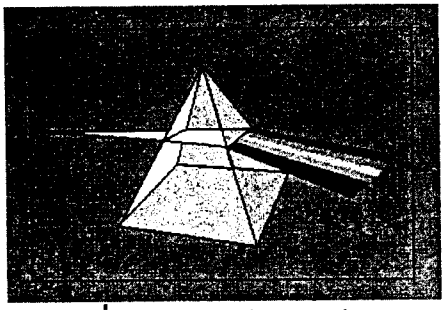
บทที่ 8
การใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการวิเคราะห์อาหาร
(Spectrophotometer for Food Analysis)

Spectroscopy คือ การศึกษาการเกิด interaction ระหว่างคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ากับอนุภาค

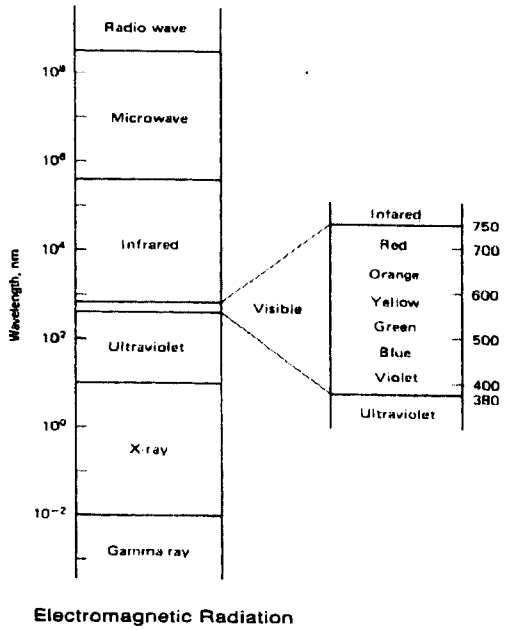
Spectrophotometry คือ การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารที่มีสีโดยใช้เครื่องมือ spectrophotometer แต่เดิมเป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายที่มีสี ต่อมาพบว่ามีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างๆเช่น Infrared, Ultraviolet และ visible (เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์ เมื่อแสงผ่านสารตัวอย่างโมเลกุลในสารจะถูกกระตุ้นและดูดกลืนแสงไว้ ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารตัวอย่าง) และใช้เทคนิคในการวัดปริมาณความเข้มข้นของแสง ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า spectrophotometry สามารถแบ่งตามความยาวคลื่นดังนี้คือ

1. Infrared spectrometry วัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นระหว่าง 1 – 15 μm
2. Ultraviolet spectrometry วัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นระหว่าง 200-380 nm
3. Visible spectrometry วัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นระหว่าง 380-780 nm

ซึ่งประกอบด้วยช่วงคลื่นแคบๆของ สเปคตรัม มีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า แต่ละช่วงคลื่นจะมีสีเฉพาะซึ่งตามองเห็นได้

