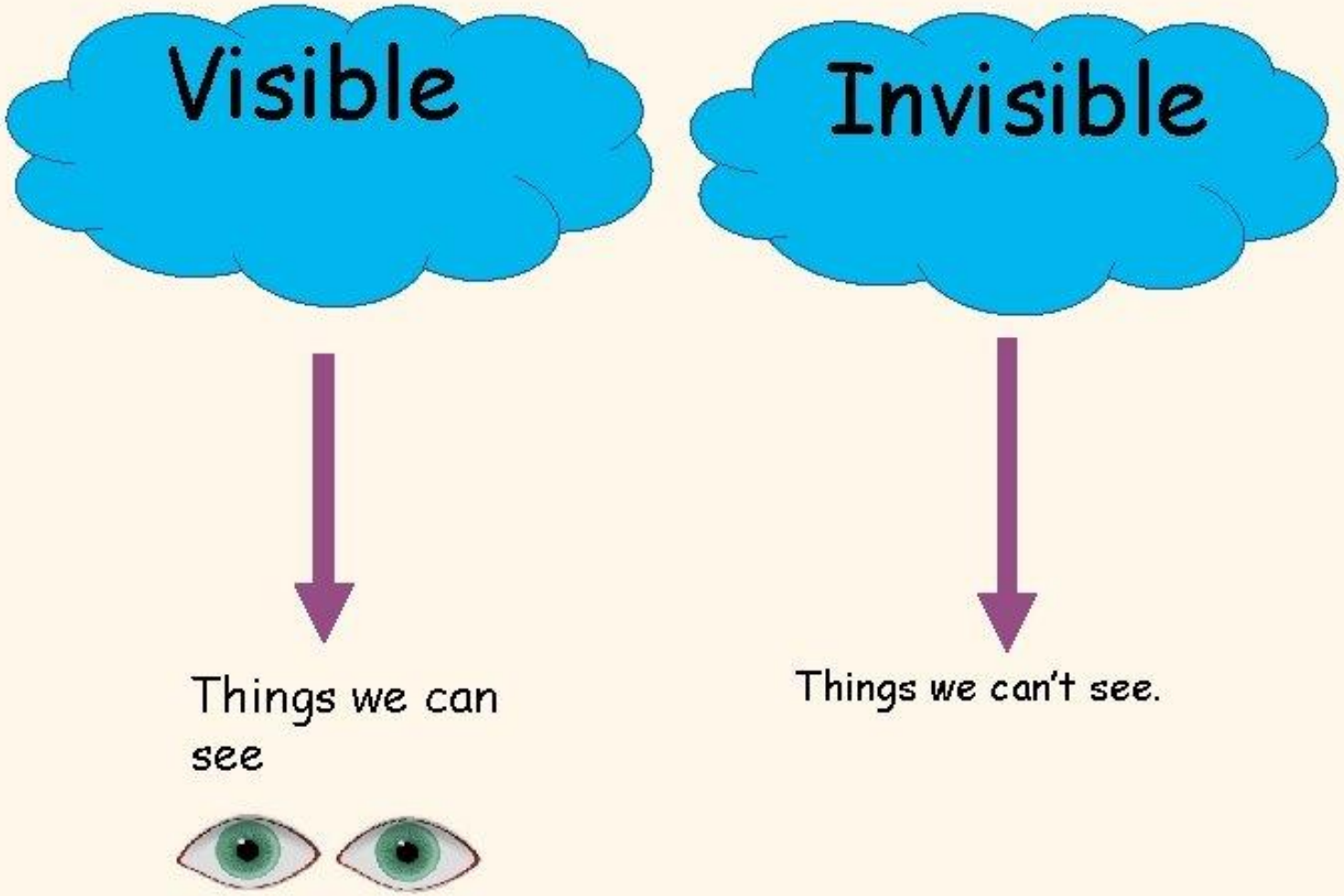
การใช้เครื่องมือเบื้องต้น เพื่อวิชาการแปรรูปอาหาร by ครูชมบี

ep.17 การใช้ Spectrophotometer

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชมภูนุช เผื่อนพิภพ
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร



https://slidetodoc.com/this-resource-is-part-4-of-a-series-3/
https://www.tomorrowsworld.org/commentary/you-can-see-invisible-things
https://www.labvalley.com/product/295...-graduated-plastic-erlenmeyer-flask-with-screw-cap

