UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis)

By Supaporn Sangsrichan

CH210 Analytical Chemistry

Maejo University

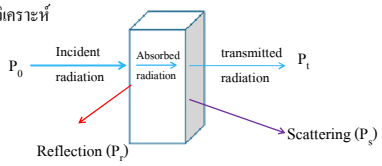
สเปกโทรสโคปี (Spectroscopy)

1. บทนำ
2. เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-VIS Spectroscopy)
3. ส่วนประกอบของเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer)
4. การประยุกต์ใช้ (Application)

2

สเปกโทรสโคปี

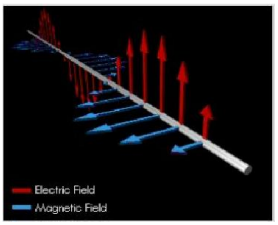
* หมายถึง การแยก การตรวจสอบและการบันทึกพลังงานที่เปลี่ยนไป เกี่ยวกับนิวเคลียส อะตอม ไอออน หรือโมเลกุล
* พลังงานที่เปลี่ยนไปนั้นเนื่องจากเกิด อีมิสชัน (Emission) การดูดกลืน (Absorption) การกระเจิง (Scattering)
* ในธรรมชาติ สสารสามารถดูดกลืนแสง รังสี หรือแสงได้แตกต่างกัน ทำให้วัตถุเหล่านั้นมีสีสันต่างกันไปด้วย นักวิทยาศาสตร์จึงนำสมบัติเหล่านี้ไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์



3

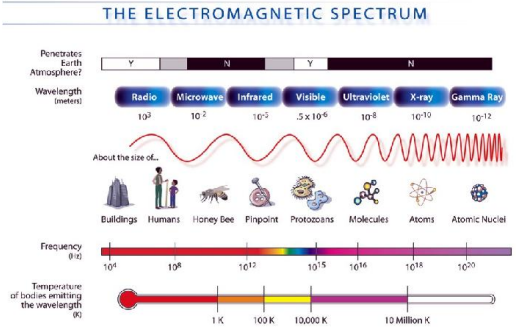
แสง

* แสงเป็นคลื่นชนิดหนึ่งซึ่งประกอบไปด้วยสนามแม่เหล็ก (magnetic field) และสนามไฟฟ้า (electric field) ที่วางตัวตั้งฉากกันและสามารถเคลื่อนที่ได้ เราจึงเรียกว่า "electromagnetic spectrum" ดังรูป



4

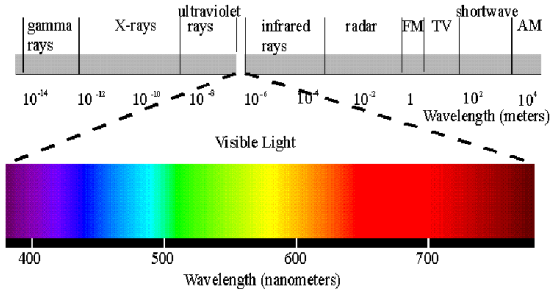
ช่วงของสเปคตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic spectrum)



http://mynasadata.larc.nasa.gov/science-processes/electromagnetic-diagram/

5

ตัวอย่างสเปคตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า



http://www.yorku.ca/eye/spectru.htm

6

ความสัมพันธ์ระหว่างพลังงาน (E) กับความถี่ (frequency, ν (อ่าน nu))

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

เมื่อ

E = พลังงาน 1 โฟตอน หน่วยเป็น J

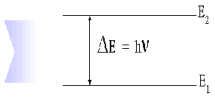
h = ค่าคงตัวของพลังค์ (Planck's constant)

$= 6.626 \times 10^{-34}$ J s

$= 6.626 \times 10^{-34}$ m^2 kg s^{-1}

$= 6.62 \times 10^{-27}$ เอิร์ก-วินาที (erg-s)

c = speed of light = 3×10^8 m s^{-1}



พลังงานจะสูงขึ้นเมื่อความถี่สูงขึ้น

ความถี่แปรผกผันกับความยาวคลื่น(wavelength; λ (lambda)

7

ตัวอย่าง

1. จงหาความถี่ (Hz) ของคลื่นที่เคลื่อนที่ในอากาศที่มีความยาวคลื่นหนึ่ง 5 cm ($\nu = 6 \times 10^3$ MHz)
2. รังสีแม่เหล็กไฟฟ้ามีเลขคลื่น 3.125×10^4 cm^{-1} จงหาความถี่ (Hz) และความยาวคลื่น (nm) ($\nu = 9.375 \times 10^{14}$ Hz และ $\lambda = 320$ nm)
3. จงคำนวณหาพลังงานในหน่วย J ของรังสีวิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 300 nm ($E = 6.626 \times 10^{-19}$ J)
4. จงหาพลังงาน (J) และความถี่ (Hz)ของรังสีที่มีความยาวคลื่น 30 Å ($\nu = 1.0 \times 10^{17}$ Hz และ $E = 6.626 \times 10^{-17}$ J))

