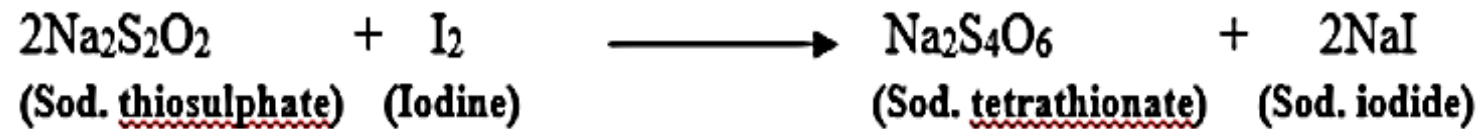
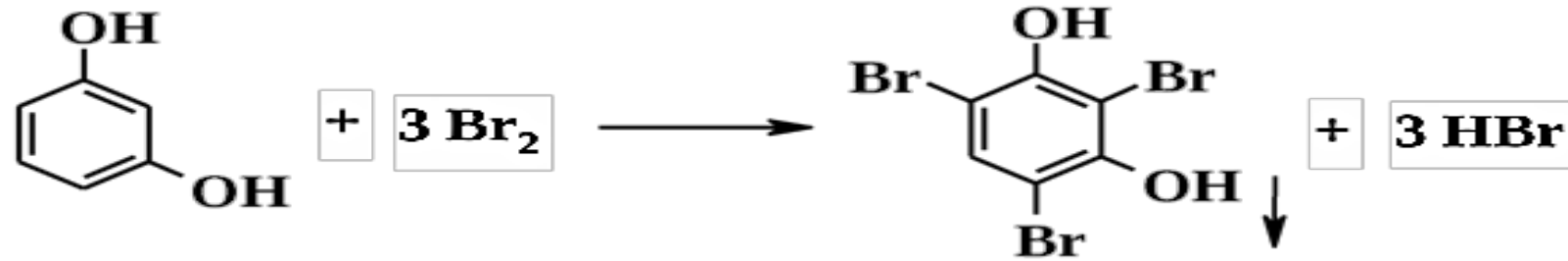
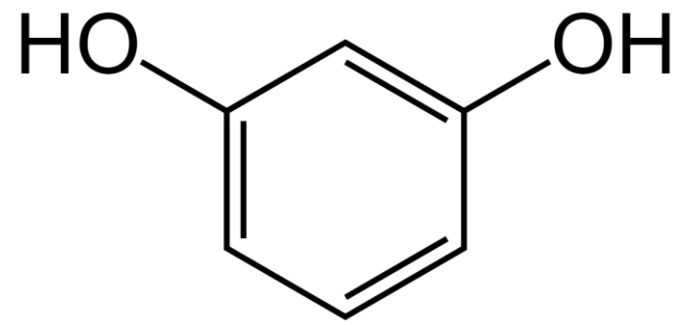


Assay— Dissolve about 1.5 g of **Resorcinol**, accurately weighed, in water to make 500.0 mL. Transfer to an iodine flask 25.0 mL of the resulting solution, add 50.0 mL of 0.1 N bromine VS, dilute with 50 mL of water, add 5 mL of hydrochloric acid, and at once insert the stopper in the flask. Shake for 1 minute, allow to stand for 2 minutes, and add 10 mL of potassium iodide TS while slightly loosening the stopper. Shake thoroughly, allow to stand for 5 minutes, remove the stopper, and rinse it and the neck of the flask with 20 mL of water into the flask. Titrate the liberated iodine with 0.1 N sodium thiosulfate VS, adding starch TS as the endpoint is approached. Perform a blank determination. From the volume of 0.1 N sodium thiosulfate VS used, calculate the volume, in mL, of 0.1 N bromine VS consumed by the **resorcinol**. Each mL of 0.1 N bromine is equivalent to 1.835 mg of $C_6H_6O_2$.



Iodide ion—

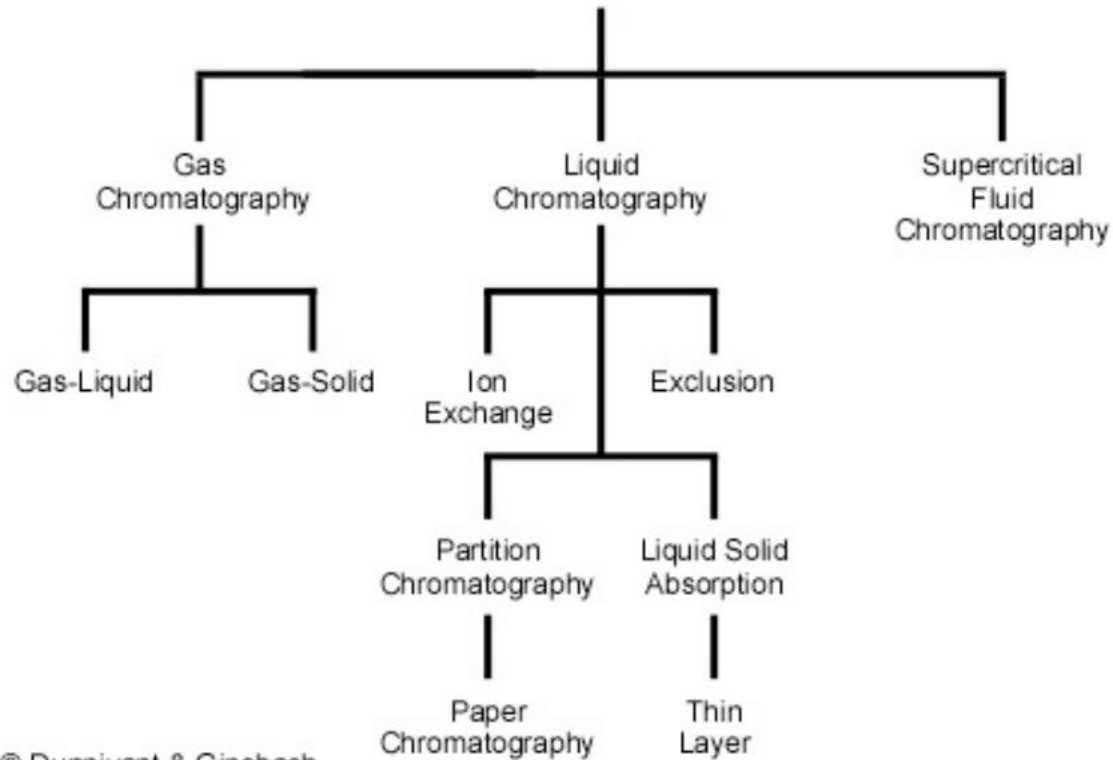
Determination of total iodine— Dissolve about 500 mg of Povidone-iodine, accurately weighed, in 100 mL of water in a 250-mL conical flask. Add sodium bisulfite TS until the color of iodine has disappeared. Add 25.0 mL of 0.1 N silver nitrate VS and 10 mL of nitric acid, and mix. Titrate the silver nitrate with 0.1 N ammonium thiocyanate VS, using ferric ammonium sulfate TS as the indicator. Perform a blank determination (see *Residual Titrations* under Titrimetry (541)). Each mL of 0.1 N silver nitrate is equivalent to 12.69 mg of I. From the percentage of total iodine, calculated on the dried basis, subtract the percentage of available iodine (see *Assay for available iodine*), to obtain the percentage of iodide ion. Not more than 6.6%, calculated on the dried basis, is found.



Assay— Transfer to a 100-mL beaker an accurately measured volume of Topical Solution, equivalent to about 50 mg of iodine, and add water to make a total volume of not less than 30 mL. Titrate immediately with 0.02 N sodium thiosulfate VS, determining the endpoint potentiometrically, using a platinum-calomel electrode system. Perform a blank determination, and make any necessary correction. Each mL of 0.02 N sodium thiosulfate is equivalent to 2.538 mg of I.

Chromatography

Branches of Chromatography



© Dunnivant & Ginsbach

GC, LC กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ
สัญญาณกับ Retention time (t_R) >>>
chromatogram (Y:Signal, X: t_R)

TLC, PC คำนวณ R_f (ระยะทาง Solute
เคลื่อนที่หารด้วย MP เคลื่อนที่)

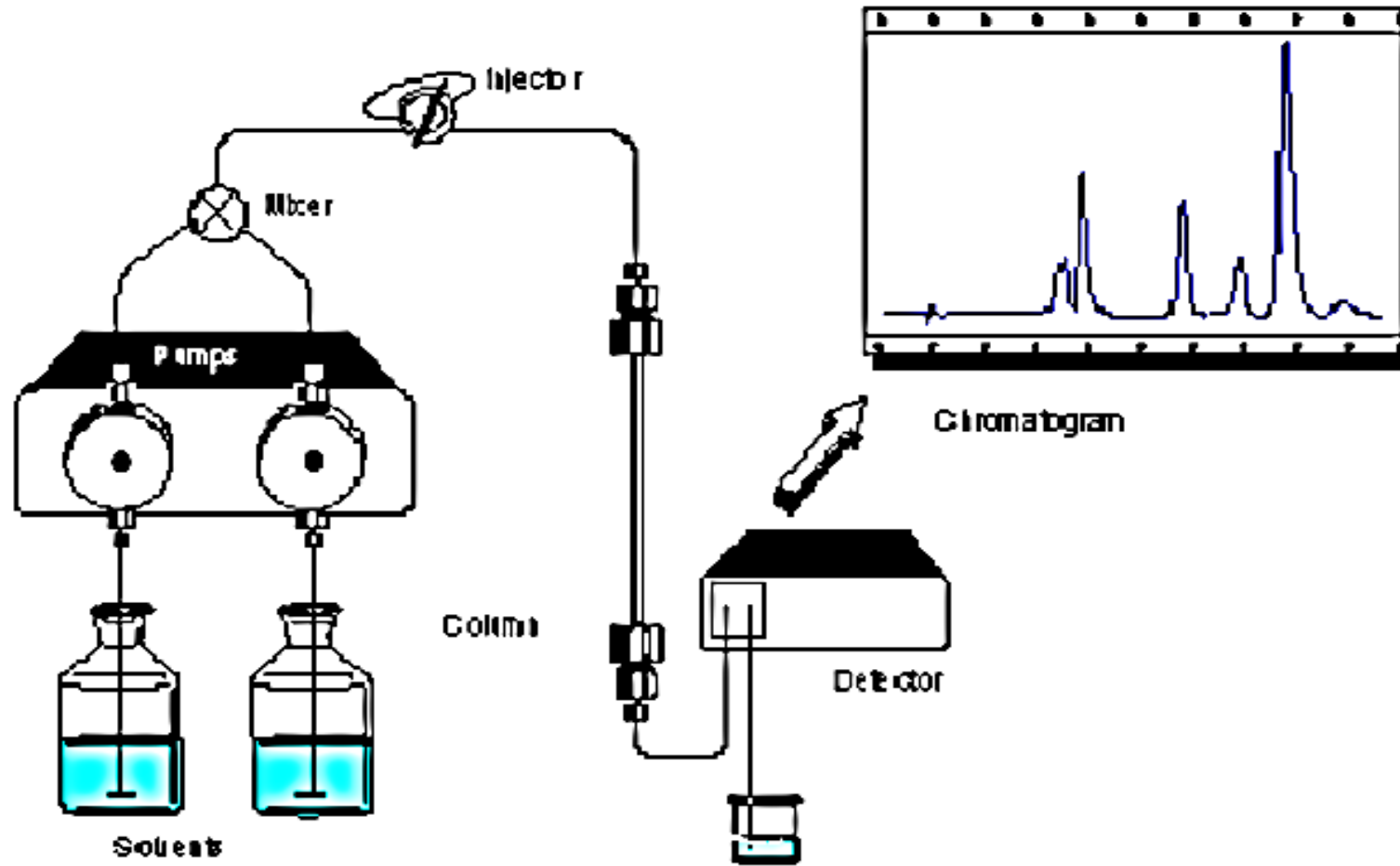
HPLC



HPLC

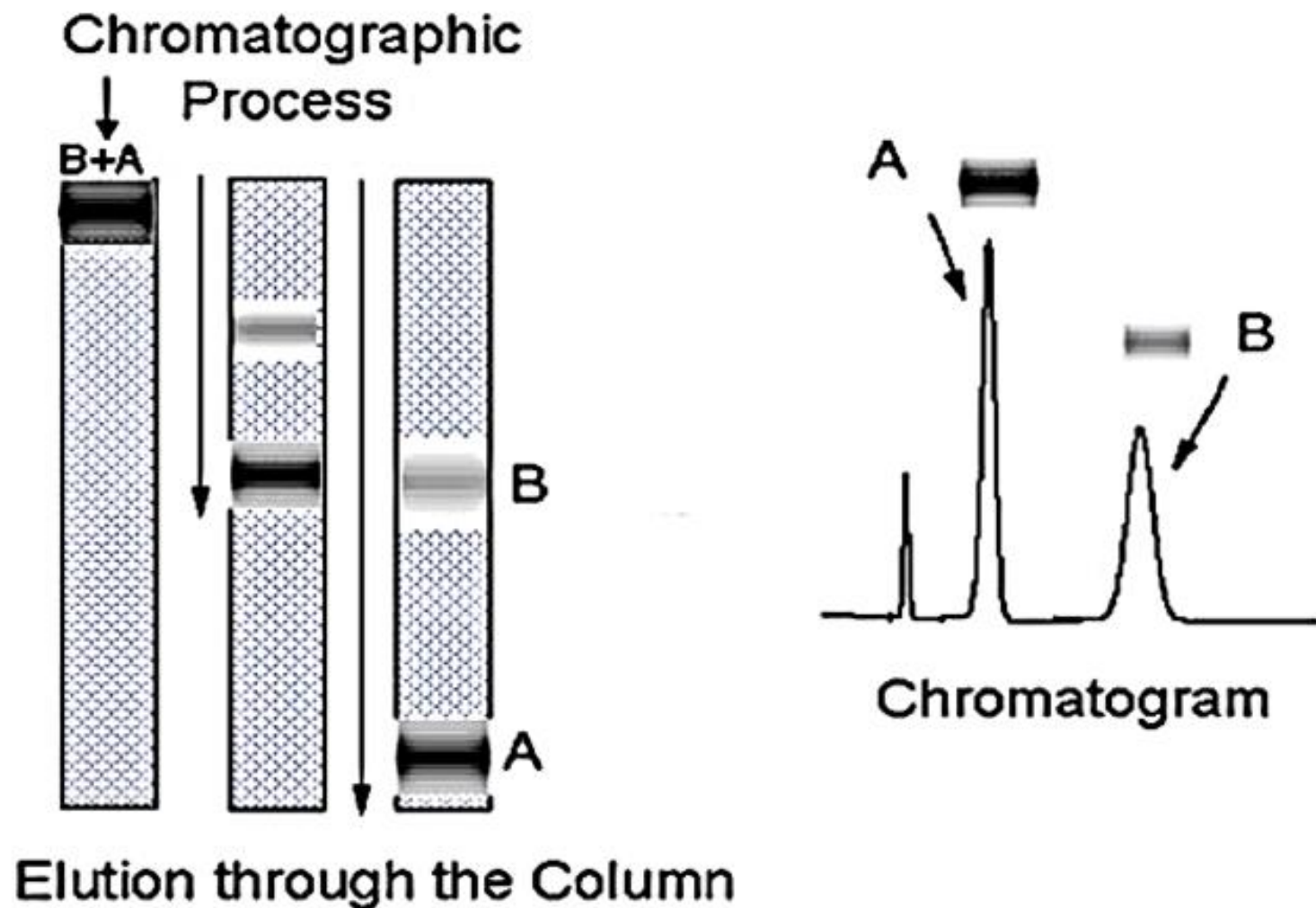
จุดประสงค์หรือประโยชน์ของ Chromatography

1. ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากของผสม
2. ตรวจสอบความสม่ำเสมอ (Homogeneity) หรือการปนเปื้อนของตัวอย่าง เนื่องจากสารชนิดเดียวจะต้องปรากฏเป็นแถบเดียวหรือจุดเดียวในคอลัมน์หรือบนแผ่นระนาบในกระบวนการโครมาโตกราฟี
3. ทำให้สารบริสุทธิ์ เช่น การใช้ ion exchange chromatography เพื่อเตรียม deionized water หรือการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ก็มักใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี
4. ทำให้สารเข้มข้นขึ้น โดยการนำสารผ่านเข็มคอลัมน์ให้ตัวถูกละลายถูกจับไว้กับวัสดุภาคอยู่กับที่ แล้วจึงใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ปริมาตรน้อยๆ จะเอาตัวถูกละลายเหล่านั้นออกมา จะทำให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นมากขึ้น
5. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร โดยเทียบกับ t_R หรือ R_f ที่ได้จากสารมาตรฐาน ภายใต้สภาวะของกระบวนการโครมาโตกราฟีเดียวกัน
6. วิเคราะห์ปริมาณ โดยเปรียบเทียบ peak height, peak area, ขนาดหรือความเข้มของจุดที่ปรากฏบนแผ่นระนาบกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณหรือความเข้มข้นภายใต้สภาวะของกระบวนการโครมาโตกราฟีเดียวกัน



ภาพที่ 10.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา : http://www_waters_com-WatersDivision-images-products-hplc_primer_fig_d_jpg



ภาพที่ 10.2 ลักษณะของ chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ที่มา : http://www_waters_com-WatersDivision-images-products-hplc_primer_fig_d_jpg

พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง

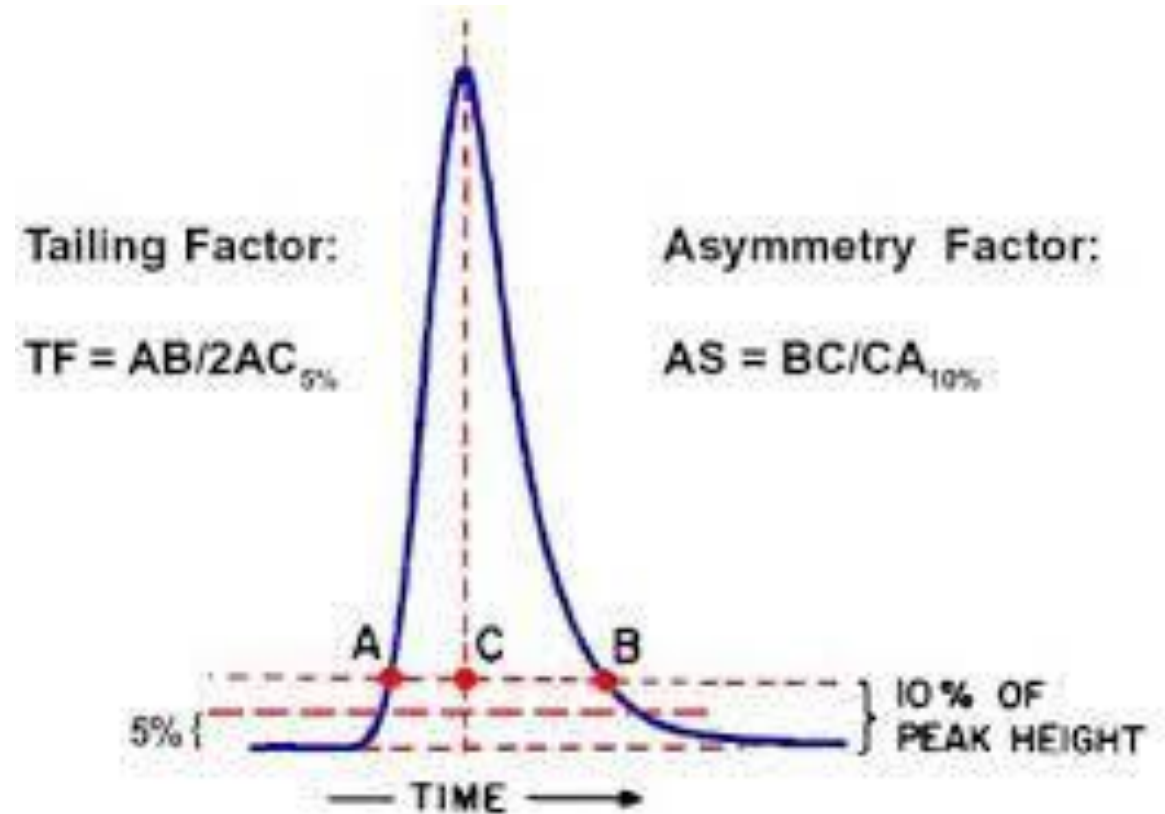
Retention time = ระยะเวลาที่ MP พาหรือชะล้างสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่าน SP

