SPECTROPHOTOMETRY

วัตถุประสงค์: เพื่อให้นักศึกษา

1. เข้าใจคุณสมบัติของ electromagnetic radiation
2. อธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance กับtransmittance
3. เข้าใจ Beer-Lambert law และการประยุกต์ใช้
4. อธิบายหลักการและส่วนประกอบของเครื่องที่ใช้หลักการ
    - Spectrophotometry
    - Atomic absorption spectrophotometry
    - Flame emission photometry
    - Fluorometry
    - Fluorescence polarization spectrophotometry
    - Nephelometry
    - Turbidimetry
    - Chemiluminescence
    - Electrochemiluminescence

แสง (Light)

เป็นรูปหนึ่งของ electromagnetic radiation ประกอบด้วย electrical และ magnetic field มีการเคลื่อนที่ในลักษณะคลื่น ความเร็วในการเคลื่อนที่= 3×10^{10} cm/sec ความยาวคลื่นของแสงคำนวณได้จากสูตร

$$\nu = c/\lambda$$

เมื่อ ν = ความถี่ (frequency)

c = ความเร็วของแสง (= 3×10^{10} cm/sec)

λ = ความยาวคลื่น

แสงประกอบด้วย photon พลังงานของ photon คำนวณได้จากสูตร

$$E = h\nu$$

เมื่อ h = Planck's constant (6.62×10^{-27} erg.sec)

ความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานกับความยาวคลื่นของแสงเป็นดังนี้

$$E = hc/\lambda$$

นั่นคือแสงที่มีความยาวคลื่นน้อยมีพลังงานสูง ส่วนแสงที่มีความยาวคลื่นมากมีพลังงานต่ำ ความยาวคลื่นของแสงชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Electromagnetic spectrum

	Gamma ray	X-ray	Ultraviolet (UV)	Visible	Infrared (IR)	Microwaves
Wavelength (nm)	0.1	1	180	390	780	400×10^{3}

แสงที่ตาเรามองเห็นหรือแสงในช่วง visible region มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 390-780 nm การที่เรามองเห็นสารละลายเป็นสีต่างๆ เนื่องจากสารละลายนั้นดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะเอาไว้แล้วปล่อยแสงที่ไม่ถูกดูดกลืนออกมา สีของแสงที่ถูกดูดกลืน (color absorbed) และ สีของสารละลายที่เรามองเห็น(complementary color) แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Colors and Complementary colors

Wavelength	Color absorbed	Complementary color
380-435	violet	yellow-green
435-480	blue	yellow
480-490	greenish-blue	orange
490-500	blue-green	red
500-560	green	purple
560-580	yellow-green	violet
580-595	yellow	blue
595-650	orange	green-blue
650-780	red	blue-green

ผลกระทบของแสงต่อวัตถุ (Interaction of Light with Matter)

แสงเมื่อตกกระทบวัตถุทำให้เกิดขบวนการดังนี้

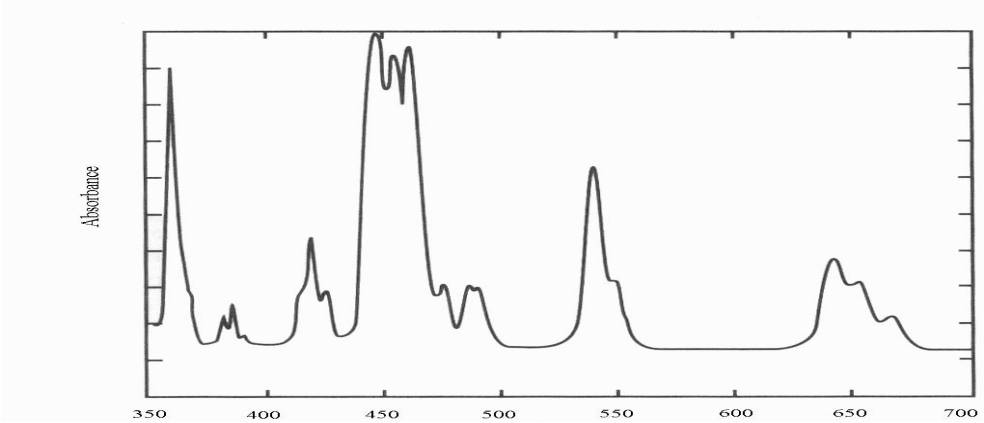
1. Absorption: แสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะ (excitation wavelength) เมื่อตกกระทบ atom, ion, molecule จะมีการดูดกลืนแสงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะของ atom, ion, molecule ได้แก่

- การเคลื่อนที่ของ electron ไปยังระดับพลังงานที่สูงขึ้น
- Vibration ของ covalent bond
- Rotation รอบ covalent bond
- โมเลกุลทั้งโมเลกุลเคลื่อนที่ไปในแกน x, y, z

การดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดแตกต่างกันตามชนิดของ chromophore ซึ่งเป็น functional group ที่สามารถดูดกลืนแสง โดยพลังงานที่ใช้กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสถานะขึ้นอยู่กับชนิดของ bond เช่น double bond, triple bond, peptide bond จะดูดกลืนแสงในช่วง UV

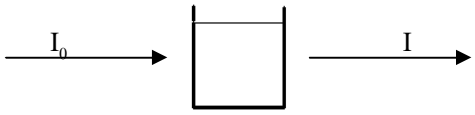
การดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่นต่างกันสามารถแสดงในรูป absorption spectrum ซึ่งเป็นกราฟที่ plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความยาวคลื่น ตัวอย่าง absorption spectrum ของ holmium oxide แสดงในรูปที่ 1

2. Emission: สารบางชนิดเมื่อได้รับพลังงานแสงจะมีการเปลี่ยนสถานะจาก ground state ไปยังexcited state ซึ่งเป็นสถานะที่ไม่เสถียรจึงต้องกลับสู่ ground state โดยมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสง(emitted light) แสงที่ถูกเปล่งออกมาจะมีความยาวคลื่นมากกว่าแสงที่ตกกระทบ (excitation light)