8

อัลตร้าไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

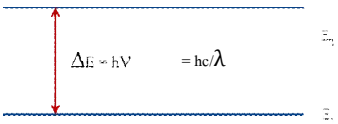
เป็นเทคนิคที่วัดการดูดกลืนแสงหรือรังสีในช่วงอัลตร้าไวโอเลตและวิสิเบิล โดยมีชื่อเรียก "เครื่องยูวีวิสิเบิล"

- ใช้แสงที่มีความยาวคลื่นที่ 190-800 nm "อยู่ในช่วง ยูวี และ วิสิเบิล"
- สารที่สามารถดูดกลืนรังสีได้แก่พวกสารอินทรีย์ (Organic compound), สารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound), สารประกอบอนินทรีย์ (Inorganic compound)
- วิเคราะห์สารทั้งที่มีสี และไม่มีสี ในรูปธาตุหรือโมเลกุล
- วิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพ (ต้องใช้ร่วมกับเทคนิค IR, NMR spectroscopy) และเชิงปริมาณ

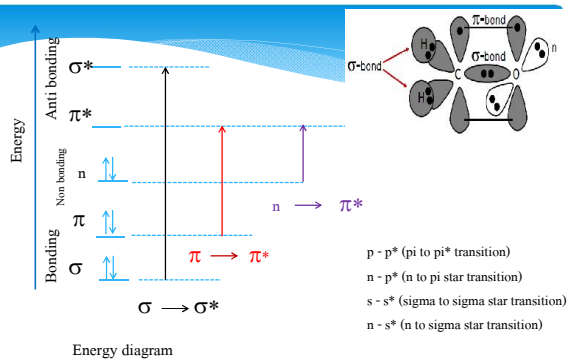
9

หลักการดูดกลืนแสงยูวี

- เกิดจากการที่สารดูดกลืนแสงที่ผ่านเข้ามา ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับ
- พลังงานของอิเล็กตรอน (Electronic transition) วงรอบนอกสุด (valence electron) หรืออิเล็กตรอนที่เกิดพันธะ (bonding electron) หรืออิเล็กตรอนที่ยังไม่เกิดพันธะ (non-bonding electron)
- การรับพลังงานของธาตุหรือโมเลกุลแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธะ ทำให้เทคนิคนี้มีความเลือกเฉพาะ และใช้ทั้งในคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์



10



Energy diagram

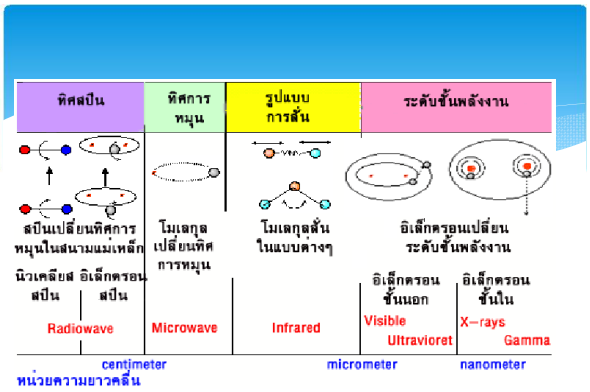
11

http://www.chem.ucla.edu/~bacher/UV-vis/uv_vis_tetracyclone.html.html

Common functional groups

Compound	λ(nm)	Intensity/ε	transition with lowest energy
CH_4	122	intense	s-s* (C-H)
CH_3CH_3	130	intense	s-s* (C-C)
CH_3OH	183	200	n-s* (C-O)
CH_3SH	235	180	n-s* (C-S)
CH_3NH_2	210	800	n-s* (C-N)
CH_3Cl	173	200	n-s* (C-Cl)
CH_3I	258	380	n-s* (C-I)
$CH_2=CH_2$	165	16000	p-p* (C=C)
CH_3COCH_3	187	950	p-p* (C=O)
	273	14	n-p* (C=O)
CH_3CSCH_3	460	weak	n-p* (C=S)
$CH_3N=NCH_3$	347	15	n-p* (N=N)

12



http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page1_3.html

13

- ช่วงคลื่นวิทยุ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทิศสปินของอิเล็กตรอน
- ช่วงคลื่นไมโครเวฟ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทิศทางการหมุนของโมเลกุล
- ช่วงรังสีอินฟราเรด มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสั่นของโมเลกุล
- ช่วงวิสิเบิลและยูวี มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนชั้นนอก
- ช่วงรังสีเอ็กซ์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนชั้นใน
- ช่วงรังสีแกมมา มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะของนิวเคลียส

ช่วงคลื่นวิสิเบิลและอัลตราไวโอเลต (Visible and Ultraviolet region) : อยู่ในช่วงความถี่ $3x10^{14}$ ถึง $3x10^{16}$ Hz หรือมีความยาวคลื่นประมาณ 1 μm ถึง 10 mm การเปลี่ยนแปลงของพลังงานที่เกี่ยวข้องเกิดจากการ เปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็คตรอน ความแตกต่างของระดับพลังงานของอิเล็คตรอน วงนอกสุดประมาณ100 kJ mol^{-1}