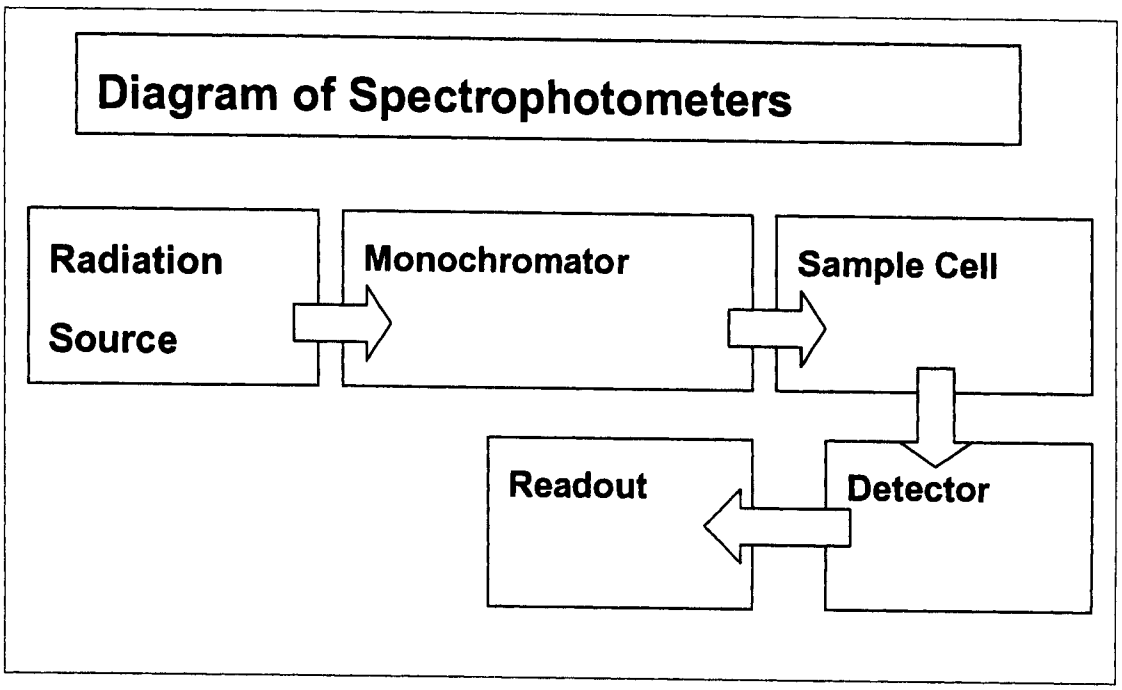


ภาพที่ 8.1 แถบสีสเปคตรัม

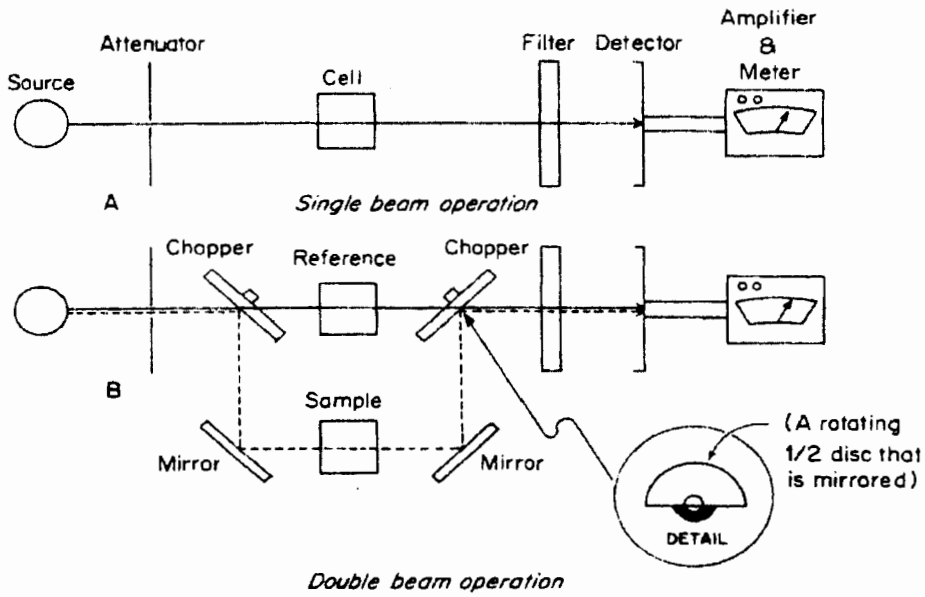


ภาพที่ 8.2 คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าต่างๆ

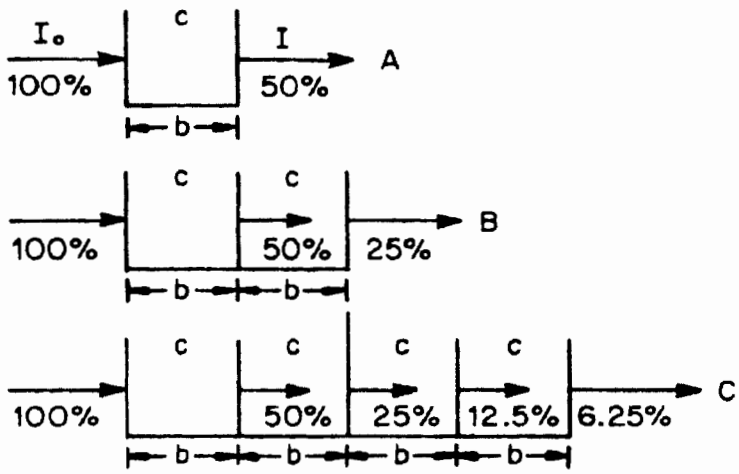
ที่มา : Larry G. Hargis, (1988)



ภาพที่ 8.3 ส่วนประกอบต่างๆภายในเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์



ภาพที่ 8.4 ส่วนประกอบต่างๆของ Double Beam Spectrophotometer



ภาพที่ 8.5 ผลของขนาดเซลที่ใช้ในสเปคโทรโฟโตมิเตอร์

หลักการที่สำคัญคือสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องมีสีหรือทำปฏิกิริยากับสารอื่นแล้วทำให้เกิดสีในช่วงการวัด visible แต่ถ้าวัดในช่วง UV สารตัวอย่างไม่มีสี สารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในช่วงคลื่นนี้ควรมีคุณสมบัติดังนี้คือ

3.1 สีของสารตัวอย่างจะต้องมีสีคงที่ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง

3.2 สีของสารตัวอย่างต้องมีความเข้มข้นมากพอที่จะวัดการดูดกลืนแสง แม้ว่าจะมีปริมาณเล็กน้อย

3.3 สีของสารตัวอย่างจะต้องไม่เปลี่ยนแปลงหรือจางลง แม้ว่าอุณหภูมิหรือค่าความเป็นกรดด่างจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย

3.4 ปฏิกิริยาของสารละลายที่ทำให้เกิดสารที่มีสีกับสารที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องให้สารที่มีสีชนิดเดียวเท่านั้น

3.5 สารละลายที่ทำให้เกิดสีกับสารตัวอย่างจะต้องไม่ดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นเดียวกันตลอดการทดลอง

การดูดกลืนคลื่นแสงหรือรังสีในช่วง ultraviolet และ visible มีความยาวคลื่นประมาณ 190-800 nm ใช้ได้กับสารเคมีส่วนใหญ่ ได้แก่ สารอินทรีย์ หรือสารประกอบเชิงซ้อนหรือสารอนินทรีย์ทั้งที่มีสีและไม่มีสีเรานิยมเรียกเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยรังสีในช่วง ultraviolet และ visible ว่า UV-VISIBLE SPECTROMETRY แต่ถ้าสารที่ทำการวิเคราะห์มีสีหรือทำให้เกิดสีขึ้น สารที่มีสีนั้นจะดูดกลืนแสงในช่วง visible อาจเรียกว่า colorimetry

ตารางที่ 8.1 ตารางสเปกตรัมของแสงที่มองเห็นได้

ช่วงคลื่น	สีที่ถูกดูดกลืน	สีที่มองเห็นได้
380	Ultraviolet	------
380-435	Violet	Yellow-green
435-480	Blue	yellow
480-490	green-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
780	Near infrared	------

เครื่อง Spectrophotometer มีส่วนประกอบพื้นฐาน คือ source , attenuatery device , monochromator , cells , detector , amplifier และ signal processor

