การวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิก ด้วยตัวเซนเซอร์ CCD แบบเส้น

เอก ไชยสวัสดิ์ [1] **เลอพงษ์ พิศนุย** [2]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
และ อมรินทร์ ปรีชาวุฒิ [3]
มหาวิทยาลัยมหิดล ศิริราช บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

รับเมื่อ 31 มกราคม 2548 ตอบรับเมื่อ 15 กรกฎาคม 2548

บทคัดย่อ

บทความวิจัยนี้เป็นการนำแนวทางการวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิกด้วยเซนเซอร์ CCD แบบเส้น ซึ่งเป็นการวัดครั้งละสเปกตรัมแสง (ความยาวคลื่นแสง 400 ถึง 800 นาโนเมตร) มาใช้งานแทนการวัดการดูดแสงแบบระบบโมโนโครเมเตอร์ ที่วัดครั้งละหนึ่งความยาวคลื่น ซึ่งจะเป็นการพัฒนาในด้านความสะดวกและรวดเร็วของการวัดแต่ละครั้ง, ไม่มีอุปกรณ์ส่วนหนึ่งส่วนใดเคลื่อนที่เมื่อมีการเปลี่ยนความยาวคลื่นของการวัด และมีการวัดที่แบนด์วิดท์แคบ

มีการใช้หลอดฮาโลเจน เป็นแหล่งกำเนิดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิก ผ่านโคลลิเมเตอร์ได้ลำแสงขนานไปผ่านเกรทติ้งเกิดการเลี้ยวเบนของแสงเป็นสเปกตรัม จากนั้นจะทำการรวมสเปกตรัมของแต่ละความยาวคลื่นของแสงด้วยเลนส์นูนตกกระทบตัวเซนเซอร์แบบเส้น เพื่อวัดค่าความเข้มของแสงที่ได้และนำมาคำนวณหาค่าการดูดแสง ในการนี้จะประมวลผลโดยไมโครคอมพิวเตอร์ จากผลการทดลองที่ได้สามารถวัดค่าการดูดแสงโดยใช้ตัวเซนเซอร์แบบเส้นขนาด 3,000 พิกเซล จะแสดงให้เห็นค่าผิดพลาดของความยาวคลื่นเมื่อสอบเทียบกับหลอดไอปรอท มีค่าผิดพลาดร้อยละ 0.049 และค่าการดูดแสงโดยอาศัยกฎของเบียร์และแลมเบอร์ท ซึ่งจะได้ค่าการดูดแสงที่ความเข้มของสารละลายในอัตราส่วนที่เท่าๆ กัน เป็นเส้นตรง

---

[1] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมระบบควบคุมและเครื่องมือวัด*

[2] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาวิศวกรรมระบบควบคุมและเครื่องมือวัด*

[3] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์*

Light Absorption Measurement in the Clinical Chemistry Solution Using CCD Line Scan Sensor

Ake Chaisawadi [1], Lerpong Pisnoiy [2],

King Mongkut's University of Technology, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

and Amarin Prijavudhi[3]

Mahidol University, Sirirath, Bangkoknoi, Bangkok, 10700

Received 31 January 2005 ; accepted 15 July 2005

Abstract

This research paper describes how to measure the light absorption in clinical chemistry solution by CCD line scan sensor. The CCD line scan sensor is employed to measure a spectrum (wavelengths ranging from 400 to 800 nanometer) instead of using momochromator system which measured only a wavelength at a time. Using the CCD line scan sensor is more convenient and faster at a time without moving of any accessories even when changing the wavelength of measurement, and compute measure the narrow bandwidth.

The Halogen lamp is chosen as the light source passed through the clinical chemistry solution and then collimator to focus the light into a parallel beam which in turn passed through diffraction grating to produce the spectrum of light. The spectrum of each different wavelength are gathered by a convex lens converging line sensor to measure the light intensity. The calculation of light absorption is then processed by a microcomputer. The results of experiment can be measured the light absorption by using the 3,000 pixels of the line sensor. It is also presented the error of wavelength only 0.049% while comparing with the mercury lamp. According to Beer and Lambert's law, the absorption value of light depends on the concentration of solution in linear equal ratio.

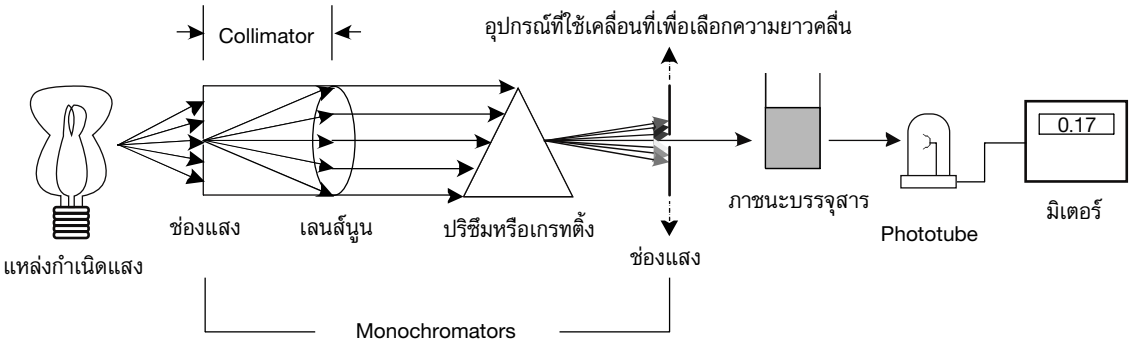
[1] *Associate Professor, Department of Control System and Instrumentation Engineering.*

[2] *Graduate Student, Department of Control System and Instrumentation Engineering.*

[3] *Associate Professor, Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology.*

1. บทนำ

การวิเคราะห์หาปริมาณหรือความเข้มข้นของสารและธาตุชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกส่วนใหญ่ใช้หลักการของสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) ซึ่งเป็นการวัดพลังงานในรูปของพลังงานแสงที่เปล่งออกมาหรือถ่ายทอดให้ หรือดูดรับไว้ หรือสะท้อนออกมาจากสารประกอบ การวัดพลังงานแสงดังกล่าวอยู่ภายใต้สภาวะที่ควบคุมไว้ และการวัดพลังงานแสงที่สำคัญมากวิธีหนึ่งคือวิธีการวัดพลังงานแสงที่สสารดูดรับไว้ (Absorption spectrophotometry)