Number of theoretical plates = บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ว่า คอลัมน์นั้นมีการบรรจุได้ดีเพียงใด >> ยิ่งสูงยิ่งมีประสิทธิภาพในการแยกดี

Resolution (Rs) = ค่าที่บอกว่าฟีกของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด

Asymmetric factor (AF) = บ่งบอกความสมมาตรของฟีกที่ได้จากการแยก

สำหรับในแล็บตำรับ จะใช้ค่า **Peak asymmetry** หรือ **Tailing factor(T)**



กระบวนการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจาก SP

การชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากวัฏภาคอยู่กับที่ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ วิธีที่นิยมมี 2 วิธีด้วยกัน คือ

1. **Isocratic elution** เป็นกระบวนการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจาก SP โดยใช้ MP ซึ่งมีส่วนผสมที่โดยตลอด เช่น ความเข้มข้นหรือ pH คงที่ วิธีนี้ใช้ในการแยกของผสมที่ไม่ซับซ้อน
2. **Gradient elution** เป็นกระบวนการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจาก SP โดยการเปลี่ยนสัดส่วนผสมของ MP

Adsorption chromatography

Adsorption chromatography/Liquid solid chromatography (LSC)

กลไกการแยก มีการดูดซับอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลสารกับ polar hydroxy group หรือ silanol group (Si-OH) บนพื้นผิวของ silica

สารที่มีสภาพขั้วมากจะถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่บนวัฏภาคอยู่กับที่นาน มีขั้วจะถูก Elute ออกมาช้ากว่าสารที่มีสภาพขั้วต่ำ

ตัวอย่าง

SP-Solid นิยมของแข็งที่มีขั้ว เช่น Silica

MP-Liquid ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น Dichloromethane

Partition chromatography

หลักการ แยกสารด้วยขั้วที่ต่างกัน

มี 2 แบบ คือ

■ **liquid-liquid chromatography** – SP เคลือบติดบนอนุภาคแบบกายภาพ

■ **Bonded phase chromatography** – SP เกิดพันธะทางเคมีบนอนุภาค

○ **Normal phase (polar bonded phase)**

○ **Reversed phase (nonpolar bonded phase)**

Phase	Normal phase	Reversed phase
SP	-CN, -NH ₂ , -OH (ขั้วสูง)	-C8, -C18, -C ₆ H ₅ (ขั้วต่ำ)
MP	Hexane, dichloromethane, Tetrahydrofuran (THF) (ขั้วต่ำ)	H ₂ O, CH ₃ OH, Acetonitrile (ACN) (ขั้วสูง)
สิ่งที่ออกมาก่อน	ขั้วน้อยสุดออกมาาก่อน	ขั้วมากสุดออกมาาก่อน

Partition chromatography

Ion-pairing chromatography

- เติมสารที่มีประจุตรงข้ามกับประจุของสารตัวอย่างลงใน MP

สารตัวอย่าง +	สารตัวอย่าง -
Tetramethyl ammonium chloride, trioctylamine, tetrabutyl ammonium chloride,	Perchloric acid, sodium alkyl sulfonate, methanesulfonic acid

Ion Exchange Chromatography (IEC)

หลักการ : แยกสารด้วยประจุ, ประจุแรงจะจับแน่นกับ ionic group ของวัสดุภาคอยู่กับที่ได้ดี ถูก elute ออกมาช้ากว่าสารที่มีประจุอ่อนกว่า

SP- Cation exchange resin, Anion exchange resin

MP – สารละลาย Buffer ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Size exclusion chromatography (SEC)

หลักการ : แยกตามขนาดของโมเลกุล

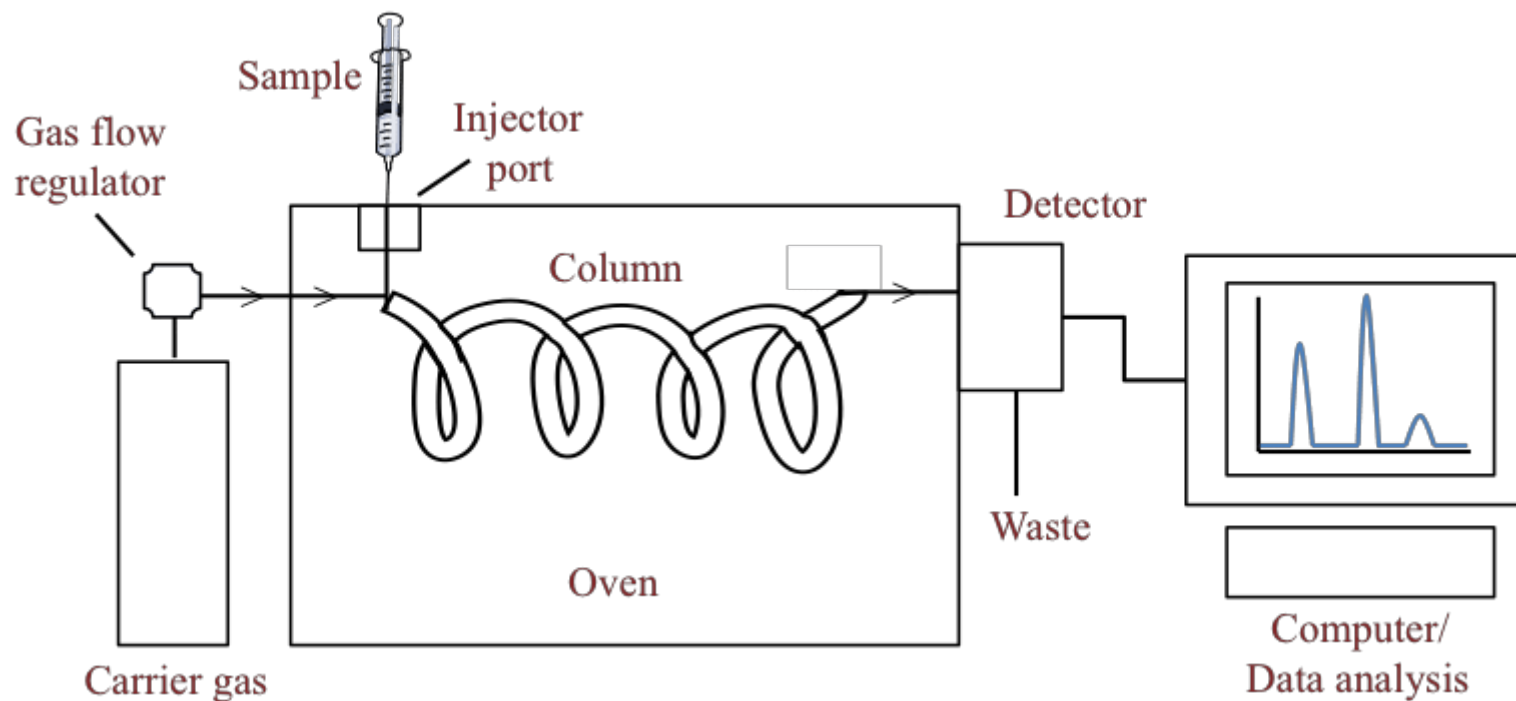
SP – ของแข็งรูปพรุน เช่น Gel permeation หรือ Gel filtration chromatography

MP – น้ำ สารละลาย Buffer ตัวทำละลายอินทรีย์

GC

ใช้แยกสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยเป็นไอได้ง่าย

ตัวอย่างจะกลายเป็นไอที่ Inlet แล้วพาเข้าคอลัมน์ด้วย Carrier gas ซึ่งเป็นแก๊สเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง โดยสารผสมแยกจากกันโดยอาศัยหลัก Like dissolve like กับ Stationary phase



MP – Inert gas (carrier gas) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง

SP – มี 2 แบบ ได้แก่

1. Gas-solid chromatography (GSC) เช่น Alumina Silica Carbon

SP เป็น Solid active adsorbent ใช้หลักการดูดซับในการแยก เหมาะกับ gas low MW

2. Gas-liquid chromatography (GLC)

SP เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่ด้านในคอลัมน์ ใช้หลักการ Partition เกิดพันธะระหว่างตัวอย่างกับ SP ในการแยก

Liquid แบบ Non-polar ได้แก่ Squalene, Polysiloxane หมู่แทนที่ $-\text{CH}_3$ และ $-\text{C}_6\text{H}_5$ Dimethylpolysiloxane

Liquid แบบ Polar ได้แก่ PEG (Carbowax), 50 % Phenyl, Trifluoropropyl silicones

Carrier gas

แก๊สพาเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พาหน้ำที่พาสารตัวอย่างที่เป็นแก๊สหรือไอจากส่วนที่ฉีดสารผ่านคอลัมน์เข้าไปสู่เครื่องตรวจวัด นิยมใช้แก๊ส He, N₂, Ar, H₂ (ที่มีความบริสุทธิ์อย่างน้อย 99.995 % High purity grade)

Makeup gas- N₂

- ❖ ช่วยเพิ่มอัตราเร็วของแก๊สที่ไหลเข้าสู่เครื่องตรวจวัดให้ได้ 30 – 40 mL/min
- ❖ ส่วนใหญ่ใช้กับ Capillary column (Flow ต่ำ)
- ❖ ทำให้ Peak สวยขึ้น

แก๊สอื่นๆ- O₂ Air H₂

ติดไฟในเครื่องตรวจวัดสาร

GC Detector

ประเภท	รายละเอียด	รูปแบบ
Thermal conductivity detector (TCD)	วัดการเปลี่ยนแปลงการเหนี่ยวนำความร้อนรอบขดลวดแล้วแปลงไปเป็นสัญญาณไฟฟ้าให้ Detector จับได้ นิยมใช้ He เป็น carrier gas	Nondestructive
Flame ionization detector (FID)	นิยมใช้มาก มักใช้กับสารที่มี C H นิยมใช้ He, N2 เป็น Carrier gas	Destructive
Electron capture detector (ECD)	ไวและจำเพาะกับโมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มี EN atom เนื่องจากสารพวกนี้จับ Electron ได้ดี นิยมใช้ dry N2, Ar + 5 % CH4 เป็น Carrier gas	Nondestructive
Nitrogen phosphorus or Thermionic detector (NPD or TID)	ใช้ตรวจหาสารประกอบ Phosphorous & nitrogen	Destructive
Atomic Emission Detector (AED)	ใช้หลักการเดียวกันกับ AED	Destructive
Infrared spectrometer (IR)	ใช้หลักการเดียวกันกับ IR	Nondestructive
Mass spectrometer (MS)	ใช้หลักการเดียวกันกับ MS	Destructive



การประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์

1. Qualitative analysis

- วิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์
- เปรียบเทียบ Retention time ของสารที่สนใจกับ Std ที่สภาวะวิเคราะห์เดียวกัน

2. Quantitative analysis

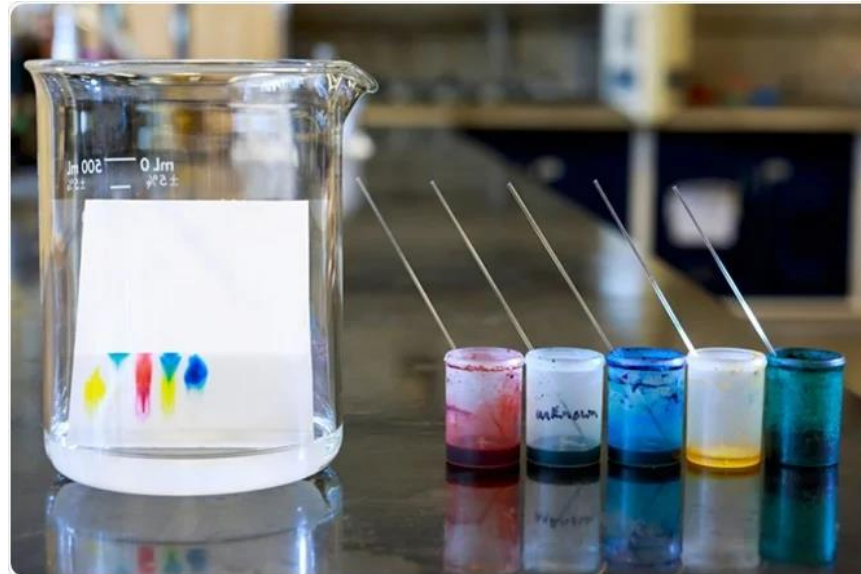
- หาปริมาณสารโดยใช้ Chromatogram (ใช้ค่า Peak height, Peak area มาคำนวณ)
- นิยมใช้ใน Limit test – residual solvent analysis (ตัวทำละลายที่ตกค้างหรือสารปนเปื้อนที่ระเหยได้ในตัวยา)
- วิเคราะห์ตัวยาที่ไม่มี Chromophore วิเคราะห์ Alcohol content*, Volatile oils
- หาปริมาณยาและ Metabolite ในของเหลวชีวภาพ เช่น ตรวจหาสารระเหยในปัสสาวะผู้ป่วย หาปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือด

Planar chromatography

บรรจุหรือวางตัวของ Stationary phase บนแผ่นเรียบ

Stationary phase (SP) สิ่งที่ดีอยู่บนแผ่นเรียบหรือรูพรุนของกระดาษ

Mobile phase (MP) จะเคลื่อนที่ผ่าน SP ด้วยแรงแคพิลลารีหรือแรงโน้มถ่วง คุณสมบัติที่ดีจะต้องมีความบริสุทธิ์สูง ไม่ทำปฏิกิริยากับ SP จุดเดือดต่ำ (แห้งไว) เข้ากับสารอื่นได้เหมาะสม ไม่ไวไฟและเป็นพิษ



Paper chromatography



กลไก Partition

SP น้ำ-liquid

MP Organic solvents or buffers

กระดาษกรอง เป็น Supporting medium ใช้ขนาดรูพรุนกำหนดการเคลื่อนที่ของ MP

- ถ้ารูพรุนน้อยละเอียดมาก เคลื่อนที่ช้า แยกดี
- ถ้ากระดาษหนาความจุมากเหมาะกับการแยกสาร

TLC

กลไก Absorption

SP คือตัวดูดซับ มักใช้ Silica gel ที่เคลือบอยู่บน Backing หรือ Plate จำพวกกระจก อะลูมิเนียม หรือ พลาสติก โดยตัวยึดจำพวก Gypsum เสริมความแข็งแรงระหว่างตัวดูดซับกับ Backing หรือ Fluorescent indication (366 nm: เห็นจุดสว่างหลายสี หรือ 254 nm เห็นจุดดำบนพื้นเขียว) จะมีหรือไม่ก็ได้ แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

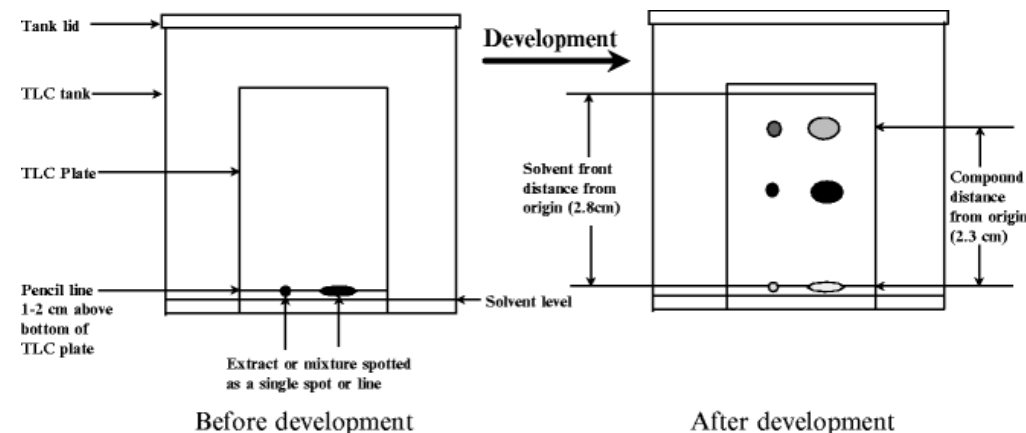
Normal phase : Polar inorganic

Reverse phase : Non-polar

MP

Normal phase : Non polar (การเพิ่มขั้วทำให้ชะไปไกล R_f เพิ่มขึ้น)

Reverse phase : การผสมน้ำกับ Methanol, ACN, หรือ THF (การลดขั้วทำให้ชะไปไกล R_f เพิ่ม)

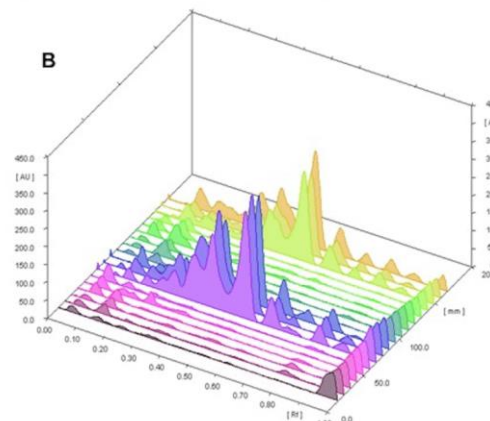
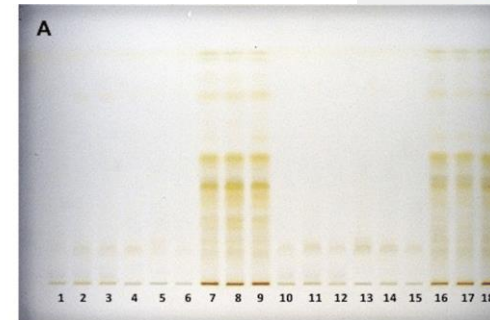