14

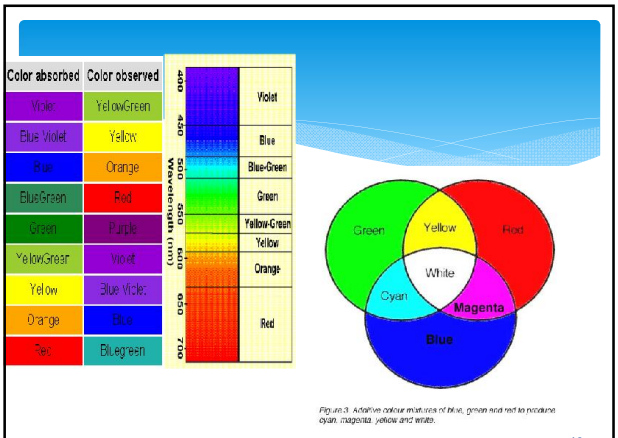
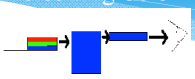


Figure 3. Additive colour mixtures of blue, green and red to produce cyan, magenta, yellow and white.

15

Perceiving Color



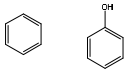
Wavelength (nm)	Absorbed color	Complementary color
<380	Ultraviolet	-
380 – 435	Violet	Yellow-green
435 – 480	Blue	Yellow
490 – 500	Blue-green	Orange
500 – 560	Green	Purple
560 – 580	Yellow-green	Violet
580 – 595	Yellow	Blue
595 – 650	Orange	Green-blue
650 – 780	Red	Blue-green
>780	Near-infrared	-

16

ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดกลืนแสง

1. โครโมฟอร์ (Chromophore) คือโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีหมู่ฟังก์ชันแบบไม่เสถียร (Unsaturated functional group) ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิลและแสดงสมบัติของมัน มีด้วยกัน 3 แบบ

- โครโมฟอร์ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยไม่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น C=C
- โครโมฟอร์ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยไม่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น C=O
- โครโมฟอร์ที่มี benzene ring ได้แก่สารประกอบพวกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เช่น benzene, phenol



17

2. ออกโซโครม (auxochrome) เป็นกลุ่มของธาตุที่ไม่ดูดกลืนแสง แต่สามารถมีผลต่อ absorption spectrum ของโครโมฟอร์ที่มีออกโซโครมเกาะอยู่ ทำให้เกิดผลดังต่อไปนี้

- เกิด Bathochromic shift (red shift) ทำให้ spectrum เคลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นมากขึ้น (λmax เพิ่ม)
- เกิด Hypsochromic shift (blue shift) ทำให้spectrum เคลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นลดลง (λ max ลด)
- เกิด Hyperchromic effect ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงมากขึ้น ε max เพิ่มขึ้น)
- เกิด Hypochromic effect ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงน้อยลง ε maxน้อยลง)

18

ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดกลืนแสง

3. ตัวทำละลาย (Solvent effect)

ตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นสารอินทรีย์บางที่มีหมู่คาร์โบนิล (C=O) ทำให้เกิดการเคลื่อนไปของแถบการดูดกลืนพลังงานเรียกว่า solvent shift

4. สเตอริกของโมเลกุล (Steric effect)

ผลของโครงสร้างที่มีความเกะกะทำให้การเกิดอันตรกิริยาของอิเล็กตรอนเปลี่ยนแปลงส่งผลให้การวัดการดูดการแสงเปลี่ยนแปลงเช่นสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันใหญ่ๆ จะทำให้ λ_{max} เคลื่อนไปทางที่สั้นกว่าและค่า ε_{max} ลดลง

19

กฎของเบียร์ (Beer's law) กล่าวไว้ว่า "*อัตราการลดลงของความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืน เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ**ความเข้มข้นของสาร***"

กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's law)"*แสงที่มีความยาวคลื่นเดี่ยวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสง แต่จะขึ้นอยู่กับ**ความหนาของตัวกลาง***" ดังนั้นตัวกลางชนิดเดียวกันที่มีความหนาเท่ากัน จะดูดกลืนพลังงานแสงได้เท่ากัน

กฎของเบียร์ แลมเบิร์ต (Beer-Lambert's law): ความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนขึ้นอยู่กับ**ความเข้มข้นและความหนาของสารละลายตัวกลาง**

$$A = \varepsilon bc$$

20

Beer Lambert's Law

Transmittance, $T = P / P_0$

% Transmittance, $\%T = 100\ T$

Absorbance,

$A = \log_{10} P_0 / P$

$A = \log_{10} 1 / T$

$A = \log_{10} 100 / \%T$

$A = 2 - \log_{10} \%T$

$A = \varepsilon bc$ (Beer's and lambert's law)

โดยที่

A = แอบซอร์บแบนซ์ (Absorbance)

ε = Molar absorptivity (L mole^{-1} cm^{-1})

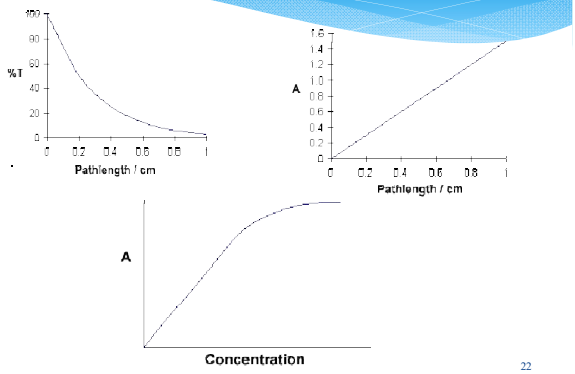
b = ความกว้างของเซลล์ เป็น (cm)