รูปที่ 1 Absorption spectrum ของ holmium oxide

Absorption spectrophotometry



รูปที่ 2 Transmittance ของแสงผ่านสารละลายที่บรรจุใน cuvette

จากรูปที่ 2 เมื่อให้แสงความเข้ม I_0 ผ่านสารละลายที่บรรจุใน cuvette และแสงที่ผ่านจากสารละลายมีความเข้ม I ค่า transmittance ของสารละลายหาได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{Transmittance} = T = I/I_0$$

โดยทั่วไปรายงานในรูป % transmittance ดังนั้นเมื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูป % จะได้

$$\%T = (I/I_0) \times 100$$

เปลี่ยนให้อยู่ในรูป absorbance ได้ดังนี้

$$A = -\log I/I_0$$

$$A = -\log T = \log 1/T$$

$$A = \log 1 \times 100/ T \times 100 = \log 100/\%T$$

$$= \log 100 - \log \%T$$

$$A = 2 - \log \%T$$

BEER-LAMBERT LAW

Beer-Lambert Law หรือเรียกว่า Beer's law แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance กับความเข้มข้นของสารละลาย โดยค่า absorbance เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น Beer's law แสดงในรูปสมการได้ดังนี้

$$A = abc$$

เมื่อ A = absorbance

a = absorptivity หรือการดูดกลืนแสงของสารละลาย

b = ระยะทางที่แสงผ่าน (light path length)

c = ความเข้มข้น (concentration)

หากนำสารละลายความเข้มข้น 1% วัด absorbance ที่ light path length= 1 cm จะมีค่า absorptivity (A 1%, 1 cm) ค่าหนึ่งที่จำเพาะสำหรับสารละลายนั้นๆ เมื่อความเข้มข้นของสารมีหน่วยเป็น molar หรือ mol/L วัดที่ light path length 1 cm ค่า absorptivity เรียกว่า molar absorptivity (ใช้สัญญลักษณ์เป็น ε) ค่า molar absorptivity มีประโยชน์ในการหาความเข้มข้นของสารละลายในกรณีที่ทราบค่า absorbance

ความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance กับความเข้มข้นจะเป็นไปตามกฎของ Beer ในกรณีต่อไปนี้

1. สารละลายต้องเป็นสารละลายเจือจาง
2. แสงที่ผ่านต้องเป็น monochromatic light
3. ไม่มี light emission
4. Solvent มีการดูดกลืนแสงน้อยมาก
5. ไม่มี stray light
6. การดูดกลืนแสงผ่านพื้นที่หน้าตัดสม่ำเสมอ

Stray light หมายถึงแสงที่มากระทบ detector และเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นอื่นๆนอกจากที่ผ่าน monochromator การที่มี stray light มากทำให้ความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance กับความเข้มข้นไม่เป็นไปตามกฎของ Beer

การหาความเข้มข้นของสารละลาย

จากกฎของ Beer สามารถหาความเข้มข้นของสารละลายได้ดังนี้

1. คำนวณโดยใช้ molar absorptivity

$A = \varepsilon bc$ จะได้ $c = A/\varepsilon b$

2. วิเคราะห์ standard ร่วมด้วย

จาก $A = abc$

$A_s = abc_s$ .....(1)

$A_u = abc_u$ .....(2)

(1)/(2) $A_s/A_u = abc_s/abc_u$

$c_u = A_u \cdot c_s/A_s$

ค่า c_s/A_s อาจเรียกว่า factor ดังนั้น $c_u = A_u$ x factor

3. การทำ calibration curve

ทำได้โดยเจือจาง stock standard ให้ได้ working standard ที่มีความเข้มข้นหลายๆความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์จากนั้นเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับ absorbance กราฟที่ได้จะเป็นกราฟเส้นตรงจนถึงความเข้มข้นหนึ่ง จากนั้นกราฟจะมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง ความเป็นเส้นตรงของ calibration curve หรือ linearity มักจะรายงานเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถอ่านค่าจาก calibration curve ได้ ในกรณีที่ความเข้มข้นสูงเกิน linearity จะต้องมีการเจือจางตัวอย่างก่อนแล้วทำการวิเคราะห์ เมื่ออ่านค่าจาก calibration curve ได้แล้วต้องคูณค่าที่ได้ด้วย dilution factor

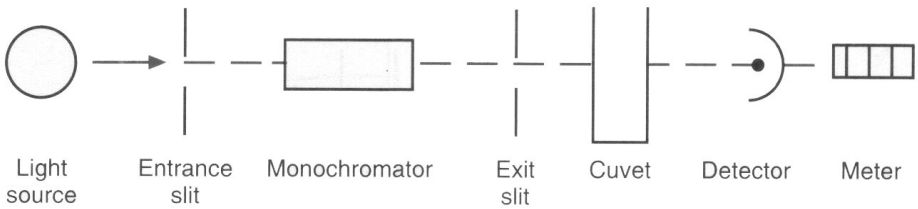
SPECTROPHOTOMETER

Single beam spectrophotometer

ส่วนประกอบของ single beam spectrophotometer มีดังนี้ (รูปที่ 3)

1. Light source
2. Monochromator

3. Cuvette holder
4. Detector
5. Meter



รูปที่ 3 Single-beam spectrophotometer

Light source หรือหลอดไฟ เป็นแหล่งที่ให้แสงความยาวคลื่นต่างๆ โดยทั่วไปหลอดไฟที่ใช้ใน spectrophotometer ได้แก่ tungsten lamp (ให้แสงในช่วง VIS เท่านั้น), hydrogen lamp, deuterium lamp (ให้แสงในช่วง UV เท่านั้น), tungsten halide หรือ tungsten halogen (ให้แสงทั้งในช่วง UV และ VIS) หลอดไฟชนิด mercury lamp เป็นแหล่งกำเนิดแสง แต่หลอดไฟชนิดนี้ให้แสงชนิดความยาวคลื่นไม่ต่อเนื่อง หรือให้แสงในลักษณะ line spectrum ที่มีความยาวคลื่น 313, 365, 405, 436, 546 nm นอกจากนี้อาจใช้แหล่งกำเนิดแสงชนิด laser (Light amplification by stimulated emission of radiation)