HPTLC

กลไก Absorption

SP,MP เหมือน TLC แต่มีประสิทธิภาพดีกว่าในด้าน

1. การแยกจากการที่มีความพรุนน้อยกว่าและแยกอนุภาคได้เล็กกว่า
2. การแยกที่ระยะทางสั้นกว่าจึงลดระยะเวลาการวิเคราะห์
3. SP มีตัวเลือกมาก แต่ MP เลือกได้น้อย
4. ใช้ MP น้อยกว่ามาก
5. ใช้ Autosampler spot
6. ใช้ UV/Vis มาสแกนช่วยได้

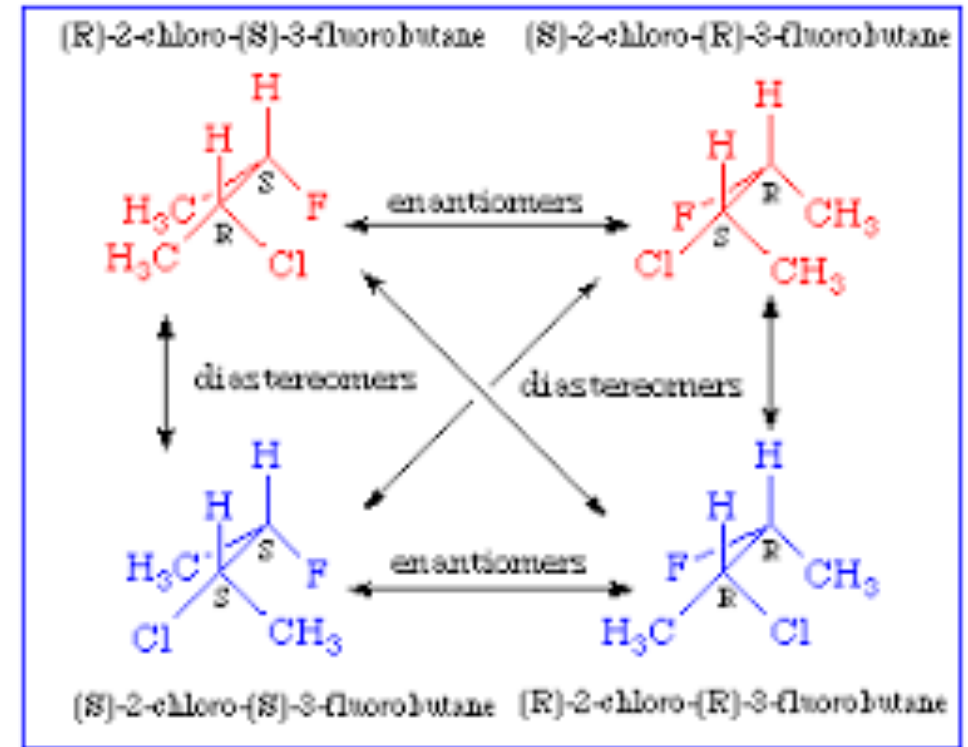
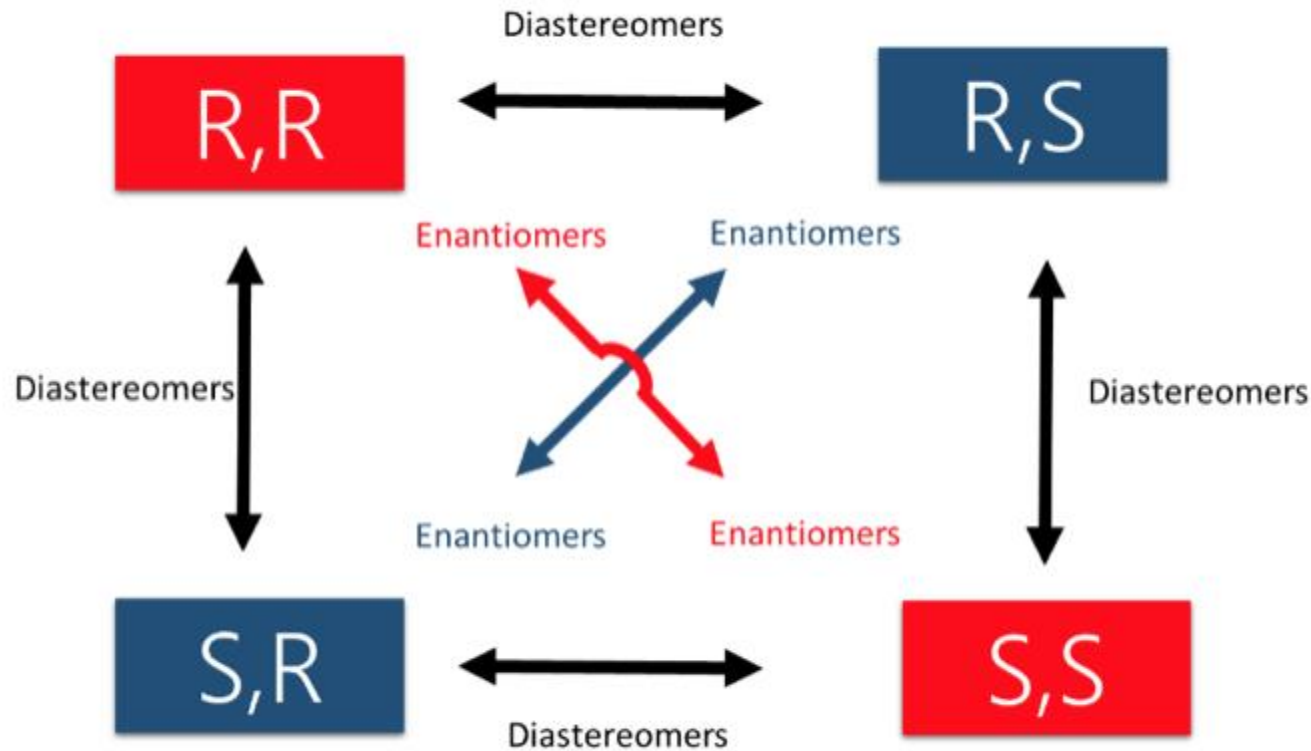


Planar chromatography

การนำไปใช้	Paper chromatography (PC)	Thin-Layer chromatography (TLC)	HPTLC
Qualitative	✓(R_f)	✓(R_f)	✓ (ขึ้นกับ Detector)
Quantitative	×	×	✓
Semi-Quantitative	✓	✓(Limit test, Spot intensity)	✓

Chiral chromatography

ใช้วิเคราะห์สาร Chiral compound



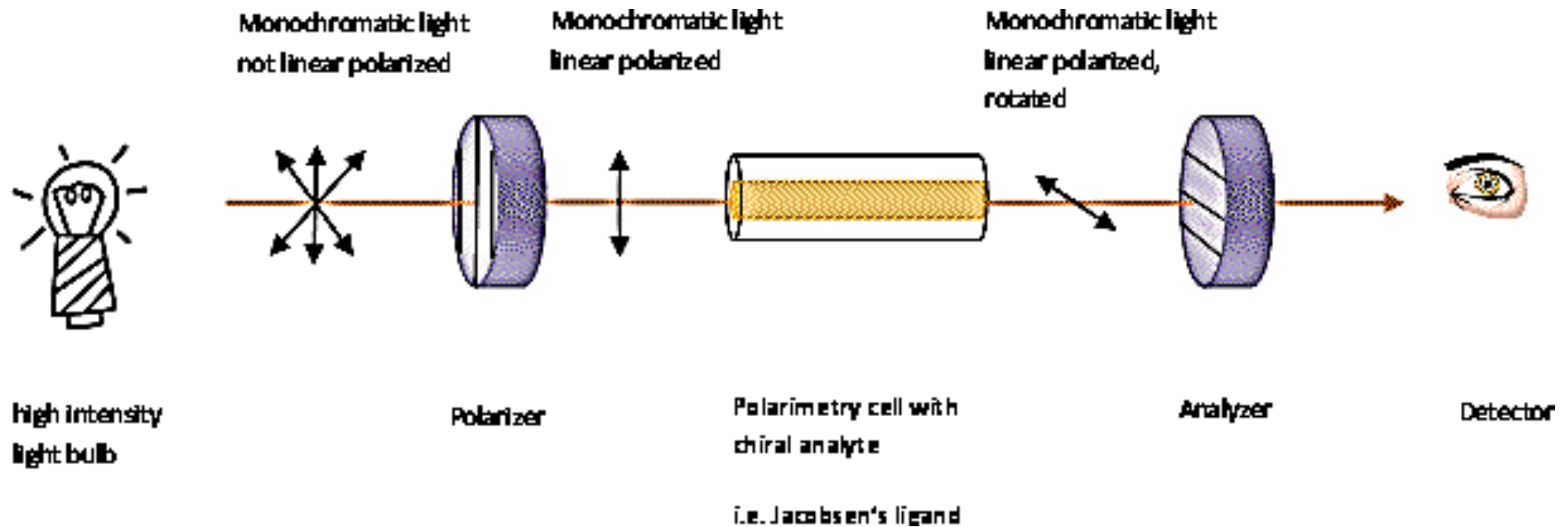
ประเภท	หลักการ	ปฏิกิริยา	การนำไปใช้
1. Indirect method	การใช้ Reagent ที่มี Form ใด Form หนึ่งเข้ามาเปลี่ยนให้ Enantiomer เป็น Diastereomer แล้วแยกด้วย Column ปกติ	ความชอบระหว่างสารกับ คอลัมน์	ทั่วไป
2. Direct method	แยกโดยใช้ Chiral Stationary Phase โดย Form ที่ reacted กับ SP จะออกมาช้า	แล้วแต่ประเภทของ Direct	แล้วแต่ประเภทของ Direct

ประเภทของ Direct method	หลักการ	ปฏิกิริยา	การนำไปใช้
1. Chiral Stationary phase (Method of choice)	Chiral recognition ชอบจับ SP จะมี tR นาน	แล้วแต่ประเภทของ 2.1	แล้วแต่ประเภทของ 2.1
1.1 Donor acceptor (Pirkle) type + ion exchange	ใช้หลัก Ion exchange ร่วมกับ Chiral recognition	Hydrogen bonding, $\pi - \pi$ and dipole stacking	อเนกประสงค์สุด
1.2 Helical polymer base	หมู่แทนที่ต่างกันจะเกิดปฏิกิริยากับคู่ Enantiomer ต่างกัน	Primary attractive interaction; inclusion complex also play an important role	นิยมใช้กับขั้นตอน Preparative
1.3 Chiral cavity phase - Cyclodextrin - Crown ether - Chirobiotic phase	Enantiomer ต่างกัน เกาะกัน ต่างกันจึงอยู่ในช่องว่าง SP ต่างกัน ทำให้ tR ต่างกัน	Formation of inclusion complexes in chiral cavity	นิยมใช้กับ Aromatic group นิยมใช้แยกสารพวก Chiral amino acid, สารประกอบที่มีหมู่ Amino group นิยมใช้กับ Hydrophobic

ประเภทของ Direct method	หลักการ	ปฏิกิริยา	การนำไปใช้
1.4 Protein base	-	Hydrophobic and polar interaction with protein bound to the SP	นิยมใช้กับ Chiral compound ตัวเล็ก
1.5 Ligand exchange columns	-	Formation of diastereoisomeric metal complex with a selector ligand bound to the SP	นิยมใช้กับ Amino acid, Amino alcohol และ Alpha-hydroxy acid
2. Chiral mobile phase additive	ใส่สารลงไปใน MP เพื่อทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง ถ้าคู่ Enantiomer จับได้จะออกมาเร็วพร้อม MP	ความชอบของสารกับ MP	ไม่ค่อยนิยม

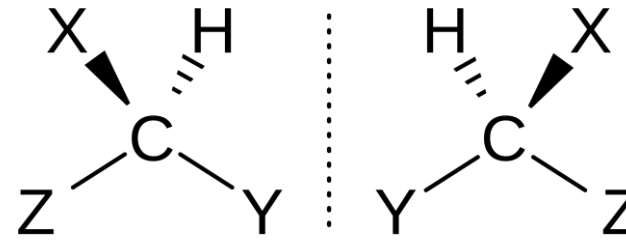
Polarimetry

ศึกษาการหมุน (rotation) ระนาบของแสง Polarized (Plane polarized light)



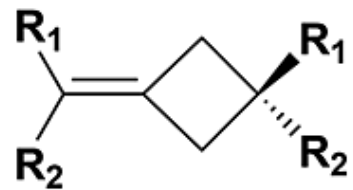
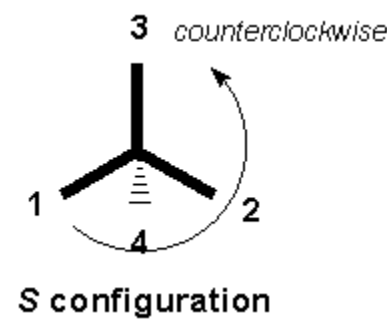
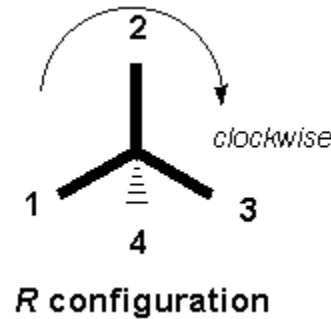
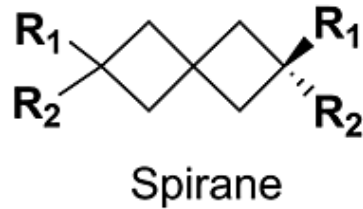
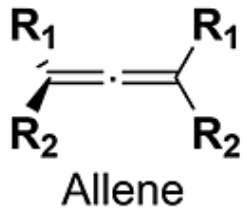
Optically active substance

Chiral substances หรือ Stereoisomers

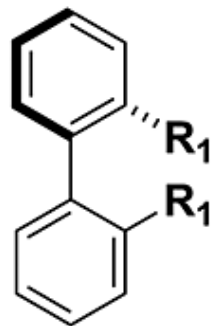


ตัวอย่างสารที่มีคุณสมบัติ Optically active เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล อัลคาลอยด์

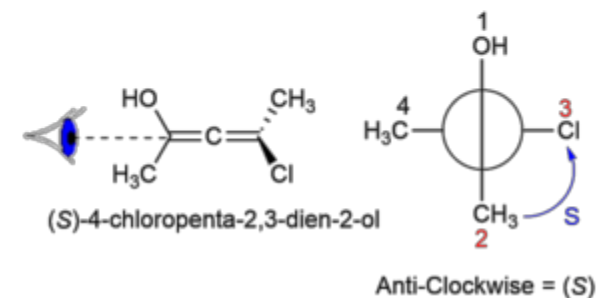
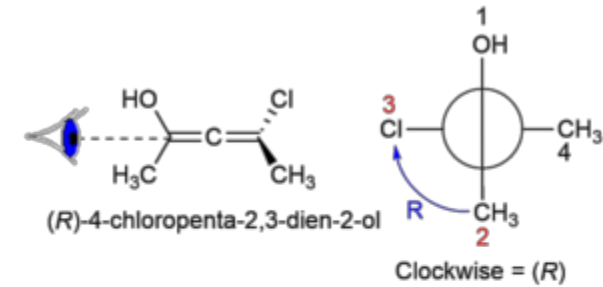
สารประกอบที่มี Chiral center จะมีจำนวน Stereoisomer ได้มากที่สุด 2^n แบบ และประกอบไปด้วย Enantiomer 2^{n-1} คู่

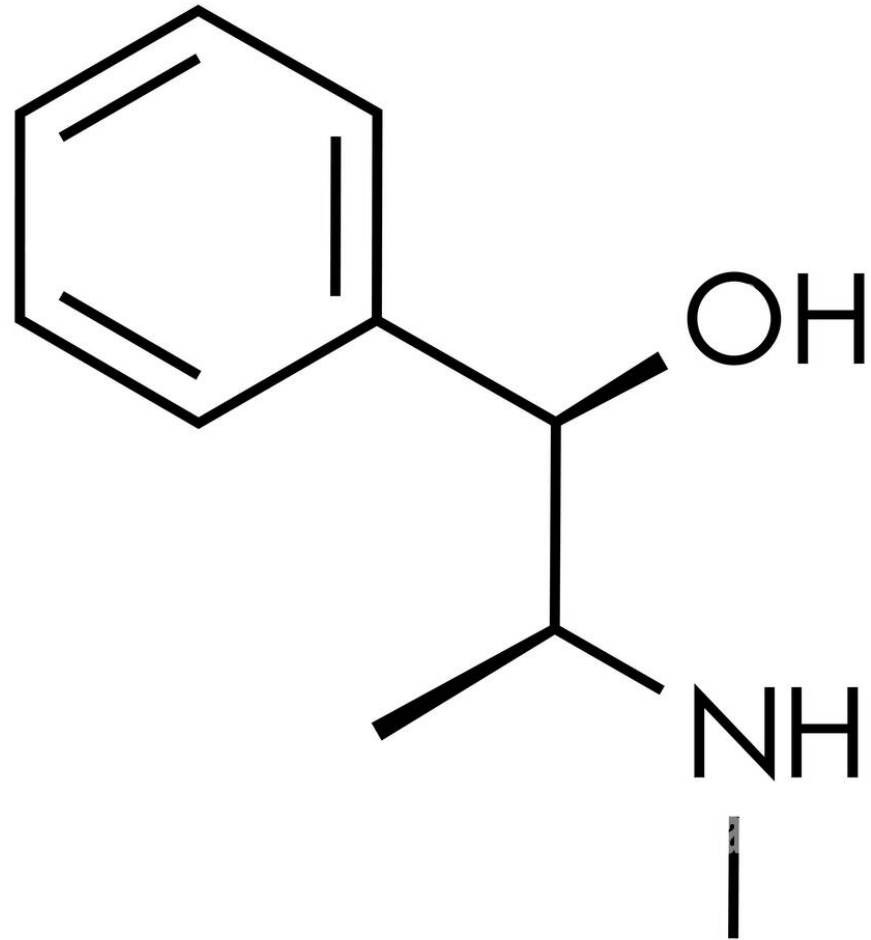


Alkylidenecycloalkane



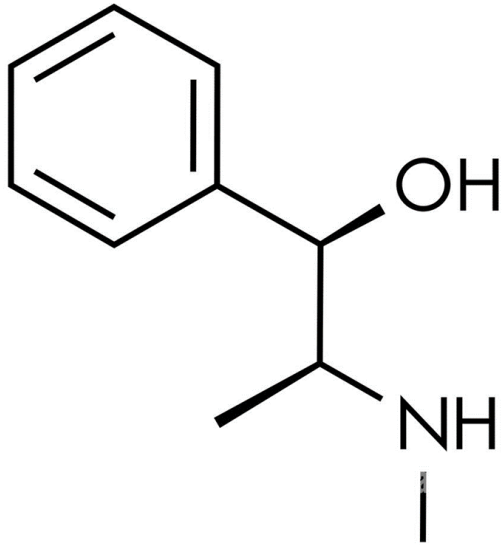
Biphenyl





ephedrine

Enantiomer

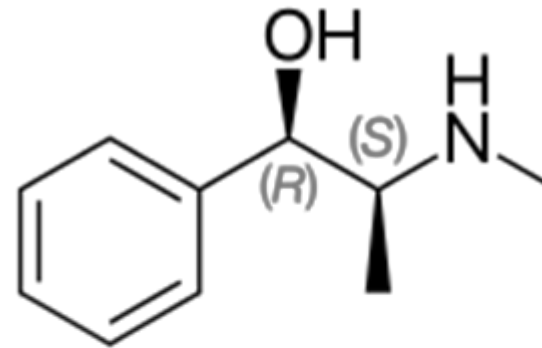


ephedrine

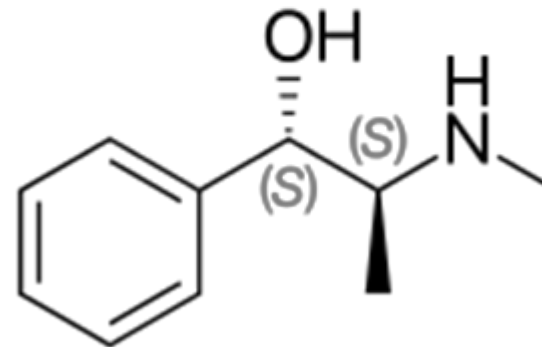
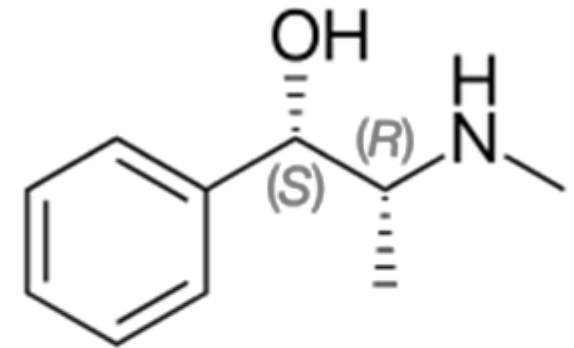
Diastereomer