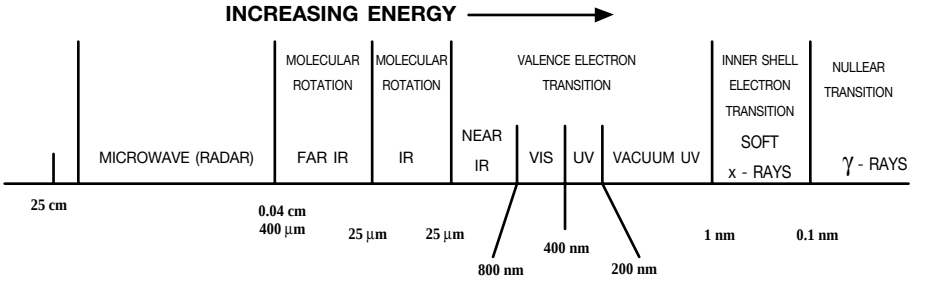


รูปที่ 1 เครื่อง Spectrophotometer ระบบโมโนโครเมเตอร์

เครื่อง Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวัดพลังงานแสงที่สสารดูดรับไว้ ซึ่งที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่เป็นระบบโมโนโครเมเตอร์ ที่มีการวัดครั้งละหนึ่งความยาวคลื่น มีค่าแบนด์วิดท์ของความยาวคลื่นแสงอยู่ประมาณ 3 ถึง 5 นาโนเมตร จากรูปที่ 1 จะแสดงการทำงานของเครื่อง Spectrophotometer ระบบโมโนโครเมเตอร์ ซึ่งมีการทำงานดังนี้ แสงจากแหล่งกำเนิดของแสง (หลอดฮาโลเจน ขนาด 12 โวลต์ 50 แอมแปร์) มาผ่านโคลลิเมเตอร์ ได้ลำแสงขนานมาผ่านเกรทติ้งเพื่อให้เกิดการแยกสเปกตรัมของแสง และจะให้แสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ต้องการผ่านช่องแสงหรือเรียกว่า Slip (การเปลี่ยนตำแหน่งของการวัดไป ณ ความยาวคลื่นแสงต่างๆ ทำได้โดยการปรับตำแหน่งของช่องแสง โดยการเคลื่อนให้ตำแหน่งความยาวคลื่นแสงที่ต้องการผ่านยังช่องแสงและการปรับขนาดของช่องแสง เป็นการปรับค่าแบนด์วิดท์ของความยาวคลื่นในการวัด) ลำแสงที่ผ่านช่องแสงจะเป็นลำแสงเดี่ยวหนึ่งความยาวคลื่นที่มีแบนด์วิดท์ 3 ถึง 5 นาโนเมตร ผ่านสารละลายมากระทบเซนเซอร์และนำค่าไปประมวลผลต่อไป จากการวัดในระบบนี้จะเป็นการวัดครั้งละหนึ่งความยาวคลื่น มีค่าแบนด์วิดท์ค่อนข้างกว้าง และการเปลี่ยนการวัดไปในตำแหน่งความยาวคลื่นอื่นๆ จะต้องมีการเคลื่อนตำแหน่งของอุปกรณ์ ซึ่งในบางครั้ง การวัดทางเคมีคลินิกจะทำการวัดสารประกอบ ซึ่งในการวัดการดูดแสงนี้จะมีสารรบกวนปนอยู่ ดังนั้นการวัดที่มีเสถียรภาพถูกต้อง และแม่นยำ จะต้องทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นอื่นๆ เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งจุดหรือมากกว่านั้นมาหักลบเพื่อเป็นการหักลบสารรบกวนอื่นที่ไม่ต้องการออก จากเหตุผลนี้ในการใช้เครื่อง Spectrophotometer ในระบบเดิมจะต้องวัดถึงสองครั้ง สองเวลา ดังนั้นสาร Color reagent ซึ่งเป็นตัวเร่งความเข้มของสารที่นำมาตรวจในการวัดครั้งที่สอง จะไม่เป็นจุดเดียวกันกับการวัดครั้งแรก และถ้าเจ้าหน้าที่ชันสูตรโรคทำในขั้นตอนนี้ช้า ค่าผิดพลาดที่เกิดขึ้นก็จะเพิ่มขึ้น

จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนา การวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิก โดยพัฒนาในแนวทางการพัฒนาของตัวเซนเซอร์ ซึ่งในปัจจุบันตัวเซนเซอร์ที่ขนาดเล็กมากและเรียงตัวกันได้หลายๆ ตัว ในการพัฒนานี้เลือกใช้ตัวเซนเซอร์แบบเส้นยี่ห้อ Sony รุ่น ILX526A ขนาด 3000 พิกเซล ในแต่ละพิกเซลจะมีขนาด $7\mu m \times 14\mu m$ มาใช้ ซึ่งจะสามารถวัดความเข้มของแสงได้ครั้งละหลายๆ ความยาวคลื่นเป็นสเปกตรัม ซึ่งจะมีการทำงานของการวัดการดูดแสงโดยใช้แหล่งกำเนิดของแสงเป็นหลอดฮาโลเจน ยี่ห้อ Osram ขนาด 12 โวลต์ 50 แอมแปร์ มีความยาวคลื่น 400 ถึง 800 นาโนเมตร มาผ่านสารละลายทางเคมีคลินิก (ซึ่งในบทความนี้จะใช้สาร Cobalt Sulfate Hepta Hydrate : $CoO_4S.7H_2O$) ในขั้นตอนนี้จะเกิดการดูดแสง จากนั้นนำแสงที่ได้มาผ่านเลนส์นูนที่ติดตั้งในลักษณะโคลลิเมเตอร์ ได้ลำแสงขนานไปผ่านเกรทติ้งเกิดการเลี้ยวเบนเป็นสเปกตรัม จากนั้นจะทำการรวมสเปกตรัมแสงด้วยเลนส์นูนตกกระทบตัวเซนเซอร์ เพื่ออ่านค่าความเข้มของแสงที่ได้และนำมาคำนวณหาค่าการดูดแสง ในการนี้จะประมวลผลโดยไมโครคอมพิวเตอร์ ก่อนที่จะกล่าวรายละเอียดต่างๆ จะขอกล่าวถึงธรรมชาติของพลังงานแสงก่อนดังนี้

ธรรมชาติของพลังงานแสงและการดูดพลังงานแสงของสสาร



รูปที่ 2 แถบความยาวคลื่น

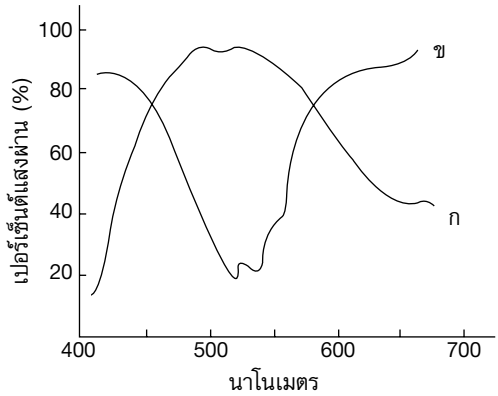
แสงมีพฤติกรรมเป็นอนุภาคหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic waves) มีหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดจะถูกแบ่งตามความแตกต่างกันของความยาวคลื่นดังรูปที่ 2 ความยาวคลื่น (λ : หน่วยเป็นเมตร) มีความสัมพันธ์กับความเร็วของแสงในสุญญากาศ (c : หน่วยเป็นเมตรต่อวินาที) กับความถี่ของแสง (f : หน่วยเป็น เฮิรตซ์ หรือ $\frac{1}{\text{นาที}}$) นั้น ดังสมการ

$$\lambda = \frac{c}{f} \tag{1}$$

พลังงานของคลื่นแสงหรือพลังงานโพตอน (E) เป็นค่าพลังงานที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (f) และมีค่าคงที่คือ ค่าคงตัวของพลังค์ (Planck's Constant " h " = 6.62×10^{-34} จูล-วินาที) ซึ่งจะหาได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$E = h.f = h.\frac{c}{\lambda} \tag{2}$$

แสงต่างๆ ที่มองเห็นได้และไม่ได้ จะมีพลังงานแตกต่างกัน แสงอัลตราไวโอเลตมีพลังงานสูงกว่าแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้ โดยแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-800 นาโนเมตรและแสงในช่วงคลื่นดังกล่าวจะมีพลังงานสูงกว่าอินฟราเรด แสงทั้งหลายที่กล่าวมาแล้วอยู่ในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดยแสงที่มีพลังงานสูงกว่า จะมีความยาวคลื่นสั้นกว่าและมีความถี่สูงกว่า



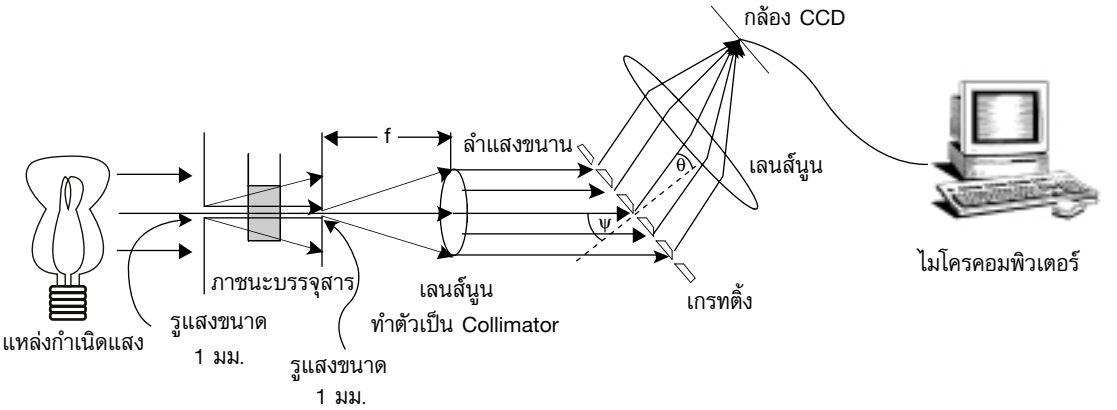
รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์แสงผ่านที่ถ่ายทอดออกมาของกราฟ ก เป็นสารนิเกิลซัลเฟต และ กราฟ ข เป็นสารโปแตสเซียมเปอร์มังกาเนต โดยมีน้ำกลั่นเป็นหลอดค่าเปล่า