C= ความเข้มข้นเป็นโมลาร์ (mole L^{-1})

$A = abc$

a = absorptivity กรณี ความเข้มข้นเป็นหน่วยอื่น เช่น g/L

21



22

เครื่อง UV-Vis จะทำการวิเคราะห์ได้ถูกต้องมากที่สุด เมื่อวัดเปอร์เซนต์ทรานสมิตแทนซ์ (%T) ได้ 30.5% จงคำนวณว่าที่%T ดังกว่าจะมีค่าการดูดแสง (Absorbance) เท่ากับเท่าไหร่

จาก $\varepsilon bc = -\log T = A$

$\%T = 30.5\ \%\ T = 30.5/100$

$A = -\log T$

$= -\log (30.5/100)$

$= -\log (0.305)$

$= -(-0.5157)$

$= 0.516$

Absorbance = 0.516 ตอบ

23

ตัวอย่างโจทย์

1. สารละลายชนิดหนึ่ง ดูดกลืนแสงร้อยละ 40 ที่ความยาวคลื่น 200 nm สารละลายนี้ใช้สารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 400 g mol^{-1} หนัก 0.1 mg ละลายในเฮกเซน 25 cm^3 ในการวัดการดูดกลืนแสงใช้เซลล์ที่มีความหนา 1 cm จงคำนวณหาค่า molar absorptivity ของสารละลายนี้ (ตอบ $\varepsilon = 4.0 \times 10^4$ L mol^{-1} cm^{-1})

2. สารละลายชนิดหนึ่งวัดค่า absorbance ได้ 0.6 จงหา %T (ตอบ 25.12%)

การบ้าน: สารละลายชนิดหนึ่งมีความเข้มข้น เท่ากับ 0.0010 โมลาร์ จากการทดลอง โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโคปี พบว่า สารละลายดังกล่าวมีค่า Transmission เท่ากับ 0.10 และความกว้างของเซล เท่ากับ 10 มิลลิเมตร จงหาค่า Absorbance และค่า molar absorptivity ของสารละลายนี้

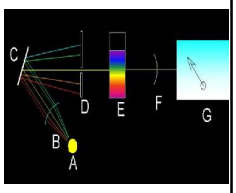
24

เครื่อง UV-VIS spectrometer

องค์ประกอบ

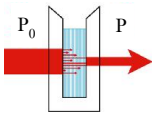
ประกอบด้วย 5 ส่วนหลัก

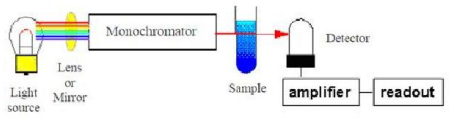
1. ต้นกำเนิดแสง (Light source)
2. โมโนโครมาเตอร์ (Monochromator)
3. เซลล์ใส่สารตัวอย่าง (Cell compartment)
4. มาตรแสง (Detector)
5. เครื่องบันทึกและอ่านผล (Readout system)



25

* การวัดปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนทำได้โดยการให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง (P_0) แล้ววัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุ (P) โดยเปรียบเทียบกับแสงที่ให้ (P_0)





ข้อกำหนด

- แสงที่ใช้ต้องเป็นแสงเอกรงค์ (monochromatic radiation)
- ช่อง slit ต้องแคบจึงจะให้การวัดที่มีประสิทธิภาพ
- ต้องไม่มีแสงหลงมาจากแหล่งอื่น (stray light)
- กระบวนการดูดกลืนแสงต้องไม่ขึ้นแก่กัน นั่นคือ สารละลายต้องเจือจาง
- สารละลายที่นำไปวัดต้องเป็นเนื้อเดียวกัน
- สารละลายต้องไม่ขุ่น ไม่เป็นตะกอน ไม่เป็นคอลลอยด์

27

1. ต้นกำเนิดแสง (Light source)

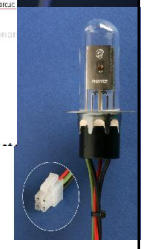
ลักษณะต้นกำเนิดแสง (Light source)

- ต้องให้กำลังพอที่จะวัดด้วยมาตรวัดแสง
- ต้องแผ่รังสี (radiation) ออกมาตลอดในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการ
- ต้องให้การแผ่รังสีคงที่ (Po คงที่)

ตัวอย่างของต้นกำเนิดแสงได้แก่

- หลอดไฮโดรเจน หรือ หลอดดิวเทอเรียม (deuterium lamp) 185-375 nm
- หลอดทังสเตน 320-2500 nm
- หลอดไอปรอท 365 nm
- หลอดซีนอน 250-600 nm

tungsten lamp



deuterium lamp

28

2. โมโนโครมาเตอร์ (monochromator)

เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง โมโนโครมาเตอร์จะทำให้แสงโพลิโครเมติกกลายเป็นแสงโครเมติกที่เป็นแถบแสงแคบๆ

ประกอบด้วย

2.1 ช่องแสงเข้า (entrance slit) เพื่อปล่อยให้แสงมีความแรงพอ ดังนั้นความกว้างของช่องสลิทจึงเป็นส่วนสำคัญ