Racemic mixture/Racemate

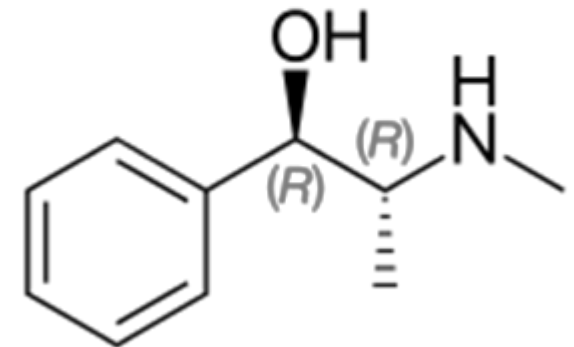
(1*R*,2*S*)-(-)-Ephedrine
(-)-*erythro*-Ephedrine



(1*S*,2*R*)-(+)-Ephedrine
(+)-*erythro*-Ephedrine

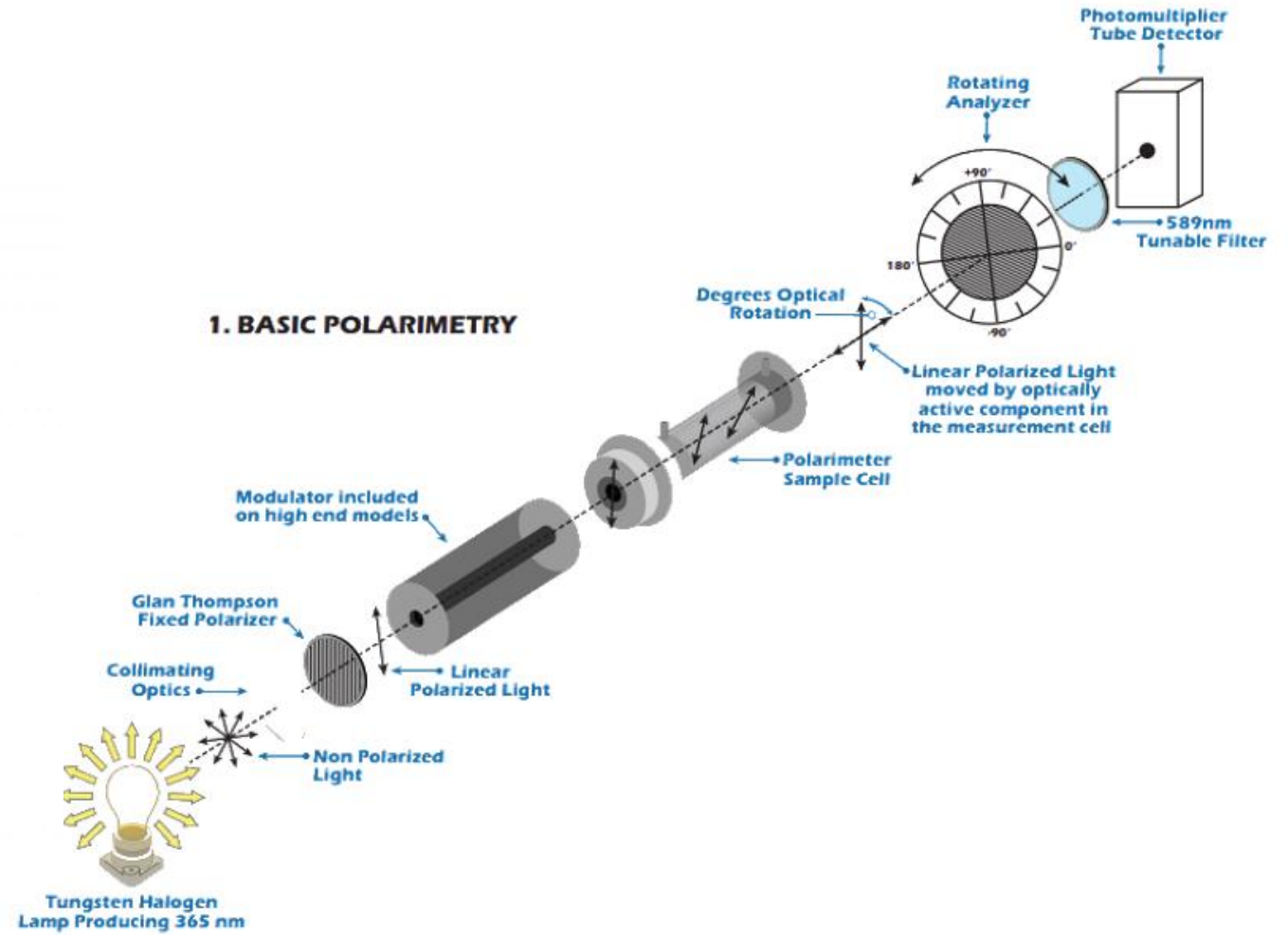
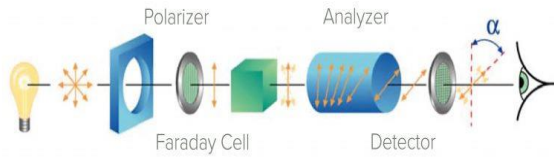


(1*S*,2*S*)-(+)-Pseudoephedrine
(+)-*threo*-Ephedrine



(1*R*,2*R*)-(-)-Pseudoephedrine
(-)-*threo*-Ephedrine

Polarimeter



การรายงานผล

$$[\alpha]_D^{25} \text{ or } [\alpha]_D^{20},$$



<781> Optical rotation

1. ความยาวคลื่นแสงของแสงโพลาไรซ์แบบระนาบ นิยมใช้ Sodium D line (589.3 nm) ยกเว้นสำหรับสารประกอบบางชนิด เช่น Digoxin, d-tubercuraine HCl นิยมใช้ Mercury green line (564.1 nm)
2. อุณหภูมิที่ทำการวัด ใช้ที่ 20 °C แต่ใน USP และ NF นิยมใช้ที่ 25 °C
3. ระยะทางที่แสงโพลาไรซ์เคลื่อนที่ผ่านสารที่ต้องการวัด สำหรับสารที่เป็นของเหลวหรือสารละลายใช้ 1 dm และสารที่เป็นของแข็งใช้ 1 mm

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100a}{lc},$$

where $[\alpha]$ is the specific rotation at wavelength λ , t is the temperature, a is the observed rotation in degrees ($^{\circ}$), l is the pathlength in decimeters, and c is the concentration of the analyte in g per 100 mL. Thus, $[\alpha]$ is 100 times the measured value, in degrees ($^{\circ}$), for a solution containing 1 g in 100 mL, measured in a cell having a pathlength of 1.0 dm under defined conditions of incident wavelength of light and temperature. For some Pharmacopeial articles, especially

ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า Optical rotation

1. ความยาวคลื่นของ Plane polarized light
2. ความเข้มข้นของสารละลาย
3. ตัวทำละลาย
4. อุณหภูมิ
5. เวลา

การประยุกต์ใช้

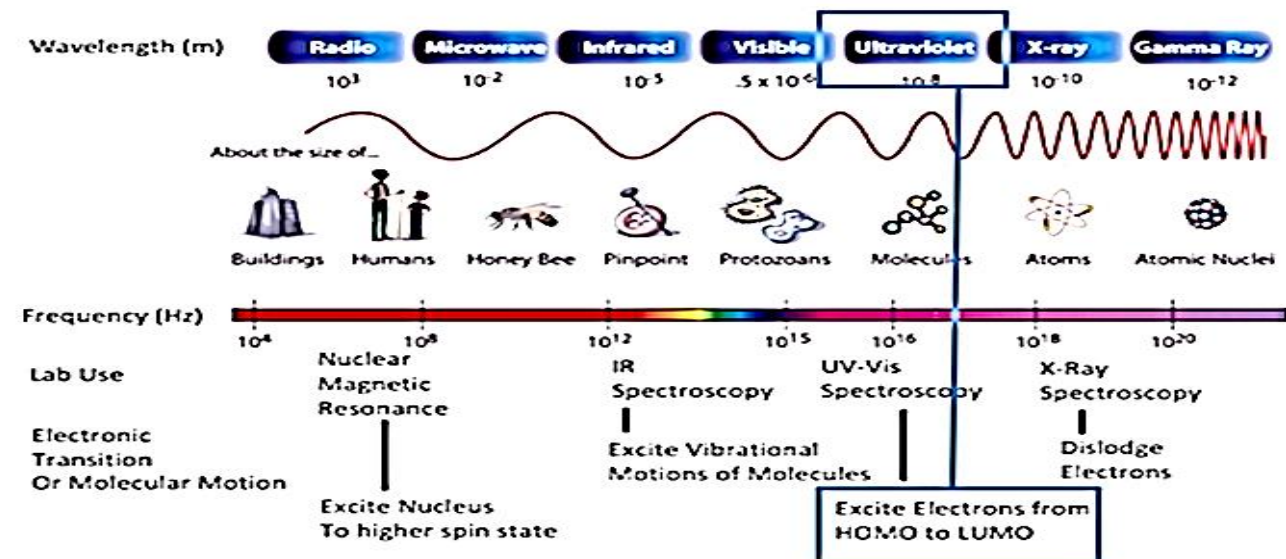
ใช้ในงาน Identification หรือทดสอบความบริสุทธิ์ (Qualitative) ไม่นิยมวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative)

Spectroscopy

เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการใช้คลื่นแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

Region	Type of quantum transition
Gamma rays	Nuclear
X rays	Inner electrons
UV-visible	Bonding electrons
Infrared	Rotation/Vibration of molecules
Microwave	ESR
Radio	NMR

EMR	Wavelegnth range
UV	190 to 380 nm
Visible	380 to 780 nm
Near-IR	780 to 3000 nm
IR	2.5 to 40 μm or 4000 to 250 cm^{-1}

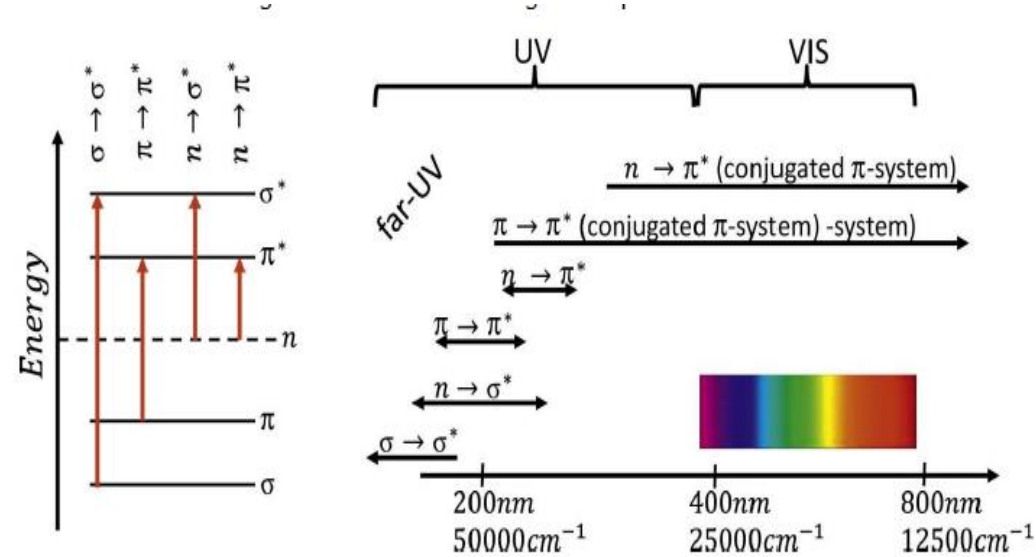
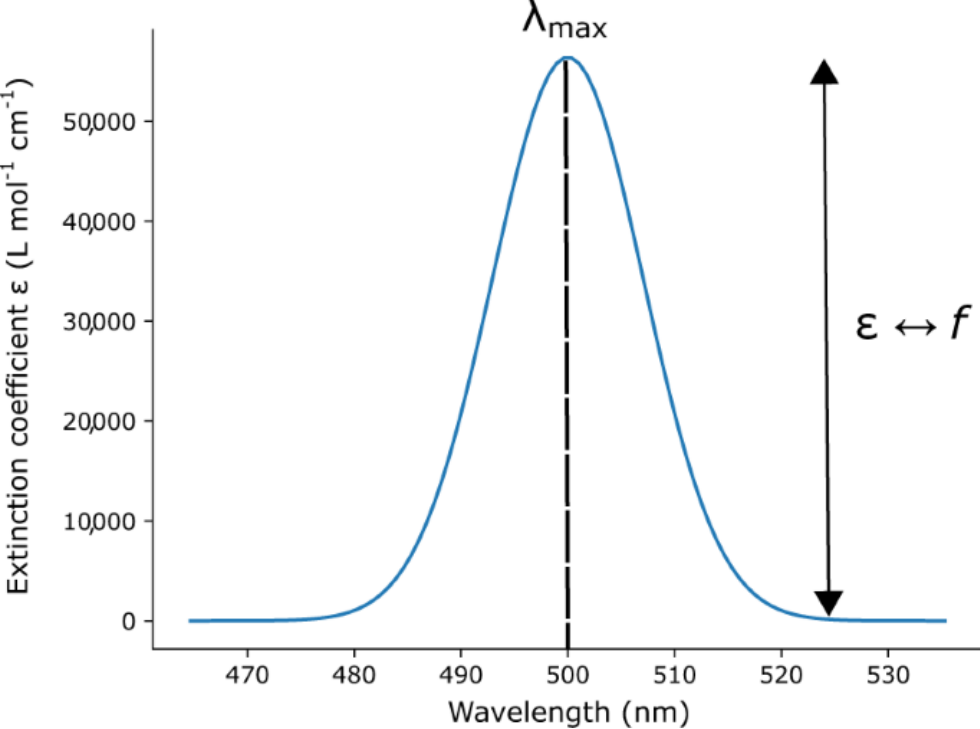


UV-VIS Spectrophotometer

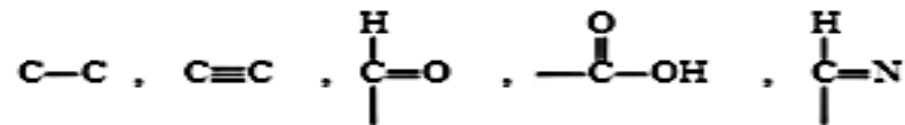


หลักการ

Ultraviolet (UV) และ visible (vis) spectrophotometry หมายถึง การวัดการดูดกลืนพลังงานรังสีของสาร (absorbing species) ที่ความยาวคลื่นที่แคบ (ประมาณเท่ากับแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว = monochromatic light) และแน่นอนในช่วงความยาวคลื่นของ UV (200-400 nm) และ vis (400-750 nm) ของ electromagnetic spectrum พลังงานที่ถูกดูดกลืนนี้จะใช้เพื่อให้เกิด electronic transitions ของ valence electron ในพันธะเคมีของโมเลกุล และโดยที่ปริมาณของพลังงานที่ใช้เพื่อการนี้เท่ากับความแตกต่างของพลังงานระหว่างระดับพลังงานใน ground และ excited states ดังนั้นการดูดกลืนพลังงานของ absorbing species หนึ่งๆ จะเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นกลุ่มหนึ่งเท่านั้นไม่ใช่ทุกความยาวคลื่น การเกิด electronic transitions นั้นมีหลายแบบตามชนิดของอิเล็กตรอนในพันธะต่าง ๆ ซึ่งสำหรับช่วงความยาวคลื่นข้างต้นนั้นจะเกิด $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ และ $n \rightarrow \pi^*$ transitions ดังนั้นรูปแบบหรือลักษณะของการ transition จะขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของสาร โดยการเกิด $\sigma \rightarrow \sigma^*$ transitions จะต้องใช้พลังงานสูงซึ่งจะพบในพวกสารประกอบอิ่มตัวซึ่งดูดกลืนแสงในช่วง vacuum uv (ต่ำกว่า 200 nm) ส่วน $\pi \rightarrow \pi^*$ และ $n \rightarrow \pi^*$ transitions จะพบในสารประกอบไม่อิ่มตัวซึ่งลักษณะโครงสร้างมี chromophores ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ เช่น



Source: Chapter 2 - Interaction of Matter and Electromagnetic Radiation (<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63422-1.00002-X>)



สำหรับสารประกอบที่มี conjugated chromophores จะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่ยาวกว่าพวก non-conjugated chromophore เพราะความแตกต่างของพลังงานใน ground และ excited states จะน้อยกว่าพวก non-conjugated chromophores ในบางครั้งถ้ามี conjugation เกิดขึ้นยาวมากจะได้สารที่ดูดกลืนแสงในช่วง visible ได้เป็นสารมีสี นอกจากนั้นแล้วการจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นใดยังขึ้นกับสถานะตัวกลางที่สารนั้นละลายอยู่ ซึ่งอาจทำให้เกิด bathochromic หรือ hypsochromic shifts และ hyperchromic หรือ hypochromic effects ได้

