

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก ก

### ตัวแปรที่ใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดลอง

**Percent graft of monomer (% G)** หมายถึง เปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของการกราฟต์กับฟิล์มเริ่มต้น

$$(\% G) = [(w_1 - w_0) / w_0] \times 100$$

$$w_0 = \text{น้ำหนักฟิล์มเริ่มต้น}$$

$$w_1 = \text{น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์}$$

ภาคผนวก ข

ตาราง

ตารางที่ ผข-1 เปรอร์เซ็นต์กราฟต์ฟิล์มพอลิเอทธิลีนด้วย 25 % w/w acrylic acid

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิเอทธิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ acrylic acid (g)	% กราฟต์ acrylic acid ± SD
1	0.0320	0.0335	5.68 ± 0.18
2	0.0336	0.0352	4.76 ± 0.20
3	0.0339	0.0357	5.31 ± 0.02
4	0.0334	0.0361	5.56 ± 0.13
5	0.0319	0.0336	5.33 ± 0.04
6	0.0308	0.0323	4.87 ± 0.15

ตารางที่ ผข-2 เปรอร์เซ็นต์กราฟต์ฟิล์มพอลิพรอพิลีนด้วย 25 % w/w acrylic acid

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิพรอพิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ acrylic acid (g)	% กราฟต์ acrylic acid ± SD
1	0.0231	0.0253	9.52 ± 0.18
2	0.0253	0.0278	9.88 ± 0.33
3	0.0215	0.0236	9.77 ± 0.29
4	0.0245	0.0265	8.16 ± 0.37
5	0.0234	0.0253	8.12 ± 0.39
6	0.0246	0.0268	8.94 ± 0.05

ตารางที่ผข-3 เปอร์เซนต์กราฟต์ฟิล์มพอลิเอทธิลีนด้วย 5 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิเอทธิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 5 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 5 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0322	0.0325	1.24 $\pm$ 0.05
2	0.0326	0.0329	0.92 $\pm$ 0.08
3	0.0332	0.0336	1.20 $\pm$ 0.03
4	0.0335	0.0339	1.19 $\pm$ 0.03
5	0.0327	0.0331	1.22 $\pm$ 0.04
6	0.0323	0.0326	0.93 $\pm$ 0.08

ตารางที่ผข-4 เปอร์เซนต์กราฟต์ฟิล์มพอลิเอทธิลีนด้วย 10 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิเอทธิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 10 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 10 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0325	0.0330	1.54 $\pm$ 0.05
2	0.0321	0.0325	1.25 $\pm$ 0.07
3	0.0335	0.0340	1.49 $\pm$ 0.03
4	0.0331	0.0336	1.51 $\pm$ 0.04
5	0.0333	0.0338	1.50 $\pm$ 0.03
6	0.0322	0.0326	1.24 $\pm$ 0.07

ตารางที่ผข-5 เปรูเซินตกรรฟต์ฟิล์มพอลิเอทธิลีนด้วย 15 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิเอทธิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกรรฟต์ 15 % w/w maleic anhydride (g)	% กรรฟต์ 15 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0324	0.0335	1.82 $\pm$ 0.00
2	0.0335	0.0341	1.79 $\pm$ 0.01
3	0.0333	0.0339	1.80 $\pm$ 0.00
4	0.0337	0.0343	1.78 $\pm$ 0.01
5	0.0325	0.0331	1.85 $\pm$ 0.02
6	0.0328	0.0334	1.83 $\pm$ 0.01

ตารางที่ผข-6 เปรูเซินตกรรฟต์ฟิล์มพอลิเอทธิลีนด้วย 20 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิเอทธิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกรรฟต์ 20 % w/w maleic anhydride (g)	% กรรฟต์ 20 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0315	0.0322	2.22 $\pm$ 0.16
2	0.0334	0.0344	2.99 $\pm$ 0.06
3	0.0331	0.0341	3.02 $\pm$ 0.16
4	0.0319	0.0327	2.51 $\pm$ 0.05
5	0.0322	0.0330	2.48 $\pm$ 0.06
6	0.0321	0.0329	2.49 $\pm$ 0.05

ตารางที่ผข-7 ร้อยละการกราฟต์ฟิล์มพอลิเอทธิลีนด้วย 25 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิเอทธิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 25 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 25 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0316	0.0326	3.16 $\pm$ 0.05
2	0.0331	0.0342	3.02 $\pm$ 0.01
3	0.0326	0.0336	3.07 $\pm$ 0.01
4	0.0322	0.0332	3.11 $\pm$ 0.03
5	0.0327	0.0338	3.06 $\pm$ 0.01
6	0.0318	0.0327	2.83 $\pm$ 0.09

ตารางที่ผข-8 ร้อยละการกราฟต์ฟิล์มพอลิพรอพิลีนด้วย 5 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิพรอพิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 5 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 5 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0223	0.0226	1.35 $\pm$ 0.01
2	0.0227	0.0230	1.32 $\pm$ 0.00
3	0.0235	0.0328	1.28 $\pm$ 0.01
4	0.0222	0.0225	1.35 $\pm$ 0.01
5	0.0226	0.0229	1.32 $\pm$ 0.00
6	0.0232	0.0235	1.29 $\pm$ 0.01

