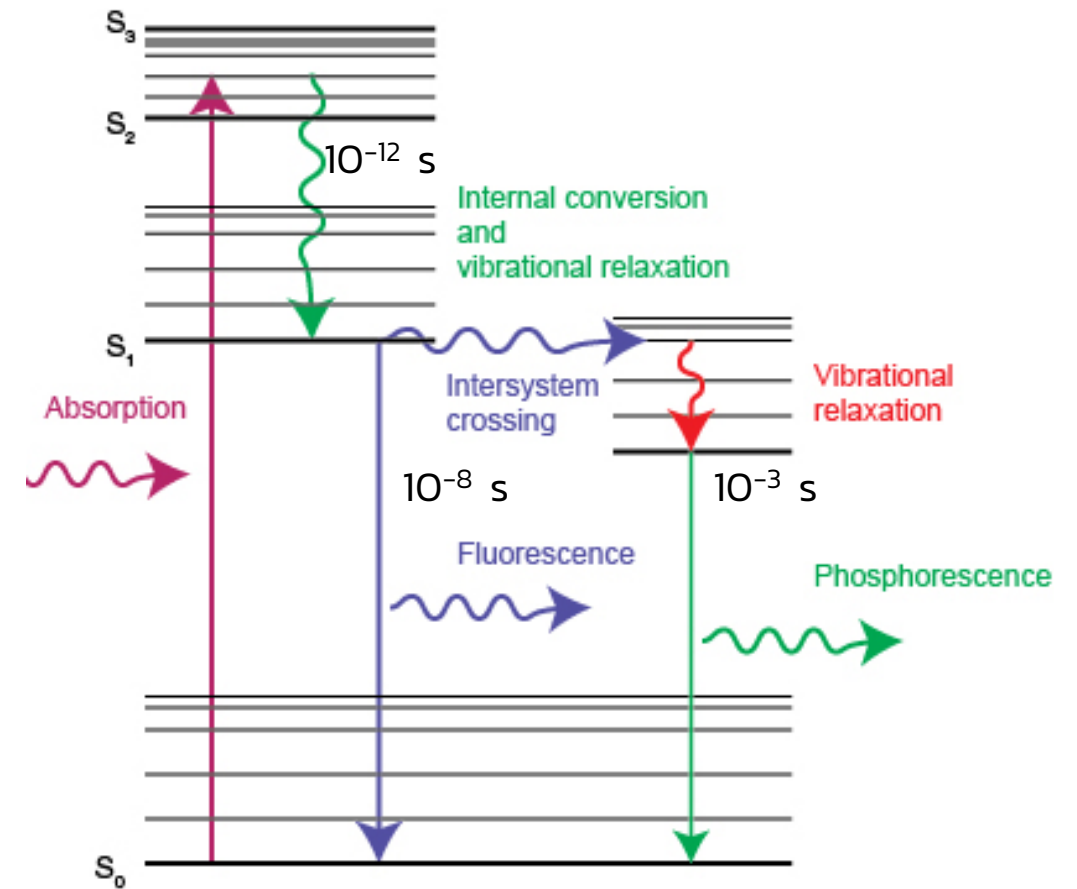
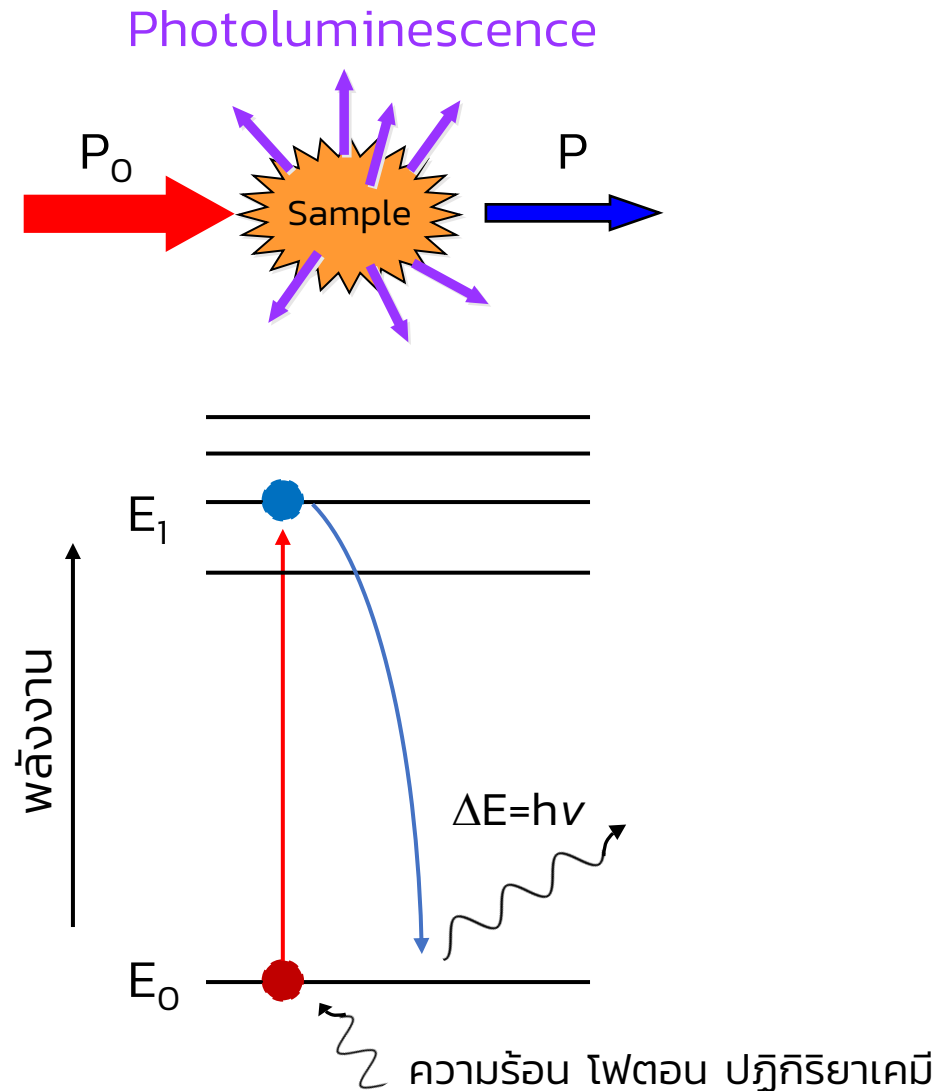


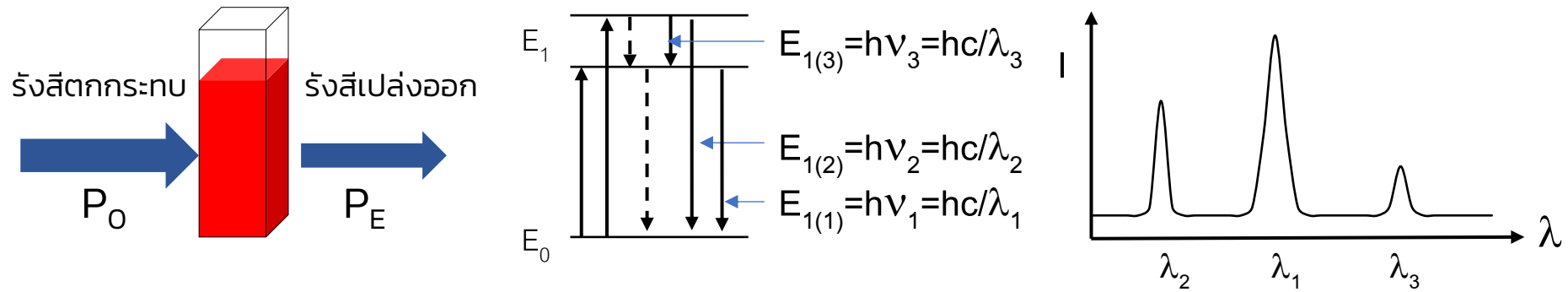
(ข) คลอโรฟิลล์บี



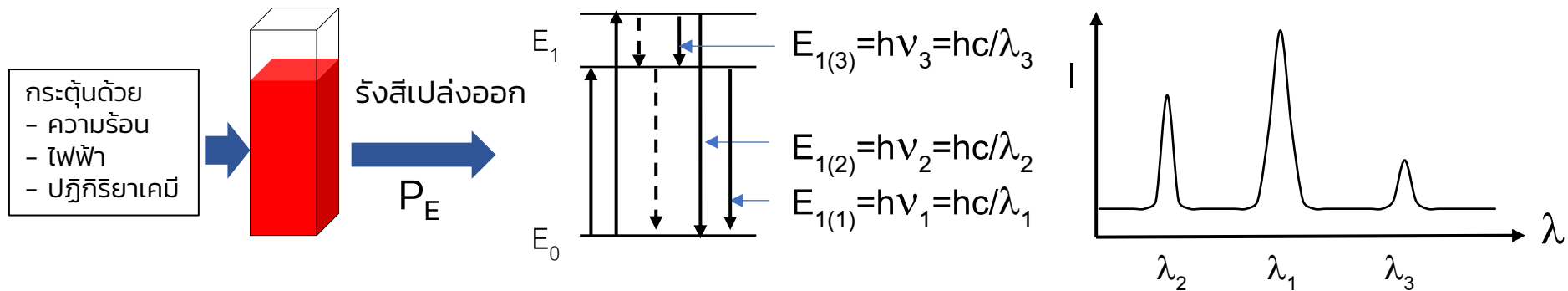
(ค) แคโรทีนอยด์

สเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก (emission spectroscopy)



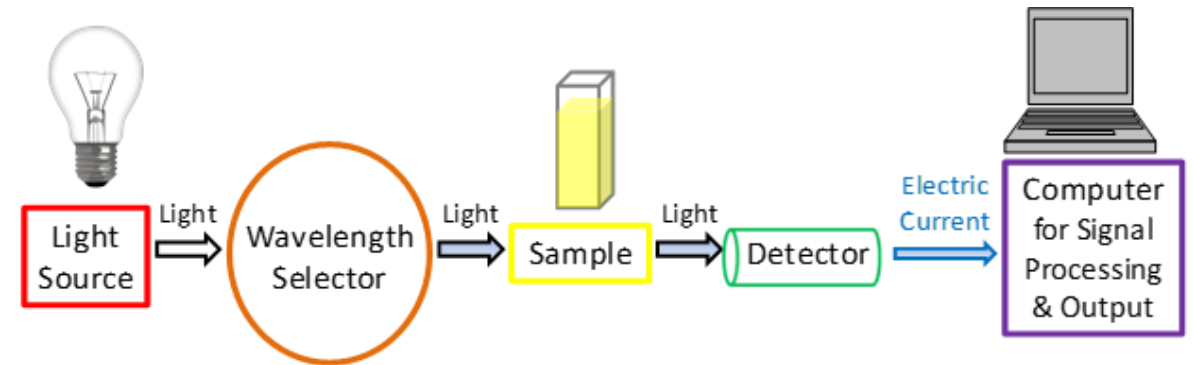
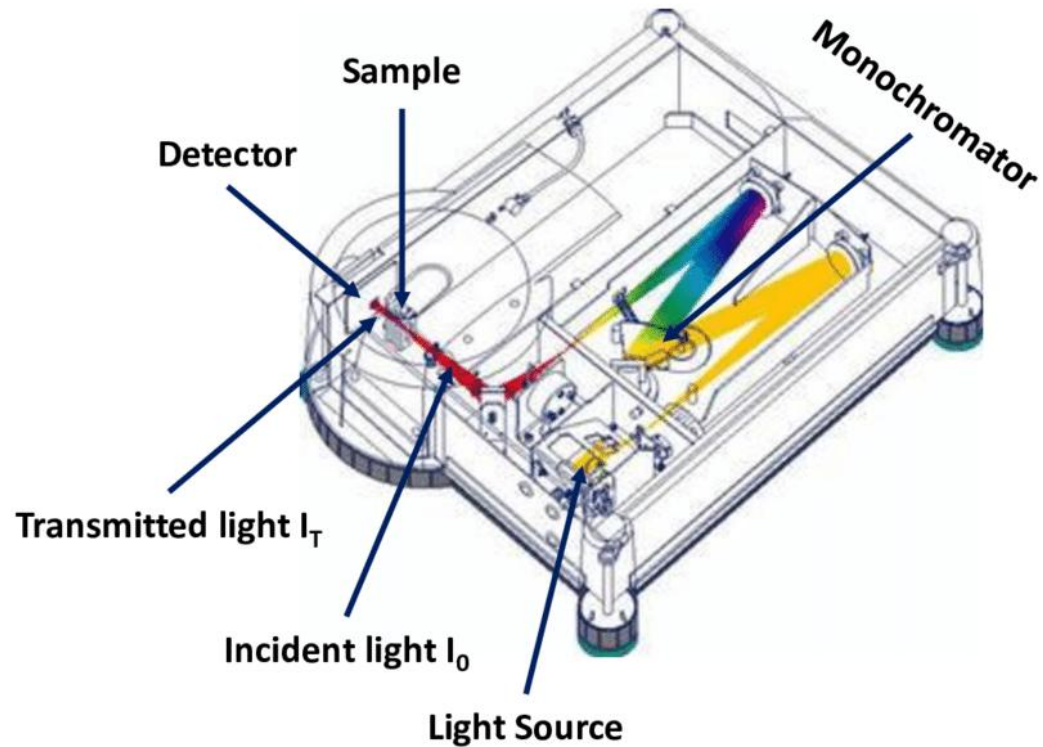