การดูดกลืนพลังงานของสารนอกจากจะเกี่ยวกับเรื่องของความยาวคลื่นแล้ว ก็ยังเกี่ยวข้องกับเรื่องของความเข้มของแสงหรือพลังงานที่ถูกดูดกลืนด้วย โดยความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนจะขึ้นกับปริมาณหรือความเข้มข้นของ absorbing species (medium) ทั้งนี้จะพบว่าความเข้มของแสงที่ตกกระทบมากกว่าความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจาก absorbing medium

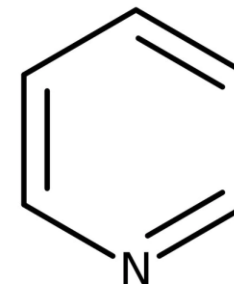
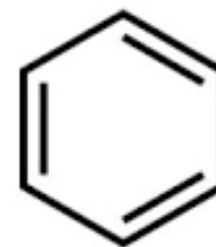
Chromophore

Unsaturated linkages or functional groups that usually absorb in UV-visible region

1 Isolated chromophores e.g. $C=C$ $C=O$ $N=N$

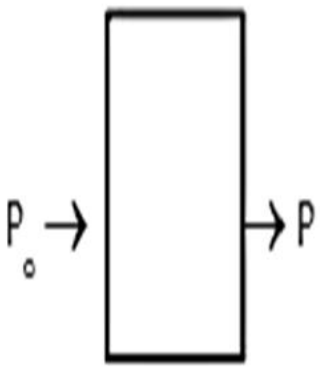
2. Conjugated chromophores e.g. $C=C-C=C$ $C=C-C=O$

3. Aromatic compound e.g. benzene pyridine



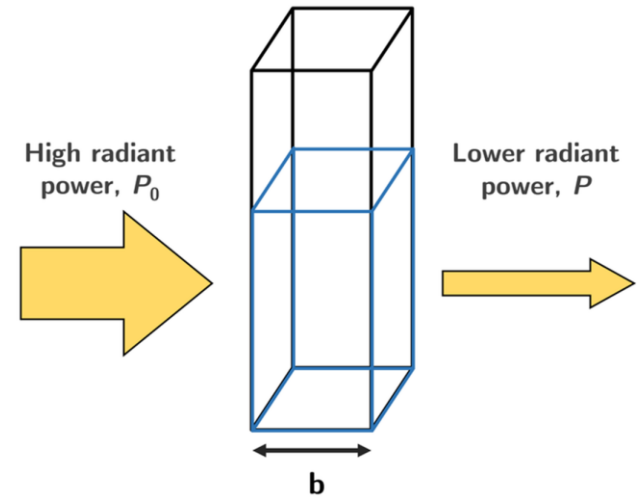
Auxochrome

Functional groups that have non-bonded valence electrons and not absorb at more than 220 nm eg. OH , NH_2 , Cl ,



P_0 = ความเข้มของแสงที่ตกกระทบบ (incident light)
 P = ความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา (transmitted light)

Absorbing Medium



จากหลักการนี้สามารถหาปริมาณของสารได้ โดยอาศัย Beer-Lambert law ซึ่งกล่าวว่า “เมื่อใช้แสงที่มีความยาวคลื่นค่าเดียวหรือ monochromatic light ปริมาณความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนจะสัมพันธ์แบบ exponential กับความหนาและความเข้มข้นของ absorbing medium” ดังแสดงไว้ในสมการที่ (1) , (2) , (3) และ (4)

Lambert law	$\log P_0/P = K'b$	(1)
Beer law	$\log P_0/P = K'c$	(2)
Beer-Lambert law	$\log P_0/P = Kbc$	(3)
หรือ	$A = Kbc$	(4)

P_0, P = ความเข้มของแสงที่ตกกระทบและความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจาก absorbing medium ตามลำดับ

K' = ค่าคงที่

b = ความหนาของ absorbing medium (โดยทั่วไปเป็น ซม.)

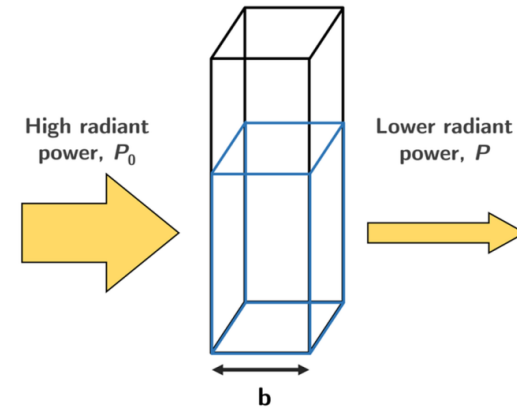
c = ความเข้มข้นของ absorbing medium (ซึ่งอาจเป็น % w/v, กรัม/ลิตร หรือ โมล/ลิตร)

K = ค่าคงที่ของสารในตัวทำละลายเฉพาะที่ความยาวคลื่นเฉพาะ ค่าของ K จะขึ้นกับหน่วยของ c ซึ่ง

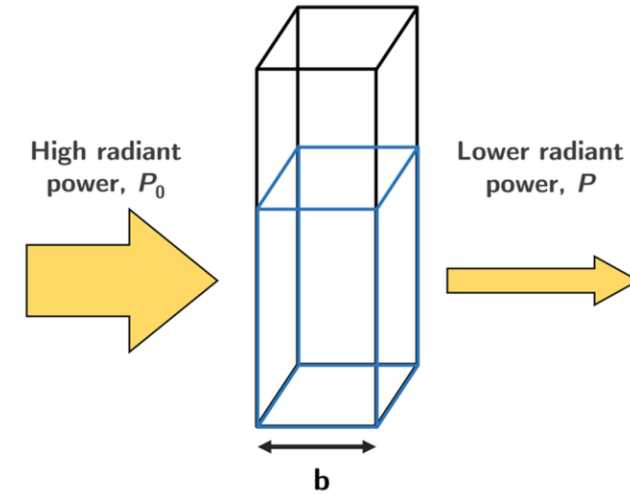
(i) ถ้า c เป็น %w/v $\gg$ K จะเป็น specific absorbance

(ii) ถ้า c เป็น กรัม/ลิตร $\gg$ K จะเป็น absorptivity (a)

(iii) ถ้า c เป็น โมล/ลิตร $\gg$ K จะเป็น molar absorptivity (ϵ)

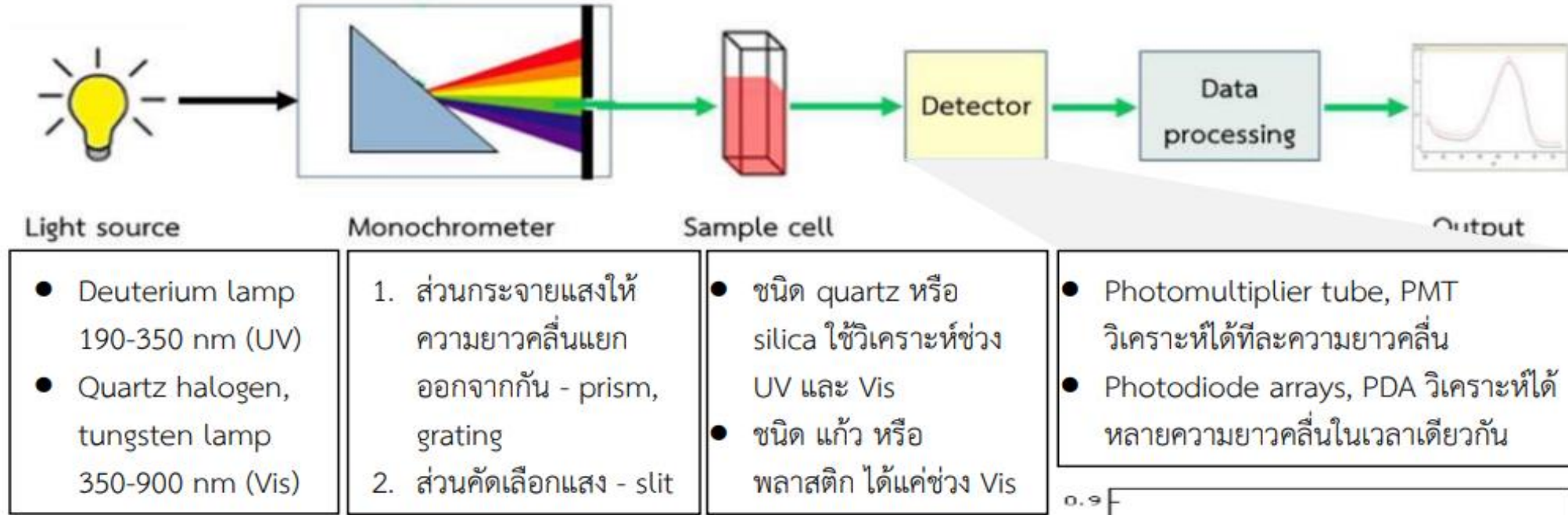


☛ $A = \text{absorbance} = \log P_0 / P = \log 1/T$ เมื่อ $T = \text{transmittance}$



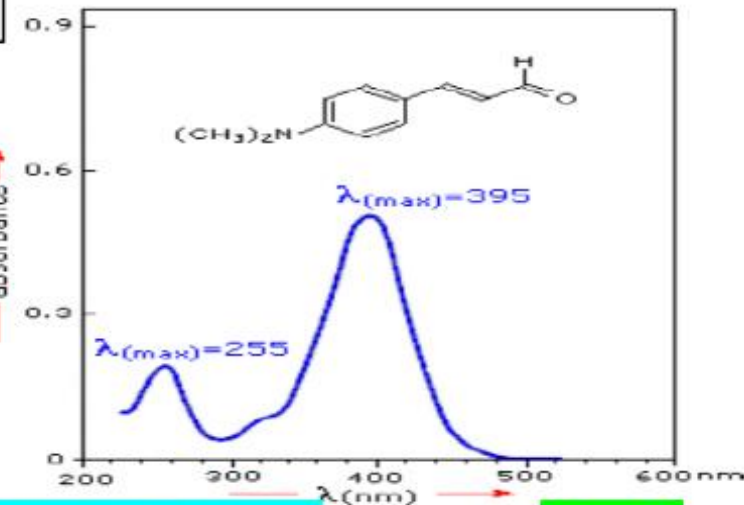
สมการที่กล่าวมาแล้วนี้สามารถใช้หาปริมาณสารโดยทั่วไปซึ่งถ้าสารดูดกลืนแสงตาม Beer-Lambert law แล้ว เมื่อ plot ระหว่าง A กับ c (เมื่อ b คงที่) จะต้องให้เป็นเส้นตรง ถ้าสารดูดกลืนแสงไม่เป็นไปตาม Beer-Lambert law แล้วการคำนวณหาปริมาณสารจะต้องใช้วิธีอื่น

UV/visible spectrophotometer

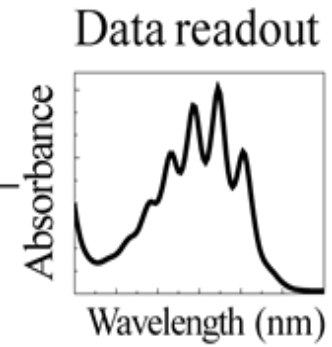
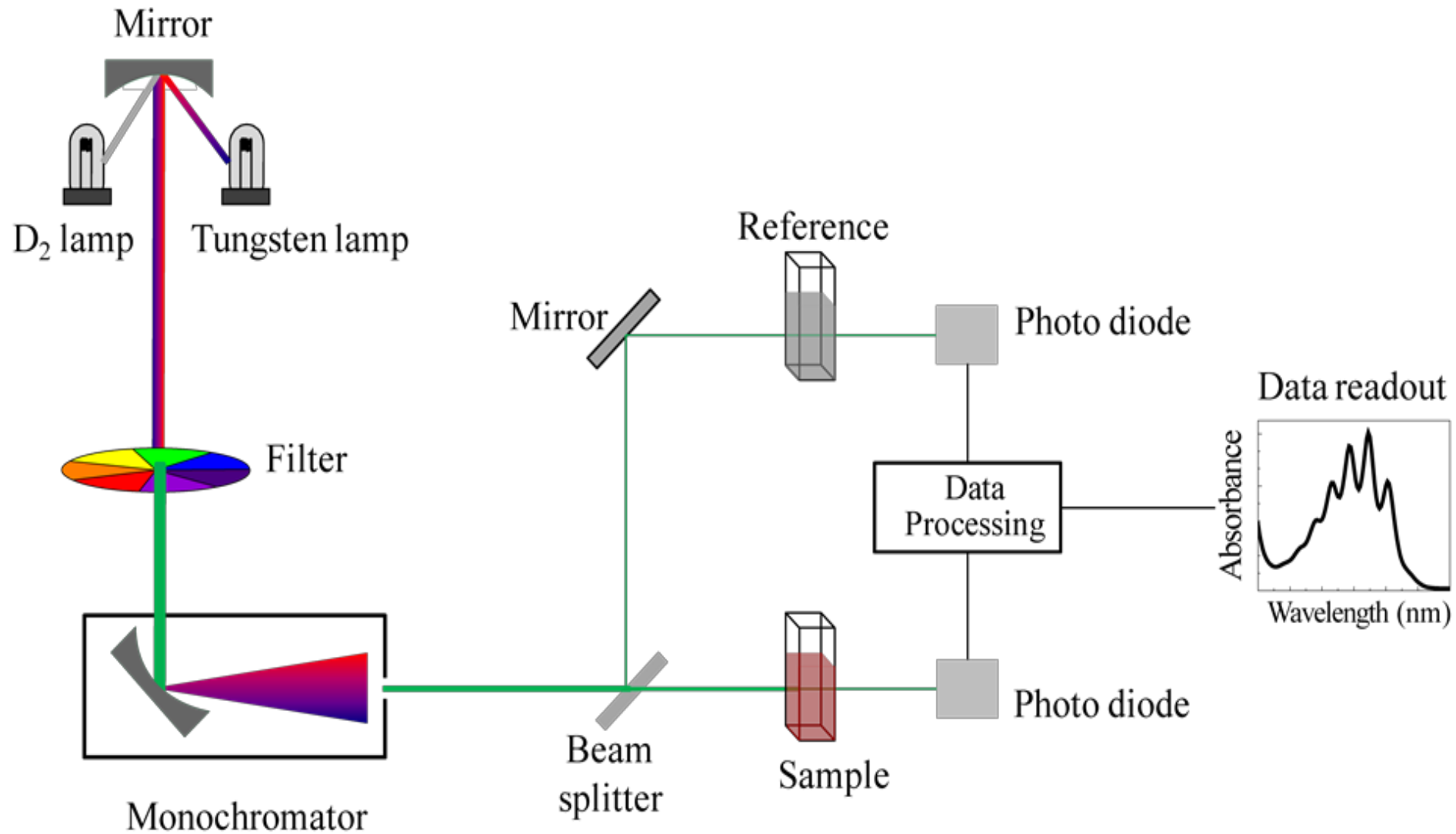


UV/visible spectrophotometer แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

- ★ **Single beam instrument:** ไม่มีการแบ่งลำแสง ต้องสลับวัดค่า A ของสารอ้างอิง และสารตัวอย่าง เหมาะกับการวัดการดูดกลืนความยาวคลื่นเดียว
- ★ **Double beam instrument:** ถูกแบ่งลำแสงเป็น 2 ส่วนโดย beam splitter เพื่อแยกให้แสงผ่านสารอ้างอิง และสารตัวอย่าง จึงวัดทั้ง 2 พร้อมกันได้



★ Output - %T, A, Conc. แสดงออกเป็นสเปกตรัม



★ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

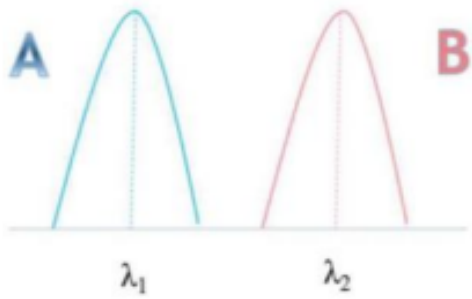
- พิสูจน์เอกลักษณ์ หาหมู่ฟังก์ชันบางชนิด หาสูตรโครงสร้างของสาร
- มีความจำเพาะเจาะจงน้อย **จำเป็นต้องอาศัยวิธีอื่นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ร่วมด้วย**
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ ทำโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง กับสารมาตรฐานที่สภาวะเดียวกัน และนำสเปกตรัมที่ได้เทียบกับข้อมูลของสารมาตรฐานที่ใช้อ้างอิง
- การเทียบสเปกตรัม พิจารณาจาก **ลักษณะรูปร่าง**ของสเปกตรัม $\lambda_{\max}$ และ $\epsilon_{\max}$

★ การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

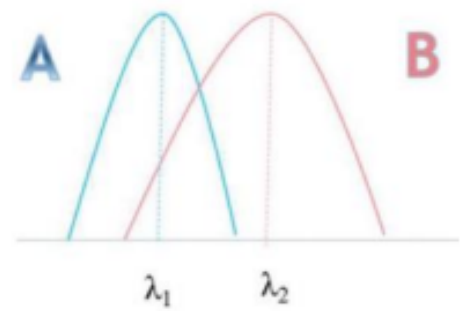
1. วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเดียว

- วิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ค่า **absorptivity มาตรฐาน**
เหมาะกับการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงตามพารามิเตอร์ต่างๆ ไม่สามารถหาสารมาตรฐานได้ หรือ สารมีราคาแพง โดย ค่า absorptivity มาตรฐาน หาจากเลขตัวรับ
- วิเคราะห์เชิงปริมาณโดย**เทียบกับสารมาตรฐาน**
เป็นการวัดสารตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โดยเทียบที่ความเข้มข้นเพียงจุดเดียว
 $C_s = (C_r \times A_s) / A_r$ เมื่อ s หมายถึง sample และ r หมายถึง reference
- วิเคราะห์เชิงปริมาณโดย**ใช้กราฟมาตรฐาน**
วัดสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน เตรียม STD Sol 4-5 conc. ให้ครอบคลุม conc. ที่สนใจ นำไปวัดค่า absorbance สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง conc. และ ค่า A ส่วนค่าความชันจะแสดงถึง A ที่ความยาวคลื่นที่ใช้ หา conc. ของตัวอย่างจากการแทนค่าในสมการเส้นตรงหรือใช้ค่า A จากกราฟมาตรฐานแทนในสมการเบียร์
- วิเคราะห์เชิงปริมาณโดย**เติมสารมาตรฐาน**
เป็นการวัดสารตัวอย่างที่มีสารอื่นปนอยู่ นิยมใช้กับการวิเคราะห์รูปแบบยาเตรียม
ทำโดยเติมสารมาตรฐาน conc. ต่างๆ ลงในสารตัวอย่างที่ conc. เดียวกัน นำไปวัดค่า absorbance และสร้างกราฟมาตรฐาน หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยลากกราฟตัดบนแกน x ที่จุดตัดคือความเข้มข้นของสารตัวอย่าง หรือคำนวณจากสมการเส้นตรง โดยแทนค่า $y=0$ ค่าที่ได้ คือ conc. ของสารที่ติดลบ

2. วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารผสม

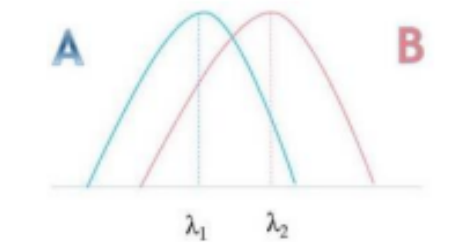


สารทั้งสอง มีค่าของการดูดกลืนแสงคนละช่วงความยาวคลื่น
แยกวิเคราะห์ โดยสร้างกราฟมาตรฐานของสารแต่ละตัวที่ $\lambda_{\max}$ ของสารทั้งสอง และวัด
ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสารผสมที่ $\lambda_{\max}$ ทั้งสองความยาวคลื่น แล้วเทียบกับ
กราฟมาตรฐาน

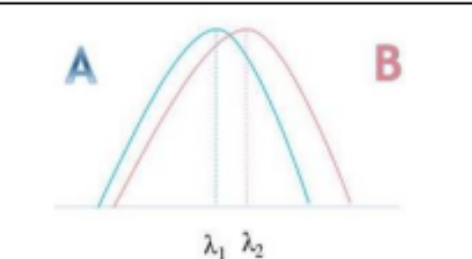


ช่วงการดูดกลืนของสาร 1 รบกวนการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} ของสาร 2 โดยที่การดูดกลืนแสงที่ λ_{max} ของสาร 1 ไม่ถูกรบกวน

ให้วิเคราะห์ปริมาณของสารที่ความยาวคลื่นไม่ถูกรบกวนก่อน โดยสร้างกราฟมาตรฐานที่ความยาวคลื่นนั้น แล้วนำปริมาณที่วิเคราะห์ได้ไปแทนค่าในสมการผลรวมของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 2



ช่วงการดูดกลืนแสงของสารทั้งสองรบกวนการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} ซึ่งกันและกัน
ให้วิเคราะห์ปริมาณของสารโดยใช้สมการหลายชั้น



ช่วงการดูดกลืนของสารทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันมาก รบกวนการดูดกลืนแสงซึ่งกันและกัน ใช้สมการหลายชั้นไม่ได้ ต้องทำการแยกสารออกจากกัน เช่น การสกัด การละลาย วิธีการทางโครมาโตกราฟี หรือใช้การทำอนุพันธ์ทางเคมี เพื่อช่วยให้การดูดกลืนแสงของสารทั้งสองแยกออกจากกันชัดเจนขึ้น

เทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของสารนั้นๆ โดยการผ่านคลื่นแสงอินฟราเรดช่วงความถี่ $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ ไปยังสารตัวอย่างที่ต้องการ

สเปกตรัมที่ได้จะแสดงออกมาในรูปความสัมพัทธ์ระหว่างความถี่หรือความยาวคลื่น และ % ความเข้มข้นของแสงส่องผ่าน (% Transmittance, %T) ซึ่งค่านี้เป็นค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มของคลื่นแสงที่ผ่านสารตัวอย่างกับความเข้มของรังสีที่ตกกระทบสารตัวอย่าง

% ความเข้มแสงที่ส่องผ่าน (%T) = $\left(\frac{\text{ความเข้มของรังสีที่ผ่านสารตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มของรังสีที่ตกกระทบสารตัวอย่าง}} \right) \times 100$

- อาศัยหลักการเกี่ยวกับการสั่น (Vibration) ของโมเลกุล
- เมื่อตัวอย่างได้รับคลื่นรังสีอินฟราเรดที่มีความถี่ตรงกับความถี่ของการการสั่นของพันธะโควาเลนซ์ในโมเลกุลของสาร -> จะเกิดการสั่นของโมเลกุล -> ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ (dipole moment) ของโมเลกุล -> ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสง -> วัดแสงที่ส่งผ่านออกมา แสดงผลเป็น **IR spectrum**
- ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะโมเลกุลของสาร จึงสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ที่ความถี่ที่แตกต่างกัน
- นำมาวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณ เช่น impurity และ คุณภาพ เช่น โครงสร้าง หมู่ฟังก์ชัน

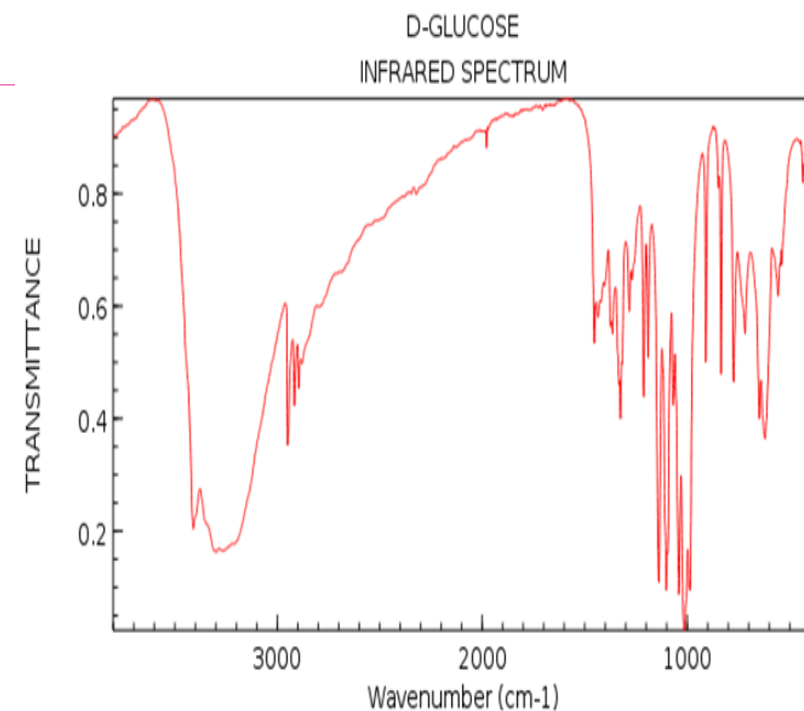
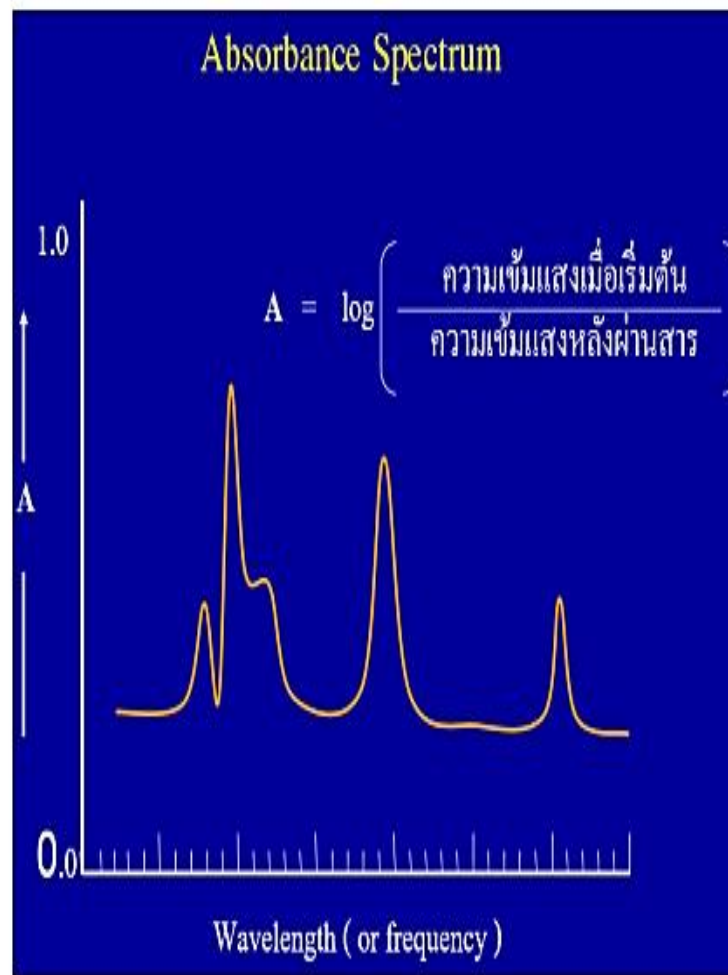
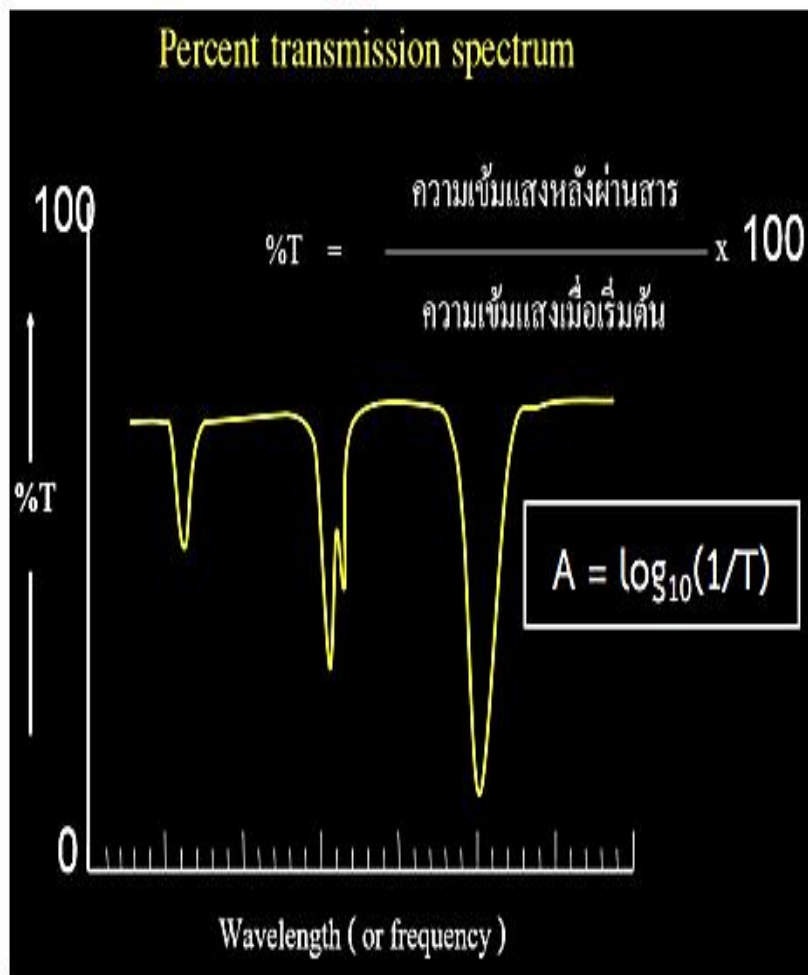
near infrared	$0.8 - 2.5 \text{ }\mu\text{m}$ หรือ $12,500 - 4,000 \text{ cm}^{-1}$
infrared region	$2.5 - 15 \text{ }\mu\text{m}$ หรือ $4,000 - 666 \text{ cm}^{-1}$
far infrared	$15 - 200 \text{ }\mu\text{m}$ หรือ $666 - 50 \text{ cm}^{-1}$

ช่วง infrared region เป็นช่วงที่นำมาใช้ใน IR spectroscopy แบบทั่วไป



IR Spectrum สามารถแสดงได้ 2 แบบ โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง ความถี่ หรือ Wave Number (แกน x) กับ

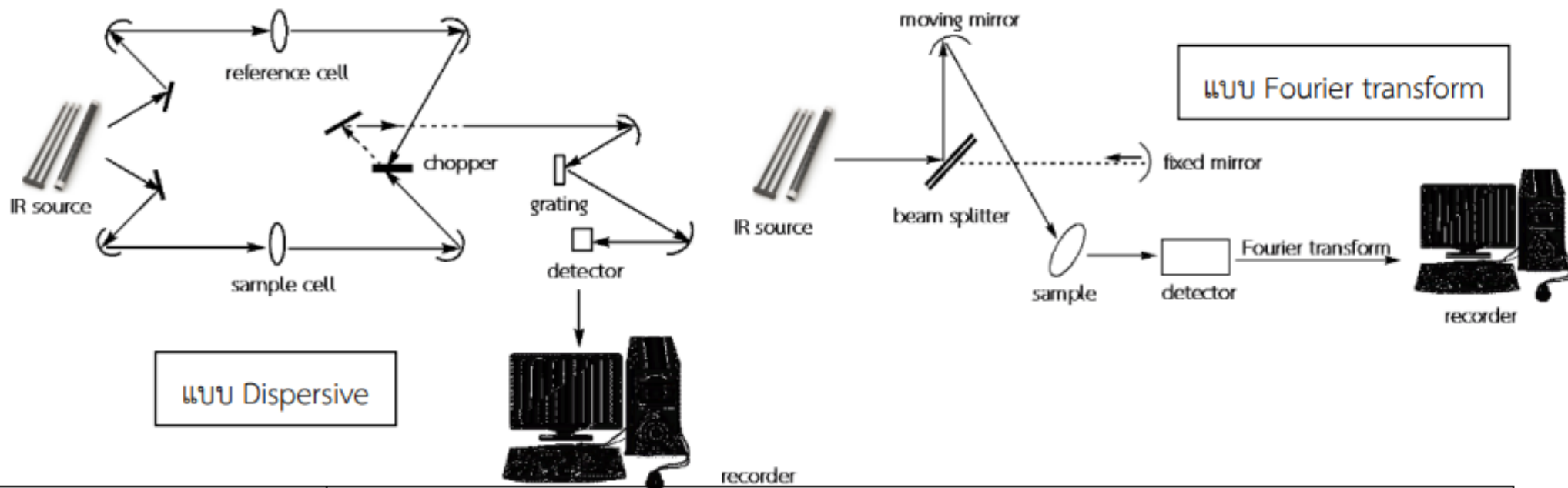
- %transmittance (%T) หรือ กับ
- Absorbance (A)



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Infrared spectrometer

แบ่งเป็น 2 แบบ คือ แบบกระจาย (Dispersive) และแบบ Fourier transform ซึ่งมีส่วนประกอบหลักๆ ดังนี้



1. แหล่งกำเนิดแสง	Nernst filaments (ZrO_2, ThO_2, CeO_2), Globar (Si Carbide), ลวดนิโครม ***แบบ dispersive ลำแสงจะแยกเป็น 2 ทางผ่านตัวอย่างและ ref
2. เซลล์ตัวอย่าง	สำหรับใส่ตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ ทำจากเกลือของแฮไลด์ (NaCl, KBr, LiF, AgCl) โปร่งใส ไม่ดูดกลืนรังสี IR ช่วงเดียวกับตัวอย่าง (ต้องป้องกันไม่ให้ถูกน้ำ)
3. Monochromater	เลือกความยาวคลื่น นิยมใช้ grating เพราะ resolution > prism ***มีเฉพาะแบบ dispersive, แบบ fourier จะเป็น interferometer
4. Detector	เปลี่ยนความเข้มของรังสีที่ผ่านตัวอย่าง เป็นสัญญาณไฟฟ้า
5. เครื่องบันทึก	บันทึกสัญญาณที่ออกมาจาก detector ออกมาเป็น spectrum (นิยมแสดงเป็น %T)

ขอขอบคุณ เนื้อหาจากเอกสารตีพิมพ์.เชียงใหม่

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างสถานะแก๊ส

บรรจุตัวอย่างตรงปลายstopcockของเซลล์ตัวอย่างที่มีระบบสุญญากาศ ตัวอย่างจะดูดกลืนรังสี IR ผ่านNaCl window

ตัวอย่างสถานะของเหลว

- กรณีของเหลวหนืด เตรียมโดยทาเป็นฟิล์มบางๆ บน window แล้วประกบด้วย window อีกแผ่น
- กรณีเป็นสารละลาย จะฉีดตัวอย่างลงใน window (มีหลายชนิด เช่น Sealed cells, Demountable cells, Variable thickness cells)

ตัวอย่างสถานะของแข็ง ★

- **Mull technique** บดตัวอย่าง 2-3 mg ในโกร่ง หยด Nujol (Mineral oil for IR) 1-2 หยด บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปใส่ใน window แล้วประกบด้วย window อีกชิ้น
 ***Nujol ดูด IR ที่ $3000-2800\text{ cm}^{-1}$, 1460 cm^{-1} ดูดปานกลาง, 720 cm^{-1} ดูดน้อย
 ***แก้ไขโดยใช้ Fluorolube ($4000-1330\text{ cm}^{-1}$)
- **KBr - pellet technique** บดผสมตัวอย่าง 1-2 mg + ผสีก KBr 200 mg (1-2%) ในโกร่ง นำมาตอกอัดที่แรง 10-15 ตัน 3-4 นาที แล้วนำมาใส่ตัวยึด (Holder)

ตัวอย่างสถานะของแข็งแข็ง

- กรณีไม่หนืดมาก ใช้เทคนิค thin film โดยใช้ Demountable cells
- กรณีหนืดมาก ใช้เทคนิค Mull technique

NIR

เป็นการผ่านคลื่นแสงในช่วง NIR ไปยังสารตัวอย่างที่ต้องการ ถ้าความถี่ของแสงตรงกันกับความถี่ของการสั่นในพันธะโมเลกุลของสาร ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างดูดกลืนพลังงาน แล้วเกิดการสั่น

สามารถวัดปริมาณรังสีที่ถูกดูดกลืนแสงโดยสามารถตรวจวัดพลังงานทำได้หลายประเภท เช่น

1. ตรวจวัดความเข้มแสงส่องผ่านตัวอย่าง (Transmittance)
2. การวัดความเข้มแสงสะท้อนกลับมาจากตัวอย่าง (Reflectance)
3. การวัดปริมาณแสงที่ส่องผ่านตัวอย่างไปตกกระทบวัตถุด้านหลังแล้วสะท้อนกลับมา (Transflectance)
4. การวัดแสงที่ออกจากใยแก้วนำแสง (Fiber optic probe) ไปยังตัวอย่างแล้วสะท้อนกลับมายังใยแก้วนำแสง (Interactance)