2.2 กระจกและเลนส์ (mirror and lens) เพื่อทำให้แสงเกิดการสะท้อนหรือบางครั้งทำให้แสงรวมตัวกัน บางครั้งทำให้แสงแยกกัน

2.3 ส่วนที่ทำให้แสงเกิดการกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ เพื่อเหมาะแก่การเลือกใช้

2.3.1 ฟิลเตอร์

2.3.2 ปริซึม

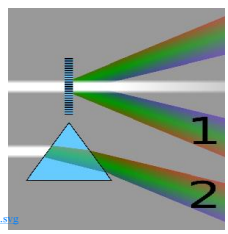
29

2.3.1 ฟิลเตอร์ เป็นโมโนโครมาเตอร์ที่ง่ายสุด

- กระจกสีต่างๆ เป็นแผ่น ให้ความกว้างของแถบคลื่นแสง 25 nm
- อินเตอร์เฟอเรนซ์เป็นฟิลเตอร์ที่ฉาบด้วยสารที่มีค่าดรรชนีหักเหต่ำและเป็นไดอิเล็กทริกฟิลเตอร์

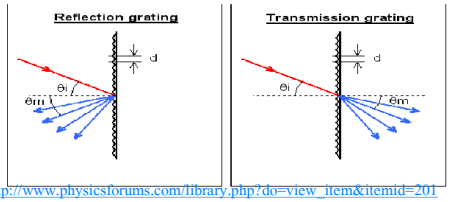
2.3.2 ปริซึม (Prism) เป็นตัวที่ทำให้แสงเกิดการกระจายเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการ ตอนนี้เลิกใช้แล้ว

Comparison of the spectra obtained from a diffraction grating by diffraction (1), and a prism by refraction (2). Longer wavelengths (red) are diffracted more, but refracted less than shorter wavelengths (violet).



http://en.wikipedia.org/wiki/File:Comparison_refraction_diffraction_spectra.svg

2.3.3 เกรตติง (grating) นิยมใช้กันมากในเครื่องมือสมัยใหม่

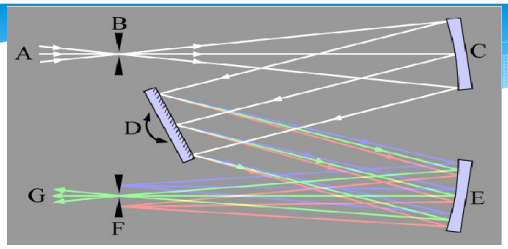


http://www.physicsforums.com/library.php?do=view_item&itemid=201

1. transmission grating ทำด้วยวัสดุโปร่งใส เป็นกระจกที่นำมาขีดให้ร่องขนานกัน ให้แสงออกเป็นหลายๆ ความยาวคลื่นในด้านที่ตรงข้ามกับแสงเข้า
2. reflection grating ชนิดสะท้อนแสง ผิวหน้าวัสดุที่ใช้ทำต้องเรียบและสะท้อนแสงได้ ด้านหน้าจะเซาะสำหรับช่วง UV-Vis 300-2000 ร่อง ต่อมิลลิเมตร

2.4 ช่องแสงออก (Exit slit) เป็นส่วนที่ปล่อยให้แสงผ่านตัวอย่างแล้วผ่านไปยังมาตรวัดแสง

31



(A)broad band illumination source **(B)**entrance slit

(C) curved mirror (the collimator), **(D)** Grating ; collimated light is diffracted

(E) mirror which refocuses the light, **(F)** exit slit

Czerny-Turner monochromator

http://en.wikipedia.org/wiki/Monochromator

3. เซลล์สำหรับใส่สารตัวอย่าง

ส่วนใหญ่มีฝาปิดเพื่อกันแสงจากภายนอกเข้าไปรบกวน เซลล์ใส่สารตัวอย่าง (sample cell) หรือ cuvette ทำจากแก้วควอร์ซ (quartz) ซิลิกา (silica) มีหลายแบบหลายรูปร่าง ขึ้นอยู่กับลักษณะงานที่ใช้

http://sciencefair.math.iit.edu/techniques/spectrophotometer/

33

4. เครื่องวัดแสง (Radiation detector)

เครื่องวัดแสงที่ดีควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

4.1 มีสภาพไวสูง แม้ความเข้มแสงต่ำก็สามารถตรวจวัดได้

4.2 มีการตอบสนองเป็นแบบเชิงเส้นตรง

4.3 สัญญาณรบกวนต้องน้อย

4.4 การตอบสนองขึ้นอยู่กับความถี่หรือความยาวคลื่นแสง

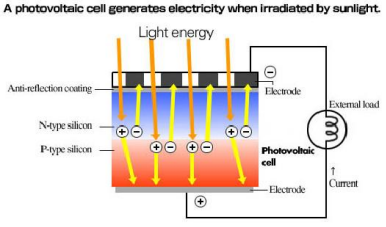
4.5 ต้องมีเสถียรภาพดี

4.6 ขนาดเล็ก

4.7 ราคาไม่แพง

34

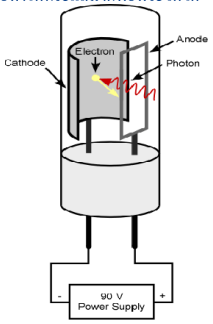
4.1 โฟโตโวลตาอิกเซลล์ (Photovoltaic cells) เป็นเซลล์ที่ใช้ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 550 nm ได้ดี แต่ความไวจะลดลง 10% ที่ความยาวคลื่น 350 หรือ 750 nm เมื่อแสงจากภายนอกตกลงบนผิวของสารกึ่งตัวนำ (ใช้ selenium) ทำให้เกิดอิเล็กตรอนแล้ววิ่งไปยังโลหะที่ต่อไปยังวงจรภายนอก ปริมาณของกระแสจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของแสงที่ตกกระทบ