แสงสีขาวเช่น แสงแดด เกิดจากส่วนผสมของแสงที่มีความยาวช่วงคลื่นต่างๆ กัน สสารที่มองเห็นเป็นแสงแดดในเวลากลางวัน แสดงว่าเมื่อแสงแดดตกกระทบสสารนั้น แสงที่มีความยาวช่วงคลื่นอื่นๆ จะถูกสสารนั้นดูดไว้ นอกจากแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วงของแสงสีเขียว (ความยาวช่วงคลื่นระหว่าง 500 ถึง 580 นาโนเมตร) จะถูกถ่ายทอดออกมาจึงทำให้เห็นเป็นสีเขียว

โครงสร้างของสสารที่เป็นสาเหตุทำให้มองเห็นสีต่างๆ ได้เรียกว่า โครโมเจน (Chromogen) โครงสร้างดังกล่าวส่วนมากจะมีบอนด์ชนิดไม่อิ่มตัว เช่น $\overset{\backslash}{C} = O$, $\overset{\backslash}{C} = \overset{/}{C}$, -N=N- และ $-NO_2$ เป็นต้น ส่วนโครงสร้างอื่นๆ เช่น -OH, $-NH_2$, -CI และ -Br ไม่สามารถทำให้ปรากฏสีได้เอง แต่สามารถช่วยให้สีที่เกิดโดยโครโมเจนมีความเข้มมากขึ้น สารที่มีโครงสร้างเหล่านี้เรียกว่าออกโซโครม (Auxochrome) รูปที่ 3 กราฟเส้นโค้ง ก แสดงเปอร์เซ็นต์แสงที่ถ่ายทอดออกมาโดยนิเกิลซัลเฟต ซึ่งมีช่วงคลื่นที่ถ่ายทอดสูงสุดที่ประมาณ 500 นาโนเมตร ดังนั้นสีของสารนิเกิลซัลเฟตที่ตามองเห็นจะเป็นสีเขียว ส่วนกราฟเส้นโค้ง ข เป็นของโปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตจะมีช่วงคลื่นที่ถ่ายทอดสูงสุด 2 ช่วงคลื่น คือ ช่วงคลื่นตั้งแต่ต่ำกว่า 450 นาโมเมตร (สีน้ำเงิน) ผสมกับช่วงคลื่นตั้งแต่สูงกว่า 600 นาโนเมตร (สีแดง) ดังนั้นสีที่ตามองเห็น คือ สีม่วงซึ่งเป็นสีผสมของสีทั้งสอง

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทำงาน

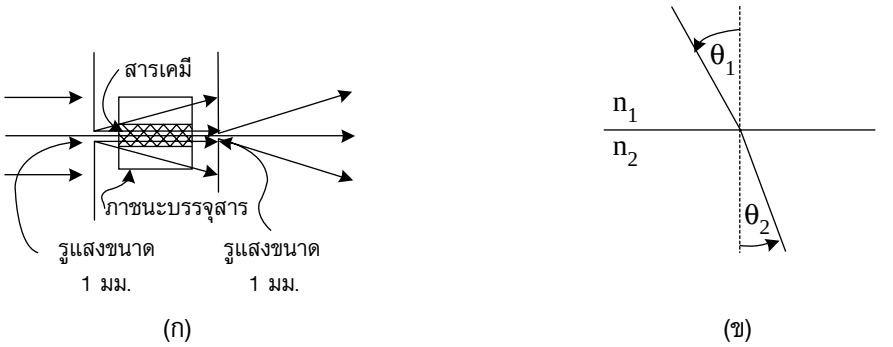
2.1 การจัดวางอุปกรณ์แสง



รูปที่ 4 การจัดวางอุปกรณ์แสง

การจัดวางอุปกรณ์แสงได้แสดงตามรูปที่ 4 สำหรับรายละเอียดของวัสดุอุปกรณ์และวิธีการทำงานจะอธิบายดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1.1 แหล่งกำเนิดแสง ใช้หลอดฮาโลเจน ขนาด 12 โวลต์ 50 แอมแปร์ ทำงานในย่านความยาวคลื่น 400 ถึง 800 นาโนเมตร



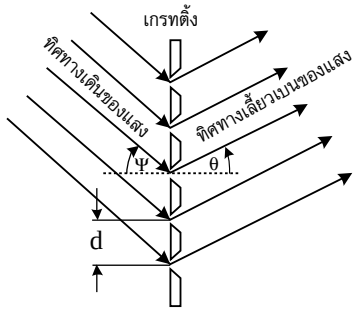
รูปที่ 5 (ก) การติดตั้งภาชนะบรรจุสารและทิศทางของลำแสง
(ข) ทิศทางการหักเหของแสง

2.1.2 ภาชนะบรรจุสาร ในการทดลองนี้ใช้เป็นหลอดเหลี่ยมแบบควอรท์ซ ซึ่งวางอยู่ระหว่างรูแสงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร (ด้านแหล่งกำเนิดแสง) กับรูแสงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร (ด้านเลนส์นูน) โดยที่ภาชนะบรรจุสารนี้มีพื้นที่หน้าตัดขนาด 10 มิลลิเมตร × 10 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 5 (ก) (มอง

ด้านบนภาพ) จะเห็นว่าลำแสงจากแหล่งกำเนิดผ่านรูแสงออกมาตรงผ่านสารทดสอบและผ่านรูแสงอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงเดินทางไปหาเลนส์ จากสมการการหักเห

$$n_1 \sin\theta_1 = n_2 \sin\theta_2 \quad \textbf{(3)}$$

รูปที่ 5 (ข) แสดงทิศทางหักเหของแสง จะเห็นว่าลำแสงที่ผ่านสารทดสอบในภาชนะบรรจุสารจะไม่มีการหักเหในส่วนที่ออกไปยังเลนส์เนื่องจากมุมตกกระทบเท่ากับ 0 องศา



รูปที่ 6 การเลี้ยวเบนของเกรทติ้ง

2.1.3 เกรทติ้งเป็นอุปกรณ์แสงที่ทำให้แสงเกิดการเลี้ยวเบนซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงการเลี้ยวเบนดังรูปที่ 6 และค่าต่างๆ จะมีความสัมพันธ์ซึ่งเป็นไปตามสมการเกรทติ้ง ดังนี้

$$n\lambda = d\,(\sin\psi + \sin\theta_n) \quad \textbf{(4)}$$

เมื่อ λ = ความยาวคลื่นแสง, d = ระยะห่างของเส้น, θ = มุมเลี้ยวเบน, n = จำนวนลำดับของริ้ว, ψ = มุมตกกระทบระหว่างเส้นทิศทางของแสงกับเส้นตั้งฉากกับเกรทติ้ง

เกรทติ้งที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเกรทติ้งขนาด 1,100 เส้นต่อมิลลิเมตร ซึ่งจะมีระยะห่างของเส้น (d) เท่ากับ 909 นาโนเมตร การทำงานของเกรทติ้งเกิดขึ้นจากการที่ลำแสงขนาน มากระทบเกรทติ้งด้วยการทำมุม 30 องศา กับเส้นตั้งฉากเกรทติ้ง และลำแสงนั้นจะทำมุมเลี้ยวเบน (θ) กับเส้นตั้งฉาก เกรทติ้งซึ่งมุมเลี้ยวเบนจะเป็นไปตามสมการ (4) ในการทดลองนี้ได้เลือกจำนวนลำดับของริ้ว n = 1

