

หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโดยอาศัยกราฟมาตรฐาน (Instrumental Analysis based on Calibration Method)



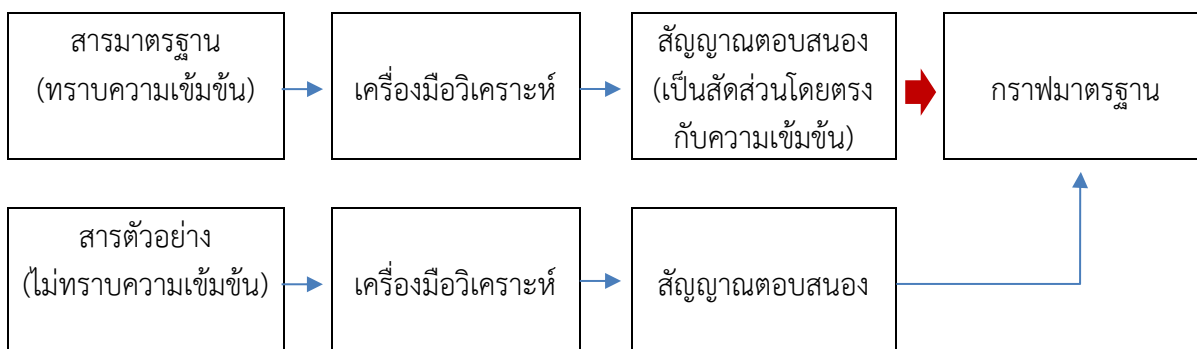
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จันทรสุวรรณ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

หลักสำคัญของการวิเคราะห์หาปริมาณโดยการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ (instrumental analysis) เกือบทุกเทคนิค เมื่อทำการวิเคราะห์เครื่องมือจะรายงานสัญญาณตอบสนอง (responsible signal) ที่วัดได้ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง เราอาจจำแนกสัญญาณตอบสนองในเครื่องมือวิเคราะห์เป็น 2 โดเมนคือ

1. โดเมนทางไฟฟ้า (electrical domain) เช่น ศักย์ไฟฟ้า กระแสไฟฟ้า ประจุไฟฟ้า หรือความต้านทานไฟฟ้า ซึ่งสัญญาณในลักษณะนี้สามารถใช้วงจรอิเล็กทรอนิกส์วัดค่าหรือดำเนินการเก็บข้อมูลได้โดยตรง

2. โดเมนที่ไม่ใช่ทางไฟฟ้า (non-electrical domain) เช่น ความร้อน ความเข้มแสง พลังงาน ซึ่งสัญญาณในลักษณะนี้ต้องอาศัยตัวแปลงสัญญาณ (transducer) เพื่อแปลงสัญญาณจากโดเมนที่ไม่ใช่ทางไฟฟ้าให้อยู่ในโดเมนไฟฟ้า

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือในทางวิเคราะห์ทางเคมีมีหลายเทคนิคด้วยกัน แต่โดยหลักที่เหมือนกันคือ ตัวตรวจวัด (detectable unit, detector) จะทำการวัดสัญญาณตอบสนองหรือสัญญาณการเปลี่ยนแปลงตามแต่ละเทคนิคที่เกิดจากปริมาณสารที่สนใจ (analyte) ในสารตัวอย่าง แล้วจึงแสดงผลลัพธ์ (readout) โดยอาศัยส่วนประมวลผลสัญญาณ (signal processing) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณ บันทึก คำนวณ แปรผล และดำเนินการอื่น ๆ เกี่ยวกับสัญญาณตอบสนอง อย่างไรก็ตามสัญญาณตอบสนองที่วัดได้จากเครื่องมือวิเคราะห์จะเป็นสัญญาณที่ไม่อาจเชื่อได้ว่าเป็นความสัมพันธ์เชิงปริมาณที่แท้จริงระหว่างค่าที่เครื่องมือแสดงกับปริมาณของสารที่สนใจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการเทียบกับสารมาตรฐาน (standard reagent)



ภาพที่ 1 แนวคิดของการวิเคราะห์โดยอาศัยกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน (calibration curve) หรือกราฟมาตรฐานความเข้มข้น (concentration calibration curve) จัดเป็นวิธีการเทียบหาปริมาณสารที่สนใจกับสารมาตรฐานทางอ้อม ซึ่งกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นเป็นความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนองที่วัดได้จากเครื่องมือวัด (แกน y) กับความเข้มข้น (ปริมาณ) ของสาร

Asst.Prof.Woravith Chansuvarn, Ph.D.

Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Phra Nakhon



<http://web.rmutp.ac.th/woravith>



woravith.c@rmutp.ac.th



Chemographics

มาตรฐาน (แกน x) โดยสัญญาณตอบสนองที่วัดได้ต้องแปรผันตรงกับความเข้มข้น (ปริมาณ) สารมาตรฐาน การสร้างกราฟมาตรฐานจึงเป็นวิธีการสร้างความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (หรือปริมาณ) แน่นนอนจากการเตรียมกับสัญญาณตอบสนองที่ได้จากเครื่องมือวิเคราะห์ ซึ่งสามารถสร้างกราฟมาตรฐานหลายวิธีด้วยกัน ดังนี้

1. วิธีสารมาตรฐานภายนอก (External standard)