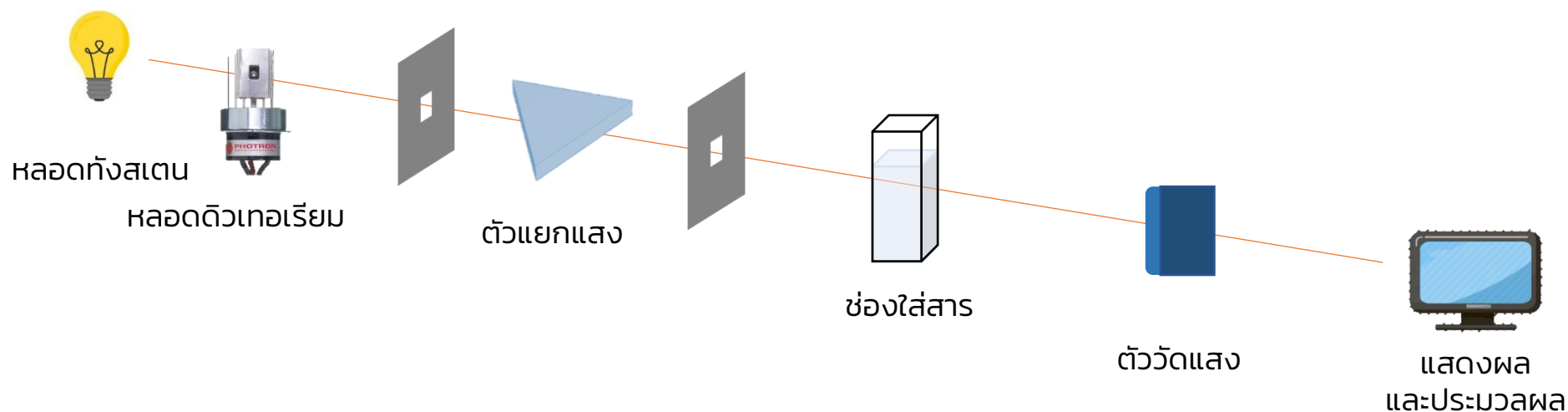
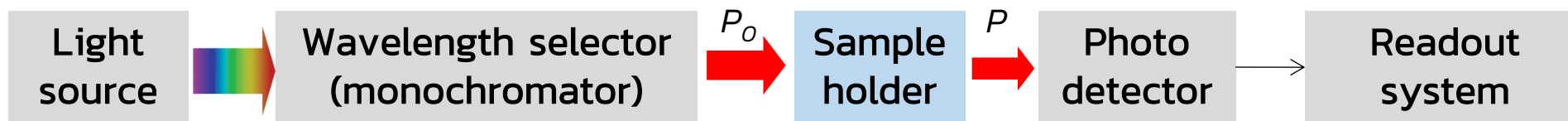
หลักของสเปกโทรสโกปีการเปล่งแสงด้วยแสง (การวาวแสงและการเรืองแสง)



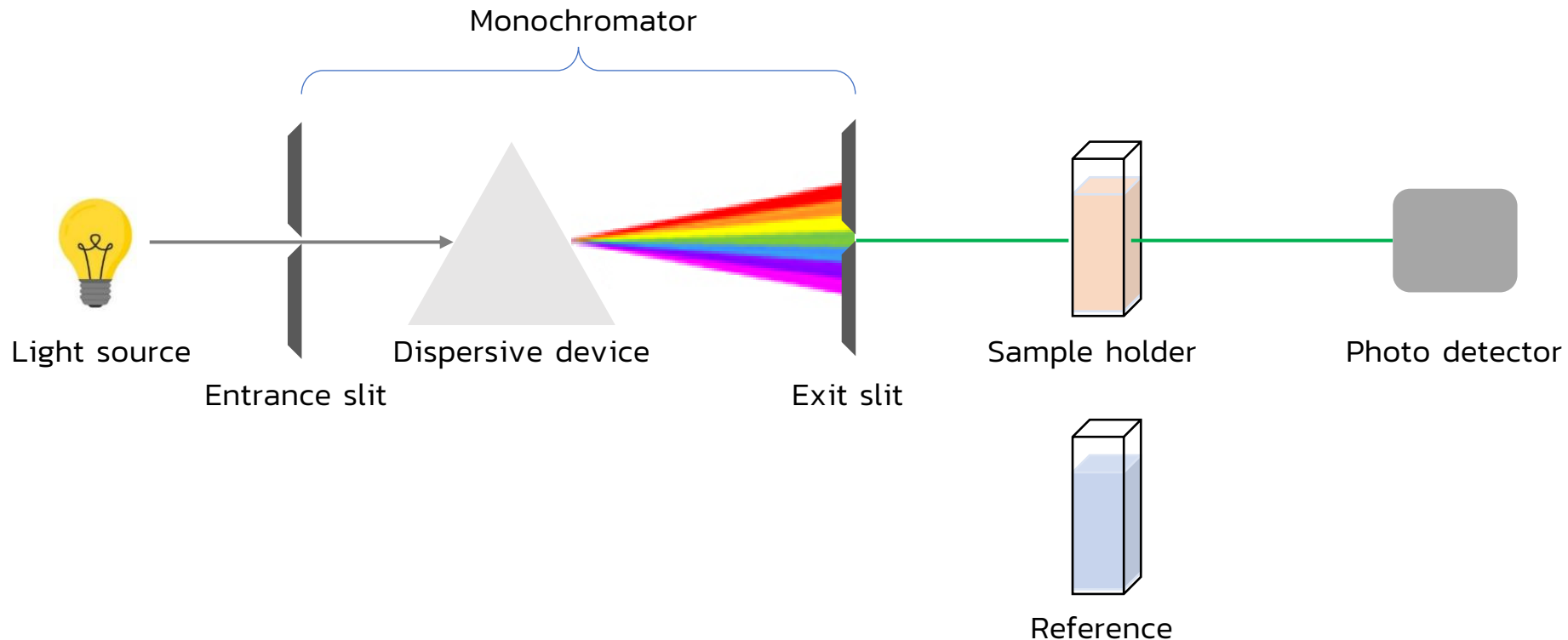
หลักของสเปกโทรสโกปีการเปล่งแสงทางเคมี (chemiluminescence)

ส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis





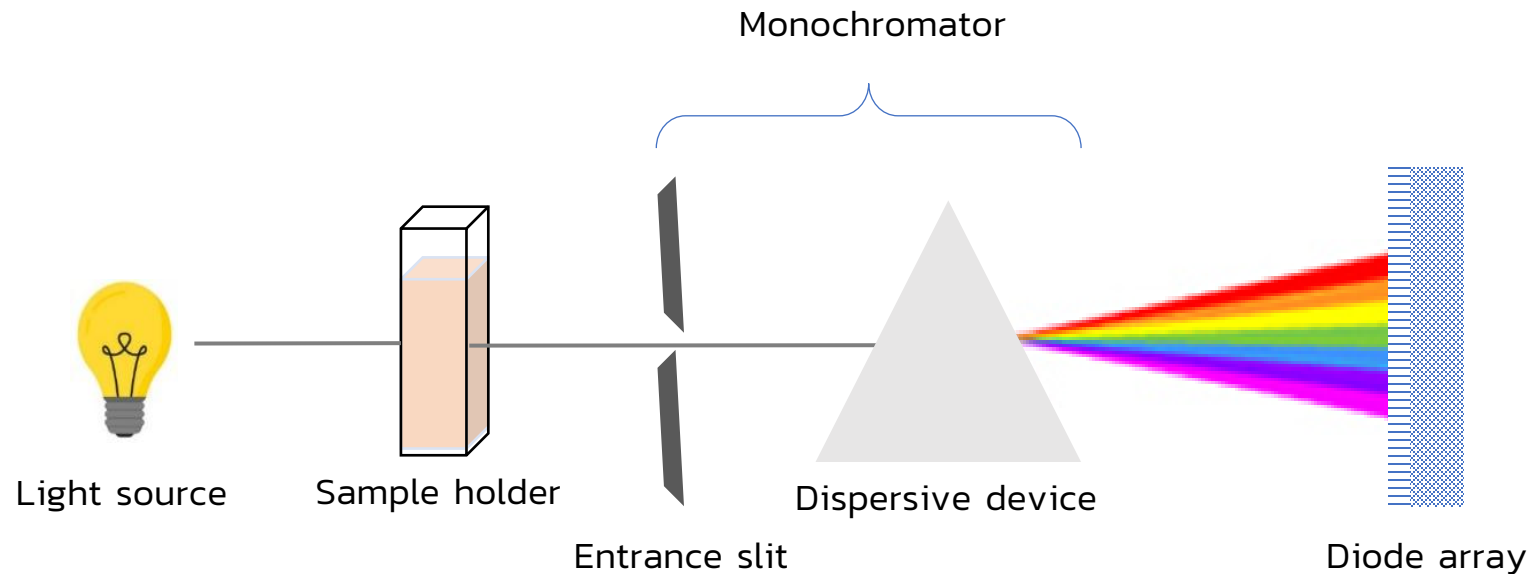
Single beam : Conventional



ชนิดลำแสงเดี่ยว
: ใช้ลำแสงเพียง
ลำเดียวผ่านจาก
ตัวแยกแสงไปสู่
ช่องใส่สาร
ตัวอย่างและเข้าสู่
ตัววัดแสง