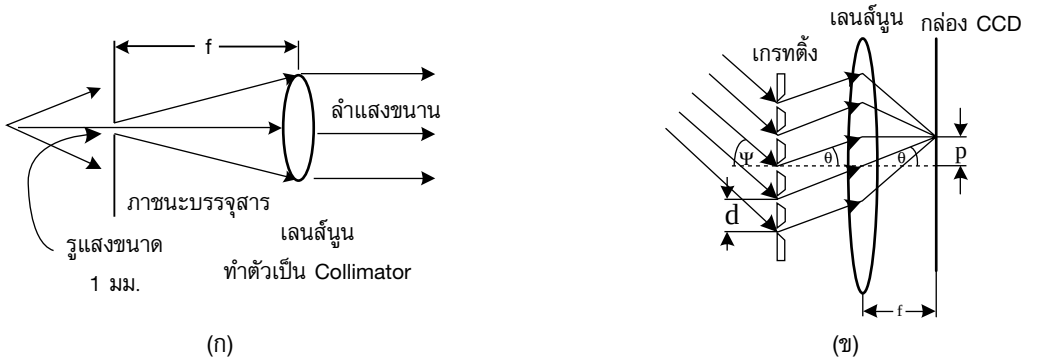
รูปที่ 7 (ก) ตำแหน่งของจุดโฟกัสของเลนส์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงเป็นจุด
(ข) ตำแหน่งของจุดโฟกัสของเลนส์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงเป็นลำแสงขนาน

2.1.4 เลนส์นูนเป็นอุปกรณ์ทางแสงอันหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะตรงกลางของเลนส์จะหนากว่าบริเวณขอบทั้งสองข้าง โดยส่วนที่นูนออกมานั้นเป็นส่วนโค้งของทรงกลมที่มีรัศมีเท่ากับ R และจะมีจุดโฟกัส : F อยู่ที่ครึ่งหนึ่งของรัศมี จุดโฟกัสของเลนส์นูนจะมี 2 จุดคือ

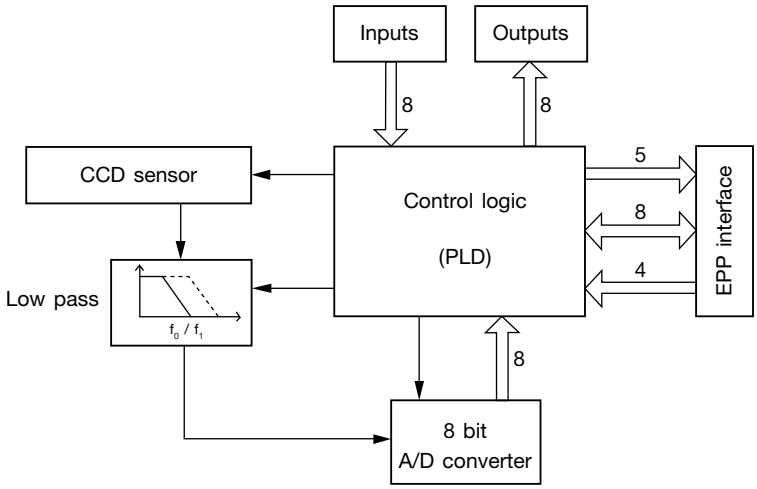
2.1.4.1 จุดโฟกัสเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่มีลักษณะเป็นจุด แสดงดังรูป 7 (ก) แสงที่ออกจากเลนส์จะเป็นแสงขนานได้ ก็ต่อเมื่อระยะจากจุดกำเนิดแสงที่เป็นจุดกับจุดกึ่งกลางของเลนส์เท่ากับระยะโฟกัส การติดตั้งเลนส์ในลักษณะนี้เรียกว่า เลนส์โคลลิเมเตอร์ (Collimator lens)

2.1.4.2 จุดโฟกัสเป็นจุดรวมแสง แสดงในรูป 7 (ข) แสงที่เข้าเป็นแสงขนานและออกจากเลนส์จะรวมกันที่จุดโฟกัส

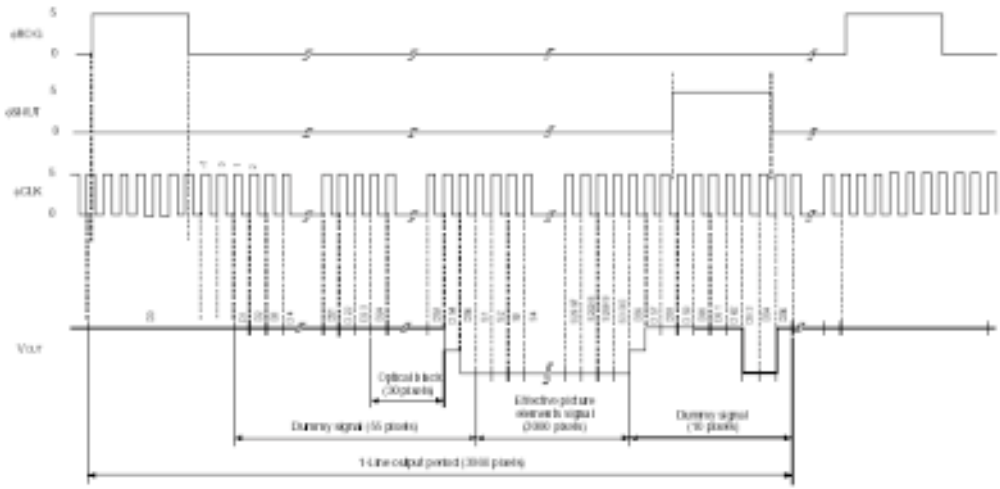
เลนส์นูนที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ใช้งาน 2 จุด จุดแรกแสงที่เกิดจากแหล่งกำเนิดผ่านรูแสงขนาด 1 มิลลิเมตร ซึ่งรูแสงนี้จะถือว่าเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่เป็นจุด ที่ตั้งห่างจากเลนส์นูนตัวแรกเท่ากับระยะโฟกัสของเลนส์ (4 เซนติเมตร) ลำแสงที่ผ่านเลนส์นั้นเป็นลำแสงแบบขนานที่แสดงในรูปที่ 8 (ก) จุดที่สองเลนส์นูนติดตั้งระหว่างเกรทติ้งกับตัวเซนเซอร์ภาพ เพื่อรวมแสงที่เลี้ยวเบนจากเกรทติ้งทำการรวมแสงในความยาวคลื่นใดๆ ไปกระทบที่ตัวเซนเซอร์ภาพ ดังรูปที่ 8 (ข) ระยะห่างระหว่างเลนส์นูนกับเกรทติ้งนี้ จะมีระยะเท่ากับค่าโฟกัสของเลนส์นูน (4 เซนติเมตร) และระยะนี้จะเป็นตัวกำหนดขอบเขตของความยาวคลื่นแสงที่กระทบในตำแหน่งพิกเซลของตัวเซนเซอร์



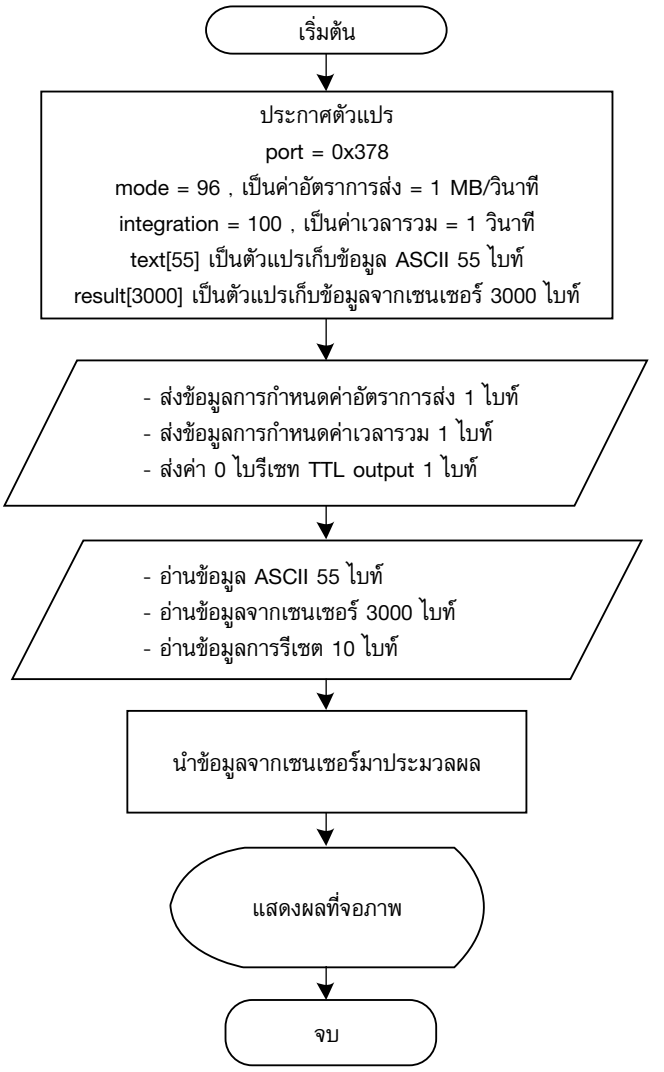
รูปที่ 8 (ก) ตัว Collimator ที่ให้ลำแสงขนาน (ข) เลนส์ที่ทำการรวมลำแสงขนานในแต่ละความยาวคลื่น