Monochromator เป็นอุปกรณ์แยกแสงให้เป็นแสงสีเดียว (monochromatic light) ประกอบด้วย entrance slit, dispersive element, และexit slit ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการแยกแสง(dispersive element) มีหลายชนิดได้แก่

1. Filter แบ่งเป็น

- Absorption filter เป็นแก้วหรือ gelatin ที่มีสี ประกบด้วยแก้วทั้ง 2 ด้าน มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงเอาไว้ แสงที่ไม่ถูกดูดกลืนจะถูกปล่อยออกมา

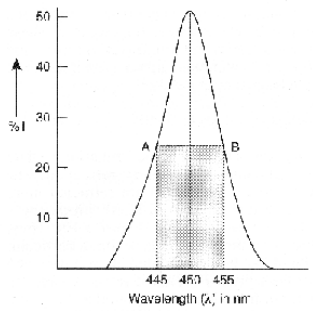
- Interference filter ทำจาก calcium fluoride, magnesium fluoride, หรือ silicon dioxide เคลือบด้วยชั้นเงินบางๆ ชั้นนอกสุดเป็นแก้ว filter ชนิดนี้ยอมให้แสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะผ่าน

2. Grating ทำจากแก้วหรือโลหะโดยผิวของ grating มีการเซาะร่องเล็กๆจำนวนมาก grating

แบ่งเป็น transmission grating (ทำจากแก้ว)และ reflection grating (ทำจาก aluminum) เป็นอุปกรณ์แยกแสงที่สามารถแยกความยาวคลื่นแคบๆได้

3. Prism ทำให้เกิด continuous spectrum โดยหลักการ refraction จากนั้นใช้ exit slit ในการเลือกแสงความยาวคลื่นที่ต้องการ

Band width หรือ band pass width เป็นช่วงของความยาวคลื่นที่มี transmittance เป็นครึ่งหนึ่งของ transmittance สูงสุด (peak transmittance) ค่า band width บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของแสงที่ผ่านจาก monochromator ในรูปที่ 4 ความยาวคลื่นที่มี transmittance 50 % เท่ากับ 445 และ 455 ค่า bandwidth เท่ากับ 455-445 = 10 nm



รูปที่ 4 Band pass ของ spectrophotometer

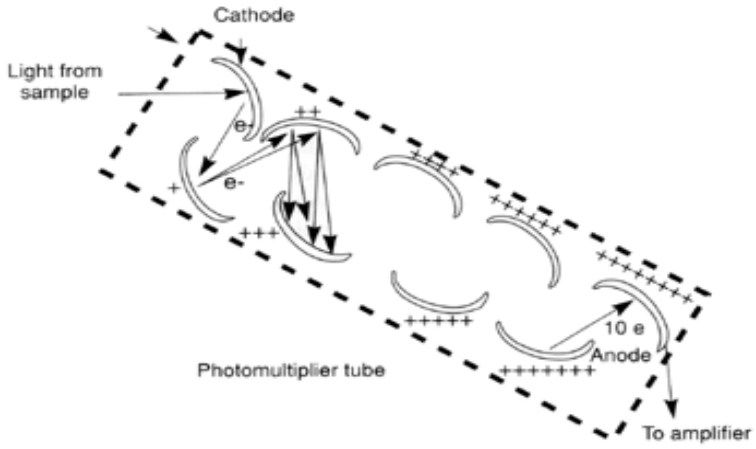
Cuvette Holder เป็นช่องสำหรับใส่ cuvette ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ใส่สารละลายที่ต้องการวัดค่า absorbance สำหรับ cuvette ที่ใช้อาจทำจากแก้ว พลาสติกหรือ quartz ข้อดีของ cuvette ที่ทำจากแก้วคือมีราคาถูก แต่มีข้อเสียคือสามารถใช้ในช่วง VIS เท่านั้น ในขณะที่ cuvette ที่ทำจากพลาสติกหรือ quatz สามารถใช้ได้ทั้ง UV และ VIS

Detector เป็นอุปกรณ์รับแสงที่ผ่านจากสารละลายและแปลงสัญญาณแสงเป็นไฟฟ้า มีหลายชนิดได้แก่

1. Barrier layer cell (photovoltaic cell) ทำจากผลึก selenium เคลือบด้วยโลหะเงินบางๆ อีกด้านเป็นเหล็กหรือทองแดง เมื่อแสงตกกระทบทำให้เกิด electron ข้อดีของ detector ชนิดนี้คือราคาถูก แต่มีข้อเสียคือ response time ช้า

2. Phototube เป็นหลอดสูญญากาศ ภายในมี cathode และ anode โดย cathode ทำจาก light sensitive metal เมื่อมีแสงกระทบ cathode ทำให้ electron หลุดออกมาและเคลื่อนที่ไป anode จากนั้นวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดด้วย ammeter

3. Photomultiplier tube เป็นหลอดแก้วสูญญากาศ ภายในมี cathode, dynode, และ anode เมื่อมีแสงกระทบ cathode ทำให้ electron หลุดและไปกระทบ dynode หลายๆตัว ทำให้ electron เพิ่มขึ้น วัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดด้วย ammeter



รูปที่ 5 Photomultiplier tube

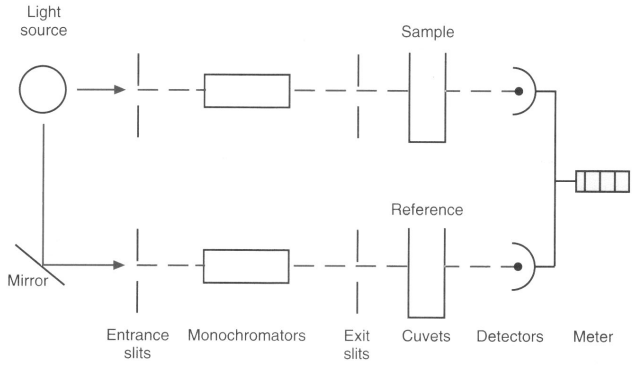
4. Photodiode ทำจาก semiconductor ที่บริเวณ reversed-biased junction (pn junction) ของ diode มีการนำไฟฟ้าต่ำ เมื่อมีแสงกระทบทำให้electron เคลื่อนที่ วัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ในปัจจุบันนิยมต่อ silicon diode หลายๆตัวเรียกว่า photodiode array ทำให้สามารถวัดหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน

Meter (Readout) เป็นส่วนที่แสดงผลการวัดออกมาในรูป analog หรือ digital บางเครื่องมีการต่ออยู่กับ recorder ทำให้แสดงค่าอย่างต่อเนื่อง

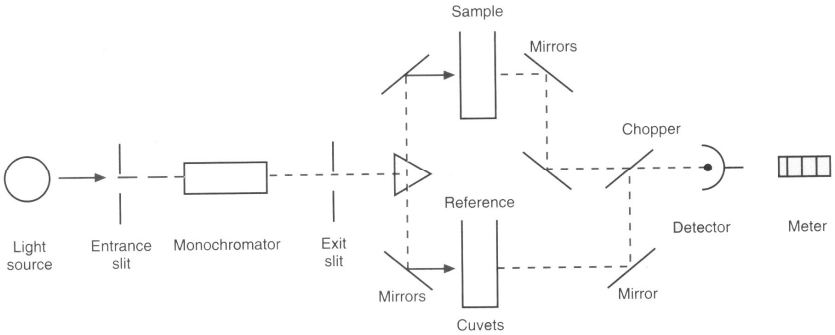
Double-beam spectrophotometer

Double beam spectrophotometer หรือ spectrophotometer ชนิดลำแสงคู่ มีข้อดีคือสามารถวัดได้หลายความยาวคลื่นโดยไม่ต้องปรับค่า blank ทุกครั้ง เนื่องจากเครื่องมีการวัดblank ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง ดังนั้นจึงเหมาะในการ scan ดูค่า absorbance ของสารที่ความยาวคลื่นต่างๆกัน อุปกรณ์คล้าย single beam spectrophotometer มีการแยกลำแสง reference beam และ sample beam ทำให้สามารถ correct กรณีความเข้มของแสงเปลี่ยนแปลง เครื่อง spectrophotometer ชนิดลำแสงคู่ มี 2 ชนิดคือ double beam-in- space และ double beam- in- time spectrophotometer

A



B



รูปที่ 6 Double-beam spectrophotometer, (A) double-beam in space (B) double-beam in time

Wavelength calibration

เป็นการทดสอบดูว่าความยาวคลื่นของเครื่อง spectrophotometer มีความถูกต้องหรือไม่ ทำได้หลายวิธีดังนี้

1. เปลี่ยน lamp เป็น mercury lamp ปรับปุ่มเลือกความยาวคลื่นตรงกับที่ lamp ให้แสงได้แก่ 313, 365, 405, 436, 546 nm หากมีแสงมากระทบที่ detector จะมีสัญญาณเกิดขึ้นแสดงว่าความยาวคลื่นที่ตั้งที่ตัวเครื่องถูกต้อง

2. ใช้ rare earth filter เช่น holmium oxide (241, 279,287, 333, 361, 418, 452, 536, 636 nm), didymium (573, 586, 685, 741, 803 nm) ปรับปุ่มเลือกความยาวคลื่นและวัดค่าการดูดกลืนแสงว่ามี maximum absorption ตรงกับที่กำหนดหรือไม่

3. ใช้ solution ของ stable chromogen e.g., cobalt ammonium sulfate (λ_{max} =512 nm), methyl orange (λ_{max} =460 nm) ทำเช่นเดียวกับข้อ 2

Linearity

ในกรณีที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เครื่อง spectrophotometer จะต้องสามารถวัด absorbance ได้เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกัน การทดสอบ linearity ทำได้โดย เจือจางสารละลาย เช่น cobalt ammonium sulfate, copper sulfate (650 nm), oxyhemoglobin (415 nm) วัดค่า absorbance จากนั้น plot ระหว่าง Absorbance กับ ความเข้มข้น กราฟที่ได้จะต้องเป็นเส้นตรง

Stray light

การทดสอบ stray light ทำได้โดยใช้ stray light filter e.g. blue filter (350 nm) จะดูดกลืนแสง visible ซึ่งเป็น stray light หรือ red filter จะดูดกลืนแสงในช่วง 650- 800 nm เมื่อใส่ filter ลงในช่องใส่ cuvette จะต้องไม่มีแสงผ่านมาที่ detector นอกจากนี้อาจใช้ สารละลาย e.g., 50 g/L sodium nitrite (300 – 385 nm), acetone (250 – 320 nm)

Photometric accuracy

เป็นการประเมินความถูกต้องของค่า absorbance ทำได้โดย ใช้ neutral density glass filter ที่ทราบค่าการดูดกลืนแสงใส่ลงไปในช่องใส่ cuvette อ่านค่าที่ได้ว่าตรงกับที่กำหนดหรือไม่ หรือใช้สารละลาย potassium dichromate การเตรียมสารละลายทำได้อบ potassium dichromate (analytical grade) ที่อุณหภูมิ 110 C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่ง potassium dichromate ละลายใน 0.005 M sulfuric acid สารละลายเข้มข้น 0.0500 g/L ที่ 350 nm จะมีค่า absorbance = 0.536 $\pm$ 0.005 สารละลายเข้มข้น 0.1000 g/L ที่ 350 nm จะมีค่า absorbance =1.071 $\pm$ 0.011

Interferences

ในการตรวจวัดโดยใช้ spectrophotometer อาจมีการรบกวนจากสารอื่นๆ นอกเหนือจากสารที่ต้องการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในการเก็บสิ่งส่งตรวจทางเคมีคลินิกอาจมีปัญหาคือมีภาวะhemolysis, lipemia, icterus ทำให้รบกวนการตรวจวัดดังนี้

Hemolyzed serum: มี hemoglobin ซึ่งรบกวนการวัด absorbance ในบางการทดสอบเช่น รบกวนการตรวจ total protein (A_{540})

