

Cuvette Calibration

วิสุทธิ์ กังวานตระกูล

Cuvette เป็นภาชนะสำหรับใส่สารละลายเพื่อนำไปวัดค่า A หรือ %T ในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดย cuvette จะกำหนดความกว้างของสารละลายที่จะให้แสงเดินทางผ่านเพื่อตรวจวัด วัสดุที่ใช้ทำ cuvette ไม่ควรดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ทำการวัด ส่วนมากมักทำด้วยแก้ว พลาสติกใส หรือควอทซ์ (quartz) ในกรณีที่ทำด้วยแก้วจะเหมาะสำหรับใช้งานในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 – 950 นาโนเมตร ถ้าต้องการใช้งานในช่วงความยาวคลื่นน้อยกว่า 320 นาโนเมตร ควรใช้ cuvette ที่ทำด้วยควอทซ์ cuvette ที่ทำด้วยพลาสติกชนิด polyacrylate จะใช้งานได้ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 – 950 นาโนเมตร cuvette มีหลายรูปแบบ เช่น เป็นชนิดหลอดกลมหรือสี่เหลี่ยม อาจทำให้มีช่องสำหรับดูดปล่อยสารละลายออกจากตรวจวัด เรียก cuvette แบบนี้ว่า flow-cell หรือ flow-cuvette ชนิดสี่เหลี่ยมจะเหมาะสำหรับใช้งานที่ต้องการความแม่นยำมาก เพราะมีการหักเหของแสงน้อยกว่า จึงมีราคาค่อนข้างแพง ในห้องปฏิบัติการประจำวันมักใช้ cuvette ชนิดกลม ซึ่งทำด้วยแก้วที่มีราคาไม่แพงมาก อย่างไรก็ตาม cuvette ชนิดกลมที่ได้รับการ calibrate และมีขายตามท้องตลาดยังมีราคาแพง เมื่อเทียบกับราคาของหลอดแก้วธรรมดา (ราคาสูงกว่าประมาณ 30 เท่า) และส่วนใหญ่จะทำไว้ให้เหมาะกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แต่ละชนิด

ในกรณีที่ต้องการใช้ cuvette จำนวนมากๆ และต้องการความประหยัด อาจจะใช้หลอดแก้วธรรมดาที่มีคุณภาพดี เช่น Pyrex, Kimax หรือ Corning มา calibrate เพื่อใช้งานเป็น cuvette ก็ได้ อย่างไรก็ตาม cuvette ที่ได้รับการ calibrate เองจะมีความแม่นยำน้อยกว่า แต่ก็ยังสามารถใช้งานได้ดีอยู่เนื่องจากหลอดแก้วที่นำมาใช้ทำ cuvette นั้น เนื้อแก้วอาจจะไม่สม่ำเสมอ เราจึงต้องปรับและเลือกหาตำแหน่งในหลอดแก้วให้อ่าน A หรือ %T ได้เท่าหรือใกล้เคียงกัน เพราะวาระยะทางที่แสงผ่านซึ่งกำหนดโดยความกว้างของ cuvette เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการวัดค่า A หรือ absorbance ดังสูตรที่แสดงต่อไปนี้

$$A = abc$$

โดยที่ A = Absorbance

a = ค่าคงที่

b = ระยะทางที่แสงผ่าน

c = ความเข้มข้นของสารละลาย

เพราะฉะนั้น ถ้าระยะทางที่แสงผ่านคือ b ไม่คงที่ ก็จะทำให้ค่า A หรือ absorbance ผิดพลาดไปได้

หลักการ

นำหลอดแก้วกลมที่มีผิวเรียบและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากันชุดหนึ่งมาบรรจุสารละลาย 0.01% (w/v) potassium ferricyanide แล้วนำไปวัดค่า %T หรือ A เทียบกับน้ำกลั่นที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร หมุนหาตำแหน่งการวางหลอดแก้วจนกระทั่งสามารถอ่าน %T หรือ A ได้ไม่แตกต่างกันมาก โดยยอมรับหลอดที่ให้ค่า %T ต่างกันไม่เกิน 0.5%T หรือ ค่า A ต่างกันไม่เกิน 0.002

สารเคมีและการเตรียมน้ำยา

Potassium ferricyanide 0.01% (w/v)

ละลาย potassium ferricyanide จำนวน 0.02 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 200 มล.