การวัดจึงต้องวัด
วัดสารอ้างอิงและ
วัดสารตัวอย่าง
(sample) ทีละ
ครั้ง

Single beam : Multichannel

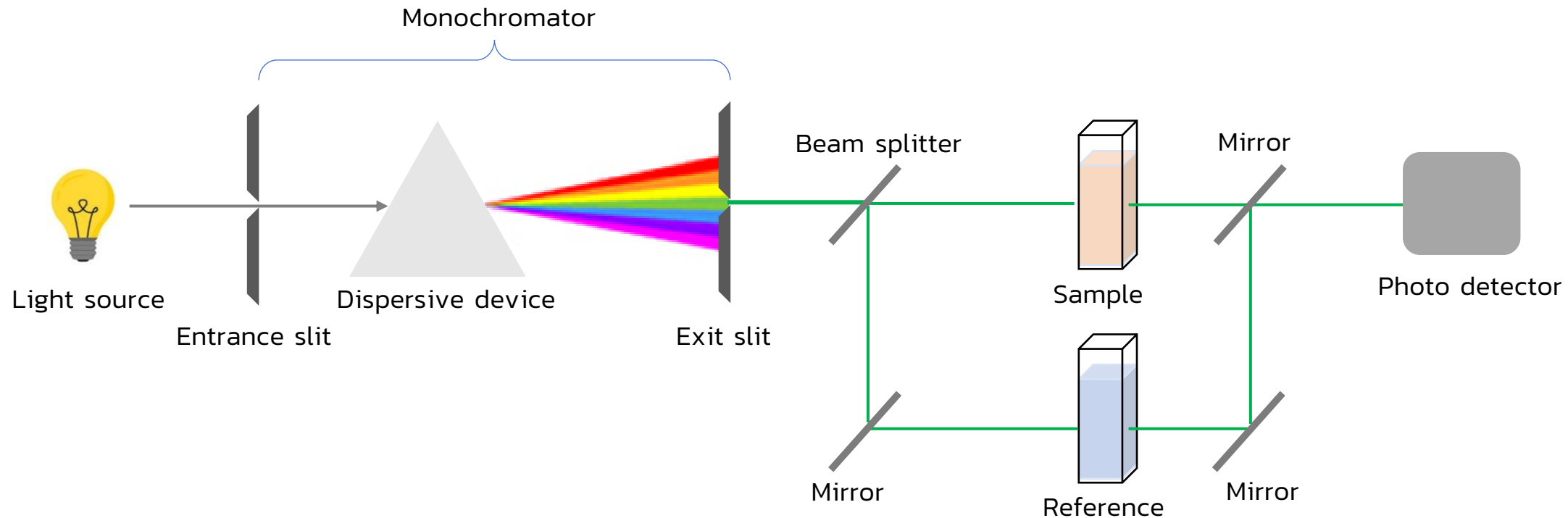


- มี diode array เป็นตัววัดแสง
- สามารถวัดทุกความยาวคลื่นได้ในเวลาเดียวกัน

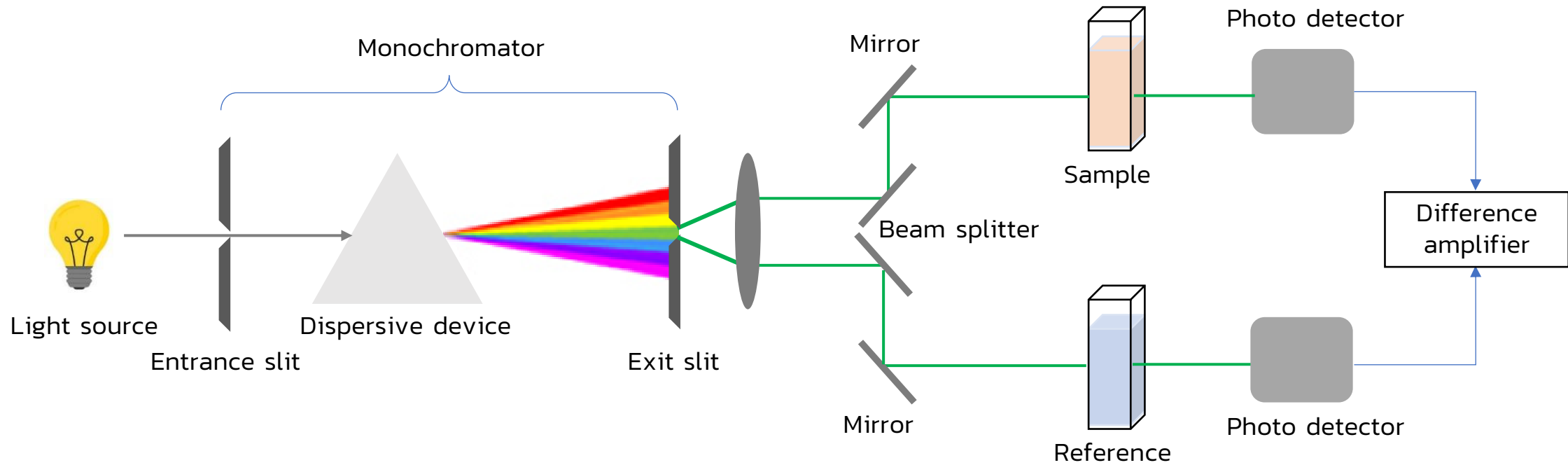
การเก็บข้อมูลสามารถเก็บค่าการดูดกลืนได้เป็นช่วงของความยาวคลื่น โดยใช้เวลาเพียงสั้นๆ เนื่องจากสามารถวัดทุกความยาวคลื่นได้ในเวลาเดียวกัน

Double beam : Split beam

ลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงออกจากช่องแสงออก ลำแสงจะเข้าสู่อุปกรณ์ตัดลำแสง (beam splitter) ซึ่งจะทำหน้าที่สะท้อนลำแสงไปผ่านสารตัวอย่าง และจะสะท้อนลำแสงไปผ่านสารอ้างอิง ลำแสงทั้งสองนี้ไปตกกระทบบนตัววัดแสง ความแตกต่างของความเข้มแสงหลังจากผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิงจะเป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

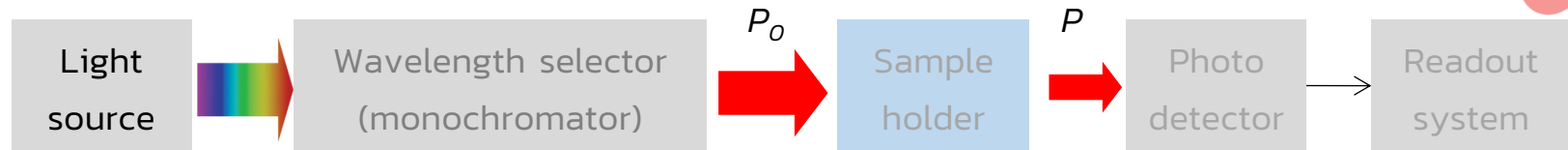


Double beam in space



แหล่งกำเนิดแสง

เป็นส่วนกำเนิดแสงที่ต้องมีความเข้มแสงคงที่และแบบต่อเนื่อง (continuous source) จะเปล่งแสงที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแสงตามความยาวคลื่น



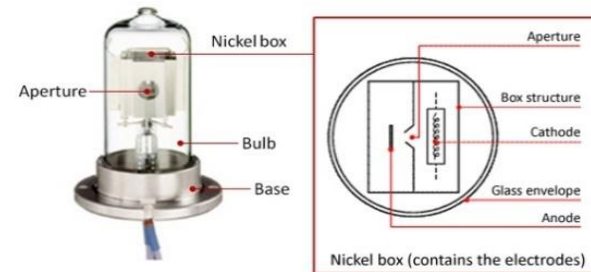
หลอดทังสเทน (W)

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



หลอดดิวทีเรียม (D₂)

- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 180-350 nm



หลอดทังสเทนแฮโลเจน (W-halogen)

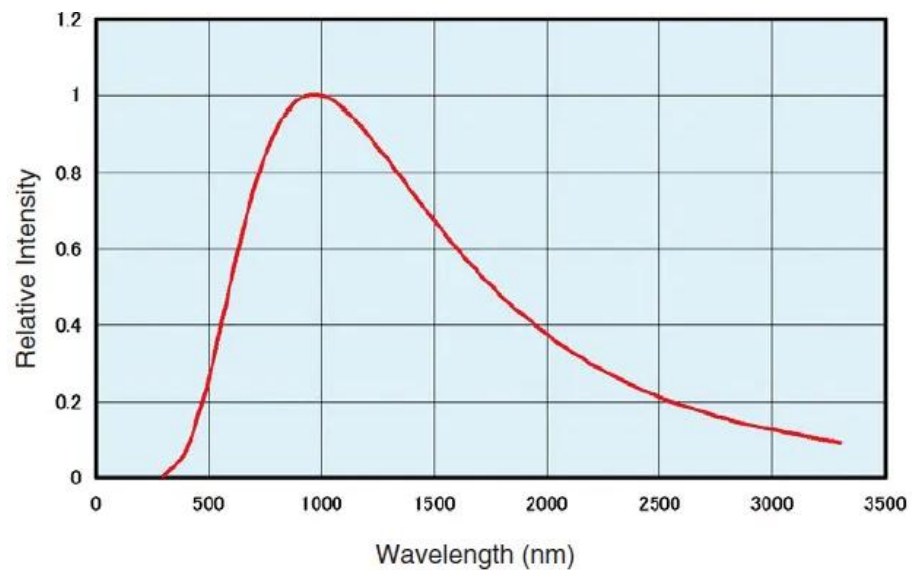
- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 240-2,500 nm
- พัฒนามาจากหลอดทังสเทน โดยการเติมธาตุกลุ่มแฮโลเจนในกระเปาะ เช่น ไอโอดีน
- ใช้ควอตซ์ทำกระเปาะหลอดไฟแทนแก้ว



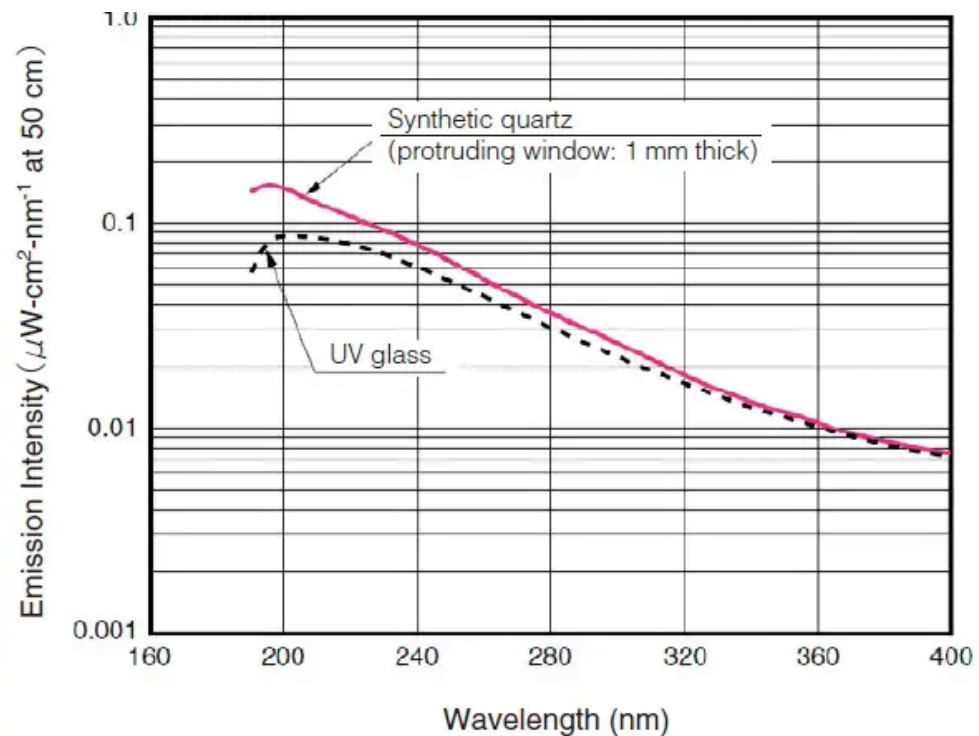
หลอดซีนอน (Xe)

- ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน 185-2,000 nm

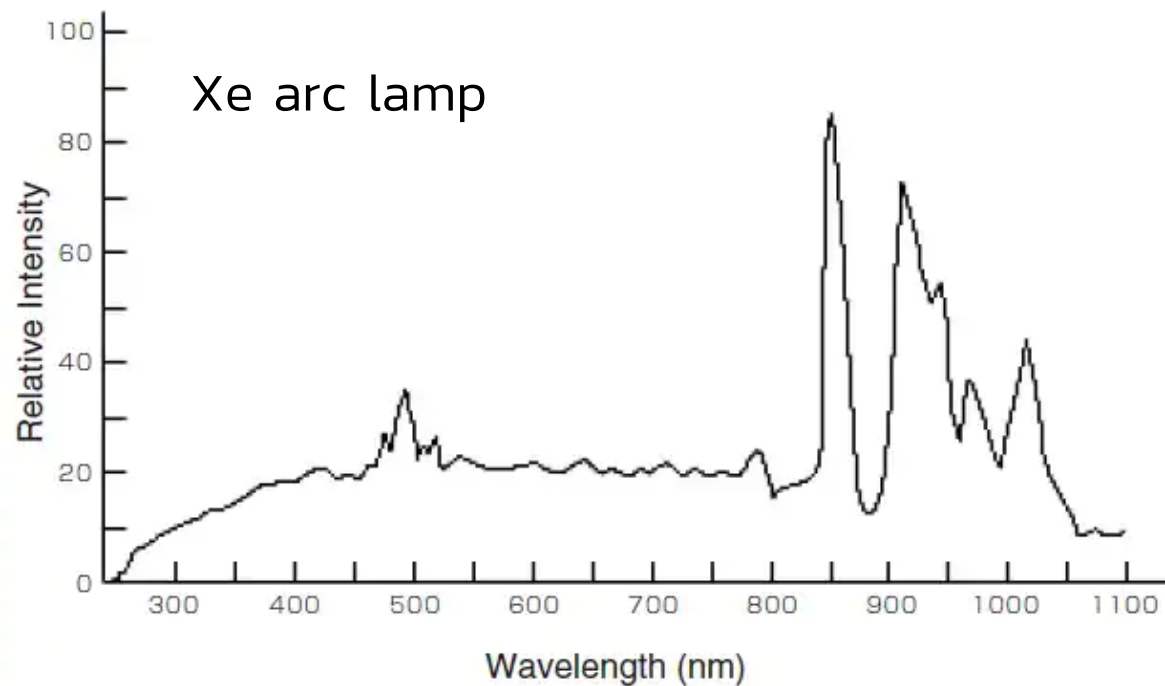
หลอดแอลโวลูเมน



หลอดตัวเทอริยม



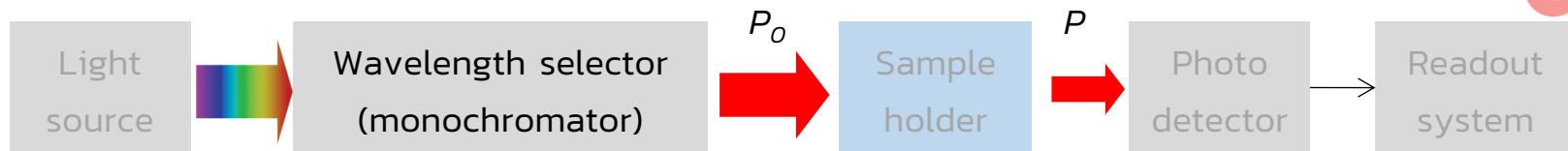
สเปกตรัม



ตัวแยกแสง

ทำหน้าที่แยกแสงหลายสีหรือหลายความยาวคลื่นให้เป็นแสงสีเดียว (monochromatic radiation) ที่มีความยาวคลื่นแสงช่วงแคบ ๆ (band)

โดยอาศัย
การดูดกลืน
การสะท้อนกลับ
หรือการหักเหของแสง



Polychromatic radiation



Wavelength selector

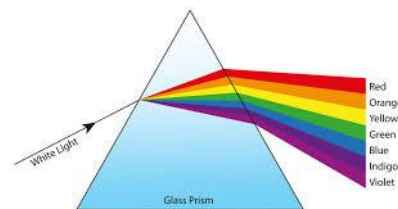
Monochromatic radiation



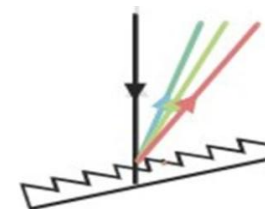
- ตัวกรองแสง (filter)
- ปริซึม (prism)
- เกรตติง (grating)



filter



prism

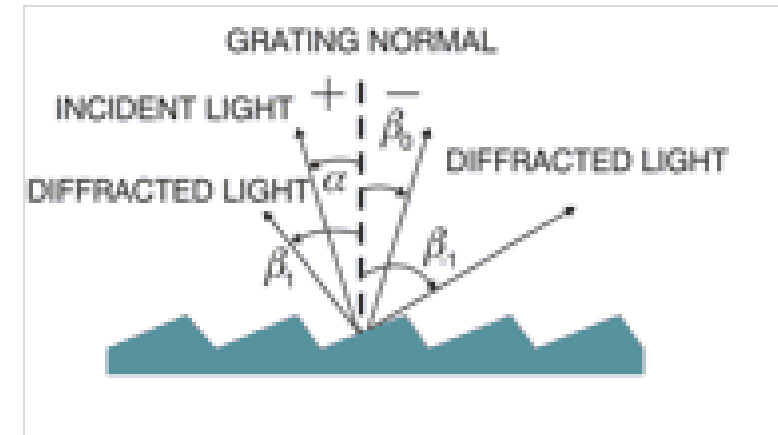


grating

เกรตติง (grating)

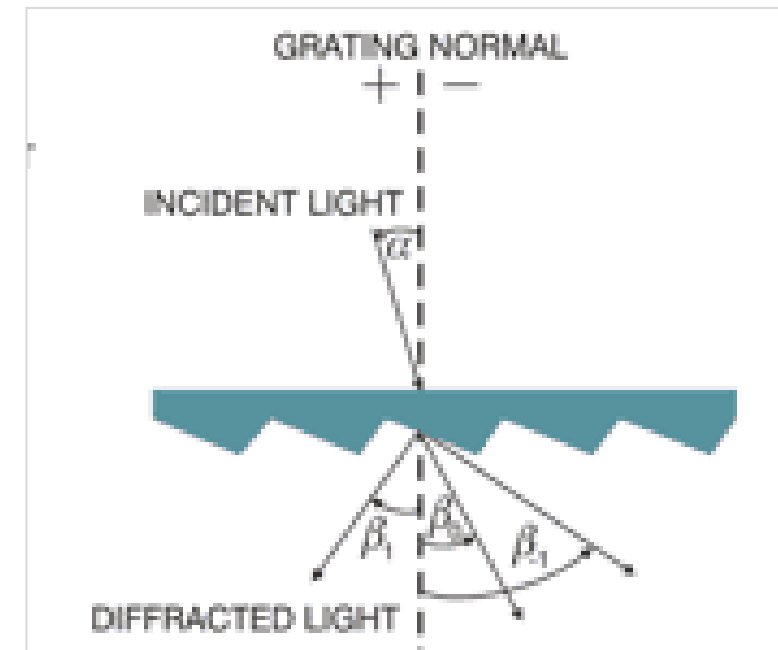
เกรตติงแบบสะท้อน (reflection grating)

แผ่นโลหะผิวหน้าเรียบและสะท้อนแสงได้ดี
ด้านหน้าจะเซาะร่องขนาดเล็ก ๆ ขนานกัน
จำนวน 600-2,000 ร่องต่อมิลลิเมตร



เกรตติงแบบส่งผ่าน (transmission grating)

ทำด้วยวัสดุโปร่งใส เป็นกระจกที่นำมาขีด
ให้ร่องขนานกัน ให้แสงออกเป็นหลาย ๆ
ความยาวคลื่นในด้านที่ตรงข้ามกับแสงเข้า

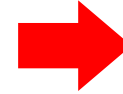


Polychromatic
radiation

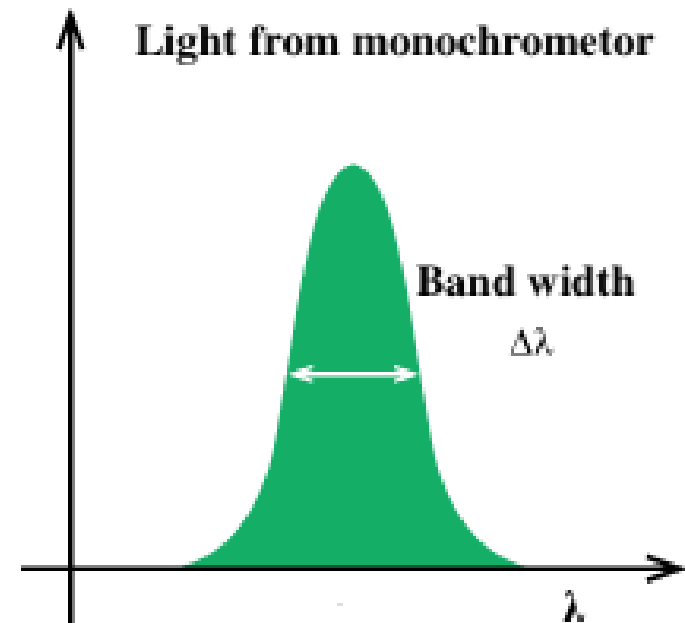
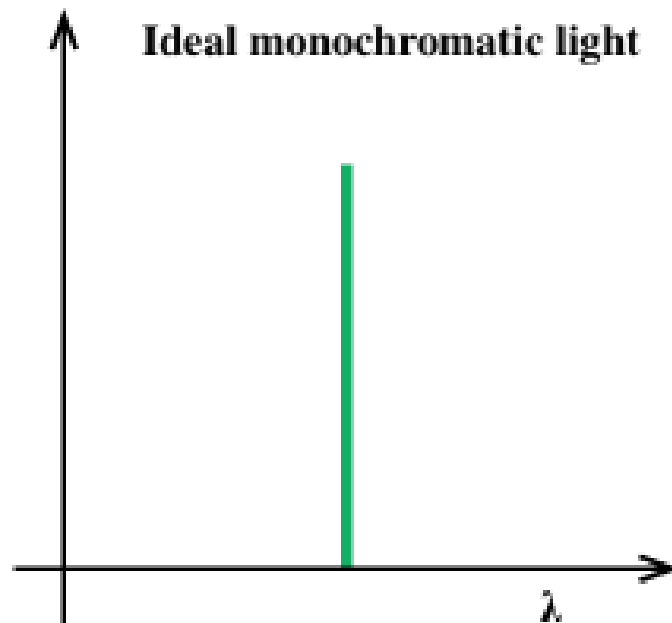


Wavelength
selector

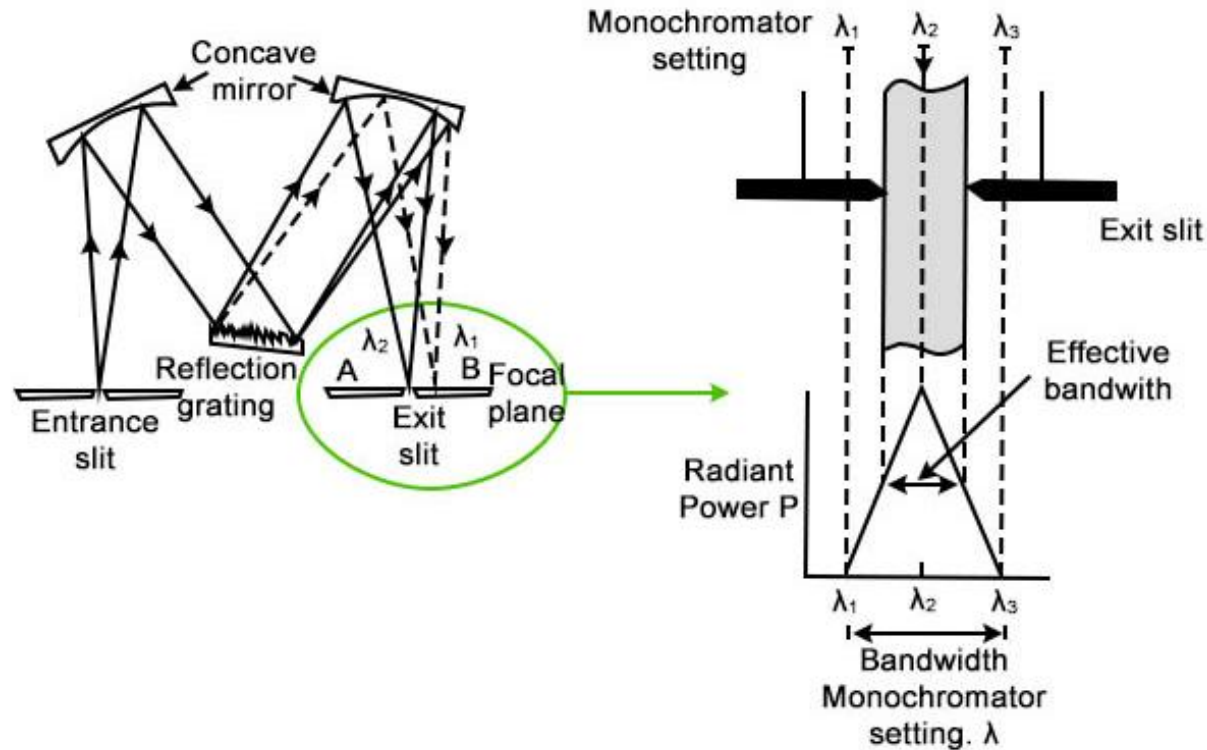
Monochromatic
radiation



ในทางปฏิบัติ ไม่มี wavelength
selector ที่ให้ single wavelength แต่
จะให้ช่วงของ wavelength ที่ต่อเนื่อง
เรียกว่า band



Monochromator Slits



- 1) **Entrance slit:** brings radiation from the source into the monochromator
- 2) **Exit slit:** passes the radiation from the monochromator to the detector