http://www.apec-vc.or.jp/e/modules/tinyd00/index.php?id=74

35

4.2 หลอดรับแสง (Phototube) เป็นหลอดที่ทำด้วยซิลิกา ภายในหลอดเป็นสุญญากาศ ฉาบผิวแคโทดด้วยสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนเมื่อถูกแสง แล้วอิเล็กตรอนวิ่งไปยังขั้วแอโนด ดีเทคเตอร์ ชนิดนี้จะต้องต่อกับชุดขยายสัญญาณอีกครั้งเพื่อทำให้กระแสมากพอที่จะวัดได้



36

4.3 หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (Photomultiplier tube : PMT) มีลักษณะคล้ายหลอดรับแสง แต่ให้สภาพไวดีกว่า และสามารถใช้ได้ที่ความยาวคลื่น 190-900 nm ภายในหลอด PMT ประกอบด้วยชุดไดโนด Dynodes 9 ชุด ซึ่งแต่ละชุดไดโนดจะเพิ่มขึ้น 90 โวลต์ จนครบ 9 ไดโนด ทำให้ศักย์ไฟฟ้าแตกต่างกันระหว่างขั้วแคโทดและ อโนดเป็น 900 โวลต์ ดังนั้นหลอดชนิดนี้จึงมีประสิทธิภาพสูงเหมาะสำหรับวัดแสงต่ำ หลอดวัดแสงชนิดนี้นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบัน

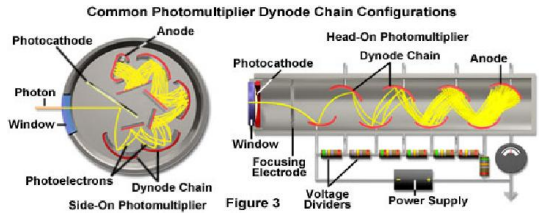
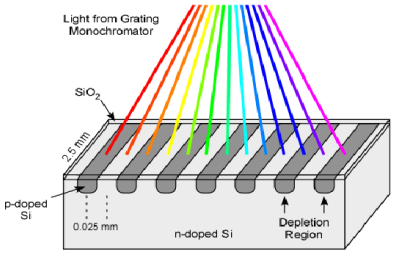


Figure 3

http://www.olympusconfocal.com/theory/pmtintro.html

4.4 หลอดวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด ทำงานโดยการเกิด depletion layer ที่การทำให้การนำไฟฟ้าลดลง เมื่อแสงตกกระทบ depletion layer จะเกิดกระแสไฟฟ้าและเป็นปฏิภาคกับกำลังแสงที่ได้รับ



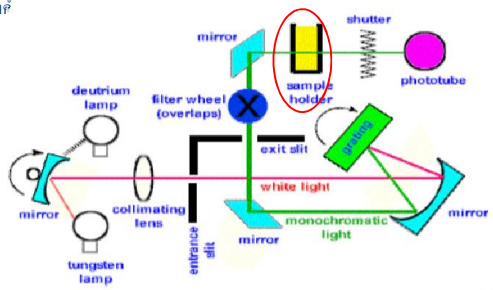
http://people.whitman.edu/~dunnivfm/FAASICPMS_Ebook/CH2/2_2_9.html

5. เครื่องขยาย-แยกสัญญาณและประมวลผล

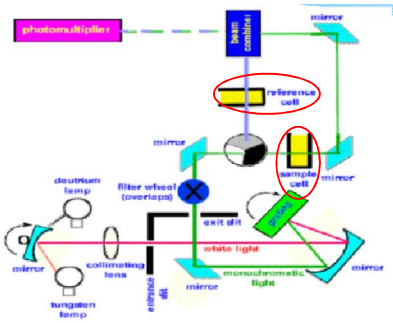
เป็นการนำสัญญาณที่ได้ไปเข้ากระบวนการของระบบอิเล็กทรอนิก เช่น ขยายสัญญาณ กรองสัญญาณ แล้วนำผลของการวิเคราะห์ดังกล่าวเสนอ ในรูปของมิเตอร์ ดิจิทัลมิเตอร์ เครื่องบันทึก เรคคอร์เดอร์ และเครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