วิธีทำ

1. เปิดเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ตั้งความยาวคลื่นที่ 420 นาโนเมตร อุณหภูมิเครื่องไว้ประมาณ 15 นาที
2. เตรียมชุดหลอดแก้วที่มีขนาดเดียวกัน (ตามต้องการ เช่น 12x75, 13x100 หรือ 16x150 มม.) สะอาดใส ไม่เป็นรอยฝ้า ไม่มีรอยขีดข่วน
3. ใช้เทปกาวติดรอบขอบด้านนอกส่วนบนของหลอดแก้วทุกหลอด และขีดผิวด้านนอกของหลอดให้สะอาด
4. ใส่สารละลาย potassium ferricyanide เว้นไว้ 1 หลอด สำหรับใส่น้ำกลั่นเพื่อใช้เป็น blank และทำเครื่องหมายบนเทปกาวที่ติดบนหลอด blank ด้วย
5. ใส่หลอด blank ลงในเครื่อง และจัดตำแหน่งของหลอด blank ให้เครื่องหมายที่ทำไว้ตรงตำแหน่ง marker ของช่องสำหรับใส่ cuvette (ตำแหน่งนี้จะอยู่ในแนวทางเดินแสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์) ปรับสเกลให้อ่านได้ 100 %T หรือ A = 0
6. นำหลอดที่ใส่สารละลาย potassium ferricyanide ลงไปแทนหลอด blank อ่านค่า %T หรือ A แล้วหมุนหลอดไปมารอบๆ เพื่อหาตำแหน่งที่อ่านค่า %T หรือ A แล้วได้ค่าที่ไม่เปลี่ยนแปลงมาก (แสดงว่าแสงในระบบวัดของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ผ่านผิวหลอดแก้วตรงบริเวณที่มีเนื้อแก้วสม่ำเสมอ) **ให้เลือกเอาหลอดนี้เป็นมาตรฐาน** จดค่า %T หรือ A ไว้ และทำเครื่องหมายบนเทปกาวของหลอดในตำแหน่งที่ตรงกับ marker ของช่องสำหรับใส่ cuvette (ถ้าค่า %T หรือ A เปลี่ยนแปลงไปมาก จะไม่ใช้หลอดนั้น)
7. นำหลอดบรรจุสารละลาย potassium ferricyanide อื่นๆ มาอ่านค่า %T หรือ A โดยการหมุนหลอดไปรอบๆ อย่างช้าๆ เพื่อให้อ่านค่า A หรือ %T ใกล้เคียงกับหลอดที่เป็นมาตรฐาน (ในข้อ 5 ให้มากที่สุด) **ยอมให้ต่างกันไม่มากกว่า ± 0.5 %T หรือ ± 0.002 A** พร้อมทั้งทำเครื่องหมาย

บนเทพกาวของหลอดในตำแหน่งที่ตรงกับ marker ของช่องสำหรับใส่ cuvette (ควรใส่หลอด blank ทุกครั้งเพื่อปรับค่า %T = 100 หรือ A = 0 ก่อนเปลี่ยนหลอดอื่นมาอ่านค่า %T หรือ A)

8. นำหลอดบรรจุสารละลาย potassium ferricyanide ที่อ่านค่า A หรือ %T ได้ต่างกันไม่มากกว่า ± 0.5 %T หรือ ± 0.002 A มาใช้เป็นชุด cuvette เพื่อใช้งาน

หมายเหตุ

1. ถ้า cuvette มีรอยขีดข่วน เมื่อแสงมากระทบจะทำให้เกิดการกระจายแสง ซึ่งทำให้วัดค่า A ได้ผิดพลาด ดังนั้น จึงต้องระวังไม่ให้ cuvette มีรอยขีดข่วนในขณะที่ใช้งาน ตัวอย่างเช่น
 - ระวังไม่ให้กระทบกับ cuvette หรือหลอดแก้วอื่นๆ
 - rack ที่ใช้ใส่ cuvette ควรเป็น rack ที่หุ้มด้วยยางหรือพลาสติก ถ้าเป็น stainless rack ต้องระวังไม่ให้ cuvette กระทบหรือขูดกับ rack
 - ห้ามใช้แปรงล้างหลอดมาทำความสะอาด cuvette ควรใช้ผ้าก๊อชพันรอบแท่งไม้แทนแปรงล้างหลอด
 - หลีกเลี้ยงไม่ใส่กรดแก่หรือด่างแก่ลงใน cuvette เพราะว่าจะกัดแก้วทำให้ผิว cuvette ไม่เรียบ
2. สารละลายใน cuvette อย่างน้อยต้องสูงเท่าหรือมากกว่าช่องแสง (slit) ผ่าน และการจับ cuvette ควรจับเฉพาะส่วนบนของ cuvette เท่านั้น
3. เช็ดด้านนอกของ cuvette ด้วยผ้าก๊อชหรือทิชชูทุกครั้ง จนไม่มีรอยนิ้วมือ หรือ หยดน้ำ ก่อนวัด
4. ไม่ควรมีฟองอากาศเกาะด้านในของ cuvette เวลาวัด A หรือ %T ถ้ามีฟองอากาศจะต้องไล่ออกโดยการเคาะข้างหลอดเบาๆ กับนิ้วมือที่มีผ้าก๊อชหุ้มอยู่
5. ขนาดของ cuvette และ adapter ควรจะมีขนาดเดียวกัน ถ้า adapter ใหญ่กว่าจะทำให้ cuvette ไม่ตั้งตรง ค่าที่วัดได้จะผิดพลาดจากความเป็นจริง
6. ในการล้าง cuvette ให้ใช้น้ำยาเหล่านี้ล้าง คือ mild detergent, 5%(v/v) nitric acid solution หรือส่วนผสมของ 5% HCl กับ ethanol หรือ methanol ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากแช่ด้วยน้ำยาชนิดใดชนิดหนึ่งข้ามคืนแล้ว ให้ล้างออกด้วยน้ำประปา น้ำกลั่น เช็ดด้านนอกของหลอดด้วยผ้าก๊อชนุ่มๆ เพื่อมิให้มีจุดค้างเมื่อหลอดแห้ง แล้วคว่ำไว้ใน rack อาจใช้ผ้าหรือกระดาษรองพื้น rack ไว้ ถ้าต้องการอบ cuvette ให้แห้งไม่ควรอบที่อุณหภูมิเกินกว่า 100°C เพราะการอบที่อุณหภูมิสูงๆ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผิวแก้วที่ใช้ทำ cuvette ได้

บรรณานุกรม

1. Annino JS, Giese RW. Clinical chemistry : principles and procedures. 4th ed. Boston : Little Brown and company, 1976:44-55.
2. Frings CS, Gaudie J. Spectral techniques. In : Kaplan LA, Pesce AJ, ed. Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation. 2nd ed. St. Louis : CV Mosby company, 1989 : 56.