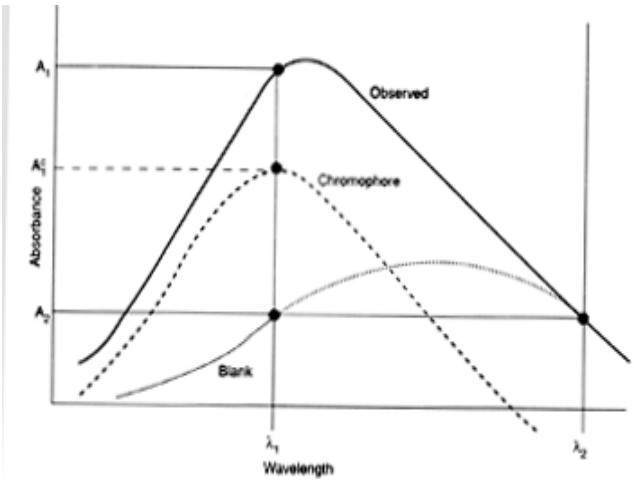
Lipemic serum: serum มีลักษณะขุ่น (turbid) เนื่องจากมี VLDL สูง รบกวนการวัด absorbance

เนื่องจากทำให้เกิด light scattering

Icteric serum หมายถึง serum ที่มีสีเหลืองเข้มเนื่องจากมี bilirubin สูง ทำให้รบกวนการวัด absorbance โดยรบกวนการวัด absorbance (bilirubin มี λ_{max} ที่ 454 nm) และ/หรือรบกวนการเกิดปฏิกิริยา

วิธีการลดการรบกวนจากสารรบกวนต่างๆ ทำได้ดังนี้

1. Bichromatic measurement: วัดที่ความยาวคลื่น 2 ความยาวคลื่นพร้อมกัน ดังในรูป จากนั้นคำนวณหา ค่า absorbance ที่ถูกต้อง นอกจากนี้เครื่องอัตโนมัติบางเครื่องสามารถวัดพร้อมกันได้หลายความยาวคลื่น (polychromatic measurement)



รูปที่ 7 Bichromatic measurement

2. การทำ sample blank ทำได้โดยผสม sample กับน้ำยาตัวไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาหรือผสมกับ diluent เช่น normal saline นำ sample blank ไปวัด absorbance แล้วหักลบออกจากค่า absorbance ที่วัดได้ก่อนการทำ sample blank

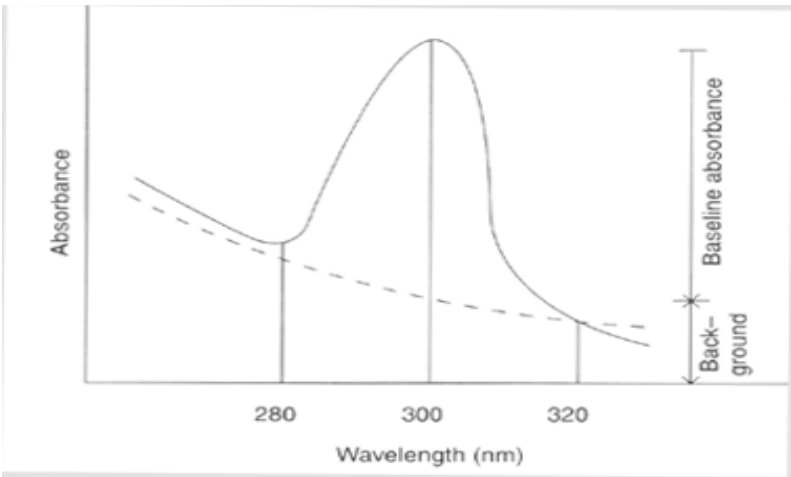
3. Kinetic measurement เป็นการวัด absorbance ที่เวลาต่างกัน เนื่องจากถือว่ามีสารรบกวนบางชนิดทำปฏิกิริยาได้เร็วกว่าสารที่ต้องการตรวจวัด และมีสารรบกวนบางตัวทำปฏิกิริยาได้ช้ากว่า ดังนั้นจึงเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัด การวัดแบบ kinetic measurement หรือ rate assay วัด absorbance 2 ครั้ง คำนวณหาอัตราการเกิดปฏิกิริยา (ΔA) คำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้สูตร

$$Cu = \frac{\Delta Au.Cs}{\Delta As}$$

4. Dilution เจือจางตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์

5. Allen correction ทำได้โดยวัดที่ primary wavelength (A_{max}) และอีก 2 ความยาวคลื่น ดังรูปที่ 8 คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ถูกต้องดังนี้

$$A(corrected) = A_{300} - (A_{280}+A_{320})/2$$

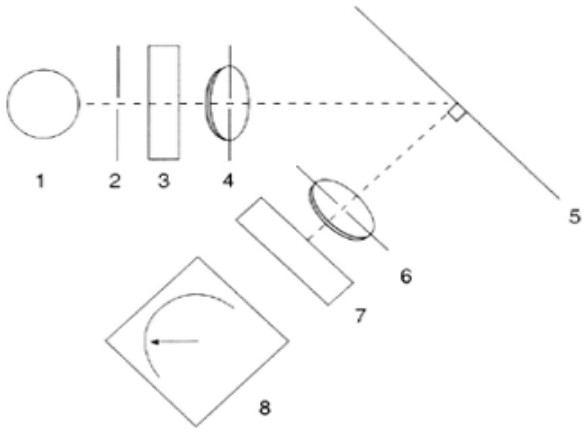


รูปที่ 8 Allen correction

REFLECTANCE SPECTROPHOTOMETRY

หลักการ แสงชนิด monochromatic light กระทบ strip หรือ slide ที่มี chromophore แสงบางส่วนถูก absorb บางส่วนสะท้อน (reflect) ไปกระทบ detector วัดความเข้มของแสง จากนั้นคำนวณหา ความเข้มข้นของสาร

ส่วนประกอบของ reflectance spectrophotometer แสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 Reflectance spectrophotometer. 1 = light source, 2= slit, 3 = filter, 4 = collimating lens, 5 = test surface, 6= collimating lens, 7 =detector, 8 = meter