เครื่องสเปกโทรมิเตอร์แบบต่างๆ

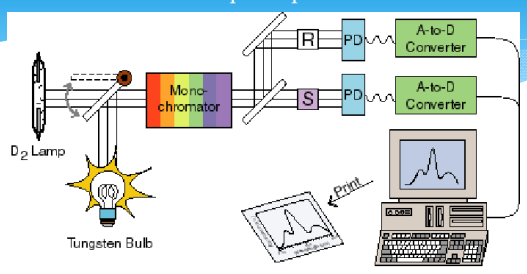
1. single beam เป็นเครื่องที่ใช้ลำแสงเดี่ยวจากต้นกำเนิดแสงผ่านโมโนโครมาเตอร์ แล้วผ่านสารละลาย แล้วจึงไปยังมาตรวัดแสง ทำให้การวัดต้องปรับ 0 และ 100% T ด้วยสารละลายแบลงค์



2. แบบ double beam แสงที่ผ่าน monochromator ถูกแยกออกเป็น 2 ลำแสงด้วย beam splitter แสงแรกผ่านsample cell และอีกแสงหนึ่งผ่าน blank แล้วผ่านไปยังเครื่องวัดแสง

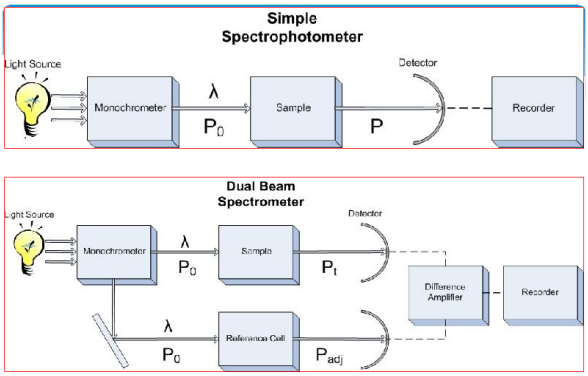


Absorbance Spectrophotometer



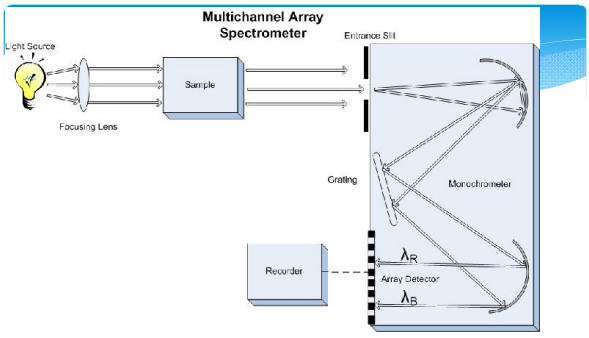
Absorbance Spectrophotometer

http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absflr.html



http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Application

43



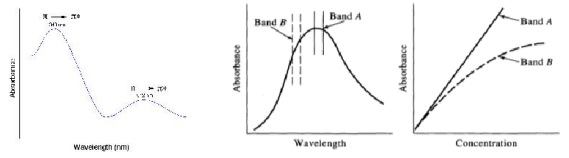
http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Application

44

การตรวจวัด

1. เลือกตัวทำละลายที่ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับสารตัวอย่าง และมีค่าความยาวคลื่นต่ำสุด (cut-off points) ที่จะใช้ได้อยู่ต่ำกว่าสารตัวอย่าง
2. เลือกใช้แหล่งกำเนิดแสงและความกว้างช่อง slit ให้ถูกต้อง
3. สแกนสเปกตรัม สเปกตรัมที่ได้แสดงคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารนั้นๆ แล้วเลือกใช้ที่ λ_{max} หรือ λ ที่เหมาะสมสำหรับหาปริมาณสารต่อไป

Solvent	lower limit (nm)
Acetonitrile	190
Chloroform	240
Cyclohexane	205
95% Ethanol	205
n-Hexane	195
Methanol	205
Water	190



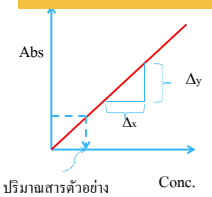
การทำปริมาณวิเคราะห์

วิธีหาปริมาณสาร โดยการทำ calibration curve มีหลายวิธี เช่น

1. วิธีสารมาตรฐานภายนอก External standard method
   - 1.1 เตรียมสารมาตรฐานหลายๆ ความเข้มข้น วัดค่า Abs และสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration graph)
   - 1.2 วิเคราะห์สารตัวอย่างแบบเดียวกันกับสารมาตรฐาน และนำค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง ไปเทียบกับ calibration graph เพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยตรง
   - 1.3 คำนวณหาความเข้มข้นที่แท้จริง (ในกรณีที่เกิดการเจือจาง หรือเพิ่มความเข้มข้น)
2. วิธีเติมมาตรฐาน (standard addition method)
   - 2.1 เติมสารมาตรฐานที่มีปริมาณต่างๆ กัน ลงไปในสารตัวอย่าง
   - 2.2 วัดค่า Abs และสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration graph)
   - 2.3 จากกราฟมาตรฐาน หาจุดตัดแกน x คือปริมาณสารตัวอย่าง
   - 2.4 คำนวณหาความเข้มข้นที่แท้จริง (ในกรณีที่เกิดการเจือจาง หรือเพิ่มความเข้มข้น)