Mixture ?

https://health.mthai.com/howto/health-care/4828.html
https://www.provsci.com/product/erlenmeyer-flask-glass-narrow-neck-500mlisolab/

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

- เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสาร
  - เชิงคุณภาพ
  - เชิงปริมาณ โดยวิธีกราฟมาตรฐาน (standard curve), วิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition)
- วิเคราะห์ปริมาณสารได้ในระดับไมโครกรัม
- วิเคราะห์สารละลายชนิดเดียว หรือสารละลายผสม

https://camspec.eu/true-double-beam-scanning-spectrophotometer/
https://www.indiamart.com/proddetail/single-beam-uv-vis-spectrophotometer-13400277833.html

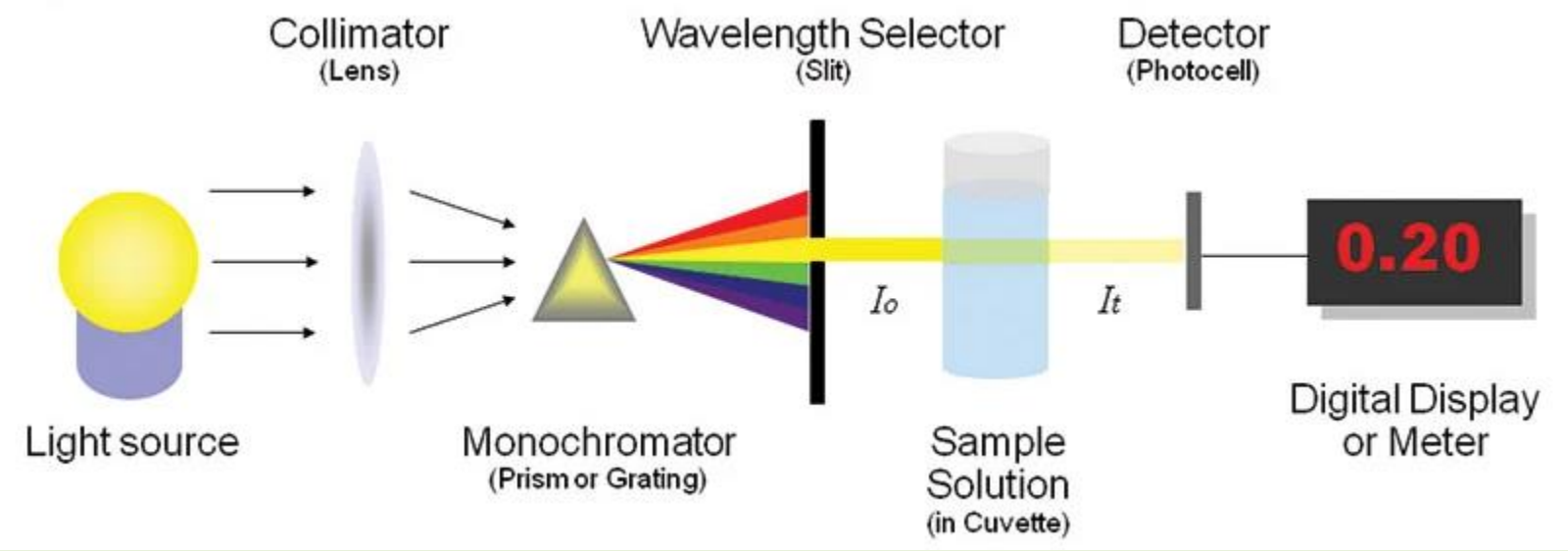
สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

- เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณแสงที่ตัวอย่างดูดกลืนในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม
- สามารถวัดความเข้มของแสงช่วงความยาวคลื่นแคบๆ อย่างต่อเนื่องตามต้องการ และใช้ตัวไวแสง (sensitivity) ที่มีประสิทธิภาพสูง
- มีทั้งแบบระบบบอนาล็อก และระบบดิจิตอล

https://camspec.eu/true-double-beam-scanning-spectrophotometer/
https://www.indiamart.com/proddetail/single-beam-uv-vis-spectrophotometer-13400277833.html