รูปที่ 9 บล็อกไดอะแกรมของกล้อง CCD



รูปที่ 10 ไดอะแกรมสัญญาณนาฬิกาในการควบคุม



รูปที่ 11 ขั้นตอนการทำงานของโปรแกรมการอ่านกล้อง CCD

2.1.5 กล้อง CCD แบบการสแกนแนวเส้น ขนาด 3,000 พิกเซล เป็นอุปกรณ์ดิจิตอลซึ่งอ่านข้อมูลแอนะลอกจากตัวเซนเซอร์ CCD ผ่านวงจรกรองความถี่ต่ำเพื่อลด Thermal Noise ของตัวเซนเซอร์ CCD แล้วนำสัญญาณที่ได้มาแปลงเป็นดิจิตอล ในวงจรแปลง A/D ขนาด 8 บิต ส่งไปยังไมโครคอมพิวเตอร์ทางพอร์ตแบบขนาน (IEEE 1284 standard) ซึ่งการควบคุมภายในนี้จะถูกควบคุมโดย PLD (Programmable Logic Device) ดังแสดงต่อรูปที่ 9

ตัวเซนเซอร์ภาพ CCD เป็นแบบเส้น ขนาด 3,000 พิกเซล ในแต่ละพิกเซลมีขนาด $7\mu m \times 14\mu m$ มีความไวในการวัดแสง 300 V/(lx.s) ซึ่งจะมีไดอะแกรมสัญญาณนาฬิกาในการควบคุมดังรูปที่ 10 จากไดอะแกรมสัญญาณนาฬิกาในการควบคุม จึงนำมาเขียนโปรแกรมควบคุมการอ่าน ดังจะแสดงขั้นตอนการทำงานของโปรแกรมการอ่านกล้อง CCD ในรูปที่ 11

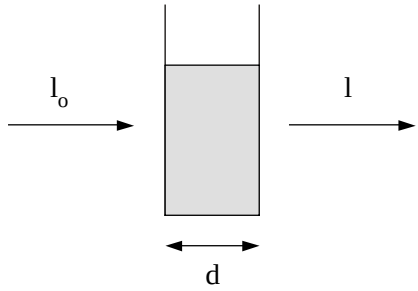
2.2 การคำนวณค่าการดูดพลังงานแสงและเปอร์เซ็นต์แสงผ่าน

สมมุติมีคิวเวทบรรจุสารละลายอย่างหนึ่งซึ่งสามารถดูดพลังงานแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งและจัดให้แสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวผ่านคิวเวท แสงที่ตกกระทบคิวเวทมีความเข้ม l_O, แสงที่มีผ่านคิวเวทออกมามีความเข้ม l และคิวเวทที่แสงผ่านบรรจุสารละลายมีความหนา d (รูปที่ 12)

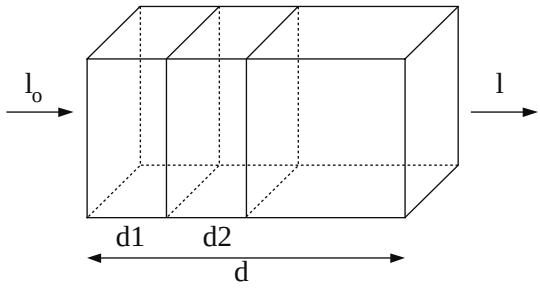
หาค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่านได้โดยการเทียบบัญญัติไตรยางค์ เริ่มต้นจากแสงตกกระทบคิวเวท l_O แสงผ่านคิวเวทออกมามีความเข้ม l ดังนั้นถ้าแสงตกกระทบ 100 จะหาความเข้มของแสงผ่านคิวเวทได้ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์แสงผ่าน } (\%T) = \frac{l}{l_o} \times 100 \qquad \textbf{(5)}$$

โดยปกติหากไม่มีสารดูดพลังงานแสงในสารละลาย แสงที่ผ่านคิวเวทออกมาจะมีค่าความเข้มเท่ากับแสงตกกระทบ หรือ $l = l_O$ และค่า $\%T$ จะเท่ากับ 100 เมื่อบรรจุสารดูดพลังงานแสงไว้ในคิวเวท ความเข้มของแสงที่หายไป (ที่ถูกดูดไว้) ขึ้นกับจำนวนโมเลกุลในสารละลายที่เรียงตัวอยู่ในคิวเวท ซึ่งมีความหนาตลอดระยะทางที่แสงผ่าน



รูปที่ 12 ทางเดินของแสงเมื่อผ่านสารละลายในคิวเวท



รูปที่ 13 ทางเดินของแสงเมื่อผ่านแต่ละชั้นของตัวกลางในคิวเวท

2.2.1 กฎของ Lambert มีอยู่ว่า "สัดส่วนของความเข้มของแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวและถูกดูดไว้โดยตัวกลางที่มีเนื้อเดียวกัน และจะไม่ขึ้นกับความเข้มของแสงที่ตกกระทบกับตัวกลางนั้น แต่ละชั้นของตัวกลางที่หนาเท่ากันจะดูดกลืนความเข้มของแสงที่ได้รับในสัดส่วนเท่าๆ กัน" (รูปที่ 13) หรืออาจกล่าวได้ว่า ถ้าให้ลำแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว ผ่านตัวกลางที่เป็นเนื้อเดียวในแต่ละชั้นที่หนาเท่าๆ กันแล้วความเข้มของแสงที่ลดลงจะเป็นแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential) กับความหนารวม

$$l = l_o e^{-k_1(d_1+d_2+d_3+...+d_n)}$$

$$\log_e \frac{l}{l_o} = -k_1 (d_1 + d_2 + d_3 + ...+ d_n)$$

$$\log \frac{l_o}{l} = k_a d \qquad \textbf{(6)}$$

โดยที่ k_1 คือ โมล่าร์แอบซอพทิวิตี้ (molar absorptivity) ซึ่งมีค่าคงที่สำหรับแต่ละความยาวคลื่น โดยปรกติจะมีค่าเป็นฟังก์ชั่นของความยาวคลื่นและอุณหภูมิ

d คือ ความหนารวมของแต่ละตัวกลางในแต่ละชั้นซึ่งเท่ากับ $d_1 + d_2 + d_3 + ... + d_n$

k_a คือ $\frac{k_1}{2.303}$ เป็นสัมประสิทธิ์แห่งการลดทอน (coeffecient) ปัจจุบันใช้สัญลักษณ์ a แทน และเรียกว่าดัชนีแห่งการดูดพลังงานแสง (absorptivity)

$\log \frac{l_o}{l}$ คือ ค่าการดูดพลังงานแสง (Optical Density ; O.D.) ให้สัญลักษณ์เป็น A มาจาก Absorbance

โมล่าร์แอบซอพทิวิตี้ คือ ค่าการดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 M และมีระยะทางที่แสงผ่าน 1 ซม.