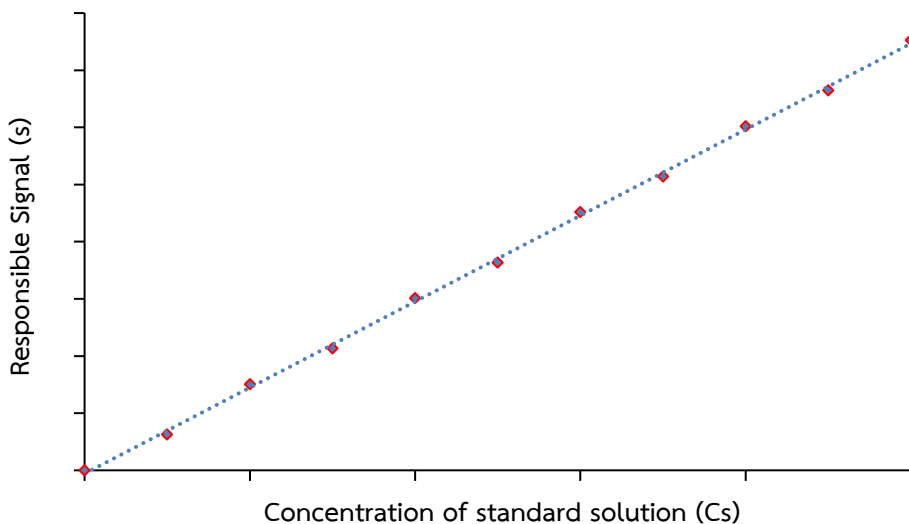
การสร้างกราฟมาตรฐานภายนอก จะต้องกำหนดช่วงความเข้มข้นให้เหมาะสม โดยควรเป็นช่วงความเข้มข้นที่สัมพันธ์กับสัญญาณที่วัดได้มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด เรียกว่า ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) โดยเครื่องมือบางประเภทอาจมีคู่มือ (cook book) ระบุสัญญาณตอบสนองที่ใช้สอบเทียบสภาพไว้ จึงอาจนำมาเป็นแนวทางในการเตรียมชุดสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานได้ ส่วนเครื่องมือที่ไม่มี cook book ผู้วิเคราะห์ต้องทดลองหาช่วงความเข้มข้นจากสัญญาณของเครื่องมือ วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานภายนอกมีขั้นตอนดังนี้

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 4-5 ความเข้มข้น (ตามลำดับ) และสารละลายแบลงค์ (blank) โดยอาจใช้ reagent blank ซึ่งเตรียมตามกระบวนการเดียวกับสารละลายมาตรฐานเพียงแต่ไม่มีสารที่สนใจ (analyte) เป็นองค์ประกอบ หรืออาจใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายแบลงค์

1.2) ทำการปรับศูนย์ (zero adjustment) ด้วยสารละลายแบลงค์และวัดสัญญาณตอบสนองของสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ นำสัญญาณตอบสนองมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนอง (แกน y) กับความเข้มข้น (แกน x) จะได้ลักษณะกราฟมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งสามารถหาสมการเส้นตรงของกราฟ

1.3) เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับกระบวนการเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยอาจต้องทำละลาย ย่อย หรือเจือจางสารตัวอย่างก่อนเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1.4) วิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง แทนค่าผลลัพธ์หรือสัญญาณตอบสนองที่ได้ในสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

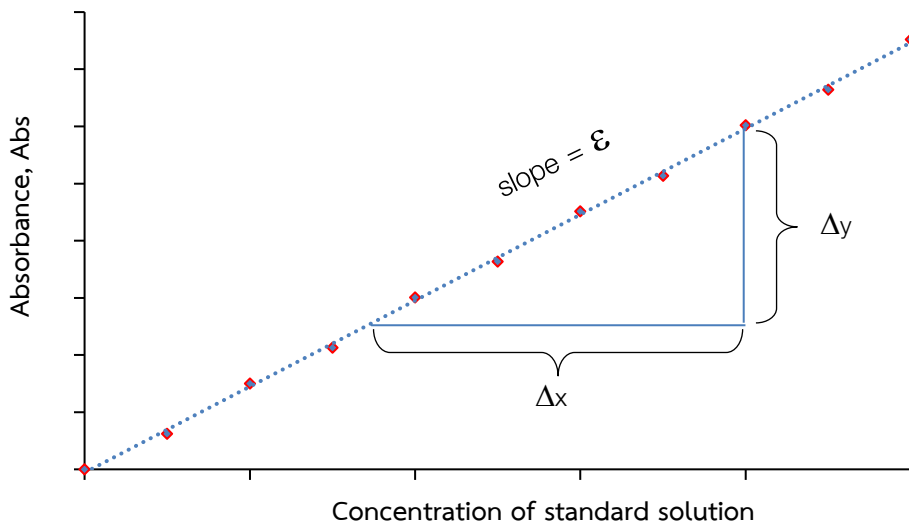


ภาพที่ 2 ลักษณะกราฟมาตรฐาน

เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ควรอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยสัญญาณที่วัดได้ต้องไม่ต่ำกว่าสัญญาณที่วัดได้ของความเข้มข้นของสารมาตรฐานตัวที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุด ในกรณีที่สารตัวอย่างมีสัญญาณต่ำกว่า อาจต้องทำการเพิ่มความเข้มข้น (pre-concentration) ก่อน แต่ถ้าสัญญาณสูงกว่าสัญญาณที่วัดได้ของความเข้มข้นของสารมาตรฐานตัวที่สูงที่สุด จะต้องทำการเจือจาง (dilution) ให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง

วิธีสารมาตรฐานภายนอกนิยมใช้กันมากที่สุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เนื่องจากทำได้ง่าย โดยใช้สารละลายมาตรฐานเพียงชุดเดียว จึงเหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ประจำ (routine analysis) ที่วิเคราะห์สารตัวอย่างจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม วิธีสารมาตรฐานภายนอกก็มีข้อจำกัดที่ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนเชิงระบบ เนื่องจากเมทริกซ์ของสารละลายตัวอย่างจะไม่เหมือนกับเมทริกซ์ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายแบบลงค์ได้ทั้งหมดทุกส่วน และการเตรียมสารละลายตัวอย่างจากตัวอย่างจริงเพื่อให้เมทริกซ์ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานที่สุดอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนหรือสูญเสียสารที่สนใจวิเคราะห์จากสารตัวอย่าง⁽¹⁾

ในที่นี้ขอยกตัวอย่างกราฟมาตรฐานของเทคนิคการวัดการดูดกลืนแสง จากกฎของเบียร์ “ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่สนใจที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (absorbing analyte species)” ดังนั้นเมื่อนำความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจและค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟ จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เรียกว่า กราฟมาตรฐานความเข้มข้น (calibration curve) เมื่อค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) เป็นแกน y และความเข้มข้น (concentration, C) เป็นแกน x จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ ϵb และเมื่อ b เท่ากับ 1 ความชันจึงเท่ากับ ϵ ดังแสดงในภาพที่ 3

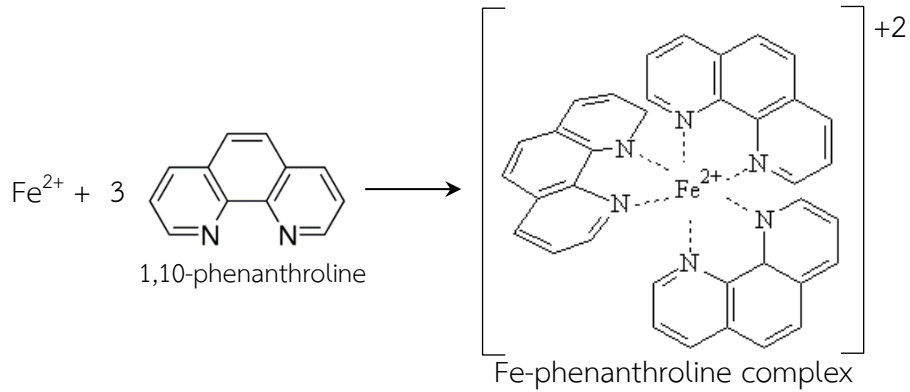
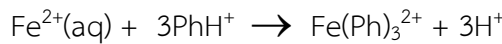
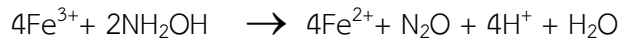


ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น (concentration calibration curve)

จุดประสงค์ที่สำคัญของการทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นเพื่อให้ได้สัญญาณการดูดกลืนแสงจากเครื่องมือวัดในขณะนั้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายนอก (external standard solution) ที่ความเข้มข้นต่างกันตามลำดับ (concentration series) สัญญาณการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์ และที่สำคัญกราฟมาตรฐานความเข้มข้นจะเป็นเครื่องมือในการหาความเข้มข้นของสารที่สนใจในสารตัวอย่าง โดยอาศัยสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานความเข้มข้น

วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้น ทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนอย่างน้อย 4-5 ความเข้มข้น มาวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นได้เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง จะได้กราฟมาตรฐานความเข้มข้น ส่วนสารตัวอย่างเราไม่ทราบความเข้มข้นของสารที่สนใจ เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกับวิธีการทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้น เครื่องมือจะรายงานค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยอาศัยสมการเส้นตรง เราจะได้ทราบค่าความเข้มข้นของสารที่สนใจในสารตัวอย่างได้

ตัวอย่างการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำได้โดยให้เกิดไอออนเชิงซ้อนที่มีสี (สีแดงถึงส้ม) ระหว่าง Fe^{2+} กับ 1,10-phenanthroline ที่เรียกว่าไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทรีน (Fe-Phen) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยควบคุม pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ pH 3.5 เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดตะกอนเป็น $Fe(OH)_2$ และจะต้องเติมตัวรีดิวซ์เพื่อทำการรีดิวซ์เหล็กทั้งหมดในสารละลายให้เป็น Fe^{2+} เสียก่อนโดยใช้สารละลายไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride) สีของไอออนเชิงซ้อนระหว่างเหล็ก(II) กับฟีแนนโทรีนจะเสถียรได้นาน (วรวิทย์, 2563)



ภาพที่ 4 ไอออนเชิงซ้อนระหว่างเหล็ก(II) กับฟีแนนโทรีน

การเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้นทำได้โดย เตรียมสารละลายเหล็กมาตรฐานให้มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นลำดับจำนวน 6 ความเข้มข้นในขวดวัดปริมาตร (ในการเตรียมชุดสารละลายมาตรฐานจะต้องไม่มีความคลาดเคลื่อนเกี่ยวกับการเตรียม เช่น ปริมาตรที่ปิเปตและการปรับปริมาตรสุดท้าย) ความเข้มข้นของเหล็กที่เตรียมดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของเหล็ก(II) สำหรับทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้น