Wavelength Selector ที่ดี ควรมีลักษณะสำคัญ 2 ประการ คือ

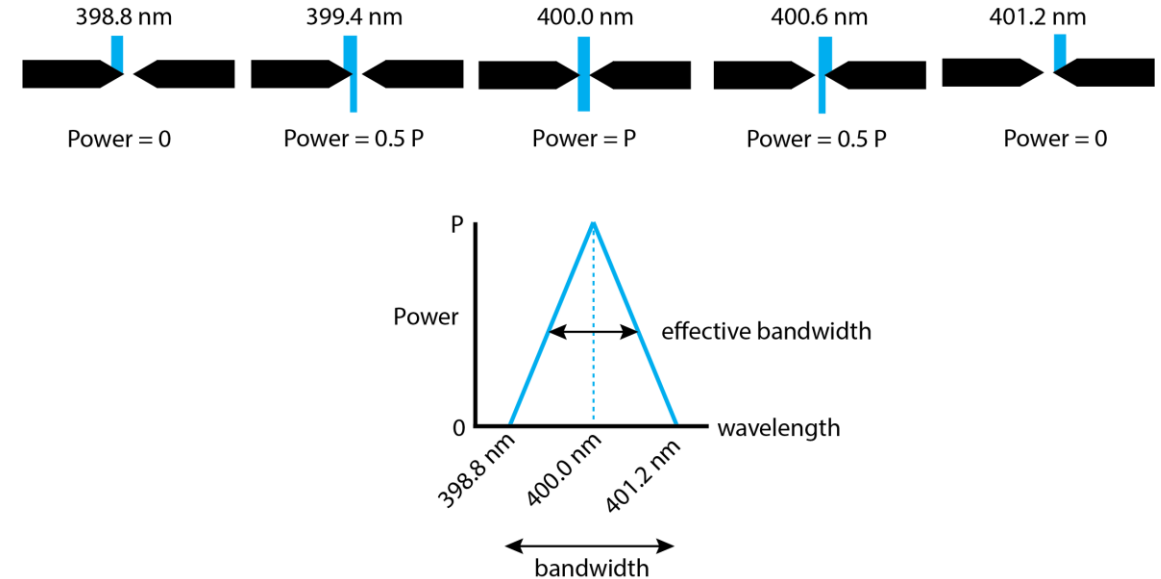
1. มีการส่งผ่านรังสี (Throughput) ได้สูง เป็นสิ่งที่ต้องการ เพราะทำให้โฟตอนจำนวนมากสามารถผ่าน Wavelength Selector ได้ส่งผลให้ได้ สัญญาณที่แรงขึ้น และมีสัญญาณรบกวน (Noise) จากพื้นหลัง น้อยลง
2. มี Effective Bandwidth ที่แคบ จะช่วยให้ ความละเอียดของการวัด (Resolution) ดีขึ้น

Entrance and exit slits with a width of 1.0 mm and a reciprocal linear dispersion of 1.2 nm/mm.

monochromator's effective bandwidth ($\Delta\lambda_{\text{eff}}$)

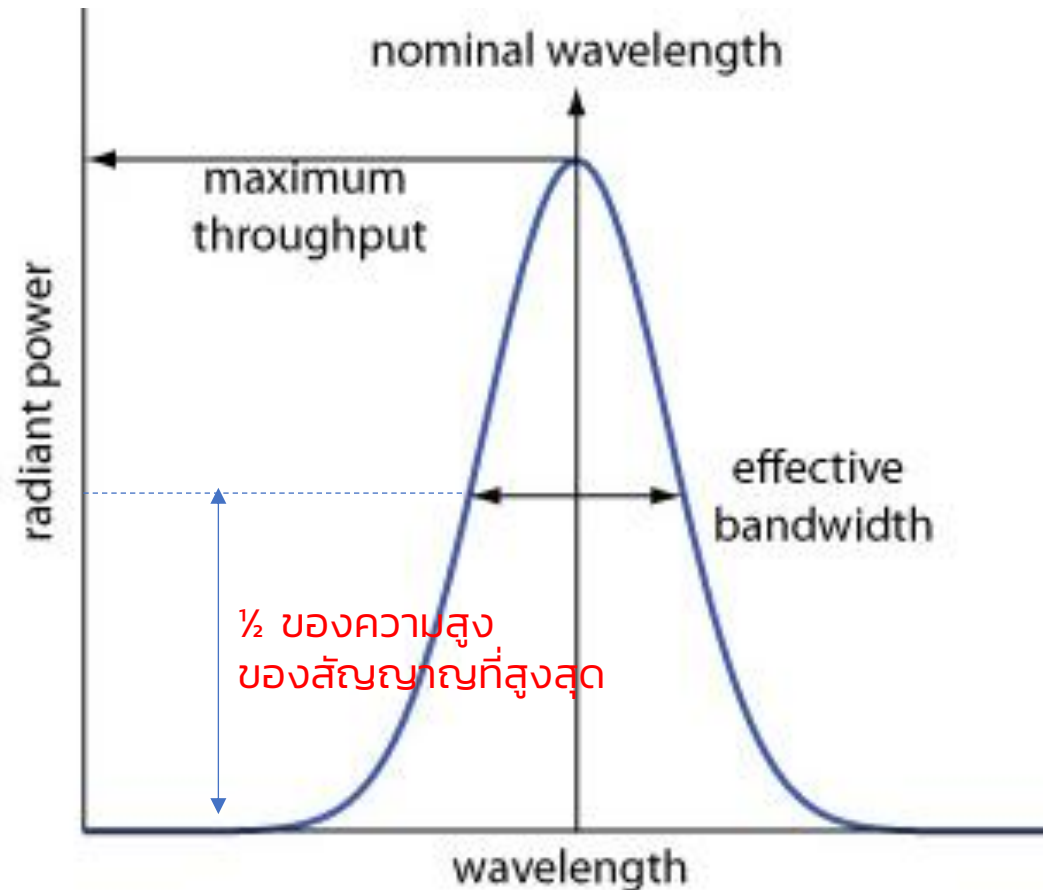
$$\Delta\lambda_{\text{eff}} = 1.0 \text{ mm} \times 1.2 \text{ nm/mm} = 1.2 \text{ nm}$$

- A source of monochromatic radiation with a wavelength of 400.0 nm.
- The exit slit at a wavelength setting of 398.8 nm and will fully exit the slit at a wavelength setting of 401.2 nm.
- When the monochromator is set to 399.4 nm or 400.6 nm, half of the beam reaches the detector.



Effective bandwidth

ในทางปฏิบัติไม่มี wavelength selector ที่ให้ single wavelength แต่จะให้ช่วงของ wavelength ที่ต่อเนื่อง เรียกว่า band ซึ่งเป็น Gaussian-shaped distribution of wavelengths

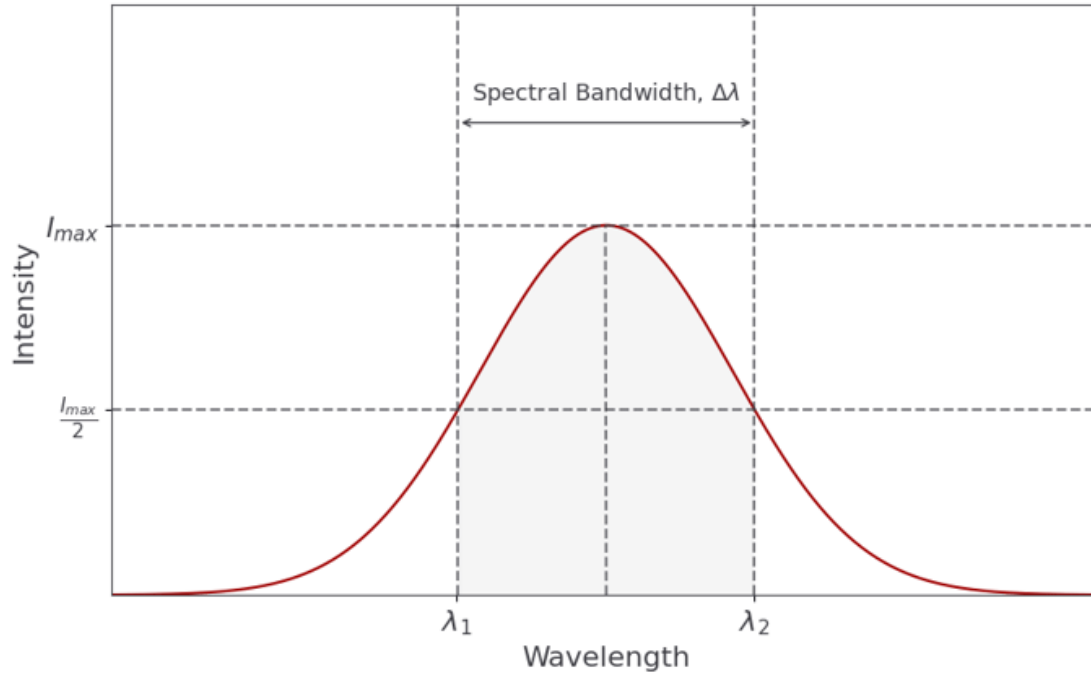


นิยามว่า effective bandwidth หรือ bandwidth คือ ความกว้างของ band ที่ half-peak height ของรังสีที่ผ่านออกมา

Bandwidth ใช้แสดงถึงคุณภาพของเครื่องมือ ถ้า bandwidth แคบ แสดงว่าเครื่องมือมีสมรรถนะสูง

Spectral bandwidth (SBW)

ช่วงความกว้างของแสง (ความยาวคลื่น) ที่ปล่อยออกมาจากโมโนโครเมเตอร์ในระดับ ครึ่งหนึ่งของความเข้มสูงสุด

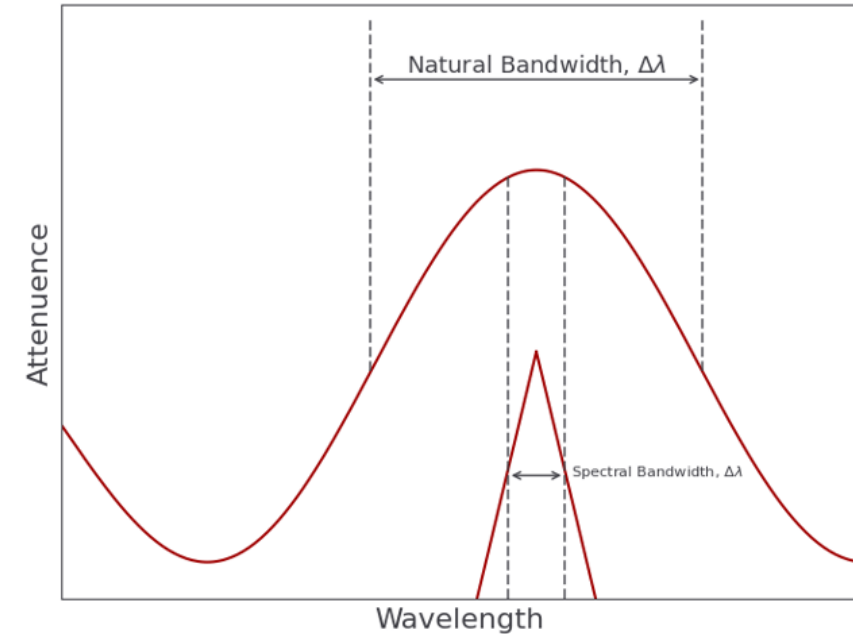


ปัจจัยที่กำหนด Spectral bandwidth

- ขึ้นอยู่กับ ความกว้างของ slit-width ของโมโนโครเมเตอร์
- องค์ประกอบที่ทำหน้าที่แยกแสง เช่น ปริซึม หรือแผ่นเกรตติง

Natural bandwidth (NBW)

ช่วงความกว้างของแถบดูดกลืนของสารตัวอย่างที่ระดับครึ่งหนึ่งของความเข้มการดูดกลืนสูงสุด