เทคนิคของ spectrophotometer

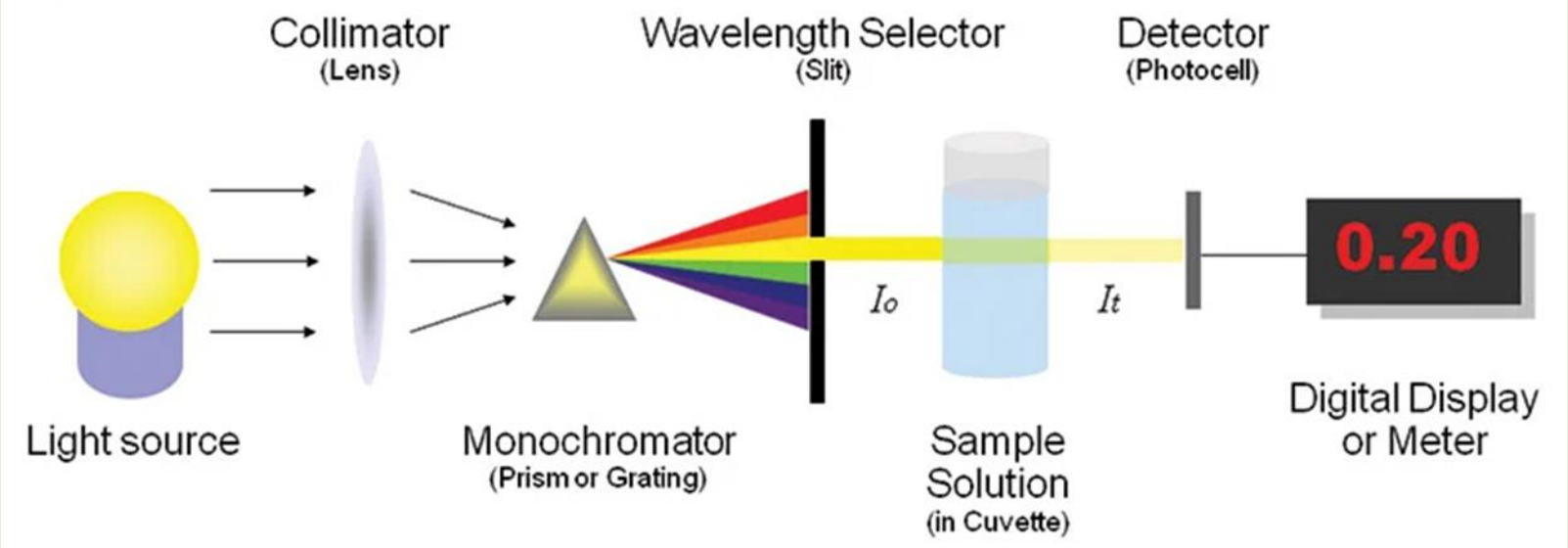
- ใช้ในการวัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลาย โดยการวัดปริมาณแสงที่ดูดซับผ่านสารละลายตัวอย่างในคิวเวตต์ที่วางไว้ในช่องใส่คิวเวตต์เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เกิดการกระจายลำแสงออกเป็นสเปกตรัมตามความยาวคลื่น และทำการตรวจจับความเข้มด้วย charge-coupled และแสดงผลเป็นกราฟบนเครื่องตรวจจับ พร้อมจอแสดงผล



หลอดไฟกำเนิดแสง มีหลาย ตัวแยกแสง มี ช่องแสง คิวเวตต ตัวไวแสง มีหน้าที่เปลี่ยนความเข้มของแสงให้
ออกมา เช่น ความยาวคลื่น จะเข้าสู่ จะนำไ เป็นสัญญาณไฟฟ้า แล้วส่งต่อไปยังภาคขยาย
- hydrogen lamp /deut คลื่นแสงช่วงแ ตัวแยกแ ในช่องไ สัญญาณและวงจรอิเล็กทรอนิกส์อื่นๆ เพื่อให้
- tungsten tamp 300-2, สะท้อนกลับหรือการหักเห แสดงค่าออกมา
- tungsten halogen lamp 400-20,000 nm เป็นต้น

https://microbenotes.com/spectrophotometer-principle-instrumentation-applications/