ขวดที่	ความเข้มข้น (mg/L)
1	0.20
2	0.40
3	0.60
4	0.80
5	1.00
6	1.20

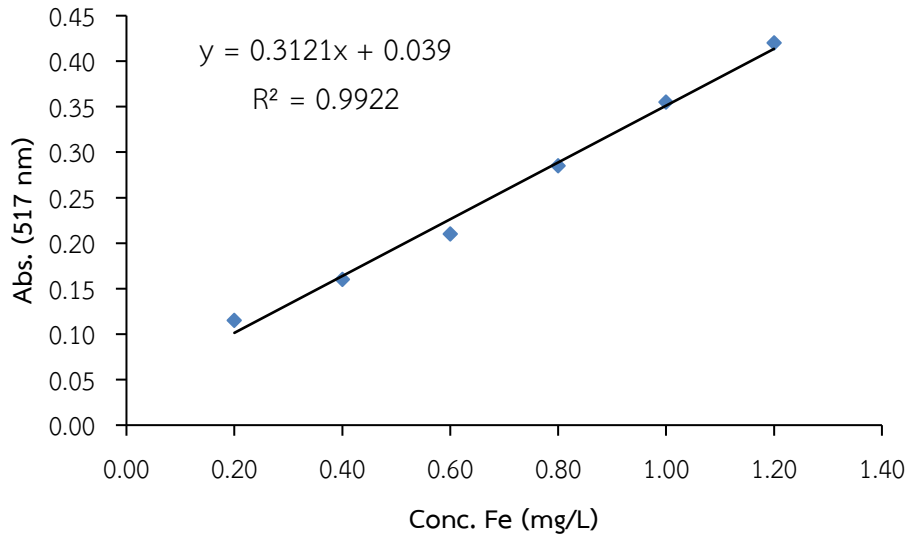
จากนั้นเติมสารละลาย $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ และแอซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) อย่างละ 1 mL ลงไป แล้วเติม 1,10-phenanthroline ปริมาตร 2 mL แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนครบขีดปริมาตร (ขวดวัดปริมาตร 50 mL) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จะได้สารละลายสีส้มแดงของไอออนเชิงซ้อนดังภาพที่ 5 จากนั้นนำสารละลายแต่ละขวดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ได้ผลดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทโรลีน

ขวดที่	ความเข้มข้น (mg/L)	Abs ที่ 517 nm
1	0.20	0.115
2	0.40	0.160
3	0.60	0.210
4	0.80	0.285
5	1.00	0.355
6	1.20	0.420

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของเหล็กกับค่าการดูดกลืนแสงของไอออนเชิงซ้อนเหล็กฟีแนนโทโรลีน จะได้กราฟเส้นตรงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไอออนเชิงซ้อนเหล็กพีแนโนโทรลีน
(เส้นกราฟนี้สร้างโดยใช้โปรแกรม MS Excel)

กราฟมาตรฐานที่สร้างโดยประยุกต์ใช้โปรแกรม MS Excel จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับสมการเส้นตรงที่บอกค่าความชัน (slope) และจุดตัดแกน y (intercept-y) และยังสามารถบอกความเป็นเส้นตรงว่ากราฟนั้นมีความเป็นเส้นตรงมากน้อยเพียงใด ถ้าค่า R^2 ใกล้ 1 แสดงว่ากราฟนั้นมีความเป็นเส้นตรงสูง โดยทั่วไปในการวิเคราะห์เชิงปริมาณค่า R^2 ต้องมากกว่า 0.99 ซึ่งจากกราฟเส้นตรงของไอออนเชิงซ้อนเหล็กพีแนโนโทรลีนพบว่า ค่าความชัน = 0.3121 จุดตัดแกน y = 0.039 และ $R^2 = 0.9925$

จากตัวอย่างกราฟมาตรฐานของไอออนเชิงซ้อนเหล็กพีแนโนโทรลีน (ภาพที่ 6) ถ้าสมมตินำสารตัวอย่างน้ำบาดาล ปริมาตร 5.00 mL เติมสารละลายเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ได้เท่ากับ 0.380 เราสามารถคำนวณปริมาณเหล็กในสารตัวอย่างเทียบกับเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้น โดยอาศัยสมการเส้นตรง

$$y = 0.3121x + 0.039 \quad \text{.....(1)}$$

$$x = \frac{y - 0.039}{0.3121} \quad \text{.....(2)}$$

เมื่อ y คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่สนใจในตัวอย่าง เท่ากับ 0.380 ดังนั้น