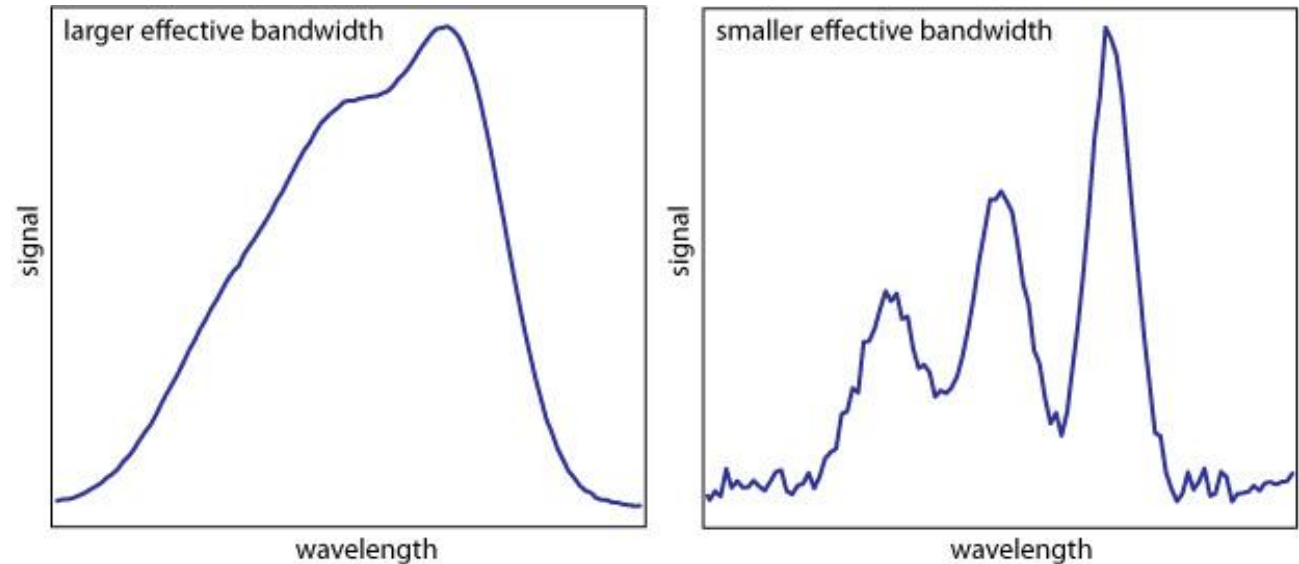
ความแม่นยำของการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่าง SBW ของเครื่องมือ กับ NBW ของสาร

- SBW ควรเลือกน้อยกว่า 10 เท่าของ NBW
- ถ้าอัตราส่วนเท่ากับ 0.1 หรือน้อยกว่า จะสามารถวัดค่าการดูดกลืนได้แม่นยำถึง 99.5% ขึ้นไป
- แต่ถ้า SBW กว้างเกินไป เมื่อเทียบกับ NBW ค่าที่วัดได้จะเริ่มเบี่ยงเบนจากค่าจริง

Effective bandwidth

ความต้องการ คือ การมี Throughput สูง และการมี Effective Bandwidth แคบ

- ถ้าต้องการให้ แสงผ่านได้มาก (High Throughput) มักต้องแลกมาด้วย Resolution ที่ลดลง
- ถ้า ลดความกว้างของ Effective Bandwidth เพื่อให้ได้ Resolution สูงขึ้น จะทำให้แสงที่ผ่านได้น้อยลง และอาจเกิดสัญญาณรบกวน (Noise) มากขึ้น



ช่องใส่ตัวอย่าง

หน้าต่างบรรจุสารละลายตัวอย่างที่ให้แสงความยาวคลื่นเดียวที่ผ่านจากตัวแยกแสงผ่านไปสัมผัสกับอนุภาคสารที่ดูดกลืนแสงได้

เรียกว่า
เซลล์ (cell)
หรือ
คิวเวตต์ (cuvette)

แก้ว (glass)

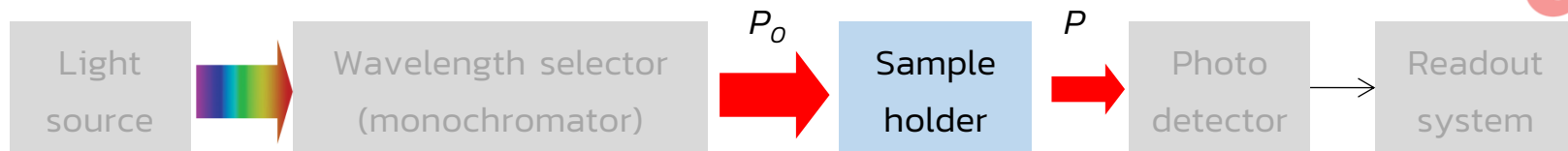
- แก้วชนิดโบโรซิลิเกต เนื่องจากมีความแข็ง ทนต่อการขีดข่วน และทนความร้อนได้สูง
- ขั้วเสีย > ดูดกลืนแสงได้เกือบ 100% ที่ 270 nm และครึ่งหนึ่ง (50%T) ที่ 310 nm และไม่เกิน 20%T ที่ 340 nm
- ช่วงใช้งานควรเริ่มตั้งแต่ 360-2,000 nm

ควอตซ์ (quartz)

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

พลาสติก (plastic)

- พลาสติกพอลิสไตรีน โปร่งใส ยอมให้แสงส่งผ่านได้มาก สามารถใช้งานได้ในช่วง 340-750 nm มีราคาถูก



Cuvette



Semi micro cell, 1400 μ L



Flow cell, 390 μ L

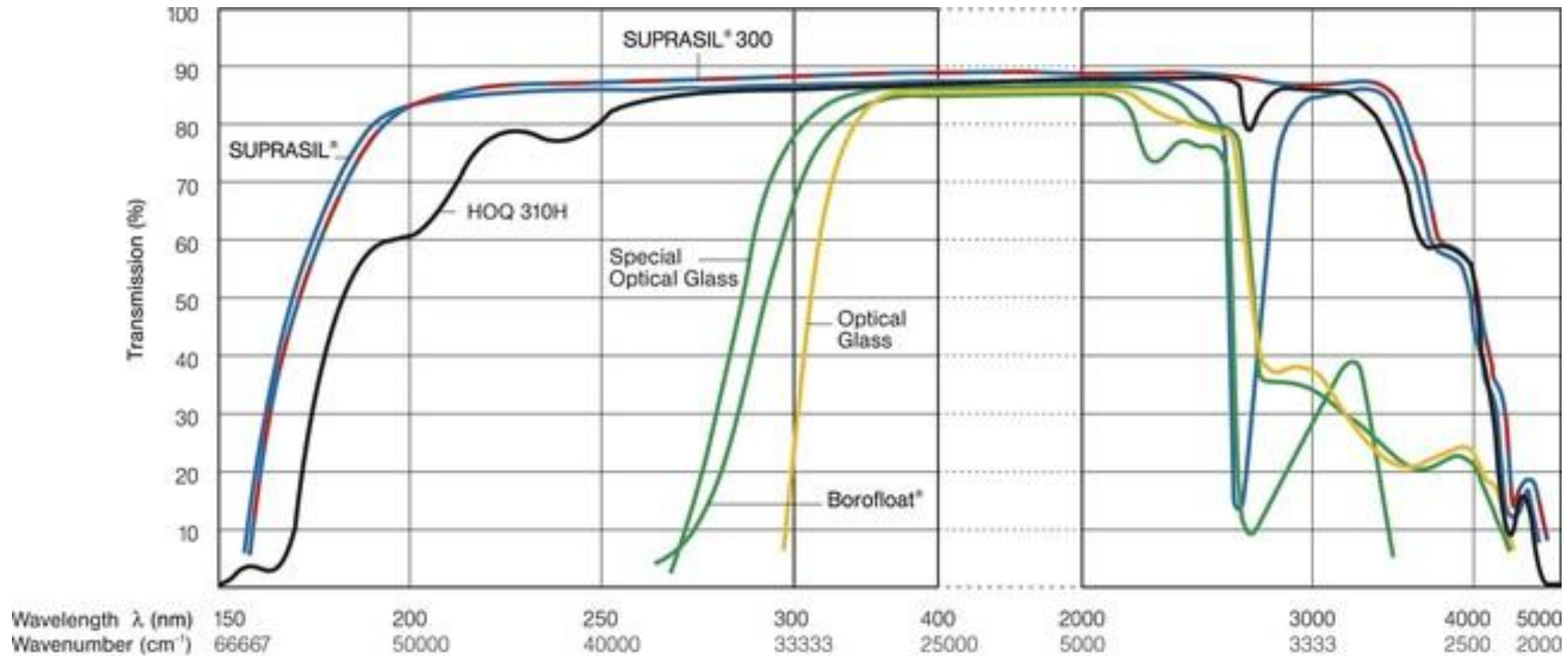


macro cell, 350 μ L



Ultra micro cell, 10 μ L

สเปกตรัมการดูดกลืน



ตัววัดแสง

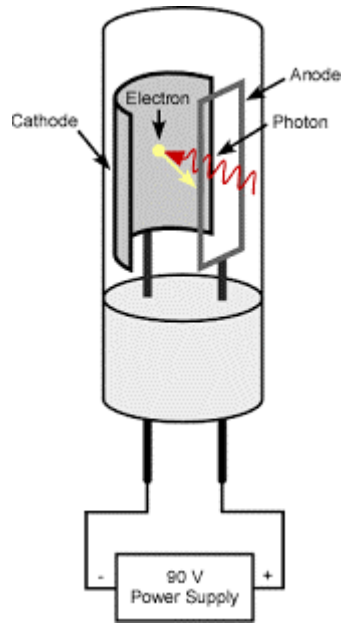
ทำหน้าที่เปลี่ยน
ความเข้มของแสง
ให้เป็น
สัญญาณไฟฟ้า
แล้วส่งต่อไปยัง
ภาคขยาย
สัญญาณและวงจร
อิเล็กทรอนิกส์
เพื่อให้สามารถ
แสดงค่าออกมาใน
รูปการดูดกลืนแสง



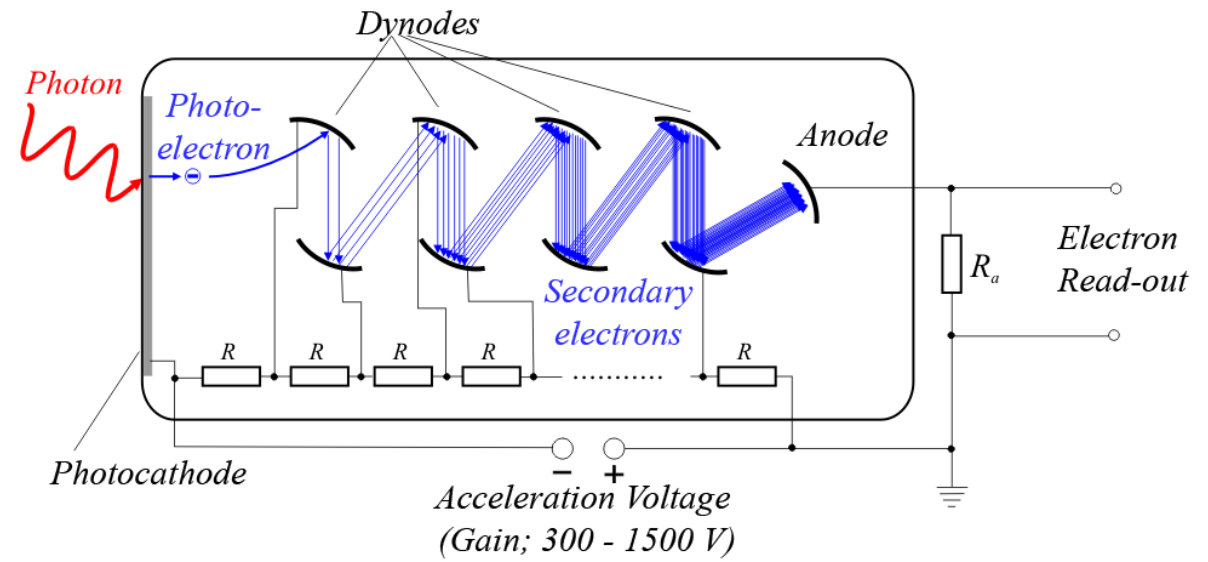
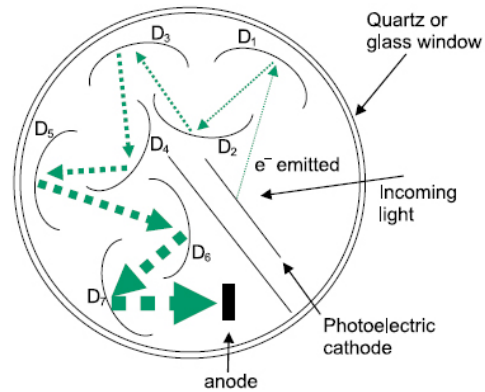
- โฟโตทิวบ์ (phototube)
- โฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์ (photomultiplier tube; PMT)
- ซิลิคอนโฟโตไดโอด (silicon photodiode,)
- โฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode array, PDA)
- (charge coupled device, CCD)
- (charge injection device, CID)