2.2.2 กฎของ Beer มีว่า "สัดส่วนของความเข้มของแสงซึ่งเป็นความยาวคลื่นเดียวและถูกดูดไว้โดยตัวกลางที่มีเนื้อเดียวกัน จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณ (ความเข้มข้น) ของตัวกลางนั้น" หรืออาจกล่าวได้ว่า แต่ละโมเลกุลของสารจะดูดกลืนความเข้มของแสงในสัดส่วนเท่าๆ กัน หรืออีกนัยหนึ่ง แสงที่ผ่านสสารในสารละลายจะมีความเข้มของแสงลดลงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียลกับความเข้มข้นของสสารที่เพิ่มมากขึ้นในคิวเวทเดียวกันดังสมการ

$$l = l_o e^{-k_2(c_1+c_2+c_3+...+c_n)}$$

$$\log_e \frac{l}{l_o} = -k_2 c$$

$$\log \frac{l_o}{l} = k_b c \qquad \textbf{(7)}$$

โดยที่ c คือ ความเข้มข้นรวมของสสาร

k_2 คือ โมล่าร์แอบซอพชั่น (molar absorption) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของสสารและไม่ขึ้นกับความเข้มข้น แต่ขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิ

k_b คือ โมล่าร์แอบซอพทิวิตี้ ปัจจุบันให้สัญลักษณ์เป็น b เดิมเรียกว่า โมล่าร์เอ็กซติงค์ชั่น (Molar extinction)

$$k_b = \frac{k_2}{2.303}$$

เมื่อรวมกฎของ Beer และ Lambert เข้าด้วยกันจะได้สมการดังนี้

$$\log \frac{l_o}{l} = k_a k_b cd$$

$$\log \frac{l_o}{l} = kcd$$

$$\text{ค่าการดูดแสง (A)} = kcd \qquad \textbf{(8)}$$

การเปรียบเทียบจากค่าการดูดแสงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่านสามารถคำนวณได้ดังนี้
จากสมการ (5) จะได้ว่า

$$\frac{l_o}{l} = \frac{100}{\%T}$$

ใส่ log ทั้ง 2 ข้าง

$$\log \frac{l_o}{l} = \log \frac{100}{\%T}$$

$$A = \log \frac{100}{\%T}$$

$$A = \log 100 - \log \%T$$

$$A = 2 - \log \%T \qquad \textbf{(9)}$$

จากสมการ (8) จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย หรือการเพิ่มความยาวของระยะทางที่แสงผ่านคิวเวท (Light path) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า A

โดยทั่วไปการวัดค่าการดูดแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ปรับความเข้มข้นของสารดูดพลังงานแสงซึ่งบรรจุอยู่ในคิวเวทให้ได้ค่า A อยู่ระหว่าง 0.05-0.70 หรือค่า %T อยู่ระหว่าง 20-90 เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นในช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรง สำหรับระยะทางที่แสงผ่านในคิวเวทนิยมออกแบบไว้เป็นมาตรฐาน โดยใช้คิวเวทซึ่งทำด้วยแก้วโปร่งใสให้ระยะแสงผ่าน 1 ซม. พอดี ถ้าเป็นคิวเวทรูปเหลี่ยมควรใช้ด้านที่มีแก้วโปร่งใสซึ่ง

เป็นด้านที่ให้แสงผ่านซึ่งจะถูกยึดด้วยแก้วขุ่นหรือซิลิกา 2 แผ่น และด้านฐานเป็นซิลิกาอีก 1 แผ่น ทั้งหมดยึดติดกันด้วยกาวซีเมนต์ ด้านที่เป็นแก้วโปร่งใสขนานกัน จะต้องรักษาไม่ให้เกิดรอยขูดขีดหรือเปื้อนสาร เพราะจะมีผลต่อลำแสงที่ตกกระทบหรือที่ผ่านออกมา ทำให้ค่าการดูดพลังงานแสงผิดพลาดได้

2.3 การประยุกต์ใช้การดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิก

การประยุกต์ใช้การดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิก เช่นการวัด การวัดหาความเข้มข้นของโฆเลสเตอรอลในร่างกายคน เป็นการเลือกค่าการดูดแสงของสารละลายโฆเลสเตอรอลมาตรฐานที่ใกล้เคียงกับค่าการดูดแสงของตัวอย่างตรวจ แล้วนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของโฆเลสเตอรอลรวม (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)} = \frac{OD_u}{OD_s} \times C_s \qquad \textbf{(10)}$$

โดยที่ OD_u = ค่าการดูดแสงของตัวอย่างตรวจ

OD_s = ค่าการดูดแสงของสารละลายโฆเลสเตอรอลมาตรฐานที่เลือกไว้

C_s = ค่าความเข้มข้นของสารละลายโฆเลสเตอรอลมาตรฐานที่เลือกไว้

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

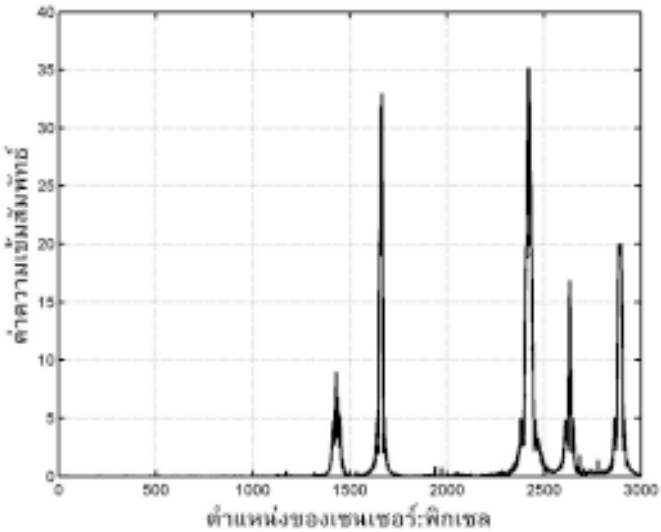
3.1 การสอบเทียบในแกนความยาวคลื่น

ตามที่ได้ติดตั้งอุปกรณ์ดังรูปที่ 4 ในการสอบเทียบ (calibration) ความยาวคลื่นของระบบทำโดยการวัดสเปกตรัมของแสงที่เกิดจากการใช้หลอดไอปรอท ยี่ห้อ Philips รุ่น HPL-N 80 W. เป็นแหล่งกำเนิดแสงอ้างอิง และจะทดสอบแสงสีม่วงเข้ม สีม่วง สีเขียว และสีเหลือง โดยแต่ละสีจะมีความยาวคลื่นของแสง 404.7 435.8 546.1 และ 579 นาโนเมตร ตามลำดับ ในขั้นตอนแรกค่าที่วัดได้จะมีข้อมูล 3,000 ตำแหน่งหรือพิกเซล จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าในแต่ละพิกเซลจะวัดความเข้มของแสงเป็นค่าความเข้มสัมพัทธ์ (relative intensity) ซึ่งในการวัดครั้งนี้จะมีค่าพีคอยู่ที่ตำแหน่ง 1,430 1,660 2,422 และ 2,634 พิกเซล ตามลำดับ และนำค่าพีคต่างๆ มาหาสมการโดยใช้หลักการประมาณค่าของกฎ Least square จะได้สมการดังนี้

$$\lambda = 768.20 - 0.14n_p \qquad \textbf{(11)}$$

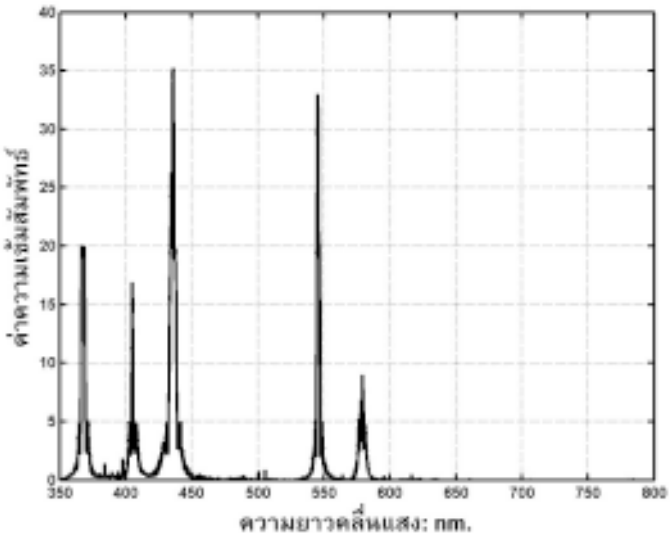
เมื่อ λ = ความยาวคลื่นแสง: (นาโนเมตร)

n_p = ตำแหน่งพิกเซลของตัวเซนเซอร์ (= 1, 2 ,....., 3,000)