$$x = \frac{0.380 - 0.039}{0.3121} = 1.09 \text{ mgFe/L} \quad \text{.....(3)}$$

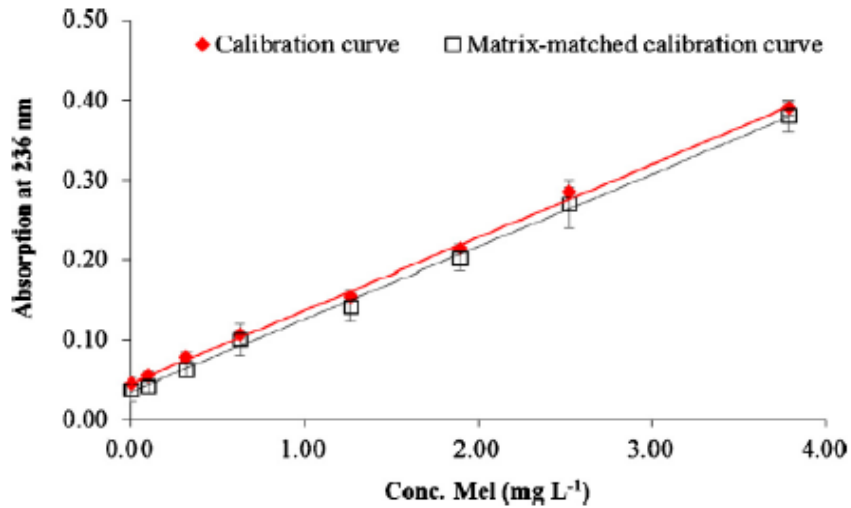
แต่สารละลายตัวอย่างที่วิเคราะห์นี้ได้จากการเจือจางสารตัวอย่าง 5.00 mL ให้ได้สารละลาย 50.00 mL (dilution factor = 10) ดังนั้น ความเข้มข้นของเหล็กในตัวอย่าง

$$Fe = 1.09 \text{ mgFe/L} \times 10 = 10.9 \text{ mg/L}$$

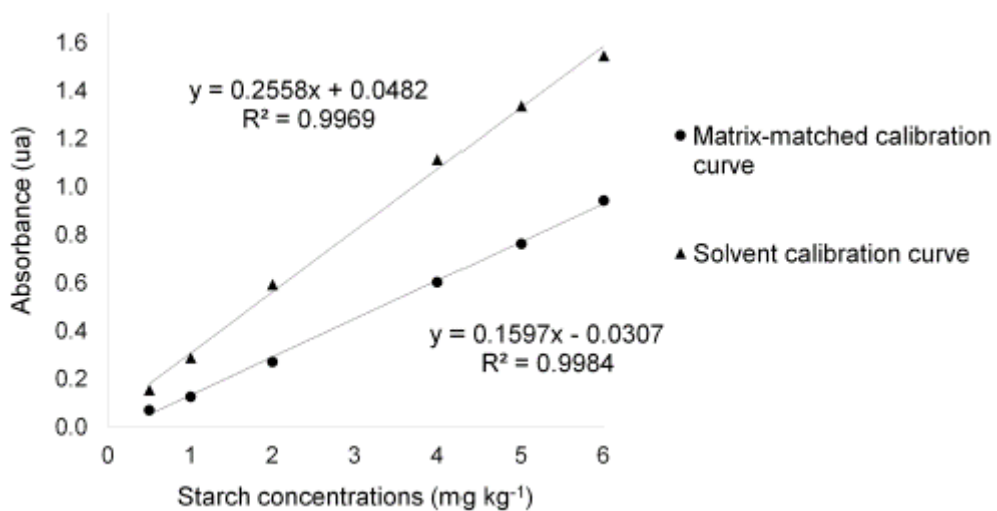
ดังนั้น สรุปได้ว่าในสารตัวอย่างมีปริมาณเหล็กเท่ากับ 10.9 mg/L (ppm)

แต่ในกรณีที่ตัวอย่างอาจสิ่งรบกวน (matrix) หรือสิ่งเจือปนที่ทำให้องค์ประกอบส่วนใหญ่แตกต่างจากสารมาตรฐาน และสิ่งรบกวนเหล่านั้นอาจมีผลต่อการดูดกลืนแสงทั้งบวกหรือทางลบ เราสามารถทำการเติมสารมาตรฐานแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง เรียกว่าวิธี matrix-matched calibration โดยวิธีนี้สามารถบ่งชี้ถึงผลของสิ่งรบกวนโดยดูจากกราฟเส้นตรง โดยถ้ากราฟระหว่างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นกับ

matrix-matched calibration มีความชันเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เส้นกราฟจะขนานกัน อธิบายได้ว่าผลของสิ่งรบกวนในสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ เช่นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เมลามีนในนมผง (Chansuvarn et al., 2013) ดังภาพที่ 7 แต่ถ้าความชันไม่เท่ากันหรือไม่ใกล้เคียงกัน เส้นกราฟจะไม่ขนานกัน (Silva, et al., 2017) ดังภาพที่ 8 อธิบายได้ว่าสิ่งรบกวนหรือสารเจือปนในสารตัวอย่างมีผลต่อการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 7 ผลการทำ matrix-matched calibration. (Chansuvarn et al., 2013).



ภาพที่ 8 ผลการทำ matrix-matched calibration. (Silva et al., 2017).

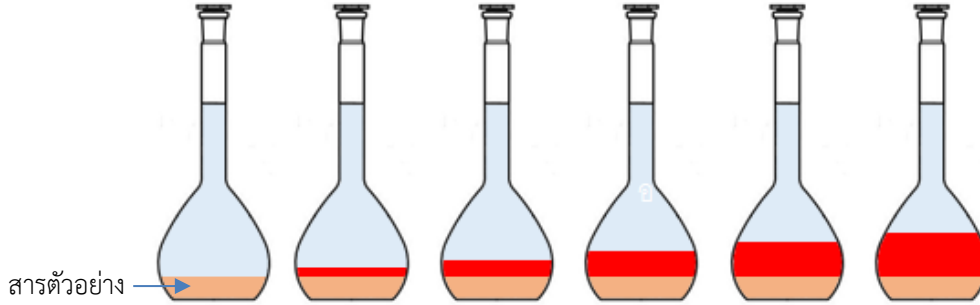
2) วิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition)

วิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition) หรือเรียกอีกอย่างว่า spiked method เป็นอีกวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่สนใจที่มีสารที่มีเมทริกซ์เจือปนมาก (matrix effect) ซึ่งอาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ได้ และไม่อาจใช้วิธี matrix-matched calibration ได้ โดยหลักการของวิธีนี้คือการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์สารที่สนใจ โดยขั้นตอนวิธีเติมสารละลาย ทำได้ดังนี้

2.1) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น (C_x) ปริมาตรแน่นอน (V_x) เท่ากัน ในขวดวัดปริมาตรอย่างน้อย 5 ขวด (ภาพที่ 9)

2.2) เติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (C_s) ปริมาตรที่แตกต่างกันเป็นลำดับ (V_s)

2.3) เติมสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาให้เท่ากันทุก ๆ ขวด และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย (ปริมาตรรวม V_t)



ภาพที่ 9 วิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition)

2.4) ทำการปรับศูนย์ด้วยสารละลายแบลงค์และวัดสัญญาณสารละลายมาตรฐานที่เติมสารตัวอย่าง (spiked sample) ด้วยเครื่องมือ ได้สัญญาณตอบสนองเป็น S นำสัญญาณตอบสนอง (S) มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนอง (แกน y) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (แกน x) จะได้ลักษณะกราฟมาตรฐานจากวิธีเติมสารมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 10

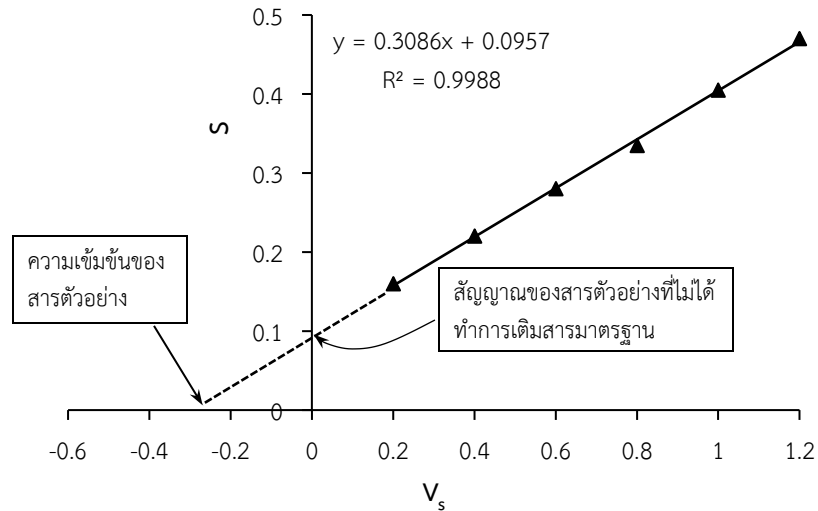
สัญญาณตอบสนอง (S) ที่ได้จะเป็นผลรวมของสัญญาณจากสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่เติมลงไป ดังนี้

$$S = \frac{V_s C_s}{V_t} + \frac{V_x C_x}{V_t} \quad \text{.....(4)}$$

จากสมการ (4) ถ้าเขียนกราฟระหว่าง S กับ V_s จะได้กราฟเส้นตรง ดังภาพที่ 8 โดยมี

ความชัน คือ $m = \frac{C_s}{V_t}$ (5)

จุดตัดแกน y คือ $b = \frac{V_x C_x}{V_t}$ (6)



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานของวิธีการเติมสารมาตรฐาน. (วรวิทย์, 2563).

สารตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น (C_x) สามารถหาความเข้มข้น ได้ดังนี้

$$\frac{b}{m} = \left(\frac{V_x C_x}{V_t} \right) \left(\frac{V_t}{C_s} \right) \quad \text{.....(7)}$$

$$C_x = \frac{b C_s}{m V_x} \quad \text{.....(8)}$$

จากกราฟภาพที่ 10 เมื่อลากเส้นต่อจากเส้นตรงไปตัดแกน y ที่จุดตัดแกน y จะเป็นสัญญาณของสารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการเติมสารมาตรฐาน (S_x) และที่จุดตัดแกน x จะเป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (C_x) ดังนั้น สมการ (4) เมื่อสัญญาณรวมเป็นศูนย์ เราสามารถคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ดังสมการ (10)

$$S = \frac{V_s C_s}{V_t} + \frac{V_x C_x}{V_t} = 0 \quad \text{.....(9)}$$

$$C_x = - \frac{(V_s)_0 C_s}{V_x} \quad \text{.....(10)}$$

ข้อดีวิธีเติมสารมาตรฐาน คือสามารถลดผลรบกวนจากเมทริกซ์และตัวรบกวนอื่น ๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากในสารละลายมาตรฐานแต่ละขวดที่ใช้เตรียมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานนั้น จะมีผลของเมทริกซ์ของสารตัวอย่างที่เติม (spike) ลงไปอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น แต่ก็มีข้อจำกัดเช่นกันคือความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติม (spike) ลงไปต้องอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงใช้งาน (linear working range) และอนุมูลของสารตัวอย่างที่เติม (spike) และสารที่สนใจต้องเหมือนกัน (Fortunato, et al., 2015) นอกจากนี้สารละลายมาตรฐานหนึ่งชุดที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐานจะใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้เพียงตัวอย่างเดียว จึงทำให้สิ้นเปลืองสารเคมีและเวลาอย่างมาก แต่ในบางกรณีที่ไม่ต้องการความถูกต้องมากนัก อาจใช้วิธีการเติมแบบสารเดี่ยว (single addition) ในการวิเคราะห์ ซึ่งทำได้ง่ายกว่าและประหยัดทั้งเวลาและสารเคมีมากกว่า โดยวิเคราะห์