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

Photo detector



phototube



photomultiplier tube

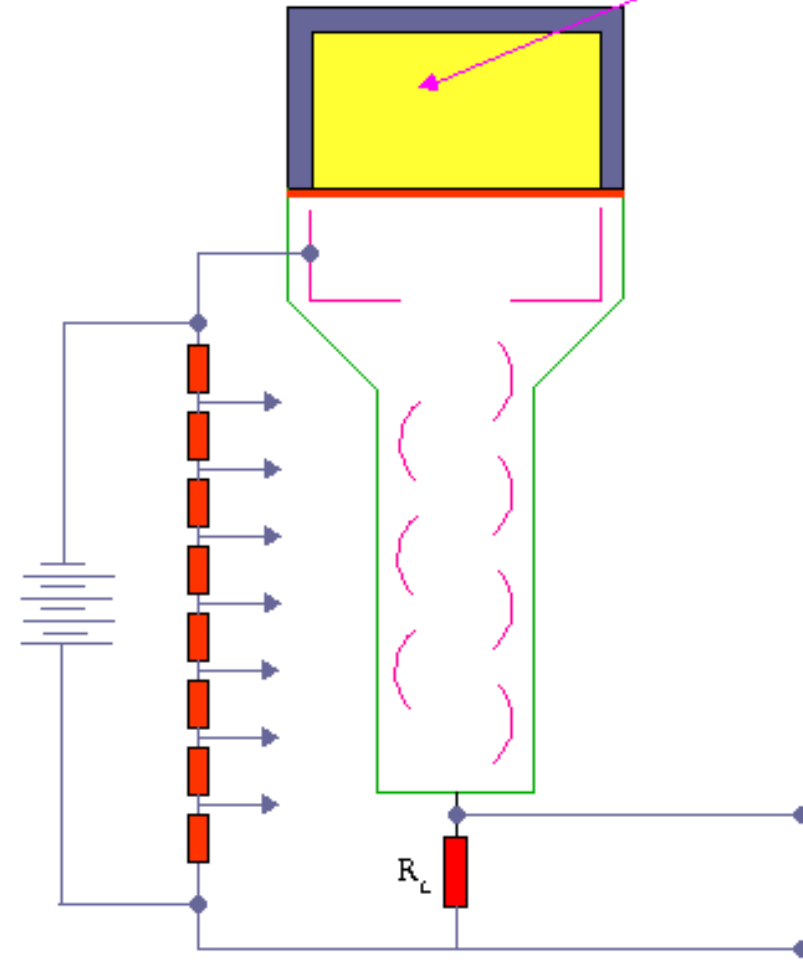
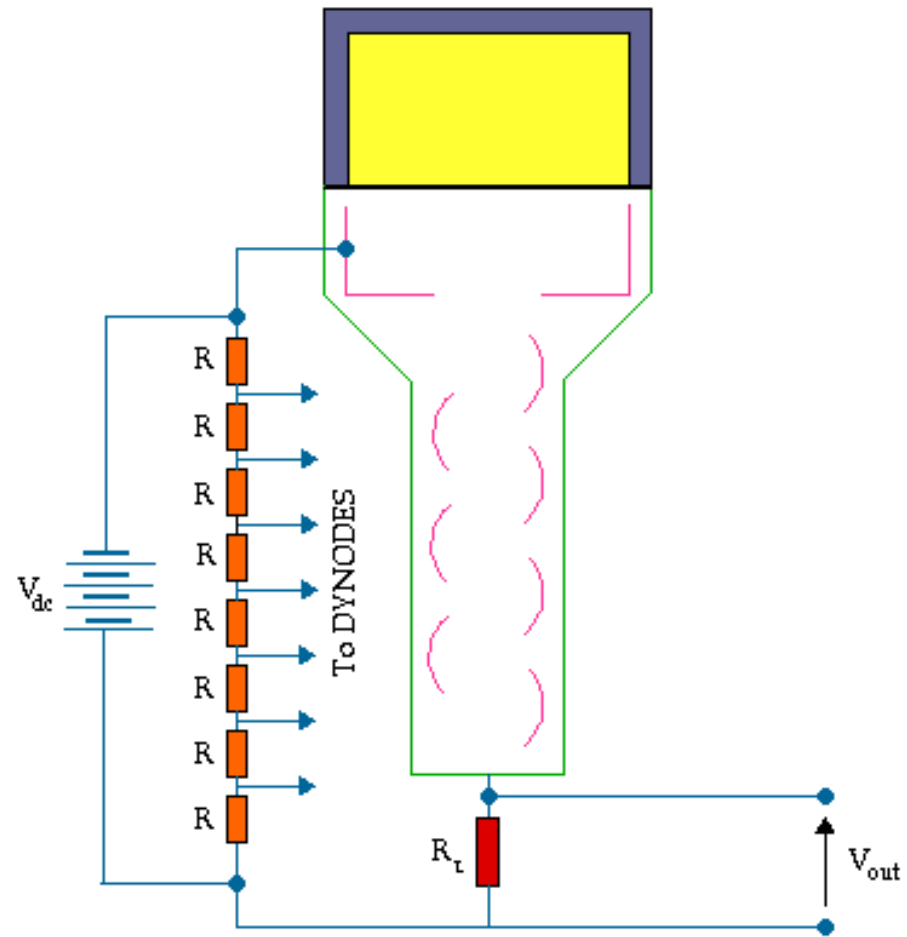
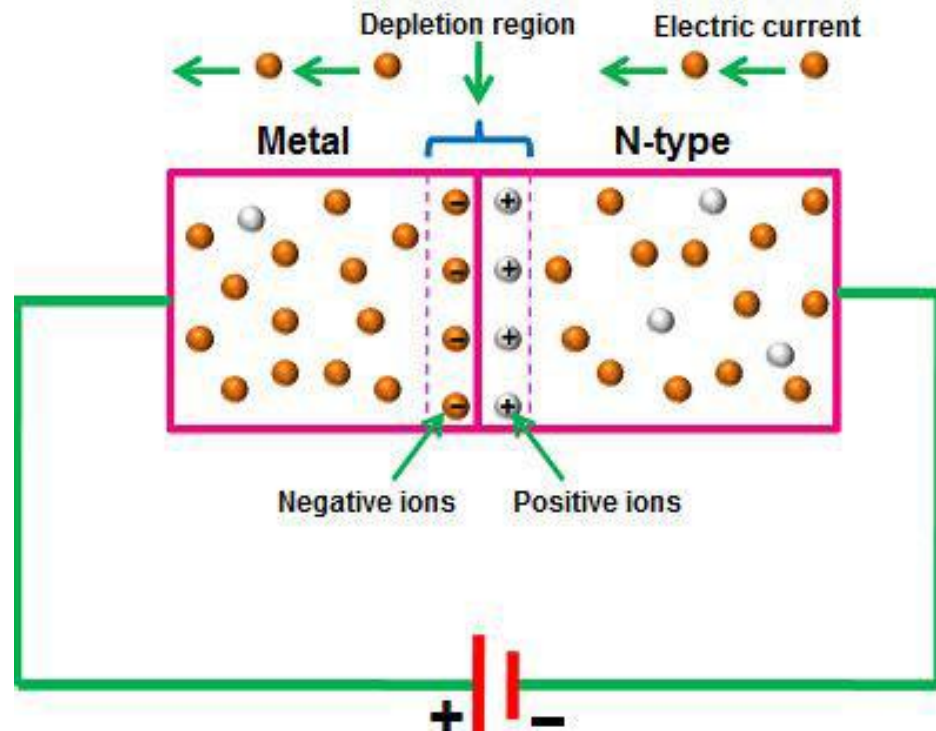
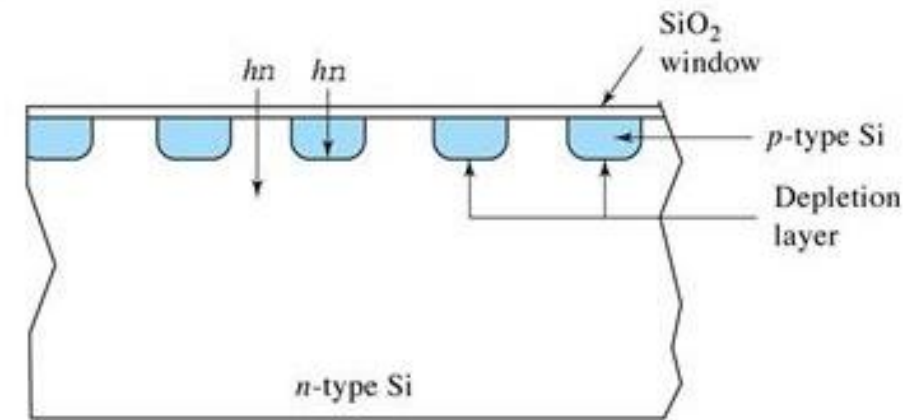


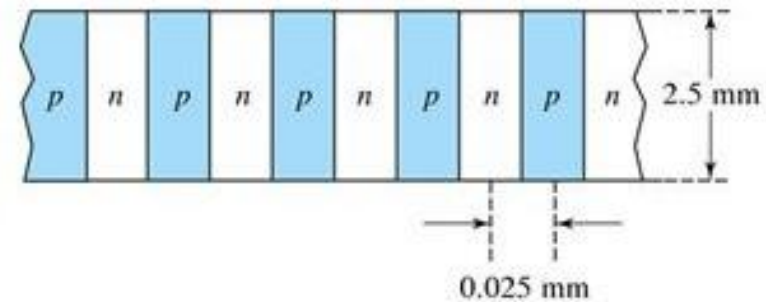
Photo detector



silicon photodiode



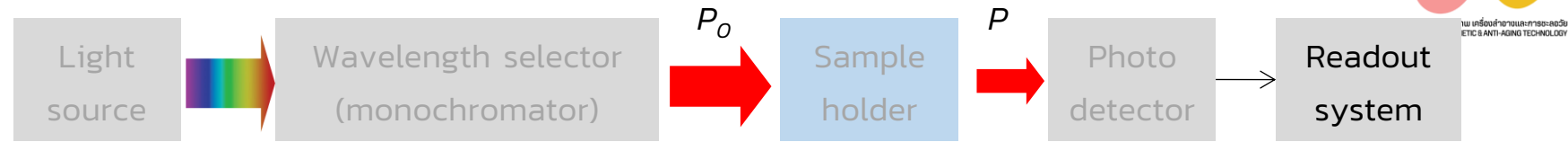
(a)



(b)

photodiode array

ภาคขยาย สัญญาณ และ ภาคแสดงผล



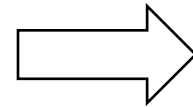
ภาคขยายสัญญาณ (amplifier) มีหน้าที่หลักในการขยายสัญญาณไฟฟ้าจากตัววัดแสงให้มีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่าออกมาได้โดยการรบกวนจากสัญญาณอื่น ๆ ให้น้อยที่สุด

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

การเตรียมตัวอย่างและการเจือจาง



เทคนิค UV-Vis สารตัวอย่างต้องอยู่ในสถานะสารละลาย (ใส ไม่เป็นสารแขวนลอย ไม่มีตะกอนหรือขุ่น)



Ascorbic acid

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

หลักการเตรียมตัวอย่างและการเจือจางต้องเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ เช่น

- 1) ต้องละลายตัวอย่างเป็นลักษณะใส ไม่มีตะกอนหรือสารแขวนลอย โดยพิจารณาจากสภาพขั้ว (polarity) ของตัวอย่างและตัวทำละลายต้องใกล้เคียงกัน
- 2) ต้องไม่ดูดกลืนรังสี UV-Vis ช่วงความยาวคลื่นเดียวกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ (cut-off point) ของตัวทำละลาย
- 3) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่สนใจในตัวอย่าง