Radiation Source (แหล่งกำเนิดแสง) ให้แสงอย่างต่อเนื่อง (Continuous)

♦ Tungsten Lamp ให้แสงในช่วง 350-1000 nm ถ้าเป็นช่วง visible จะใช้หลอด tungsten ประมาณ 15%ของพลังงานจากหลอดทังสเตนจะอยู่ในช่วง visible มีเพียง 2-3% ของรังสีจากหลอดทังสเตน ซึ่งเป็นหลอดแก้วสุญญากาศ ภายในมีไส้หลอดทำด้วยลวดทังสเตนให้ศักย์ไฟฟ้า จนกระทั่งหลอดร้อนถึง 3000 Kelvin ไส้หลอดจะแผ่รังสีออกมาเป็นคลื่นแสงแบบต่อเนื่อง โดยมีธาตุ Halogen อยู่ภายในหลอด เช่น Bromine, Iodine เป็นต้น เพื่อยืดอายุการใช้งานของหลอด

♦ Ultraviolet radiation ให้แสงในช่วง 185-375 nm เป็นหลอดแก้วกลวง ภายในบรรจุก๊าซไฮโดรเจนที่ความดันต่ำ มีลวด filament ทำด้วยโลหะออกไซด์ ต่ออยู่ระหว่าง cathode และ anode ให้ศักย์ไฟฟ้าต่ออยู่ระหว่างขั้ว 40 volt ลวดร้อนจัดแล้วคาย electron ออกมา เรียกว่า electron ที่มีพลังงานสูง เคลื่อนที่ชนโมเลกุลของแก๊สที่ exited state แล้วคายพลังงานแสงเมื่อกลับมาสู่ ground state แหล่งกำเนิดแสงในช่วง UV นิยมใช้ hydrogen discharge lamp , mercury vapor lamp และ deuterium (D_2) discharge lamp

Attenuating Devices : เป็นส่วนที่ดึงปริมาณรังสีจากแหล่งกำเนิดแสง ถ้าใช้ wavelength ต่างกันปริมาณรังสีก็ต่างกัน ส่วนอุปกรณ์ประกอบอื่นๆ เช่น cells ,สารเคมี, monochromators จะดึงดูดรังสีเท่ากัน

$$I = kv''$$

V = voltage , k = ค่าคงที่ , I = intensity

ปริมาณความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนตรงกับ voltage

Cells : cells หรือ cuvette ที่ใช้อาจเป็นชนิดกลมหรือเหลี่ยม

ถ้าเป็นช่วง visible นิยมใช้ชนิดทำจากแก้ว หรือพลาสติกใส

ถ้าเป็นช่วง UV นิยมใช้ Quartz และ fused silica Quartz จะกระจายแสงดีกว่า fused silica แต่ fused silica สามารถให้แสงผ่านได้ถึง 185 nm.

ขณะที่ Quartz แสงผ่านได้แค่ 200 nm

♦ การทำความสะอาดใช้กรดเจือจาง เช่น กรดไนติกเจือจางหรือกรดโครมิกแช่ล้าง และล้างสะอาดด้วยน้ำกลั่นหรือผงซักล้างที่เหมาะสม และทำความสะอาดสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บใส่กล่องสำหรับเก็บเซลล์

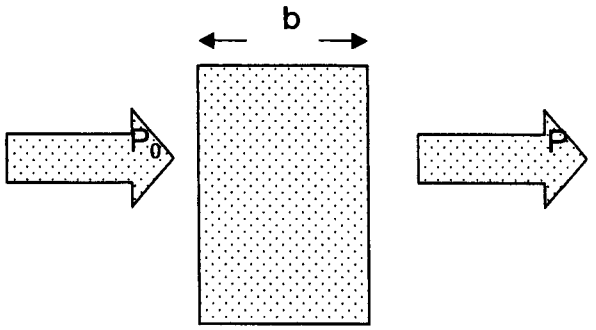
♦ ไม่ควรใช้แปรงหรือผ้าทำความสะอาด cuvettes ควรใช้ cotton bud ชนิดที่ก้านทำจากกระดาษและหุ้มปลายด้วยสำลี

Detector (เครื่องวัดแสง)

1. Phototube ทำด้วยแก้วหรือ silica ภายในเป็นหลอดสุญญากาศ ที่ cathode ฉาบด้วยสารที่สามารถให้ electron เมื่อถูกแสง
2. Photomultiplier tube มีสภาพไวดีกว่าใช้ในช่วง 190-900 nm
3. Silicon diode detector

Signal processor ประกอบด้วย meter บอกค่า A, %T เป็น scale, Digital meter บอกค่า A, %T เป็นตัวเลข เครื่องบันทึก หรือเครื่องพิมพ์ เครื่องคอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงานของเครื่องมือชนิดนี้

Attenuation of a beam of radiation by an absorbing solution



$T = P/P_0$

$T = \log P_0/P$

Absorbing solution of concentration C

ภาพที่ 8.6 แสดงทางเดินของแสงผ่านสารตัวอย่าง

Transmittance (T) คือค่า ที่แสดงอัตราส่วนของกำลังแสงที่ผ่านจาก absorbing species นิยามโดย