spectrophotometer



- แสงจะถูกปล่อยมาจากแหล่งกำเนิดแสง และถูกส่งผ่านไปยังส่วนควบคุมแสง ทำให้แสงที่ผ่านออกมาเป็นลำแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวตามต้องการ และถูกส่งผ่านไปยังสารละลายตัวอย่างที่บรรจุในคิวเวตต์ จากนั้นแสงจะไปที่ตรวจวัดสัญญาณ ซึ่งจะแปลงพลังงานคลื่นรังสีไปเป็นพลังงานไฟฟ้า และแสดงผลทางหน้าจอเป็นตัวเลข มีหน่วยการวัดเป็น OD โดยค่าการดูดกลืนแสงของสาร จะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ตามกฎของ Beer-Lambert

https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-diagram-of-a-single-beam-UV-Visible Spectrometer_fig5_28358404

วิธีการใช้งานเครื่อง spectrophotometer

- เตรียมสารละลายตัวอย่างให้เรียบร้อย
- เสียบปลั๊กไฟ เปิดเครื่อง spectrophotometer โดยควรเปิดเครื่องก่อนการใช้งาน ไม่น้อยกว่า 15 นาที (วอร์มเครื่อง)
- เลือกแหล่งกำเนิดแสง และกำหนดความยาวคลื่นแสงที่ต้องการ

วิธีการใช้งานเครื่อง spectrophotometer

- ปรับเครื่องเป็น 100%T หรือตั้งค่าการดูดกลืน ให้เป็นศูนย์ด้วยปุ่มปรับศูนย์ (ปุ่ม calibrate)
- เลือกคิวเวตต์ ให้เหมาะกับสารตัวอย่าง (quartz, polymethacrylate, polystyrene)
    - เตรียม blank (reagent ที่ไม่มีตัวอย่างที่ต้องการวัด) แล้วบรรจุในคิวเวตต์
    - ใส่สารละลายตัวอย่างในคิวเวตต์ เช็ดด้านข้างของคิวเวตต์ให้แห้งสะอาด

วิธีการใช้งานเครื่อง spectrophotometer

- วางคิวเวตต์ในช่องสำหรับใส่ในเครื่อง โดยจับที่ปากคิวเวตต์หรือจับด้านทึบแสง
  - วาง blank เพื่อปรับมาตรฐานที่ช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการวัด โดยปรับให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น ศูนย์ (set zero)
  - ในกรณีที่เป็นเครื่องแบบ double beam จะใช้คิวเวตต์ 2 อัน คือ blank และสารตัวอย่าง เครื่องจะทำการหักลบค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและ blank ให้อ่านผลได้จากจอแสดงผล
- กรณีเปลี่ยนความยาวคลื่น จะต้องวัด blank ใหม่ทุกครั้ง