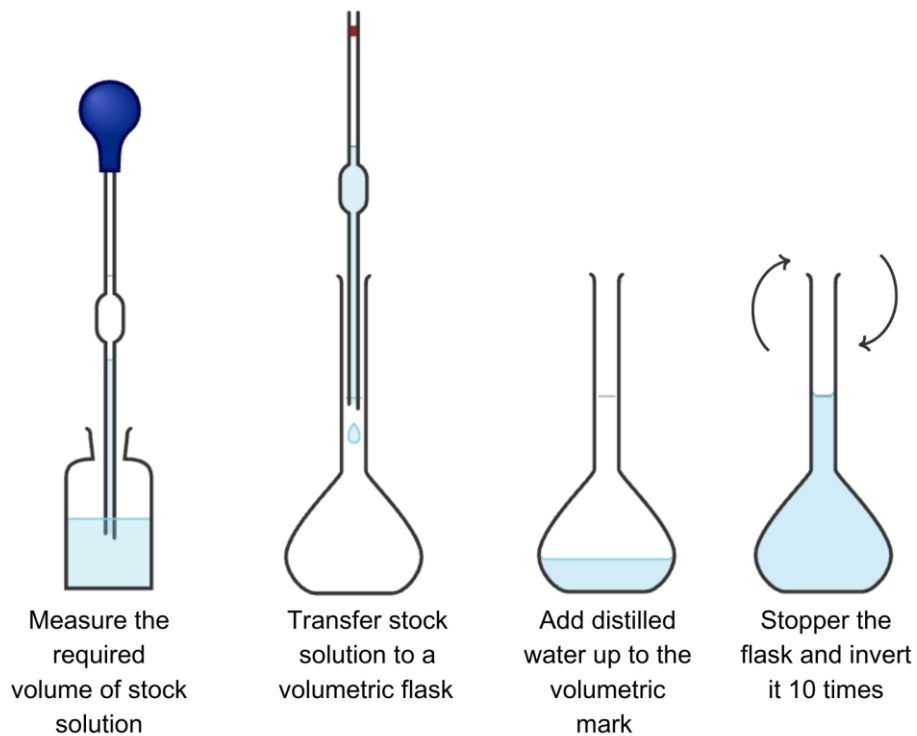
วิธีการเตรียมตัวอย่าง

- การกรอง
- การละลาย
- การหมุนเหวี่ยง
- การสกัด
- การย่อยด้วยกรด
- การย่อยด้วยเบส

Slide วิธีการเตรียมตัวอย่าง

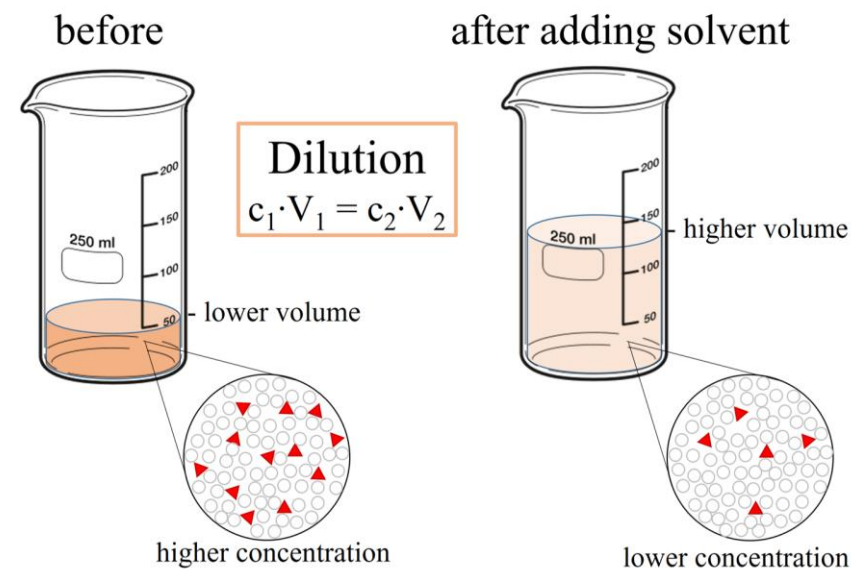


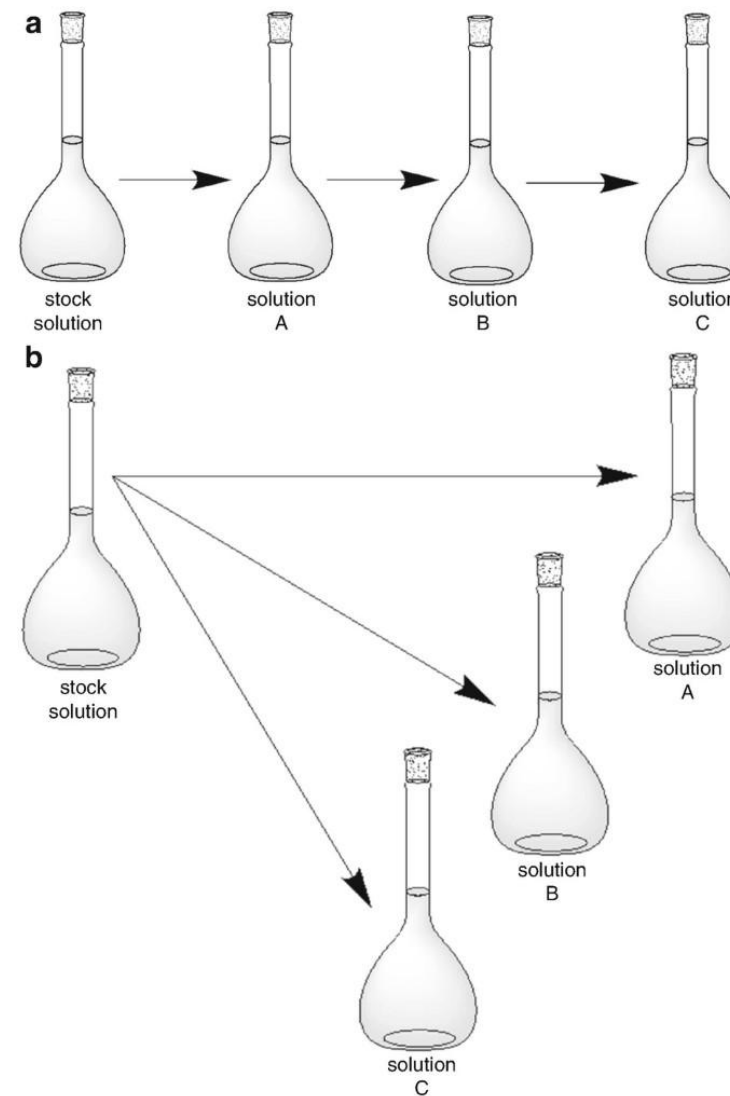
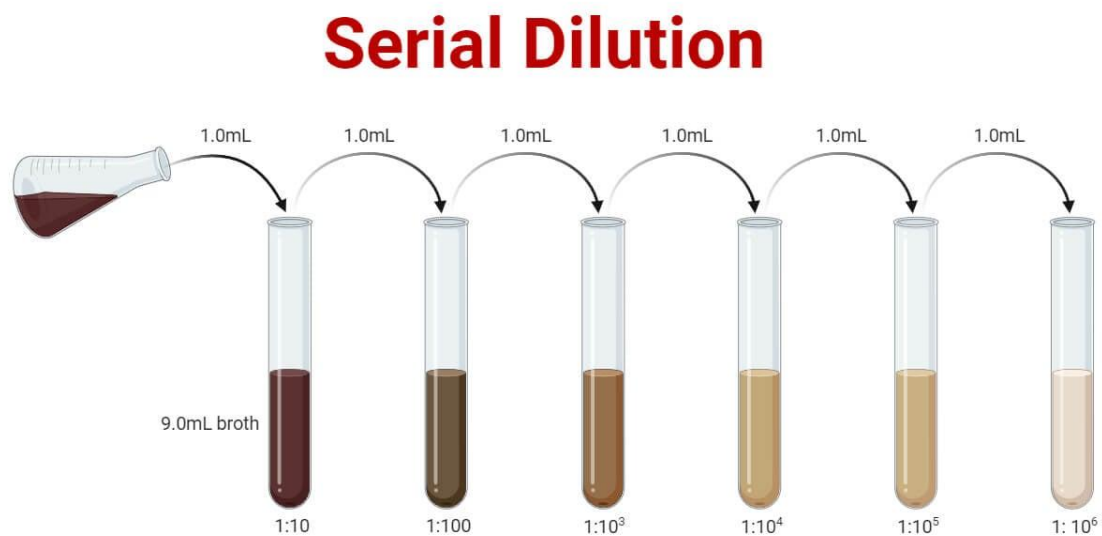
การเตรียมสารละลาย



การเจือจางสารละลาย

$$C_1V_1 = C_2V_2$$





Exercise

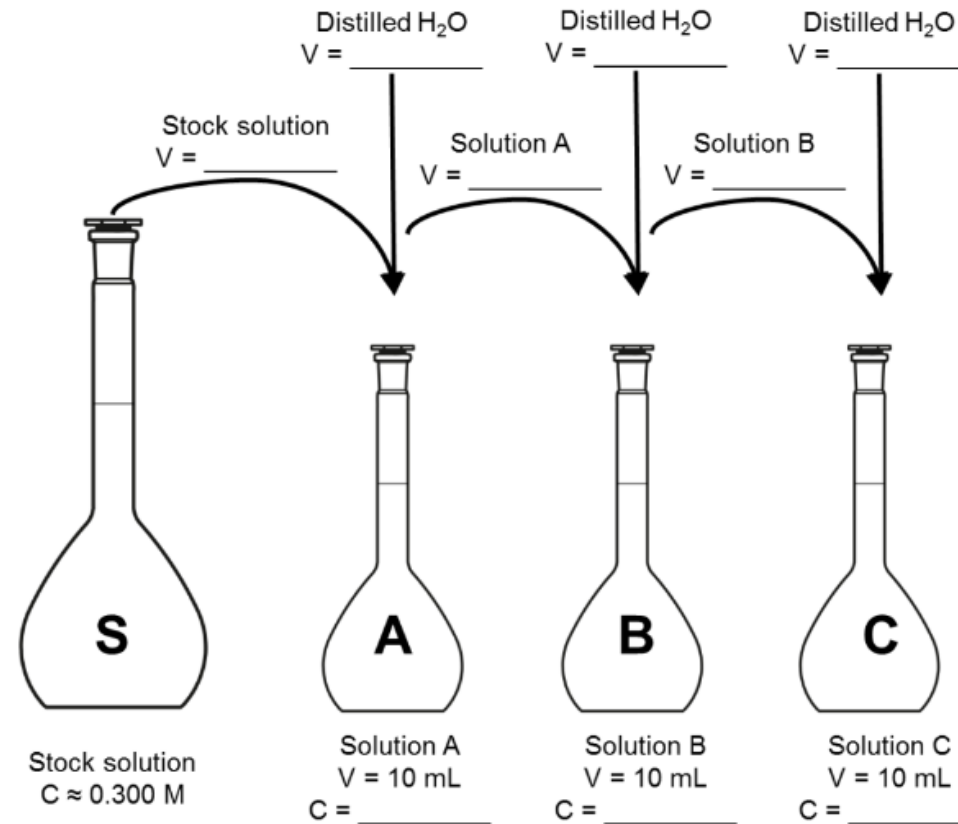


Figure 2.5 Preparation of solutions using the serial dilution method.
 Figure adapted from File: Volumetric flask.svg - <https://en.wikipedia.org>).

#กิจกรรม work@class

แบ่งกลุ่มทำกิจกรรม 1.2

มอบหมายโจทย์ให้แต่ละกลุ่ม
ระดมสมองแก้ไขโดยวิธีการ
ร่วมแสดงความคิดเห็น

ให้แต่ละกลุ่มนำเสนอ วิธีการแก้ไขโจทย์ปัญหา

- 1) หลักการสำคัญหรือหลักพื้นฐานที่ถูกต้อง
- 2) วิธีการคำนวณค่าที่ถูกต้อง
- 3) วิธีอธิบายเชิงพฤติกรรม (วิธีปฏิบัติ) ที่ถูกต้อง

โดยให้กลุ่มอื่น ๆ รับฟัง และซักถามในข้อที่สงสัย