$T = P/P_0$

P_0 คือ ความเข้มของแสงก่อนผ่าน absorbing species

P คือ ความเข้มของแสงหลังผ่าน absorbing species

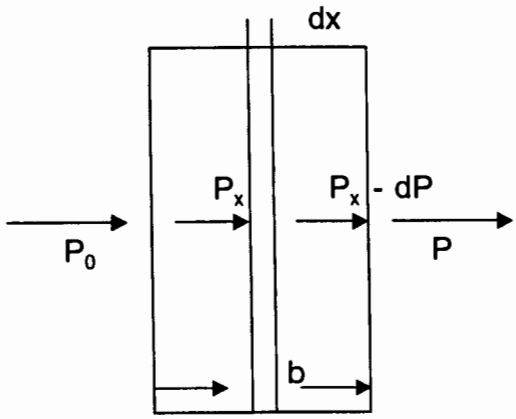
Absorbance (A) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

$$A = -\log T$$
$$= \log (P_0 / P)$$

Molar absorptivity (ε) คือ ค่าที่แสดงถึงความสามารถในการดูดกลืนแสงของ absorbing species ที่ความยาวคลื่นที่กำหนด มีหน่วยเป็นลิตรต่อโมล-เซนติเมตร และ c มีหน่วยเป็น โมล/ลิตร

$$\varepsilon = A/bc$$

Absorption Law



ภาพที่ 8.7 แสดงทางเดินของช่วงคลื่นที่ผ่านสารตัวอย่าง

dp	=	$-kP_x\,cdx$
c	=	ความเข้มข้นของสารดูดกลืนแสง
P_x	=	กำลังแสงที่เข้าไปในสารละลายที่มีความหนา dx
k	=	ค่าคงที่

$-dp/P_x = kcdx$

$-(\ln P - \ln P_0) = kcb$

$\log P_0/P = kcb/2.303$

$= \varepsilon bc$

$A = -\log T = \varepsilon bc$

Beer's Law คือ กฎที่แสดงความสัมพันธ์ของแสงที่ส่งผ่านสารละลาย การดูดกลืนความเข้มข้นและระยะทางที่แสงผ่าน

$T = P/P_0$

$P/P_0 = 10^{-\varepsilon bc}$

$A = -\log T$

$= \log (P/P_0)$

$= \varepsilon bc$

A = ค่าการดูดกลืนแสง

ε = molar absorptivity ($L\text{-}mol^{-1}cm^{-1}$)

b = ความกว้างของเซลล์

c = ความเข้มข้นของสารละลาย (mole/L)

ตัวอย่าง 8.1 เมื่อผ่านแสงเข้าไปในเครื่อง spectrophotometer ค่า P_0 = 100% เมื่อแสงถูกดูดกลืนไปครึ่งหนึ่ง ค่า P = 50%

$A = \log (100/50) = 0.301$

เมื่อแสงถูกดูดกลืนเข้าไป 90% แสงจะถูกปล่อยออกมา 10%, P = 10%

$A = \log (100/10) = 1.0$

ข้อจำกัดของการใช้ Beer's Law

- สารละลายต้องเป็นเนื้อเดียวกัน
- อยู่ในช่วงความเข้มข้นพอเหมาะ
- ใช้แสงที่มีคลื่นเดียว (monochromatic light)

- การดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดเป็นอิสระต่อกัน
- แสงที่ผ่านสารละลายต้องตกกระทบตั้งฉากกับผิวของตัวกลาง

การเบี่ยงเบนจาก Beer's Law

- กราฟมาตรฐานไม่ผ่านจุด 0
- กราฟมาตรฐานไม่เป็นเส้นตรงตลอดช่วง
- ค่า absorbance ที่วัดได้ไม่เป็นปฏิภาคกับความเข้มข้น

สาเหตุการเบี่ยงเบนจาก Beer's Law

- Chemical Reaction เนื่องจากสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์เกิดปฏิกิริยา
  - เกิดปฏิกิริยากับตัวทำละลายที่ใช้
  - เกิดการ polymerization
  - เกิดการรวมตัวและสลายตัว

1. ผลของสมดุลเคมี (chemical equilibrium)

สารหรือไอออนที่จะทำการวัดอาจเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นอยู่กับสมดุลเคมี เช่น

$$C_6H_5COOH + H_2O \longrightarrow C_6H_5COO^- + H_3O^+$$

λ_{max} = 273 nm $\qquad$ λ_{max} = 268 nm

ε_{max} = 970 $\qquad$ ε_{max} = 650

$$Cr_2O_7^{2-} + 3\,H_2O \longrightarrow CrO_4^{2-} + 2\,H_3O^+$$

λ_{max} = 350 nm $\qquad$ λ_{max} = 372 nm

2. ผลของความเข้มข้น (concentration effect)

กฎของ Beer 's ใช้ได้ดีสำหรับสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆเท่านั้น ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 M จะพบว่าค่า ε ไม่คงที่ ε ขึ้นกับดรรชนีหักเหของสาร

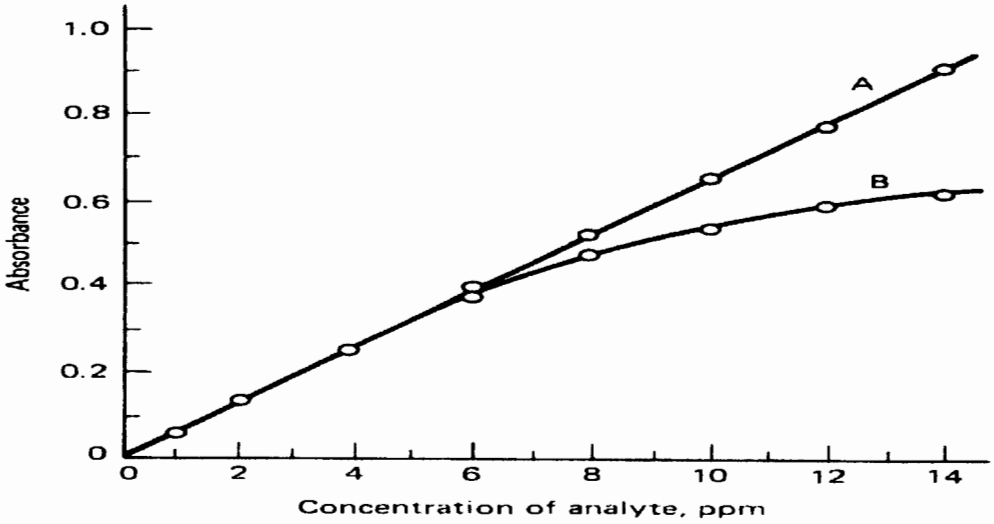
3. ผลของอุณหภูมิ (temperature effect)

ควรควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ($\pm$ 5°ซ) ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอาจทำให้เกิด red shift

4. ผลของตัวทำละลายที่ใช้ (solvent effect)

ตัวทำละลายพวกที่มี dielectric constant สูง ทำให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยนตำแหน่ง เกิด red shift หรือ blue shift ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนระดับพลังงาน

5. ผลที่เกิดจากแสง (photo effect) เมื่อใช้แสง UV อาจมีผลต่อสารเคมีบางชนิดในสารละลาย ทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งมีผลต่อการ ดูดกลืนแสง สารละลายที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์หรือขุ่นเล็กน้อย จะกระเจิงแสงได้



ภาพที่ 8.8 การเบี่ยงเบนจากกราฟมาตรฐาน

เกิดจากปัญหาของเครื่องมือ

1. Polychromatic radiation ซึ่งตามกฎของ **Beer's Law** ควรเป็น monochromatic radiation ซึ่งการทำงานเราใช้แสงที่เป็นแถบแคบๆ แทนที่จะใช้เป็นสเปคตรัม (sharp line)

2. Stray radiation คือแสงที่รั่วเข้ามาจากด้านนอก รวมทั้งแสงที่กระเจิงภายในเครื่องเข้าไปยังมาตรวัด ทำให้ค่า absorbance ได้น้อยลง

3. Slit width ปกติความกว้างของช่องแสงของเครื่อง UV-VIS อยู่ในช่วง 1 nm

ความผิดพลาด (errors)

Monochromator : เป็นอุปกรณ์ที่จำกัดปริมาณรังสีจาก wavelength ต่างๆ เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็น Polychromatic light ให้เป็น

monochromatic light ถ้าเป็นอุปกรณ์ราคาต่ำจะใช้แผ่นกรองสี ซึ่งประกอบด้วย แผ่นแก้ว 2 แผ่น รังสีจะผ่านแผ่นแก้วด้านหนึ่ง เป็นเครื่องแยกแสงที่ให้ bandpass width ที่แคบกว่าการใช้ Filter นอกจากนี้การใช้ monochromator ยังสามารถปรับคลื่นต่างๆ ให้ต่อเนื่องกันอย่างอัตโนมัติ monochromator ประกอบด้วยส่วนสำคัญดังนี้

- Entrance slit เป็นช่องเล็กๆ ที่ยอมให้ลำแสงแคบๆ ผ่านเข้าไปยังเครื่องกระจายแสง
- Exit slit (ช่องแสงผ่าน) เป็นช่องเล็กๆ ที่ยอมให้ช่วงคลื่นแคบๆ จากคลื่นกระจายแสงผ่านออกไปโดยคลื่นแสงที่ออกไปมีลักษณะเป็น spectrum คล้ายกับที่ได้กับ Filter
- Dispersing device (เครื่องกระจายแสง) ซึ่งอาจเป็นปริซึมหรือ grating ซึ่งทำหน้าที่แยกลำแสงที่มีหลายคลื่นจากช่องแสงผ่านเข้าออกเป็นช่วงคลื่นที่แคบๆ หรือให้เหลือคลื่นเดียวอุปกรณ์ส่วนนี้ประกอบด้วย

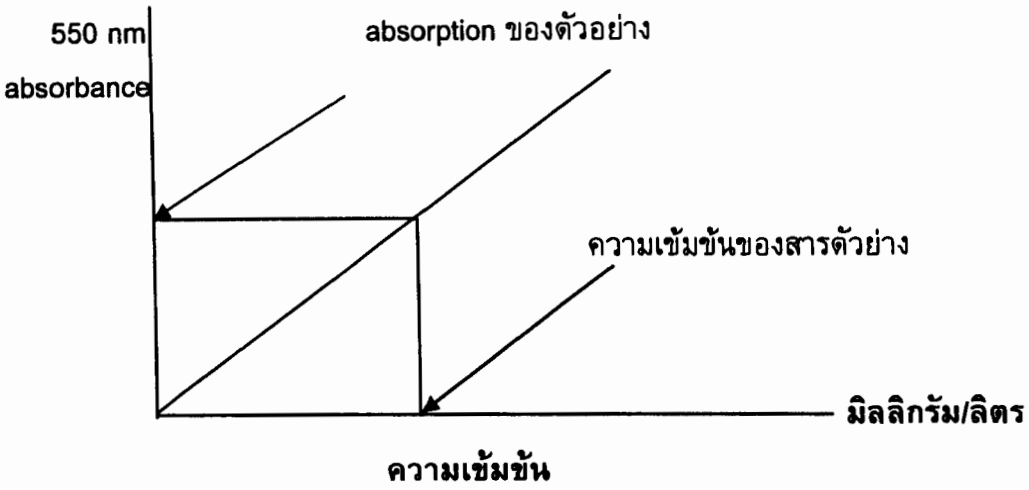
1. Filters
2. Prism
3. Grating

Detector เป็นอุปกรณ์ที่เปลี่ยนรังสีเป็นสัญญาณไฟฟ้า ซึ่งจะส่งไปยังเครื่องขยายสัญญาณ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

- การวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีกราฟมาตรฐาน (Standard curve)
- การวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard addition method)
- การวิเคราะห์หาปริมาณวิธี Internal standard
- การวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Dual wavelength