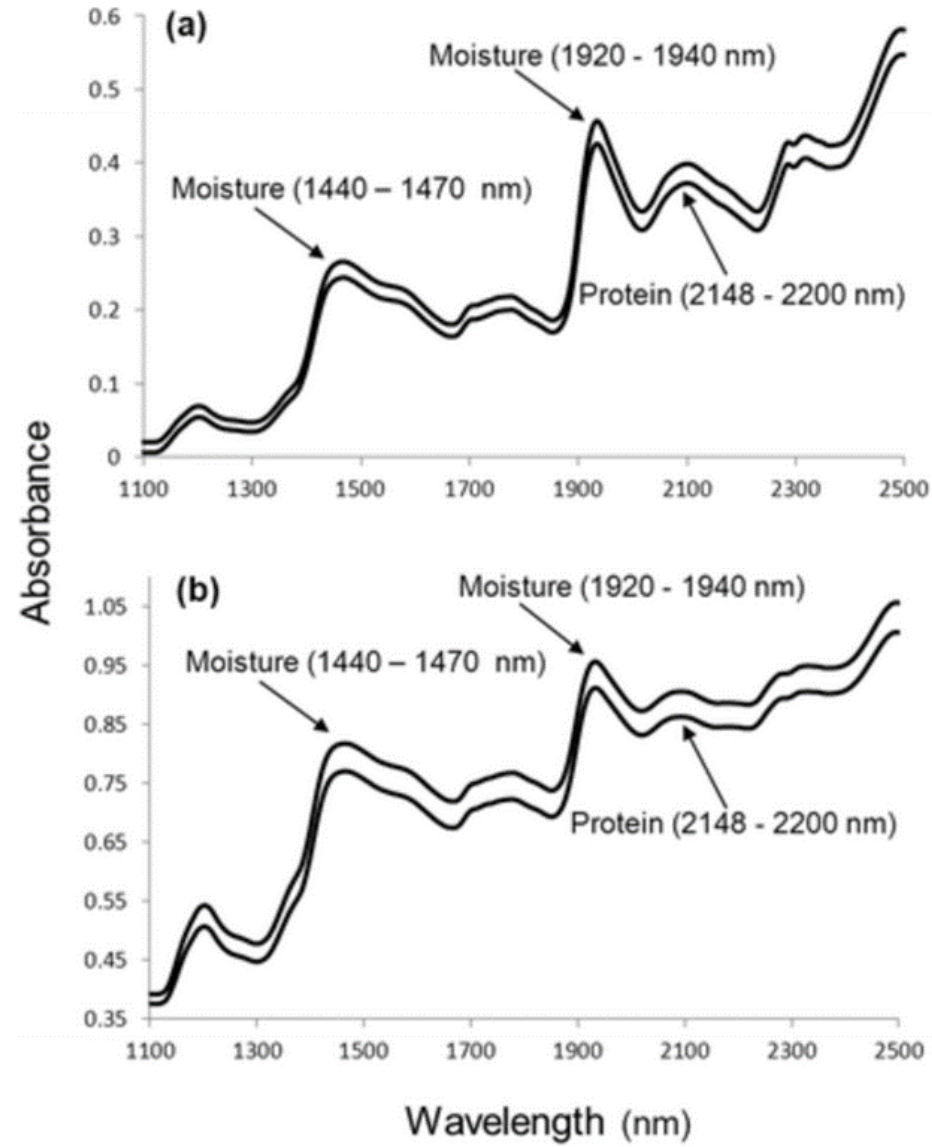
Near Infrared Spectroscopy, NIR

- ความถี่สูงกว่าช่วงอินฟราเรด หรือมีเลขคลื่น $12,500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (near ในที่นี้หมายถึง ความถี่ของแสงในช่วงดังกล่าว ค่อยไปทาง visible light)
- พีกของการดูดกลืนแสงในช่วง Near IR มีลักษณะเป็นพีกที่กว้าง (หรือแถบของการดูดกลืนแสง (absorption band)) เนื่องจากพีกของการดูดกลืนแสงหลายอันรวมกัน ทำให้สเปกตรัมที่ได้ยากต่อการวิเคราะห์
- โมเลกุลของสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน จะให้สเปกตรัมที่ต่างกัน
- หลักการโดยทั่วไปจะคล้ายกับ IR แต่ NIR จะเน้นไปที่การเปลี่ยนแปลงของพันธะระหว่าง C-H, N-H, O-H
- วิเคราะห์เชิงคุณภาพ เช่น ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ และการบ่งชี้สารประกอบอินทรีย์ได้ เช่น การบ่งชี้ วัตถุติด และคุณภาพของวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์ยา สารเคมี
- วิเคราะห์เชิงปริมาณ องค์ประกอบต่างๆ ของสารอินทรีย์ โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในระดับ ppm

หลักการ

1. ให้คลื่นในย่าน NIR ส่องไปยังตัวอย่าง
2. เกิดการดูดกลืนแสง แล้วมีการเปลี่ยนแปลงของพันธะ
3. ตรวจวัดคลื่นแสงที่ไม่ถูกดูดกลืน ซึ่งส่องผ่านออกมาด้วย Detector
4. ประมวลผลเป็นค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) วัดได้ 2 แบบ
 - ความเข้มแสงที่ส่องผ่าน (Transmittance)
 - ความเข้มแสงที่สะท้อนออกมา (Reflectance)
 ที่ความยาวคลื่นต่างๆ (แกน x)
5. เกิดเป็นสเปกตรัมที่มีลักษณะเฉพาะตัวในแต่ละตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์





ปัจจัยที่มีผลต่อ NIR spectrum

1. ขนาดอนุภาคของสารตัวอย่าง ถ้าขนาดเล็กค่าการดูดกลืนแสงจะต่ำ
2. อุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอาจส่งผลต่อความแม่นยำของสมการได้
3. ความชื้น ถ้าความชื้นสูง ค่าการดูดกลืนแสงจะสูง
4. ภาชนะบรรจุ ถ้าสารถูกอัดแน่นในภาชนะบรรจุมาก มีช่องว่างน้อย ค่าการดูดกลืนแสงจะต่ำ

Raman spectroscopy

หลักการทำงานของ Raman คือ การใช้คลื่นแสงในช่วงเลขคลื่นประมาณ $4000 - 100 \text{ cm}^{-1}$ ผ่านไปยังวัตถุดิบตัวอย่าง โดยปกติโมเลกุลของสารจะเสถียรอยู่ที่ระดับพลังงานหนึ่ง เมื่อมีคลื่นแสงตกกระทบที่โมเลกุลของสาร เกิดการกระตุ้นโมเลกุลของสารนั้นให้ไปอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงขึ้น และทำให้สภาพชั่วของโมเลกุลเปลี่ยนไปในระหว่างการสั่นของโมเลกุล เมื่อโมเลกุลของสารพยายามที่จะกลับตัวเพื่อให้อยู่ในสถานะปกติซึ่งมีพลังงานต่ำกว่า ทำให้เกิดการกระเจิงแสงขึ้นมา

ผลต่างพลังงานหรือความยาวคลื่นแสงที่ตกกระทบลงโมเลกุลกับพลังงานหรือความยาวคลื่นแสงที่กระเจิงออกมาจะเรียกว่า Raman shift ซึ่งการจะเกิด Raman Shift ได้ดีนั้น ขึ้นกับว่าโมเลกุลของสารถูกกระตุ้นหรือรบกวนได้มากน้อยแค่ไหน ถ้าโมเลกุลของสารได้รับแสงตกกระทบแล้วเกิดการสั่นจนทำให้สภาพชั่วของโมเลกุลนั้นเปลี่ยนแปลงไปได้ง่าย ก็จะทำให้เกิดการกระเจิงแสงแบบ Inelastic process ได้ง่ายทำให้เกิด Raman shift และแสดงเป็นพีคสเปกตรัมของ Raman ต่อไป

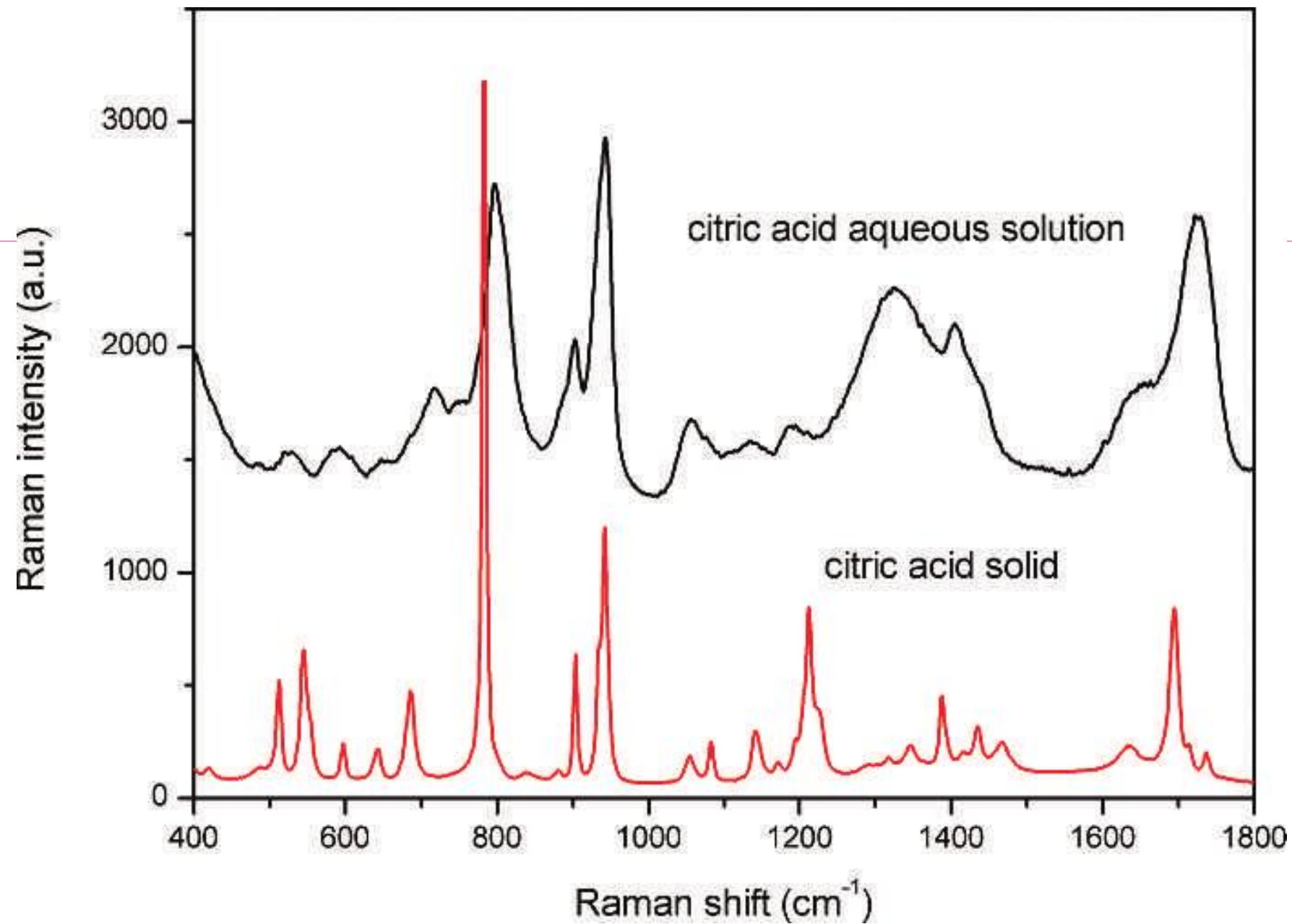
- เป็นเทคโนโลยีทาง **vibrational spectroscopy**
- อาศัยหลักการกระเจิงของของอนุภาคแสง เมื่อชนกับโมเลกุลของสาร (การกระเจิงแสงแบบ raman)
- สารแต่ละชนิดจะเปลี่ยนความถี่ของแสงหลังการชนได้แตกต่างกัน และให้ความเข้มของแสงที่กระเจิงออกมาได้ไม่เท่ากัน จึงใช้ศึกษาโครงสร้างของสารได้
- Raman shift คือ ผลต่างของความถี่ของแสงที่ตกกระทบ กับความถี่ของแสงที่กระเจิง ซึ่งจะตรงกันกับความถี่ของการสั่นของพันธะในโมเลกุล ที่วัดได้จาก IR

หลักการ

ให้ laser ความยาวคลื่นหนึ่งผ่านสารหนึ่ง จะเกิดเหตุการณ์ต่อไปนี้

- อนุภาคแสงจำนวนหนึ่งทะลุผ่านไป
 - อนุภาคแสงบางส่วนจะชนเข้ากับโมเลกุลของสาร แล้วเปลี่ยนทิศทางการชน
 - การชนแบบยืดหยุ่น เรียก Rayleigh scattering ส่วนมากพลังงานของแสงหลังการชนจะไม่เปลี่ยนแปลง
 - การชนแบบไม่ยืดหยุ่น เรียก Raman scattering โดยพลังงานของแสงหลังการชนจะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เพราะแลกเปลี่ยนพลังงานกับโมเลกุลของสาร แสงอาจมีความถี่มากขึ้น หรือน้อยลงก็ได้
- Stokes raman scattering คือ แสงเข้าชนโมเลกุลสภาวะพื้น ความถี่แสงหลังการชนลดลง (**นิยมวัดอันนี้ เพราะสารส่วนใหญ่จะอยู่ในสภาวะพื้น)
 - Anti-stokes raman scattering คือ แสงเข้าชนโมเลกุลในสภาวะกระตุ้น ความถี่หลังการชนของแสงจะเพิ่มขึ้น

Anti-Stokes Raman scattering



การประยุกต์ใช้

ใช้ในการ Iden ส่วน NIR และ Raman สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็วและสามารถ
ตรวจผ่านภาชนะบรรจุได้

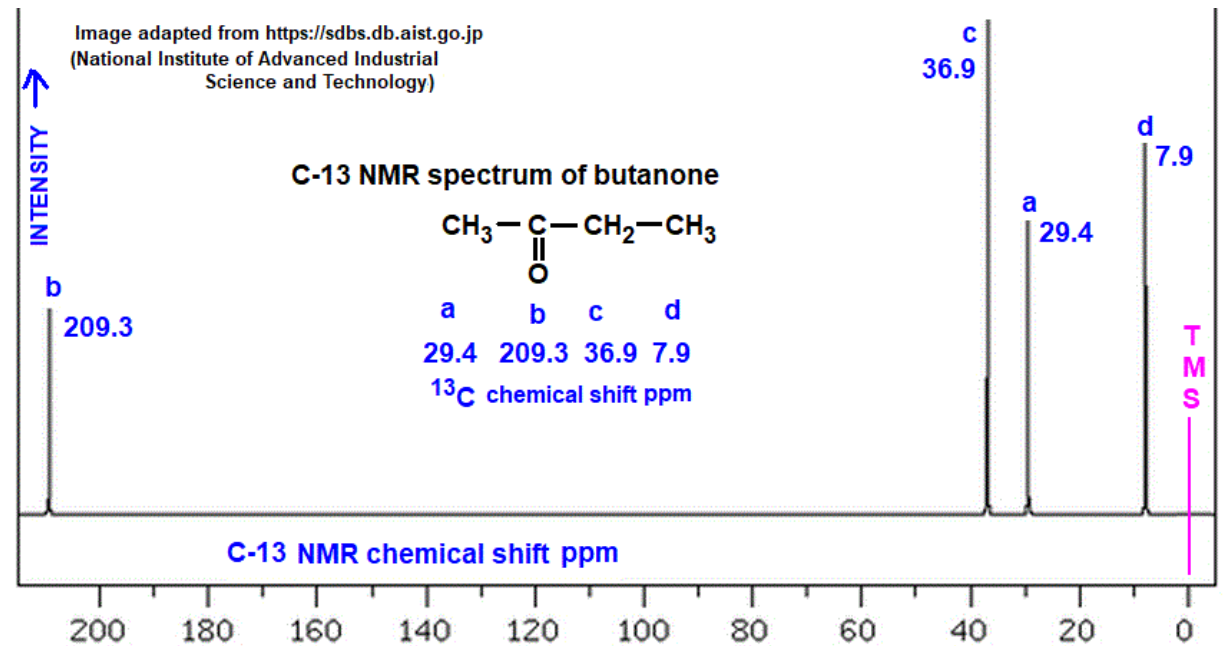
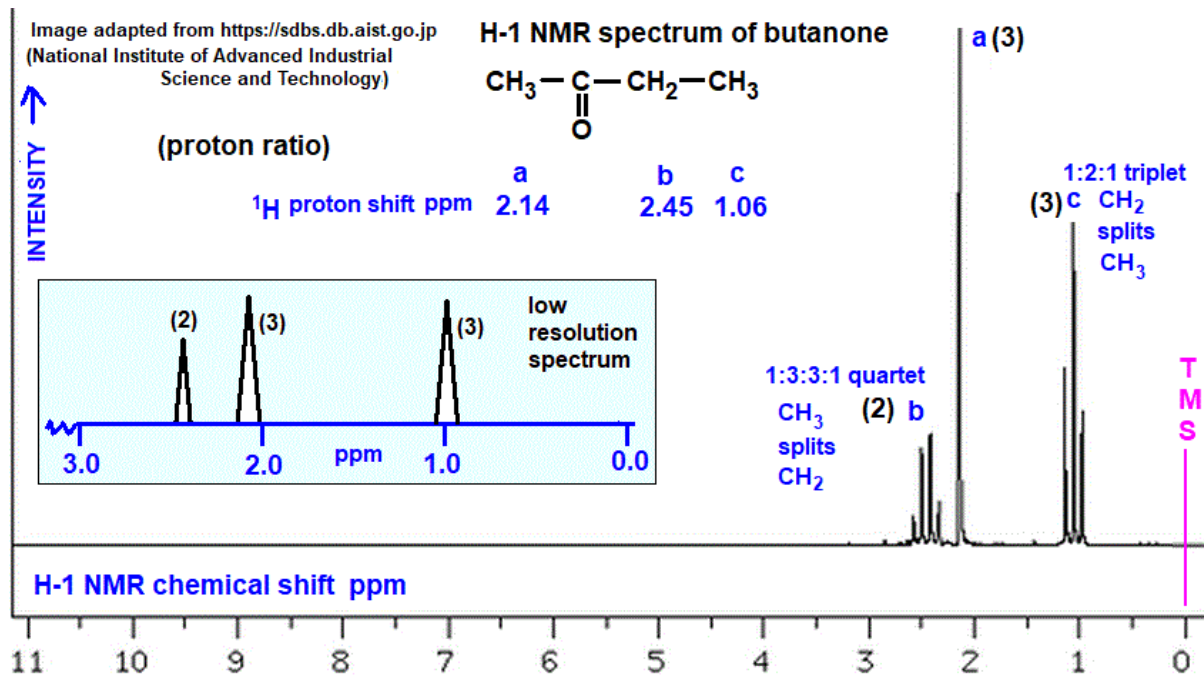
NMR : หลักการ

- NMR ให้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของอะตอมและอะตอมใกล้เคียงกับอะตอมอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษานิวเคลียสของ Hydrogen atom ที่เรียกว่า $^1\text{H-NMR}$ และการศึกษาของนิวเคลียสของ Carbon atom ที่เรียกว่า $^{13}\text{C-NMR}$
- ภายในนิวเคลียสของอะตอมจะประกอบด้วย Proton โดย Proton เหล่านี้จะมีการหมุนรอบนิวเคลียสตามปกติ และเมื่อใส่สนามแม่เหล็ก (B_0) เข้าไป ทำให้เกิด Nuclear magnetic moment (μ) และเมื่อใส่ “คลื่นความถี่วิทยุ” ที่เหมาะสมเข้าไป จะทำให้ Proton เกิด Resonance แล้วสามารถวัดออกมาได้เป็น Chemical shift
- Solvent ที่ใช้อยู่ในรูป Deuterated solvent เช่น ^2H , หรือ D, หรือ CDCl_3 , หรือ CD_3OD เพื่อลดการรบกวนสัญญาณของตัวอย่าง
- ตัวอย่างต้องอยู่ในรูป Solution
- Reference standard ที่ใช้คือ TMS (Tetramethylsilane) ซึ่งบอกเป็นตำแหน่งศูนย์ (Mark a zero) บนสเปกตรัม