รูปที่ 14 ตำแหน่งพิกเซลของเซนเซอร์แบบเส้น ที่เกิดพีคจากการวัดหลอดไอปรอท

และนำสมการที่ 11 นี้นำมาปรับเทียบสเกลจากตำแหน่งของเซนเซอร์ ดังรูปที่ 14 มาเป็นความยาวคลื่นแสง ซึ่งจะได้สเปกตรัมของแสงจากหลอดไอปรอท แสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 สเปกตรัมของแสงจากหลอดไอปรอท

จากผลการวัดสเปกตรัมของแสงโดยใช้หลอดไอปรอทเป็นแหล่งกำเนิดแสง พบว่าค่าความยาวคลื่นของแสงที่วัดได้มีค่าความคลาดเคลื่อน (error) เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานอ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 1 จากตารางจะพบว่าค่าผิดพลาดสูงสุดจากการวัดคือ 0.049%

ตารางที่ 1 ความยาวคลื่นย่าน Visble เปรียบเทียบผลกับค่าอ้างอิงของหลอดไอปรอท

แสง	ค่าอ้างอิง (nm)	ค่าที่วัดได้ (nm)	% ผิดพลาด
แสงสีม่วง	404.7	404.9	0.049
แสงสีน้ำเงิน	435.8	435.6	-0.046
แสงสีเขียว	546.1	545.9	-0.037
แสงสีเหลือง	579.0	579.2	0.035

3.2 การสอบเทียบในแกนค่าการดูดแสง

ในการสอบเทียบค่าการดูดแสงในงานทางเคมีคลินิกนั้น อาศัยการรวมกฎของ Beer และกฎของ Lambert เข้าด้วยกันจะได้ค่าการดูดแสงดังสมการที่ 8 จะเห็นว่าค่าการดูดแสงจะเป็นสัดส่วนตรงกับค่าความเข้มข้นของสารละลาย เมื่อให้ค่าความยาวของระยะทางที่แสงผ่านคิวเวทคงที่แล้ว ในการทดลองนี้จะหาการดูดแสงจากการใช้สาร $CoSO_4.7H_2O$ (Cobalt Sulfate Hepta Hydrate) โดยจะต้องปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

3.2.1 หาค่าความยาวคลื่นแสงที่วัดค่าการดูดแสงสูงสุด

ขั้นตอนการหาค่าการดูดแสงที่ผ่านสารทางเคมีคลินิกมีขั้นตอนดังนี้

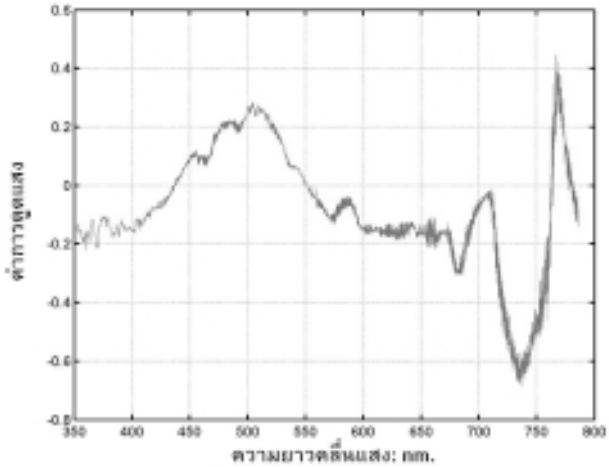
3.2.1.1 การวัดครั้งที่ 1 วัดค่าความเข้มของแสงในกรณีที่ภาชนะบรรจุสารมีสารเป็นน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ค่าที่วัดได้จะเป็น I

3.2.1.2 การวัดครั้งที่ 2 วัดค่าความเข้มของแสงในกรณีที่ภาชนะบรรจุสารมีสารทดสอบ (1.5%Cobalt Sulfate ใน 0.1 M Sulfuric acid) ค่าที่วัดได้จะเป็น I_o

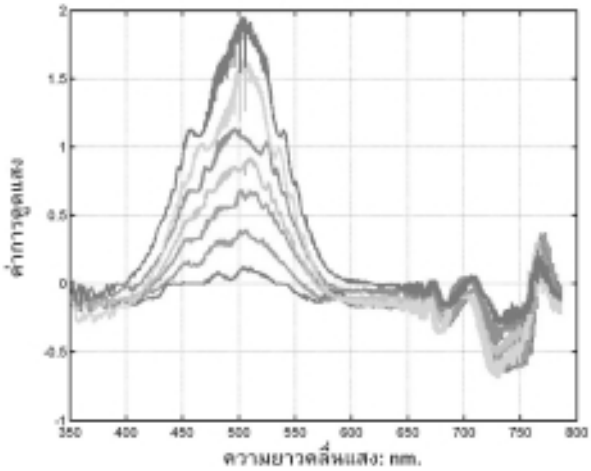
3.2.1.3 นำค่า I และ I_o ไปคำนวณหาค่าการดูดพลังงานแสงโดยใช้สมการที่ 9 ซึ่งการคำนวณแต่ละครั้งจะมีการอ่านค่า I หรือ I_o จำนวนอย่างละ 3,000 ค่า ตามความยาวคลื่นแสง ณ ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งการประมวลผลต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วนั้นจะประมวลผลโดยไมโครคอมพิวเตอร์ จะได้ผลการวัดดังรูปที่ 16 ซึ่งจะพบว่าค่าความยาวคลื่นแสงที่วัดมีค่าพีคของการดูดแสง เท่ากับ 510.03 นาโนเมตร และรูปสัญญาณที่เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 670 – 800 นาโนเมตร เกิดขึ้นเพราะพลังงานแสงเมื่อผ่านสาร Cobalt Sulfate ในย่านนี้ทำให้เกิดการสั่น หมุน หรือบิดตัวของโมเลกุล และจะเกิดการคายแสงออกมาเพื่อกลับสู่สภาวะปกติ (สภาวะสมดุลของสารทั่วๆ ไป)

3.2.2 สอบเทียบค่าการดูดแสง โดยอาศัยกฎของ Beer และกฎของ Lambert

ผสมสาร Cobalt Sulfate 10% (ส่วนผสมของ Cobalt Sulfate 10 กรัม ละลายด้วย 0.1 M. Sulfuric acid 100 มล.) เรียกว่า Stock กับสาร 0.1 M. Sulfuric acid เรียกว่า Diluent ตามตารางที่ 2 และบันทึกค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 510.03 นาโนเมตร โดยใช้สารตาม Tube No. ในการวัดค่า I_o ตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.2.1 จากรูปที่ 17 เป็นการนำค่าสเปกตรัมของค่าการดูดแสงผ่านสารละลายที่ความเข้มต่างๆ ตามตารางที่ 2 มาจัดรวมกันไว้ในกราฟเดียวกัน



รูปที่ 16 สเปกตรัมของการดูดแสงของสารละลาย (1.5% Cobalt Sulfate ใน 0.1 M Sulfuric acid)

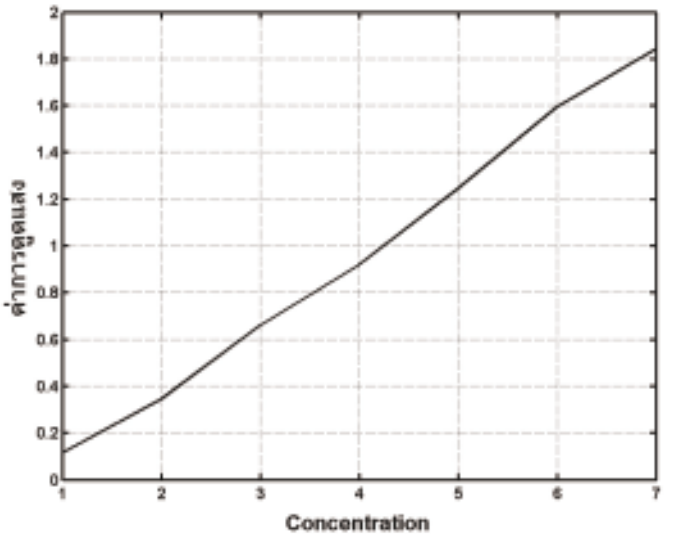


รูปที่ 17 สเปกตรัมของค่าการดูดแสงผ่านสารละลายที่ความเข้มต่างๆ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าการดูดแสงผ่านสารละลายที่ความเข้มต่างๆ