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีกราฟมาตรฐาน (Standard curve) โดยการเตรียมสารละลายความเข้มข้นต่างกัน 3-5 ความเข้มข้นตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตาม wavelength ที่กำหนดเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น

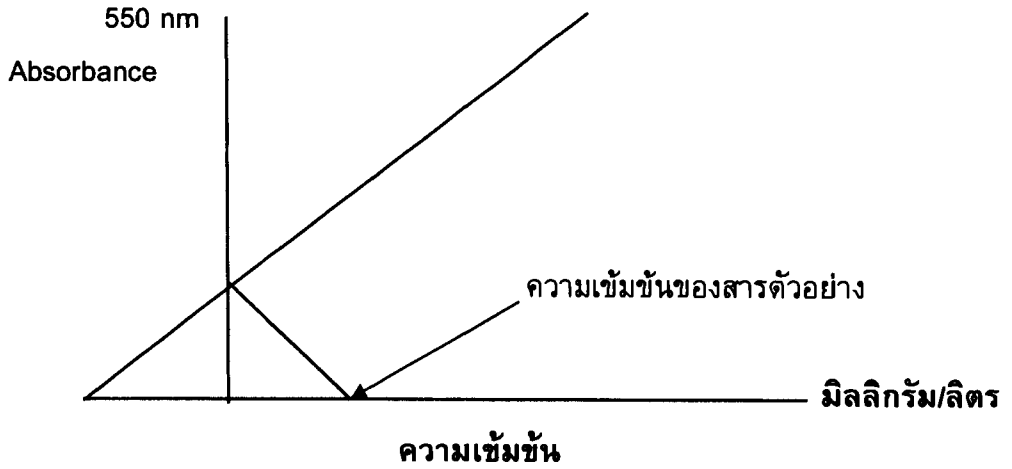


ภาพที่ 8.9 แสดงกราฟมาตรฐาน

การทำ Standard curve ที่ได้ควรใช้เฉพาะการวิเคราะห์แต่ละครั้งเท่านั้น เมื่อจะวิเคราะห์ใหม่ต้องทำใหม่ เพราะผลวิเคราะห์ที่ได้ขึ้นกับ factor หลายข้อเช่น อุณหภูมิขณะวิเคราะห์ สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ผู้วิเคราะห์ เครื่องมือ เป็นต้น

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard addition method)

เติมสารละลายมาตรฐานปริมาณแตกต่างตามลำดับลงในสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรเท่ากัน ทำให้ปริมาตรรวมเท่ากัน หลอดสุดท้ายมี unknown อย่างเดียว นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) แล้วนำไปเขียนกราฟกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปด้วย อ่านค่า least square จากกราฟ



ภาพที่ 8.10 แสดงกราฟ standard addition method

3. วิธี Internal standard วิธีนี้วิเคราะห์โดยเติม internal standard ที่รู้ความเข้มข้นและเป็นคนละชนิดกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ วิเคราะห์หาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน (A_u / A_s) จากนั้นนำไปเขียนกราฟกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับวิธีนี้ใช้ได้เมื่อ

1. สารตัวอย่างจะต้องไม่มีสารที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน
2. สารมาตรฐานและสารตัวอย่างจะต้องมีลักษณะและคุณสมบัติทางเคมีเหมือนกัน

4. การวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Dual wavelength

แสดงว่ากระบวนการหรือวิธีการที่กำหนดไว้เป็นไปตามความเหมาะสมที่ควรนำไปปฏิบัติ หรือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยยืนยันการตรวจสอบและจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรม เพื่อแสดงว่าข้อกำหนดโดยพิเศษเฉพาะต่างๆ สำหรับการใช้ที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะสามารถบรรลุผลได้

ความสำคัญของการทำ Method Validation

- กฎหมายกำหนด
- เพื่อความแน่ใจในคุณภาพและความปลอดภัยของผลทดสอบ
- เพื่อลดปริมาณของเสีย

- เพื่อลดการทำซ้ำหรือทำใหม่
- เพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจว่าจะดำเนินการต่อไปหรือหยุดการทดสอบเพื่อแก้ไขเมื่อเกิดสภาวะการเปลี่ยนแปลงไปจากที่ควบคุม
- เพื่อลดปริมาณงานในกระบวนการทดสอบ

Linearity range คือ ช่วงความเข้มข้นของสารที่มีความเข้มข้นต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่สามารถครอบคลุมช่วงวิธีทดสอบนั้นๆได้โดยให้ Accuracy และ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเมื่อนำมาสร้างกราฟโดยหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรจะให้กราฟเป็นเส้นตรงซึ่งมีค่า Regression coefficient อยู่ในช่วง 0.995-1.000 โดยทำการวิเคราะห์ Spiked samples อย่างน้อย 5 ความเข้มข้นๆ ละ 10 ซ้ำ

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วย spectrophotometer

1. ศึกษาการเตรียมตัวอย่างโดยเลือกวิธีเตรียมตัวอย่างตามลักษณะอาหารชนิดนั้นๆ และเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมโดย chromatogram ของตัวทำละลายไม่มาอยู่ตรงช่วงกับสารตัวอย่าง
2. เลือกใช้สภาวะของเครื่องมือให้ถูกต้อง
3. ศึกษาค่า absorbance ของสารตัวอย่างโดยเลือกที่ λ_{max} เพื่อได้ค่าที่ถูกต้อง
4. ศึกษาตัวแปรต่างๆ เช่น ค่า pH ของสารละลาย ตัวรบกวน ความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน
5. ทำกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารตัวอย่าง

ตัวอย่าง 8.2 สารละลาย Phenolic compound ชนิดหนึ่ง มีความสามารถในการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 485 nm ในสารละลายมี Phynolic compound 3.00×10^{-5} mol/L ซึ่งจะปล่อยแสงผ่านได้ 71.6% ของปริมาณแสงที่ตกกระทบที่ความยาวคลื่น 485 nm ใน cuvette ขนาด 1.0 cm.