FLAME EMISSION SPECTROPHOTOMETRY

หลักการ ให้ความร้อนแก่อะตอมของธาตุที่ทำการวิเคราะห์ พลังวานความร้อนทำให้orbital electron เปลี่ยนสถานะไปที่ excited state ซึ่งเป็นสถานะที่ไม่เสถียร ดังนั้น electron จึงกลับสู่ ground state พร้อมกับปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสง (emitted light)

$$A^{+} + e^{-} \longrightarrow A^{0}$$

$$A^{0} + \text{heat} \longrightarrow A^{*}$$

$$A^{*} \longrightarrow A^{0} + \text{light}$$

ส่วนประกอบของ Flame photometer

1. Atomizer ทำหน้าที่ฉีด sample ในรูปละอองฝอยเข้าสู่ flame
2. Flame ให้ความร้อนทำให้อะตอมอยู่ในสภาวะ excited state
3. Monochromator ทำหน้าที่ detect แสงที่เปล่งออกมา ทั้งนี้มีการใช้ filter แยกกันสำหรับสารแต่ละชนิด
4. Detector นิยมใช้ photomultiplier tube
5. Meter or Readout แสดงผลการตรวจ

ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

หลักการ ให้ความร้อนทำให้อะตอมอยู่ในสภาวะ ground state atom แสงจาก hollow cathode lamp ผ่านมาที่ flame และถูก absorb โดยอะตอม แสงบางส่วนที่ไม่ถูก absorb ผ่านไปที่ detector ความเข้มของแสงที่ถูก absorb เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่ทำการตรวจวัด

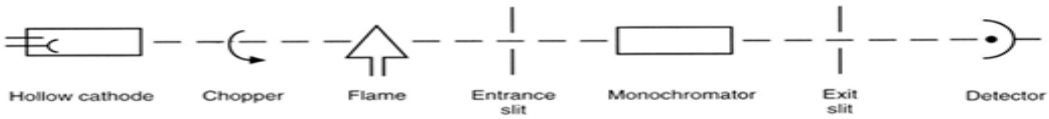
Absorption spectrum ของอะตอมมีลักษณะ line spectrum ประโยชน์ของ atomic absorption spectrophotometerใช้ในการตรวจวัด calcium, magnesium, lead, mercury

ส่วนประกอบ

1. Hollow cathode lamp เป็นแหล่งกำเนิดแสง (Light source) ภายในบรรจุ inert gas ได้แก่ Helium หรือ Argon ขั้ว cathode เคลือบด้วยโลหะที่ต้องการตรวจ เมื่อให้ความต่างศักย์ระหว่าง electrode ทำให้มี electron ไปชนกับ inert gas เกิด ionized gas จากนั้น ionized gas ชนกับอะตอมของโลหะที่ cathode ทำให้ electron เปลี่ยนสถานะไปที่ excited state เมื่อ electron กลับสู่ ground state จะมีปล่อยพลังงานออกมาในรูป emitted light

$$A^0 \longrightarrow A^* \longrightarrow A^0 + \text{light}$$

2. Chopper ทำหน้าที่เปิด-ปิด แสงจาก lamp เพื่อที่สามารถ correct สีของ flame ได้
3. Atomizer ทำหน้าที่ฉีดพ่นอะตอมในรูปละอองฝอย
4. Flame ให้ความร้อนแก่อะตอม ทำให้อะตอมอยู่ในสภาวะ ground state
5. Monochromator ทำหน้าที่เลือกแสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะ
6. Detector ตรวจวัดแสงที่ผ่านออกมาจาก flame
7. Meter แสดงผลการวัด



รูปที่ 10 Atomic absorption spectrophotometer

Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry

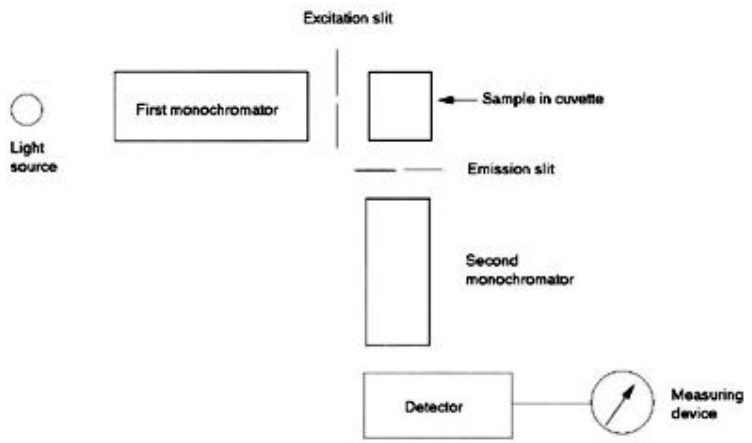
ใน atomic absorption spectrophotometer ชนิดนี้ sample จะถูกทำให้ร้อนใน closed chamber ที่มี carbon rod, tantalum, หรือ platinum เป็นแหล่งให้ความร้อน ทำให้ sample แห้ง และกลายเป็นเถ้าและอยู่ในรูปอะตอม โดยทั่วไป Sensitivity ของ Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry สูงกว่า Flame Atomic Absorption Spectrophotometry นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ

FLUOROMETRY

หลักการ โมเลกุลของสารที่มี Fluorophore ได้รับพลังงานแสง ทำให้ orbital electron เข้าสู่ excited state ซึ่งไม่เสถียร เมื่อ orbital electron กลับสู่ ground state มีการปล่อยพลังงานในรูป emitted light วัดความเข้มของแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสาร

ส่วนประกอบ

1. Light source นิยมใช้ Mercury, xenon arc lamp หรือ laser
2. Primary monochromator ใช้ Prism หรือ grating เพื่อเลือกแสงที่เป็น excitation light
3. Cuvette holder
4. Secondary monochromator ทำหน้าที่เลือกแสงความยาวคลื่นจำเพาะที่เปล่งออกมา
5. Detector
6. Readout or meter



รูปที่ 11 Spectrofluorometer

ปัจจัยที่มีผลต่อ fluorescence

1. Concentration ควรมีความเข้มข้นน้อย / การดูดกลืนแสงต่ำ
2. pH มีผลต่อประจุของสาร ทำให้การเรืองแสงเปลี่ยนแปลง
3. Temperature เมื่ออุณหภูมิสูง โมเลกุลจะชนกันทำให้การเรืองแสงลดลง
4. Viscosity ความหนืดสูงทำให้การเรืองแสงเพิ่ม
5. Interfering substance (quencher) ทำให้การเรืองแสงลดลง