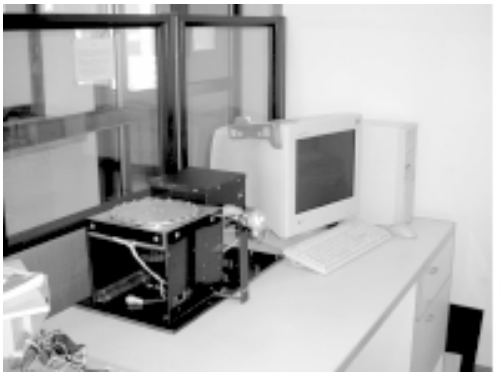
Tube No.	Dilution	Stock / mL	Diuent / mL	Concentration	O.D.
1	1:10	1	9	C1	0.116
2	2:10	2	8	C2	0.346
3	3:10	3	7	C3	0.661
4	4:10	4	6	C4	0.920
5	5:10	5	5	C5	1.246
6	6:10	6	4	C6	1.596
7	7:10	7	3	C7	1.845

หมายเหตุ O.D. (Optical Density) : ค่าการดูดแสงที่อ่านได้การวัดตามขั้นตอนในข้อ 3.2.1



รูปที่ 18 ค่าความสัมพันธ์ของการดูดแสงผ่านสารละลายที่ความเข้มต่างๆ

นำค่าการดูดกลืนแสงในตารางที่ 2 มาสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 18 จากสมการที่ 8 จะเห็นว่าความสัมพันธ์ของค่าการดูดแสง (A) จะเป็นสัดส่วนตรงกับค่าเข้มของสารละลาย เมื่อระยะความหนาของสารเท่ากับ 1 เซนติเมตร ดังนั้นค่าที่ได้จากรูปที่ 18 กราฟที่ค่อนข้างจะเป็นเชิงเส้น และรูปที่ 19 เป็นภาพของอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองนี้



(ก)

(ข)

รูปที่ 19 (ก) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง (ข) ตำแหน่งของอุปกรณ์แสง

จากผลการทดลอง การปรับเทียบในแกนความยาวคลื่น โดยใช้หลอดไอปรอทเป็นแหล่งกำเนิดแสงอ้างอิง ซึ่งเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับค่าอ้างอิงแล้วพบว่า ค่าผิดพลาดสูงสุดในการวัดคือ 0.049% และการสอบเทียบในแกนค่าความดูดแสงที่เป็นไปตามการรวมกฎของ Beer และกฎของ Lambert นั้น ตามรูปที่ 18 จะเห็นความสัมพันธ์ที่ได้เกือบเป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในงานทางเคมีคลินิกในช่วงวัดค่าดูดแสง 0 ถึง 2.0 O.D.

ผลของการนำเอาแนวทางการวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิกด้วยตัวเซนเซอร์แบบเส้น ซึ่งเป็นการวัดครั้งละสเปกตรัมมาใช้งานแทนการวัดการดูดแสงแบบระบบโมโนโครเมเตอร์ที่วัดครั้งละหนึ่งความยาวคลื่นนั้น จะมีการพัฒนาในด้านเวลาของการวัดแต่ละครั้ง เช่นในกรณีที่วัดสารประกอบซึ่งในการวัดครั้งนี้จะใช้จุดวัดที่ 3 ความยาวคลื่น การวัดโดยการตัวเซนเซอร์แบบเส้นจะเร็วกว่าแบบระบบโมโนโครเมเตอร์ประมาณ 3 เท่า จากการทำงานที่เร็วกว่านี้เป็นเหตุให้สามารถที่จะลดความผิดพลาดอันเนื่องมาจากค่าความเข้มของสารประกอบซึ่งผสมสาร Color reagent (สาร Color reagent เป็นตัวเร่งความเข้มของสารประกอบ) เมื่อเวลาเปลี่ยนไปจะทำให้ความเข้มเปลี่ยนไปด้วยในการวัดที่ 3 ความยาวคลื่นนั้น การวัดด้วยตัวเซนเซอร์แบบเส้นจะวัดที่จุดความเข้มของสารประกอบเดียวกันตลอด ซึ่งต่างจากการวัดในระบบโมโนโครเมเตอร์จะต้องวัดถึง 3 ครั้ง และมีการพัฒนาในด้านการปรับเปลี่ยนตำแหน่งของอุปกรณ์ในการวัดแต่ละความยาวคลื่น กล่าวคือในการวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ในระบบโมโนโครเมเตอร์จะต้องเคลื่อนตำแหน่งของช่องแสงเพื่อให้ตำแหน่งของความยาวคลื่นที่ต้องการผ่านยังช่องแสง ซึ่งการเปลี่ยนตำแหน่งที่บ่อยครั้งนี้จะเป็นเหตุให้เกิดความผิดพลาดขึ้นได้และต้องมีการสอบเทียบตำแหน่งของความยาวคลื่นเสมอ ส่วนการวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิกด้วยตัวเซนเซอร์แบบเส้นจะไม่มีการเปลี่ยนตำแหน่งอุปกรณ์ และจะมีการพัฒนาในปรับความกว้างของช่องแสงการวัดการดูดแสงโดยระบบโมโนโครเมเตอร์ต้องปรับช่องแสงเพื่อเป็นการปรับแบนด์วิดท์ของความยาวคลื่นของการวัด ซึ่งอยู่ระหว่าง 3 ถึง 5 นาโนเมตร และค่าที่วัดได้เป็นค่าเฉลี่ย แต่ในการวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิกโดยใช้ตัวเซนเซอร์แบบเส้นนั้น ในแต่ละตำแหน่ง (พิกเซล) จะห่างกัน 0.14 นาโนเมตร ซึ่งจะทำให้มีอ่านค่า Wave-length ได้ตรงกว่าระบบเดิมมาก

4. สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการจัดทำอุปกรณ์เพื่อใช้ในการวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิกโดยใช้ตัวเซนเซอร์แบบเส้นที่สามารถวัดค่าการดูดแสงครั้งละสเปกตรัมแสง (ความยาวคลื่นแสง 400 ถึง 800 นาโนเมตร) ซึ่งมีข้อดีกว่าการวัดการดูดแสงโดยระบบโมโนโครเมเตอร์ดังนี้

4.1 ใช้งานได้สะดวกและรวดเร็ว

4.2 การวัดการดูดแสงผ่านสารละลายทางเคมีคลินิกโดยใช้ตัวเซนเซอร์แบบเส้นจะไม่มีส่วนใดเคลื่อนที่

4.3 ตัดปัญหาในเรื่องการปรับความกว้างของช่องแสง

ประโยชน์ในการวัดการดูดแสงผ่านสารละลายที่ใช้ในงานทางเคมีคลินิกมีมากมาย เช่น การวัดหาความเข้มข้นของสารชีวเคมีต่างๆ ในร่างกายคน อีกทั้งสามารถนำหลักการทดลองนี้เป็นเครื่องต้นแบบเพื่อการผลิตขึ้นใช้เองในประเทศต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

1. อมรินทร์ ปรีชาวุฒิ และคณะ, 2529, *หลักการวิเคราะห์และปฏิบัติการเคมีคลินิก*, พิมพ์ครั้งที่ 1 พาณิชย์การพิมพ์, กรุงเทพฯ, หน้า 40-50.

2. Caraway WT.,1976, *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Philadelphia : WB Saunders Co, pp. 103 - 174.

3. Halliday, Resnick, and Krane, 1992, *Physic Volume 2 Extended Version 4th ed.*, John Wiley & Sons INC, New York, pp. 904-1002.