สารละลายตัวอย่าง ได้สัญญาณ S_1 จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์อีกครั้งหนึ่ง ได้สัญญาณ S_2 นำผลที่ได้จากทั้งสองครั้งมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

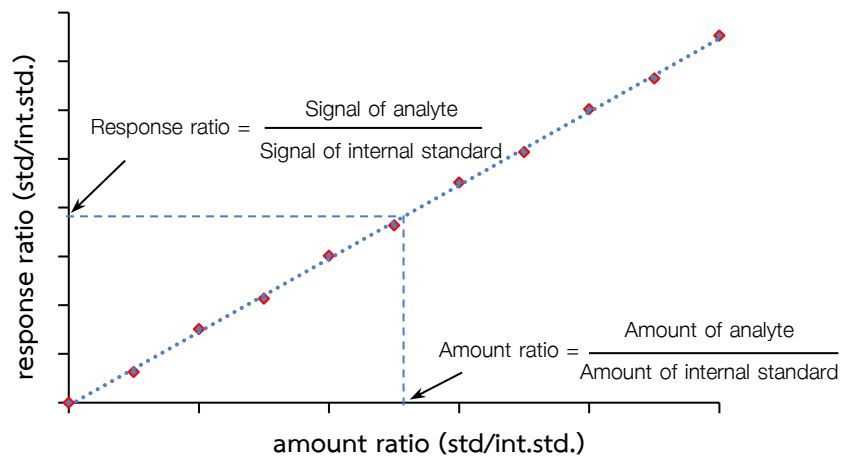
$$C_x = -\frac{S_1 V_s C_s}{(S_2 - S_1) V_x} \quad \dots\dots(11)$$

3. วิธีสารมาตรฐานภายใน (Internal standard)

วิธีนี้ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ซึ่งเป็นสารคนละชนิดกับสารที่สนใจวิเคราะห์ลงในสารละลายมาตรฐาน แบลงค์ และสารละลายตัวอย่าง ทำได้ดังนี้

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีสารที่สนใจวิเคราะห์ซึ่งทราบความเข้มข้นหลายความเข้มข้นและแบลงค์ ก่อนปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายให้เติมสารมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากันในทุกขวด
- 2) วิเคราะห์แบลงค์และสารละลายมาตรฐาน จากนั้นเขียนกราฟโดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ และแกน y เป็นอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารที่สนใจวิเคราะห์ต่อสัญญาณของสารมาตรฐานภายในและหาสมการเส้นตรง
- 3) เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยกระบวนการเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และเติมสารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับที่เติมในสารละลายมาตรฐาน
- 4) วิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง หาอัตราส่วนของสัญญาณของสารที่สนใจวิเคราะห์ต่อสัญญาณของสารมาตรฐานภายใน แล้วแทนค่าในสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง แล้วแปลงกลับเป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ในตัวอย่าง

การวิเคราะห์แบบสารมาตรฐานภายใน ต้องเติมสารที่เลือกใช้ เป็นสารมาตรฐานลงไปทั้งในตัวอย่างและสารมาตรฐานด้วยความเข้มข้นที่เท่ากัน ดังนั้นเมื่อนำสัญญาณที่วัดได้มาเขียนกราฟจะเป็นการเปรียบเทียบเป็นสัดส่วน (ratio) ระหว่างสัญญาณของสารมาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน ดังนั้นถ้าสัญญาณของสารที่สนใจทดสอบลดลง สัญญาณของสารมาตรฐานภายในก็จะลดลงไปด้วย ดังนั้น สัญญาณของสารมาตรฐานภายในเป็นตัวเปรียบเทียบ ช่วยลดควบคุมความผิดพลาดที่เกิดขึ้น ลักษณะกราฟมาตรฐานเป็นสัดส่วนสัญญาณ (แกน x) และสัดส่วนปริมาณสารที่สนใจ (แกน y) ระหว่างสารมาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน ภาพที่ 10



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานของวิธีสารมาตรฐานภายใน

ข้อดีของวิธีสารมาตรฐานภายใน คือสามารถลดความคลาดเคลื่อนจาก instrumental drift และผลของเมทริกซ์ได้ หากสารที่สนใจวิเคราะห์กับ internal standard ตอบสนองต่อเครื่องมือหรือเมทริกซ์ในทิศทางเดียวกัน เพราะการ drift ดังกล่าว แม้จะทำให้การตอบสนองเปลี่ยนไป แต่อัตราส่วนของสัญญาณระหว่างสารที่สนใจวิเคราะห์กับสารมาตรฐานภายใน จะยังคงมีค่าเท่าเดิม ส่วนข้อจำกัดคือการหาสารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมนั้นทำได้ยาก เพราะจะต้องไม่มีในสารตัวอย่าง และต้องตอบสนองต่อเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์ คล้ายคลึงกับสารที่สนใจวิเคราะห์ที่เราพิจารณา และไม่รบกวนหรือถูกรบกวนจากสารที่สนใจวิเคราะห์