FLUORESCENCE POLARIZATION SPECTROPHOTOMETRY

หลักการ แสงโดยทั่วไปเคลื่อนที่ไปทุกทิศทุกทาง Polarizer ทำให้แสงมี plane เดียวกันเรียกว่า polarized light แสง polarized light กระตุ้นให้โมเลกุลที่มี fluorophore เรืองแสง หากโมเลกุลมีขนาดใหญ่จะมีการเคลื่อนที่ช้า แสงที่เปล่งออกมาจะเป็นชนิด polarized light โมเลกุลขนาดเล็ก เคลื่อนที่เร็ว แสงที่เปล่งออกมาไม่เป็น polarized light

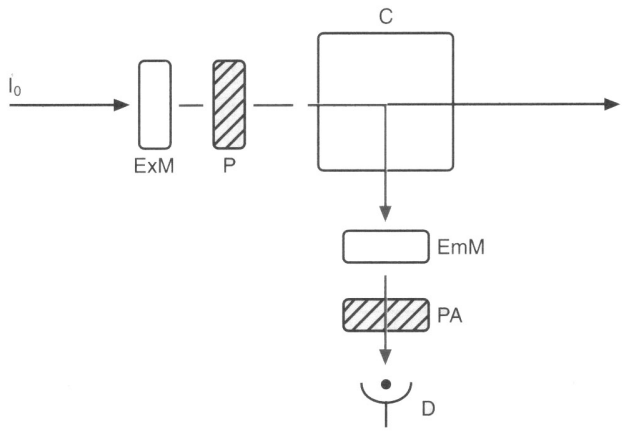
Fluorescence polarization (P) หาได้จากสมการ

$$P = \frac{(I_v - I_h)}{(I_v + I_h)}$$

เมื่อ I_v = ความเข้มของ fluorescence ในแนวดิ่ง (vertical plane)

I_h = ความเข้มของ fluorescence ในแนวนอน (horizontal plane)

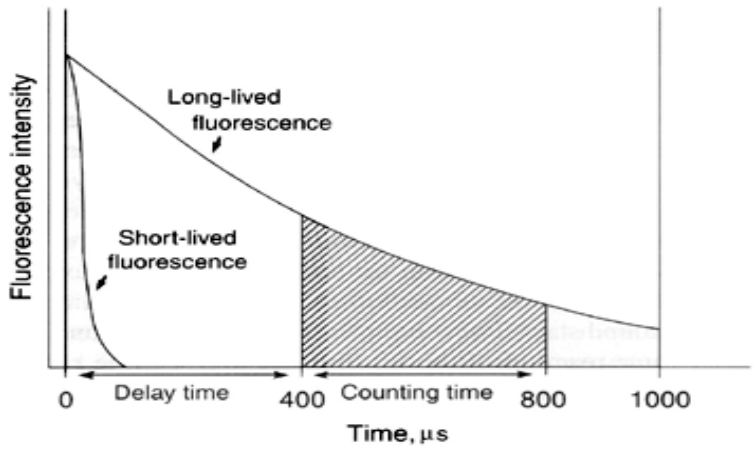
ส่วนประกอบของ fluorescence polarization spectrophotometer คล้ายกับ spectrofluorometer และมี polarizer อยู่หลัง primary monochromator และอีกตัวหนึ่งอยู่หลัง secondary monochromator



รูปที่ 12 Fluorescence polarization spectrophotometer (ExM = exitation monochromator, P = polarizer, EmM = emission monochromator, D = detector)

Time-Delayed Fluorescence Spectrophotometry

Time-Delayed Fluorescence Spectrophotometry หรืออาจเรียกว่า Time-resolved fluorescence spectrophotometry เป็นเทคนิคที่วัดการเรืองแสงของ long-lived fluorophore ได้แก่ lanthanide (La^{3+}) หรือ europium (Eu^{3+}) ซึ่งเป็นสารที่ให้แสง fluorescence นานกว่า 100 microsecond ในการวัด fluorescence จะวัดโดยให้มี delay time ระยะหนึ่งเพื่อให้การเรืองแสงของ short-lived fluorophore หมดไป เช่นวัดในช่วงเวลา 400-800 microsecond เทคนิคนี้ช่วยลดการรบกวนจากสาร interference และเป็นการเพิ่ม specificity



รูปที่ 12 Fluorescence ของ short-lived fluorophore กับ long-lived fluorophore

CHEMILUMINESCENCE PHOTOMETRY

Chemiluminescence หมายถึง การเปล่งแสงเมื่อ electron กลับจากสภาวะ excited state สู่สภาวะ ground state การที่ electron มีการเปลี่ยนสถานะเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสารเคมีในกลุ่ม luminol, isoluminol, acridinium ester, luciferin เมื่อถูก oxidized จะมีการเปล่งแสงเกิดขึ้น

Bioluminescence หมายถึงปฏิกิริยาเคมีที่ให้แสงที่เกิดตามธรรมชาติ ได้แก่การเรืองแสงของหิ่งห้อย

ตัวอย่างปฏิกิริยา chemiluminescence ได้แก่ปฏิกิริยา oxidation ของ luminol

$$2\,H_2O_2 + \text{Luminol} + \text{enhancer} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{Oxidized luminol} + 2H_2O + \text{light}$$

ใช้ปฏิกิริยา chemiluminescenceในเทคนิค immunoassay โดยติดฉลาก Antigen หรือ Antibody ด้วย enzyme หรือ สาร chemiluminescence

ELECTROCHEMILUMINESCENCE

Electrochemiluminescence (ECL) เป็นการเปล่งแสงของ electrochemical intermediate ที่ขั้ว electrode โดยที่ cathode จะมีการ oxidation ของ Ruthenium-tris (bipyridyl) $^{2+}$

$$\text{Ru-tris(bipyridyl)}^{2+} \longrightarrow e^- + \text{Ru-tris(bipyridyl)}^{3+}$$