ก. สารละลายนี้มีความสามารถในการดูดกลืนแสงเท่าใด

$\%T = 71.6$

$A = 2 - \log \%T$

$A = 2 - \log 71.6$

$= \log 1.396$

$= 0.145$

ข. หาค่า Molar absorbtivity ของ Phynolic compound

$A = \varepsilon bc$

$0.145 = \varepsilon(1\ cm)\ (3.00 \times 10^{-5}\ mol/L)$

$\varepsilon = 0.145/\ (3.00 \times 10^{-5})$

$= 4.83 \times 10^{3}\ L/mol\text{-}cm$

ค. ถ้า cuvette หนา 3 cm. จงหา %T

$\text{Log } 1/T = \varepsilon bc$

$= (4.83 \times 10^{3}\ L/mol\text{-}cm)(3\ cm)(3.00 \times 10^{-5})$

$= 0.435$

$T = 10^{-0.435}$

$= 10^{0.565} \times 10^{-1}$

$= 0.367$

$\%T = 36.7\%$

ตัวอย่างที่ 8.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ในผักผลไม้ต่างๆ ซึ่งฟอร์มัลดีไฮด์เป็นแก๊ซชนิดฟอร์มัลดีไฮด์ชนิดหนึ่งซึ่งมีอานุภาพในการทำลายจุลินทรีย์สูง ความเข้มข้นประมาณ 0.004% ช่วยป้องกันเชื้อราได้ ค่า LD_{50} orally in rat = 800 mg/kg (800 ppm)

วิธีวิเคราะห์ (AOAC 1975)

1.ชั่งตัวอย่างประมาณ 100 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่น 100-200 มิลลิลิตร เติมกรด H_3PO_4 มากเกินพอ 1 มิลลิลิตร

3. ใส่ anti-foam 1-2 หยด ต่อ kjeldahl flask

4. กลั่นช้าๆเก็บ distillated 50 มิลลิลิตร

5. ไปเปด distillate 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี Nash's reagent 2 มิลลิลิตร มิลลิลิตร

6.นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และทิ้งให้เย็น

7. วัดค่า absorbance ที่ 415 nm

8. คำนวณค่าความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์ในผักผลไม้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

AOAC Official Method 960.63
Furazolidone, Nitrofurazone, or Bifuran in Feeds
Colorimetric Method

First Action 1960
Final Action 1961

A. Reagents

(a) *Phenylhydrazine hydrochloride solution.*—Dissolve 0.5 g phenylhydrazine·HCl in 50 mL H_2O. Prepare fresh daily. Mix equal volume of this solution with HCl.

(b) *Furazolidone standard solutions.*—(*1*) *Stock solution.*—0.55 mg/mL. Weigh 55 mg furazolidone standard (available from Hess & Clark, Inc.) into 100 mL volumetric flask, dilute to volume with dimethylformamide (DMF), and mix. Solution is stable several months when protected from light. (*2*) *Working solution.*—Prepare working standard corresponding to label declaration. For feeds containing 0.011% furazolidone, pipet 2 mL stock solution into 100 mL volumetric flask, add 48 mL DMF, and dilute to volume with H_2O. For feeds containing 0.00275% furazolidone, pipet 0.5 mL stock solution into 100 mL volumetric flask, add 49.5 mL DMF, and dilute to volume with H_2O.

(c) *Nitrofurazone standard solutions.*—(*1*) *Stock solution.*—0.56 mg/mL. Weigh 56 mg nitrofurazone standard (available from Hess & Clark, Inc.) into 100 mL volumetric flask, dilute to volume with DMF, and mix. Solution is stable several months when protected from light. (*2*) *Working solution.*—Prepare working standard corresponding to label declaration. For feeds containing 0.0056% nitrofurazone, pipet 1 mL stock solution into 100 mL volumetric flask, add 49 mL DMF, and dilute to volume with H_2O. For feeds containing 0.0112% nitrofurazone, pipet 2 mL stock solution into 100 mL volumetric flask, add 48 mL DMF, and dilute to volume with H_2O.

(d) *Bifuran standard solutions.*—(*1*) *Stock solution.*—0.1285 mg/mL. Pipet 20 mL nitrofurazone stock solution and 3 mL furazolidone stock solution into 100 mL volumetric flask and dilute to volume with DMF. (*2*) *Working solution.*—For feeds containing 0.0064% total nitrofurans, prepare working standard by pipetting 5 mL bifuran stock solution into 100 mL volumetric flask, adding mL DMF, and diluting to volume with H_2O.

(e) *Adsorbent.*—To 100 parts alumina, 961.24B(b) (*see* 5.1 in screw cap bottle, add 4 parts $Mg(OH)_2$, shake until thoroug mixed, then add 5 parts H_2O, and mix until all lumps disappear. St in tightly sealed container.

B. Determination

(*Caution: See Appendix B*, safety notes on pipets, toxic solven and dimethylformamide.)

Grind coarse or pelleted feeds to "20 mesh" through cutting mill such as Wiley Intermediate. Finer feeds need not be gro Weigh 10 g sample into 125 mL Erlenmeyer, add exactly 50 DMF, stopper loosely, and place in boiling H_2O bath 5 min. Mecha cally shake 10 min and filter through rapid paper. To 25 mL filt add 25 mL H_2O and mix.