Calibration curves

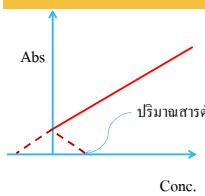
1 External calibration curve



สมการเส้นตรง $y = mx + c$

Slope= $m=\Delta y/\Delta x$

2 Standard addition calibration curve



!!!อย่าลืม

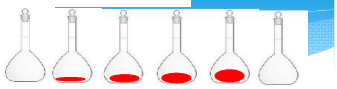
คำนวณความเข้มข้นที่แท้จริงกรณีที่เจือจางหรือเพิ่มความเข้มข้น

47

การหาปริมาณเหล็กรวมด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

$Fe^{3+} + SCN^- = [FeSCN]^{2+}$

สีส้มแดง



วิธีที่ 1 สารมาตรฐานภายนอก

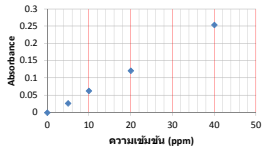
1. เตรียมสารโดยขวดที่ 1-5 เป็นสารละลายเหล็กมาตรฐาน เติมสารเพื่อเกิดสี ปรับปริมาตร 50.0 mL
2. เตรียมสารตัวอย่างขวดที่ 6 เติมสารที่ทำให้เกิดสี **แต่ไม่เติมเหล็ก** และปรับปริมาตร 50.0 mL
3. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 nm

ขวดที่	เหล็ก มาตรฐาน 100 ppm (mL)	น้ำตัวอย่าง (mL)	reagent SCN^-/H_2O_2	ความเข้มข้นเหล็ก (ppm)
1	0	0	0.5/0.5	0
2	2.5	0	0.5/0.5	5
3	5	0	0.5/0.5	10
4	10	0	0.5/0.5	20
5	20	0	0.5/0.5	40
6	0	25	0.5/0.5	???

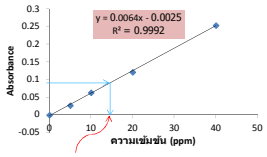
4 ข้อมูลจากการทดลอง

ความเข้มข้นเหล็ก (ppm)	Corrected Absorbance
0	0
5	0.027
10	0.063
20	0.121
40	0.254
???	0.096

5 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นและ ค่าการดูดกลืนแสง



6 เพิ่มเส้นแนวโน้ม สมการเส้นตรง และค่าความเป็นเส้นตรง



15 ppm

7 คำนวณความเข้มข้นที่แท้จริงในสารตัวอย่าง

สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน

$y = 0.0064x-0.0029$

แทนค่า y ด้วยค่าAbs ของสารตัวอย่าง = 0.096

$0.096 = 0.0064x-0.0029$

หาความเข้มข้นของเหล็ก x

$x = (0.096/0.0064) +0.0029$

$= 15$ ppm

น้ำตัวอย่างมา 25 mL เจือจางเป็น 50 mL ดังนั้นน้ำตัวอย่างมีความเข้มข้นของเหล็กเท่ากับ

ความเข้มข้นของน้ำตัวอย่าง = ความเข้มข้น(จากกราฟ) x dilution factor

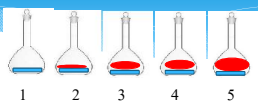
= 15ppmx(50mL/25mL)

= 30ppm

วิธีที่ 2 วิธีเติมสารมาตรฐาน

$Fe^{3+} + SCN^- = [FeSCN]^{2+}$

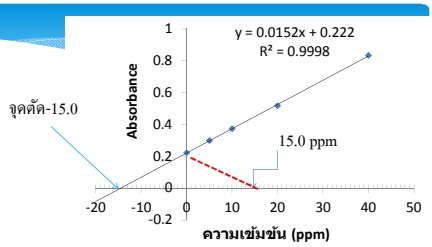
สีส้มแดง



1. เตรียมสาร โดยขวดที่ 1-5 มีน้ำตัวอย่างปริมาตรเท่ากันทุกขวด 10.0 mL
2. เติมสารละลายเหล็กเข้มข้นต่างกัน **ยกเว้นขวดแรก**
3. เติมสารทำให้เกิดสีทุกขวดและปรับปริมาตร 50.0 mL
4. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 nm

ขวดที่	เหล็ก มาตรฐาน 100 ppm (mL)	น้ำตัวอย่าง (mL)	reagent SCN^-/H_2O_2	ความเข้มข้นเหล็ก (ppm)
1	0	10	0.5/0.5	0
2	2.5	10	0.5/0.5	5.0
3	5.0	10	0.5/0.5	10
4	10	10	0.5/0.5	20
5	20	10	0.5/0.5	40

ความเข้มข้นเหล็ก (ppm)	Absorbance
0	0.224
5	0.299
10	0.375
20	0.52
40	0.834



5. สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น
6. ลากเส้นกราฟ และลากส่วนขยายไปตัดแกน X ด้านลบ ทำค่าให้เป็นบวก ค่าความเข้มข้นของเหล็ก = 15.0 ppm
7. หรือหาจุดตัดบนแกน x เมื่อ y = 0 ค่าความเข้มข้นของเหล็ก = 14.61 ppm ค่าละเอียด ถูกต้องกว่า
8. คำนวณความเข้มข้นที่แท้จริง (ความเข้มข้นจากกราฟ x dilution factor)

GOOD LUCK