https://hmong.in.th/wiki/Cuvette

วิธีการใช้งานเครื่อง spectrophotometer

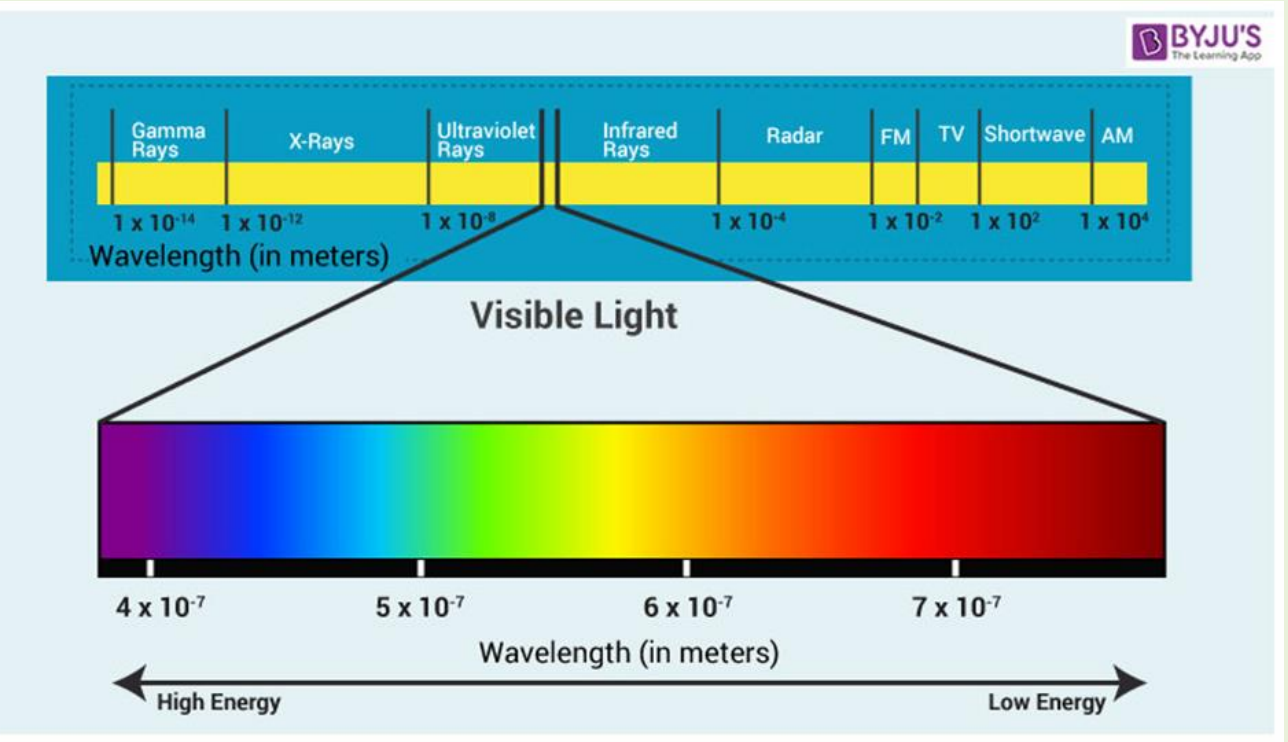
- ปิดฝาเครื่อง
- อ่านค่า %T หรือค่า absorbance จากจอแสดงผล และบันทึกผล
- เขียนกราฟระหว่าง แกน Y -- ค่าการดูดแสง

  และแกน X -- ความยาวคลื่น ,ความเข้มข้น, เวลา (ขึ้นกับการทดลอง)
- ปิดเครื่อง และทำความสะอาดเครื่องเป็นประจำทุกครั้งหลังใช้งานเสร็จ

UV-Visible spectrophotometer /UV-Vis spectrophotometer

- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV/Vis จะวัดความเข้มของแสงที่ผ่านสารละลายตัวอย่างในคิวเวตต์ และเปรียบเทียบกับความเข้มของแสงก่อนจะผ่านตัวอย่าง
- อาศัยหลักการการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 nm โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสงของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง
- ใช้สำหรับระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่าง

- **แสง** คือ พลังงานชนิดหนึ่งที่เกิดจาก**คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า** ทำให้เกิดความสว่าง และทำให้เรามองเห็นสิ่งต่างๆ ได้



- **คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า**ที่ประสาทตาของมนุษย์รับได้เรียกว่า “**แสงที่มองเห็นได้**” (Visible Light) มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 400-700 nm

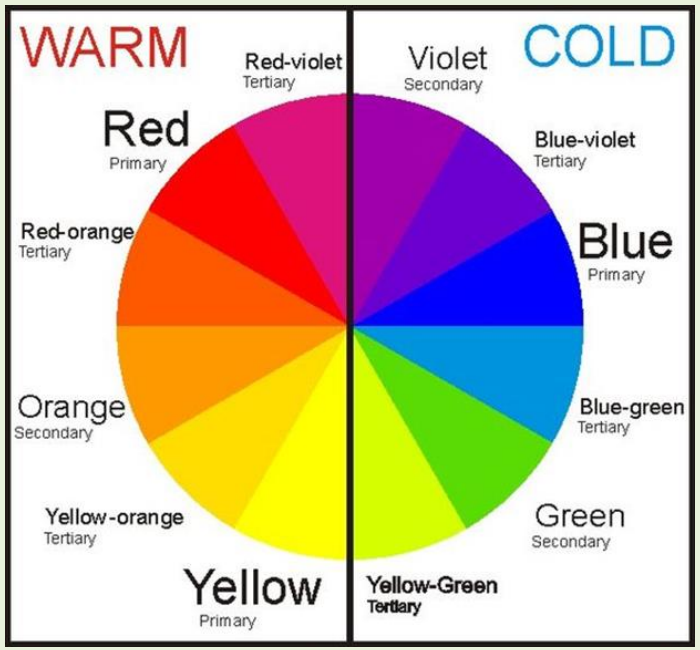
https://byjus.com/physics/visible-light/