Prepare ca 20 mm diameter adsorption column, containing sorbent, to height of 5 cm. Pass the 50% DMF sample solu through column, discarding first 3 mL eluate. (If column flow sto break up gummy film at top of adsorbent, using long thin glass ro Pipet 5 mL aliquots of eluate into each of 2 numbered test tub Protect one tube from light. To other tube, add 3 drops *fresh prepared 2% solution of sodium hydrosulfite* and let stand 20 m shaking at ca 5 min intervals. Treat 5 mL aliquots of work standard solution in exactly same manner.

Pipet 5 mL phenylhydrazine·HCl solution into each of the nu bered test tubes containing samples and standards. Mix and pla tubes in 70° H_2O bath 25 min; cool in 15° H_2O bath 5 min. Ad exactly 10 mL toluene to each tube, stopper, and shake vigorou 40 times. Centrifuge or filter toluene solution directly into absorpti cell through cotton wad inserted in stem of small funnel. Read A solutions at 440 nm.

$$\% \text{ Furazolidone} = [(A_{sample} - A_{reduced\ sample}) \times 0.011 \text{ (or } 0.00275)]/(A_{standard} - A_{reduced\ standard})$$

$$\% \text{ Total nitrofurans (bifuran)} = [(A_{sample} - A_{reduced\ sample}) \times 0.0064]/(A_{standard} - A_{reduced\ standard})$$

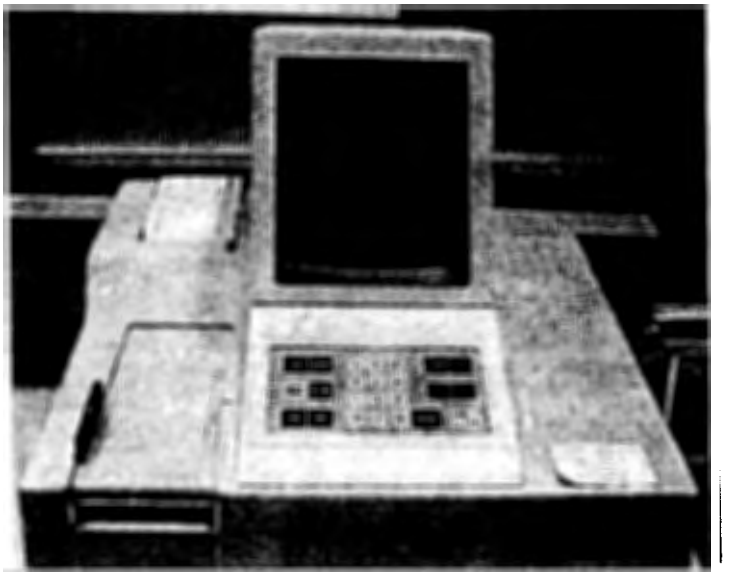
$$\% \text{ Nitrofurazone} = [(A_{sample} - A_{reduced\ sample}) \times 0.0056 \text{ (or } 0.011)]/(A_{standard} - A_{reduced\ standard})$$

References: JAOAC **40**, 463(1957); **41**, 333(1958); **43**, 310(1960); **44**, 30(1961); **52**, 233(1969).

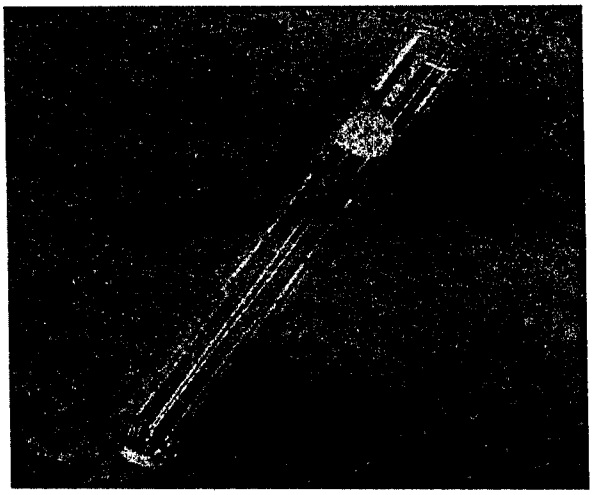
CAS-67-45-8 (furazolidone)
CAS-59-87-0 (nitrofurazone)

ที่มา : AOAC 16 th Edition (1995)

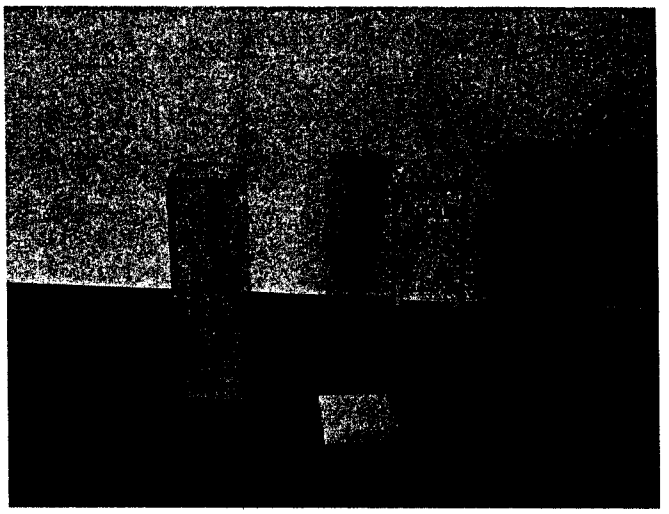
ภาพที่ 8.11 แสดงเครื่อง Single beam spectrophotometer



ภาพที่ 8.12 แสดงเครื่อง Double beam spectrophotometer



ภาพที่ 8.13 แสดง cuvette สำหรับ single beam spectrophotometer



ภาพที่ 8.14 แสดง cuvette สำหรับ double beam spectrophotometer