NMR

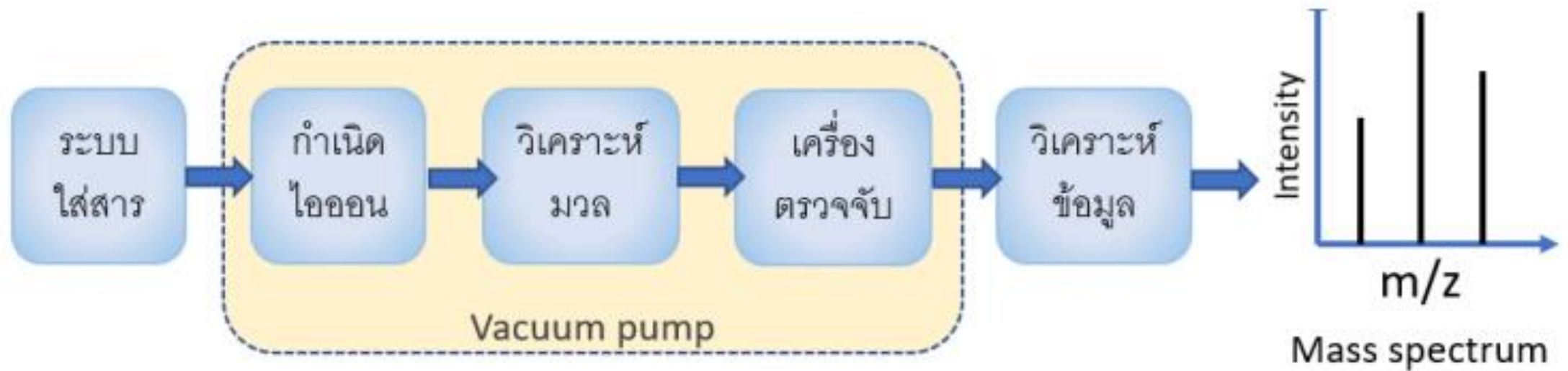
สามารถบอกโครงสร้างได้ การนำไปใช้เน้นไปในทาง Qualitative analysis คือ Identification (ทราบจำนวน C H)

NMR Spectrum แกน X คือ Chemical shift (ppm) ส่วนแกน y คือ Intensity

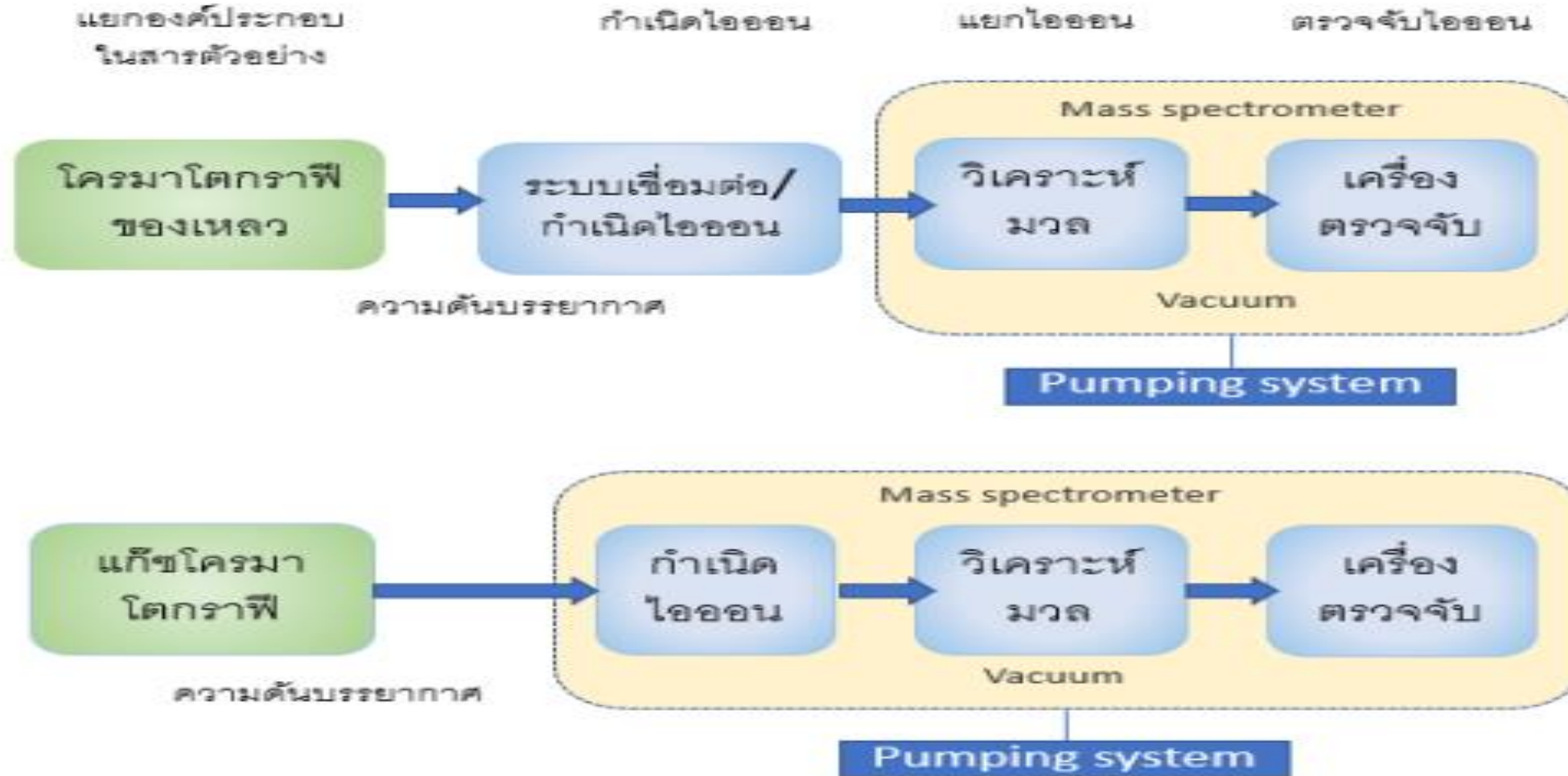


MS

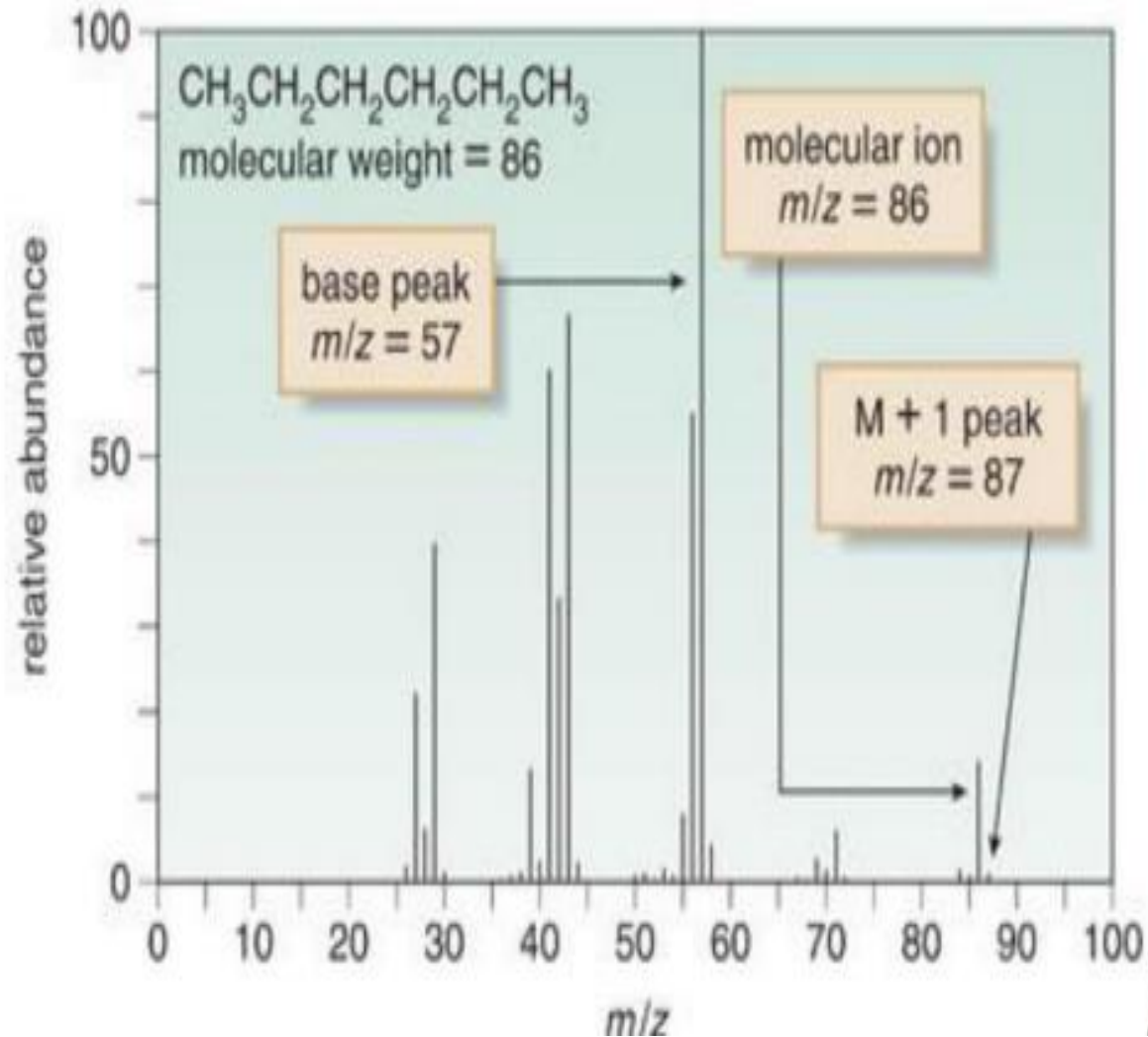
MS spectrum แกน X คือ Mass to charge ratio (m/z) ส่วนแกน y คือ % Abundance ของ Ion



รูปที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (ดัดแปลงจาก [6])



รูปที่ 2 แผนภาพ LC-MS และ GC-MS (ดัดแปลงจาก [1])



Mass Spectrum

- ความสัมพันธ์ระหว่าง **Relative Abundance** (ความสูง) กับ **m/z ratio**
- **Base peak** คือ peak ของ m/z ที่มีความสูงมากที่สุดใน mass spectrum
- ทุก peak จะคำนวณ abundance เป็น %
- **บันทึกเฉพาะ fragment ions** ไม่บันทึก neutral fragments

Base peak (เป็นปริมาณ ion มากที่สุด)

การประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์

1. Qualitative analysis

น้ำหนักโมเลกุล สูตรโมเลกุล รูปแบบ Fragmentation ของตัวอย่างที่ออกมาใน Spectrum จะบอก Functional group ของสารตัวอย่างได้

Identification โดยเปรียบเทียบกับ Reference standard

2. Quantitative

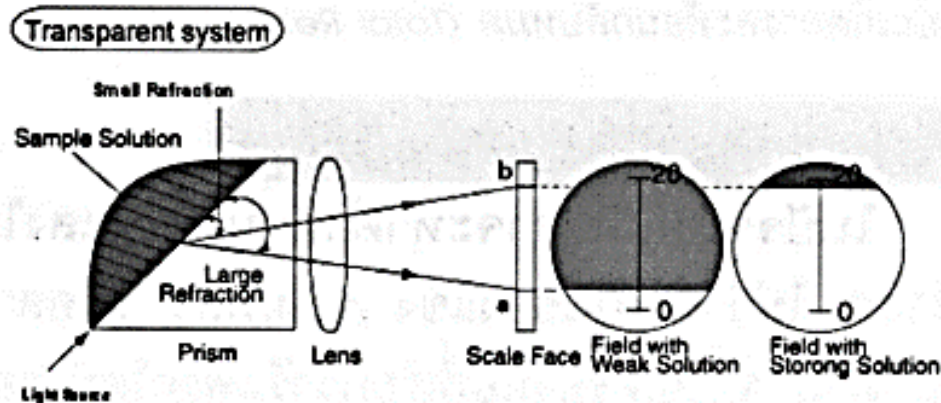
การหาปริมาณโมกุลในตัวอย่างอินทรีย์

การหาปริมาณธาตุในตัวอย่างอนินทรีย์

Reflectometer

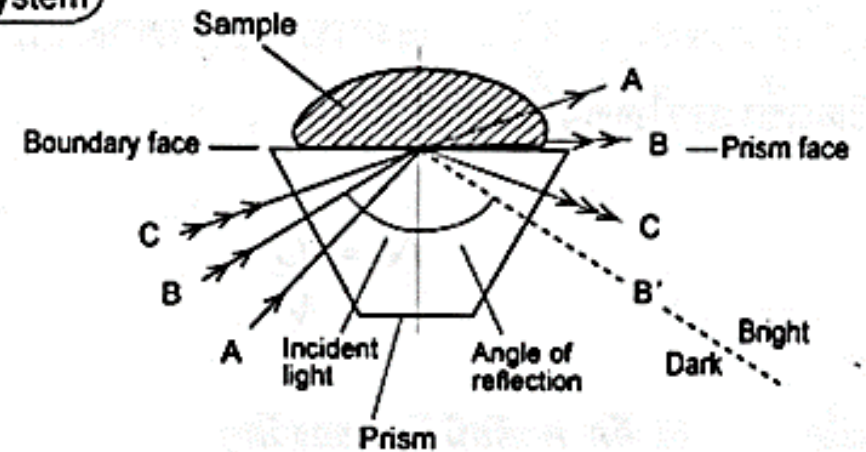
อาศัยหลักการหักเหแสง วัดออกมาเป็นค่า Refractive index ซึ่งสารทั่วไปจะมีค่า Refractive index ที่จำเพาะต่อตัวกลางนั้นๆ

นิยมใช้ในการ Iden วิเคราะห์คุณภาพของเหลว เช่น น้ำมันหอมระเหย ตัวทำละลาย ไม่นิยมวิเคราะห์แข็ง ปริมาณ



ภาพที่ 4 แสดงการวัดค่าดัชนีหักเหในระบบส่องผ่าน [1]

Reflection System



ภาพที่ 5 ระบบการวัดค่าดัชนีหักเหแบบสะท้อนกลับ [1]

Atomic spectroscopy

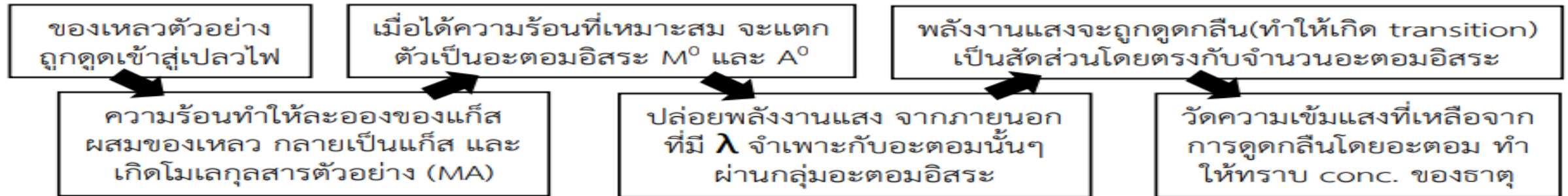
- อาศัยสมบัติของอะตอมในการปล่อย หรือดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าเฉพาะตัวของแต่ละธาตุภายใต้สภาวะหนึ่งๆ
- ต้องมีการผลิตสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปอะตอมอิสระก่อน โดยให้พลังงานเข้าไป
- เป็นการศึกษาอันตรกิริยาระหว่าง อะตอมของธาตุ กับ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า
- แบ่งได้หลักๆ 2 เทคนิค คือ
 - Atomic absorption spectroscopy (AAS)
 - Atomic emission spectroscopy (AES) หรือ plasma spectroscopy
 - (เพิ่มเติม คือ Atomic Fluorescence spectroscopy; AFS)



Atomic absorption spectroscopy (AAS)

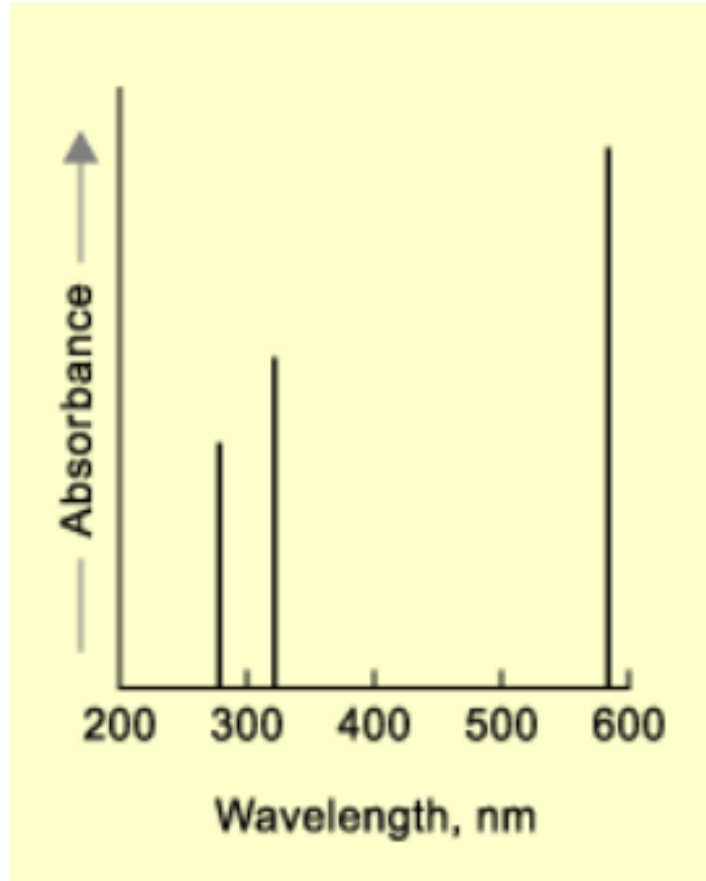
- เป็นกระบวนการที่อะตอมอิสระ (free atom) ของธาตุ ดูดกลืน (absorb) แสงที่มีความยาวคลื่นระดับหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งขึ้นอยู่กับธาตุแต่ละธาตุ

กระบวนการ



เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์โลหะหนัก (Metal Element) ที่อยู่ในตัวอย่างเมื่อโลหะมีความเข้มข้นมากจะดูดกลืนพลังงานแสงได้มาก

ขอขอบคุณ เนื้อหาจากเอกสารตีพิมพ์.เชียงใหม่



Atomic absorption spectrum



ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความยาวคลื่น

วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ

1. Calibration curve
2. Standard addition

การบ้าน

ชุด B 27 28 55

ชุด C 9 10 42