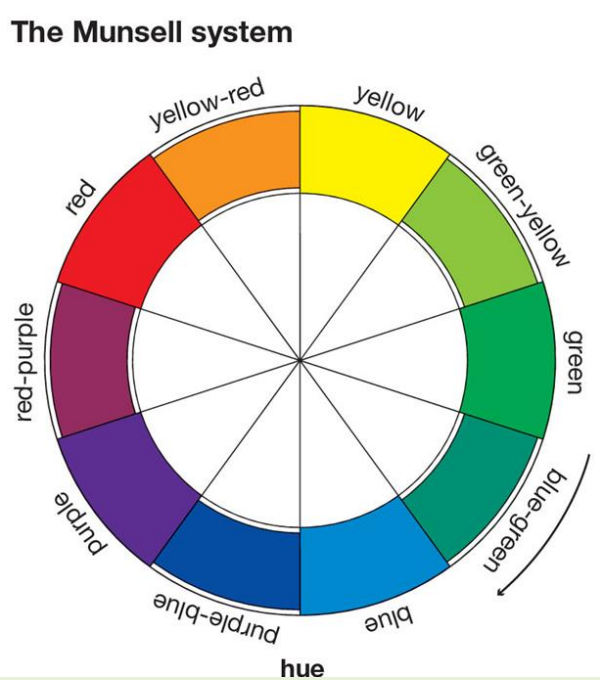
	Wavelength	Frequenzy
Red	~ 625 – 740 nm	~ 480 – 405 THz
Orange	~ 590 – 625 nm	~ 510 – 480 THz
Yellow	~ 565 – 590 nm	~ 530 – 510 THz
Green	~ 520 – 565 nm	~ 580 – 530 THz
Blue	~ 445 – 520 nm	~ 675 – 580 THz
Indigo	~ 425 – 445 nm	~ 700 – 675 THz
Violet	~ 380 – 425 nm	~ 790 – 700 THz

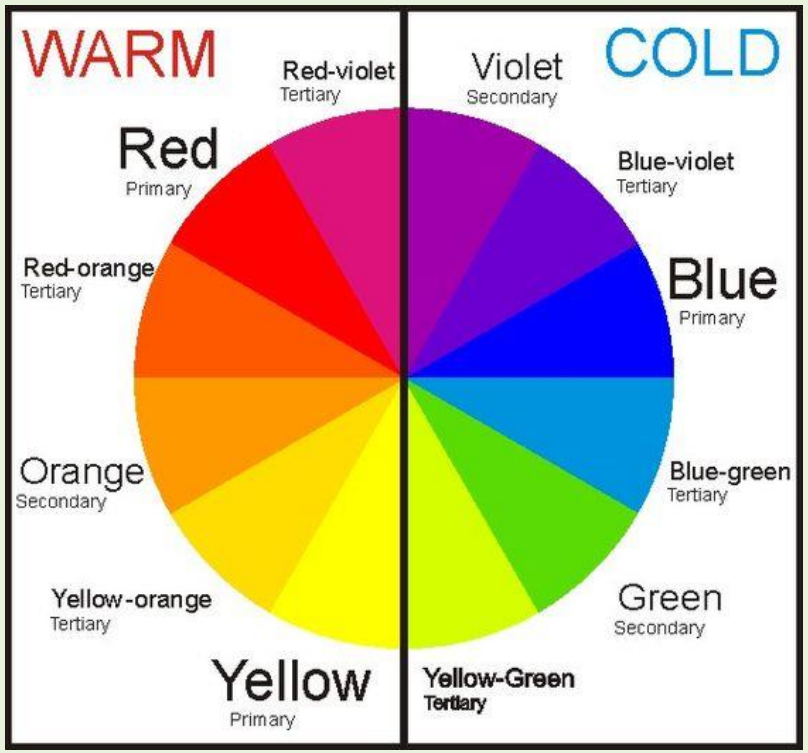
- Visible light has a whole spectrum of colors. From the color red with the longest wavelength (and thus least energy) to the color violet which has the shortest wavelength (and the highest energy):
- Photo: UiB