โดยส่วนใหญ่วิธีสารมาตรฐานภายในนิยมใช้กับวิธีวิเคราะห์เทคนิคการแยก (separation analytical methods) เช่น GC และ HPLC มากกว่าทางเทคนิคสเปกโทรสโกปี อย่างไรก็ตามสารที่เป็น internal standard ควรต้องมีสมบัติคล้ายกับสารที่สนใจวิเคราะห์ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง และต้องสารนั้นต้องมีความบริสุทธิ์

4. วิธี Standard dilution analysis

วิธี standard dilution analysis (Jones, et al., 2015) เป็นวิธีสร้างกราฟมาตรฐานแบบใหม่โดยเป็นการรวมหลักการของวิธี standard addition และวิธี internal standard เข้าด้วยกัน ซึ่งจะมีข้อเด่นในการขจัดปัญหาการรบกวนจากผลของเมทริกซ์และความคลาดเคลื่อนจาก instrumental drift ได้ในขณะเดียวกัน ทั้งนี้ยังไม่จำเป็นต้องเตรียมชุดความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐานแบบภายนอกอีก ในขั้นตอนการทดลองโดยเป็นการรวมสารละลายสองชนิดในขวดเดียว โดยสารที่สนใจ (A) ในสารตัวอย่าง ถูกนำมาผสมรวมกับสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานและสปี้ซีส์ของ internal standard (I)

สัญญาณสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (S_A) ได้มาจากสัญญาณของสารตัวอย่าง (s_{am}) และสัญญาณของสารมาตรฐาน (std) ที่ถูกวัดที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ส่วนสัญญาณของ internal standard จะได้จากสาร internal standard เท่านั้น ดังนั้นสัญญาณสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (S_A) จึงเป็นผลคูณระหว่างสภาพไว (calibration sensitivity, m_A) และความเข้มข้น (C_A)

$$S_A = m_A C_A \quad \text{.....(12)}$$

เมื่อ m_A คือ calibration sensitivity ของสารที่สนใจ
 C_A คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจ

ในทำนองเดียวกัน สัญญาณของสาร internal standard (S_I)

$$S_I = m_I C_I \quad \text{.....(13)}$$

เมื่อ m_I คือ calibration sensitivity ของสาร internal standard
 C_I คือ ความเข้มข้นของสาร internal standard

อัตราส่วนระหว่างสัญญาณสารที่สนใจในสารตัวอย่าง (S_A) กับสัญญาณของสาร internal standard (S_I) เป็นดังนี้

$$\frac{S_A}{S_I} = \frac{m_A C_A}{m_I C_I} = \frac{m_A (C_A^{std} + C_A^{sam})}{m_I C_I} = \frac{m_A C_A^{std}}{m_I C_I} + \frac{m_A C_A^{sam}}{m_I C_I} \quad \text{.....(14)}$$

$$\frac{S_A}{S_I} = \frac{m_A C_A^{std}}{m_I C_I} + \frac{m_A C_A^{sam}}{m_I C_I} \quad \text{.....(15)}$$

จากสมการ (15) เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{S_A}{S_I}$ เป็นแกน y และ $\frac{1}{C_I}$ เป็นแกน x จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน (slope) และจุดตัดแกน (intercept) ดังนี้

$$\text{slope} = \frac{m_A C_A^{\text{sam}}}{m_I} \quad \text{.....(16)}$$

$$\text{intercept} = \frac{m_A C_A^{\text{std}}}{m_I C_I} \quad \text{.....(17)}$$

เมื่อ C_A^{std}/C_I เป็นค่าคงที่ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสาร internal standard ที่ทราบอย่างแน่นอนจากการเตรียม ส่วน m_A/m_I เป็นค่าคงที่ เนื่องจากเป็นสภาพไวของสารมาตรฐานและสาร internal standard ในสภาวะเดียวกัน ดังนั้น

$$C_A^{\text{sam}} = \frac{\text{slope}}{\text{intercept}} \times \frac{C_A^{\text{std}}}{C_I} \quad \text{.....(18)}$$

เอกสารอ้างอิง

1. วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ. 2563. *เคมีวิเคราะห์: หลักการและเทคนิคการคำนวณเชิงปริมาณ*. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. Chansuvarn W., Panich S., & Imyim A., 2013. Simple spectrophotometric method for determination of melamine in liquid milks based on green Mannich reaction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 113. p. 154-158.
3. Fortunato F.M., Bechlin M.A., Neto J.A.N., Donati G.L., Jones B.T., 2015. Internal standard addition calibration: Determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry, *Microchemical J.*, 122. p. 63-69.
4. Jones W.B., Donati G.L., Calloway C.P., Jones B.T., 2015. Standard Dilution Analysis. *Anal. Chem.*, 87. p. 2321-2327.
5. Silva G.R., Menezes L.D.M., Lanza I.P., Oliveira D.D. Silva C.A., Klein R.W.T., Assis D.C.S., Cançado S.V., 2017. Evaluation of the alpha-amylase activity as an indicator of pasteurization efficiency and microbiological quality of liquid whole eggs. *Poultry Science*, 96. p. 3375-3381.
6. Skoog D.A., Holler F.J., & Crouch S.R., 2007. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Thomson Brooks/Cole.