ที่ Anode มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังนี้

$$\text{Tripropylamine(TPA)} \longrightarrow e^- + \text{TPA}^{\cdot +} \longrightarrow \text{TPA}^{\cdot} + H^+$$

จากนั้น $\text{TPA}^{\cdot}$ จะทำปฏิกิริยากับ Ru-tris(bipyridyl)$^{3+}$

$$\text{Ru-tris(bipyridyl)}^{3+} + \text{TPA}^{\cdot} \longrightarrow \text{Excited Ru-tris(bipyridyl)}^{3+}$$

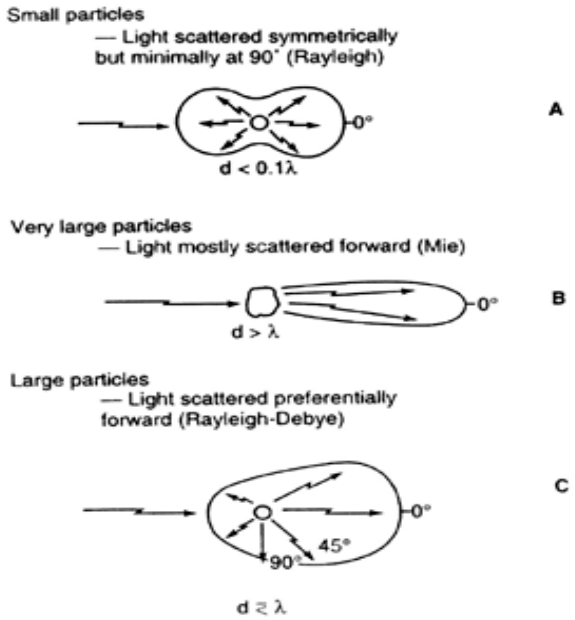
$$\text{Excited Ru-tris(bipyridyl)}^{3+} \longrightarrow \text{Ru-tris(bipyridyl)}^{3+} + \text{light}$$

ECL ใช้ใน immunoassay, nucleic acid assay ข้อดีของ ECL คือ sensitivity สูง สามารถวัดสารปริมาณน้อยๆ ได้ มี detection limit 200 fmol/L

TURBIDIMETRY & NEPHELOMETRY

แสงกระทบอนุภาคทำให้เกิดการกระจายแสง (light scattering) ซึ่งสามารถ Detect แสงโดย turbidimeter (detector อยู่ในแนวเดียวกับ light source) หรือ nephelometer (detector เอียงทำมุมกับ light source)

Interaction of Light with Particles



อนุภาคขนาดเล็ก
แสงกระจายตัวเท่าๆกัน

อนุภาคขนาดใหญ่มากๆ
แสงกระจายตัวไปข้างหน้า

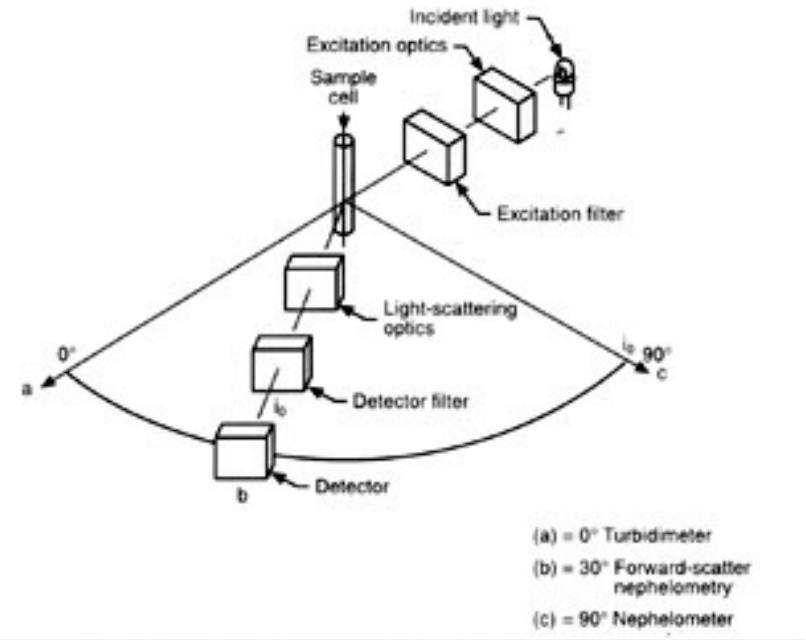
อนุภาคขนาดใหญ่
แสงส่วนใหญ่กระจายตัวไปข้างหน้า บางส่วนกระจายตัวไปด้านหลัง

รูปที่ 13 ผลของขนาดของ particle ต่อ light scattering

นิยมใช้ turbidimetry และ nephelometryในเทคนิค immunoassay โดยการ detect อนุภาคของ AgAb complex ซึ่งส่วนใหญ่มีขนาด 250-1500 nm Light scatter ส่วนใหญ่เป็นแบบ Rayleigh-Debye ใช้ spectrophotometer ในการ detect แสงในเทคนิค turbidimetry

Nephelometry ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ อาจตรวจวัดแบบ end point หรือ kinetic

NEPHELOMETER



รูปที่ 14 ส่วนประกอบของ nephelometer

ส่วนประกอบ

1. Light source นิยมใช้ quartz halogen, xenon arc lamp, หรือ laser
2. Monochromator
3. Cuvette holder
4. Detector
5. Meter

ข้อจำกัดของเทคนิค Nephelometry

1. กรณี antigen excess จะมี signal น้อยที่สุด
2. มีปัญหา matrix effect กล่าวคือ sample ที่มีความขุ่นทำให้การตรวจวัด ผิดพลาด

เอกสารอ้างอิง

1. อดิศร รัตนพันธ์ เจษฎี ม่านสะอาด สเปคโทรสโคปี.,2543.
2. Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry. 4th ed. St Louis: Mosby, 2003.
3. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamental of Clinical Chemistry. 5th ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001.
4. Anderson SC, Cockayne S. Clinical Chemistry. Philadelphia: W.B.Saunders, 1993.
5. Kricka LJ. Optical techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4 th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006: 61-89.
6. Kricka LJ, Park JY. Optical techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.6 th ed. St. Louise, Missouri: Saunders Elsevier, 2008:63-83.