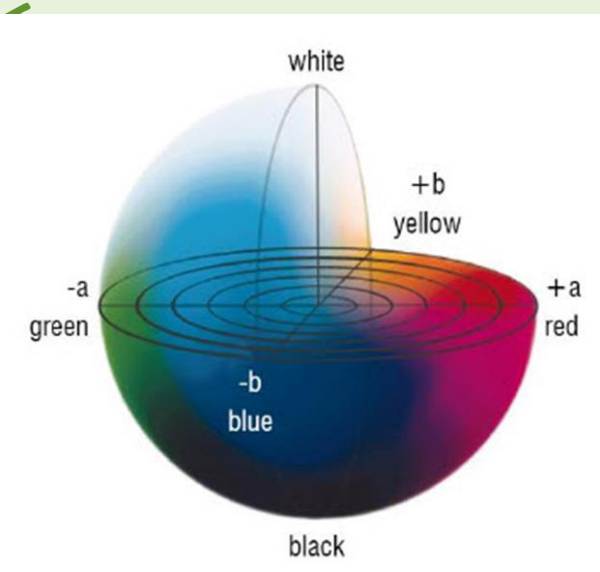
https://www.uib.no/en/hms-portalen/75292/electromagnetic-spectrum

- แสงที่ไม่มีสีหรือแสงที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (visible light) ไปกระทบจะเกิด**การดูดกลืนแสง**สีอื่นๆ ไว้มาก ส่วนแสงสีที่ไม่ถูกดูดกลืนจะทะลุวัตถุและสะท้อนออกมาสู่ตาเรา
  - เช่น แอนโทไซยานินจะสามารถดูดสีส้ม, เหลืองได้มาก แสงที่ปรากฏแก่ตาเราจึงเป็นสีน้ำเงินค่อนไปทางม่วง-แดง



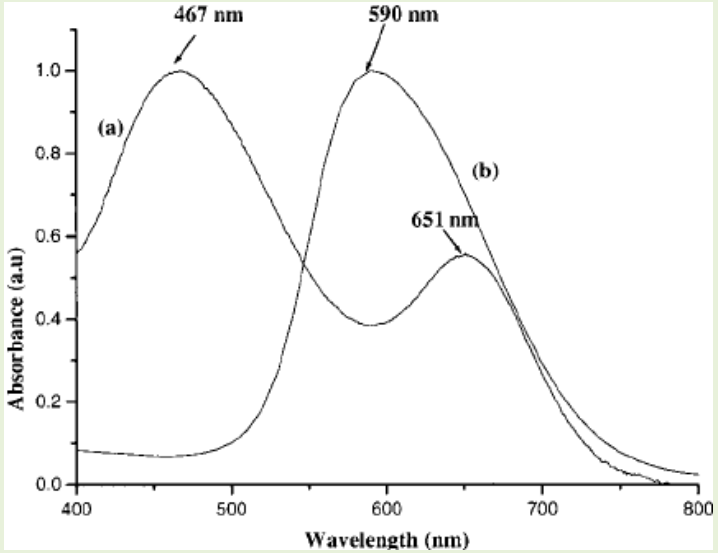






https://www.iop.co.th/content/6222/...%B8%87
https://cwsimons.com/color-determination-in-food/
https://il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_4.html
http://ect3503colors.blogspot.com/2016/10/colour-wheel-and-opposite-colour.html
https://www.researchgate.net/figure/An-example-of-a-traditional-COS-some-pages-from-the-matte-Munsell-Book-of-Color_fig5_220795299

- วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ เห็นปรากฏเป็น **สเปคตรัม (spectrum)**
- จุดที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า พีค (peak)



- ค่าการดูดกลืนแสงของสารมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของสารหรือปริมาณของเนื้อสารนั้นตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต ดังนั้นถ้าเรานำความสัมพันธ์นี้มา **plot กราฟ**จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ที่เรียกว่า “กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve)” สามารถใช้เทียบเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ไม่ทราบค่าได้

https://www.researchgate.net/figure/Graph-showing-the-UV-visible-absorption-spectrum-of-a-Coomassie-Brilliant-Blue-CBB_fig2_10643983

THANK YOU