**ตารางที่ผข-9** ร้อยละการกราฟต์ฟิล์มพอลิพรอพิลีนด้วย 10 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิพรอพิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 10 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 10 % w/w maleic anhydride ± SD
1	0.0225	0.0230	2.22 ± 0.10
2	0.0221	0.0225	1.81 ± 0.07
3	0.0231	0.0235	1.73 ± 0.10
4	0.0235	0.0240	2.13 ± 0.07
5	0.0227	0.0231	1.76 ± 0.09
6	0.0233	0.0238	2.15 ± 0.07

**ตารางที่ผข-10** ร้อยละการกราฟต์ฟิล์มพอลิพรอพิลีนด้วย 15 % w/w maleic anhydride

ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนักฟิล์มพอลิพรอพิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 15 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 15 % w/w maleic anhydride ± SD
1	0.0224	0.0229	2.68 ± 0.09
2	0.0233	0.0230	2.58 ± 0.05
3	0.0235	0.0227	2.55 ± 0.04
4	0.0237	0.0240	2.53 ± 0.03
5	0.0228	0.0244	2.19 ± 0.11
6	0.0225	0.0223	2.22 ± 0.10

**ตารางที่ผข-11** ร้อยละการกราฟต์ฟิล์มพอลิพรอพิลีนด้วย 20 % w/w maleic anhydride

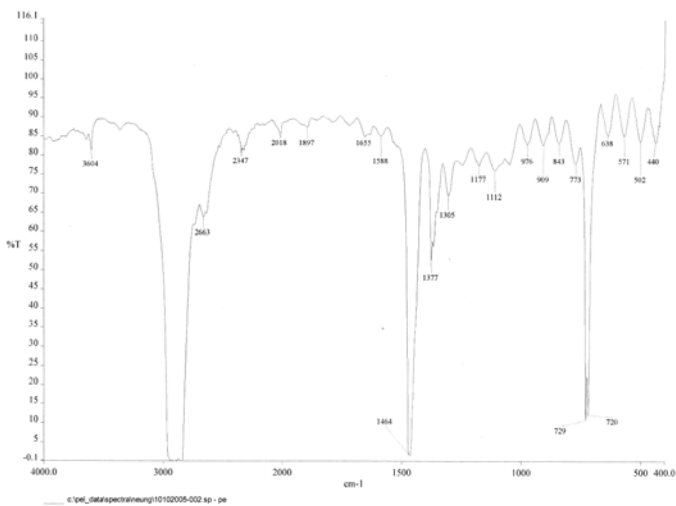
ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิพรอพิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 20 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 20 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0221	0.0229	3.62 $\pm$ 0.04
2	0.0222	0.0230	3.60 $\pm$ 0.05
3	0.0219	0.0227	3.65 $\pm$ 0.03
4	0.0231	0.0240	3.90 $\pm$ 0.07
5	0.0234	0.0244	3.85 $\pm$ 0.05
6	0.0215	0.0223	3.72 $\pm$ 0.00

**ตารางที่ผข-12** ร้อยละการกราฟต์ฟิล์มพอลิพรอพิลีนด้วย 25 % w/w maleic anhydride

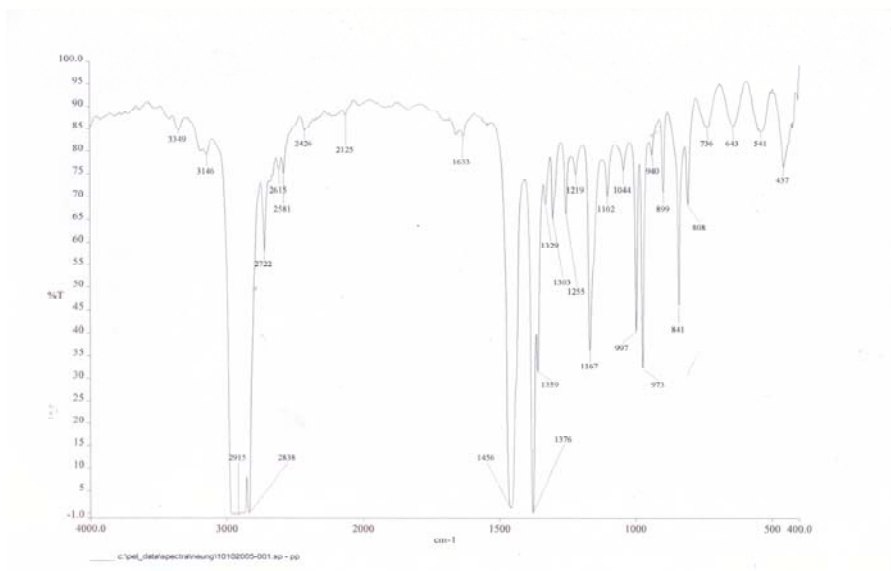
ตัวอย่างฟิล์ม ที่	น้ำหนัก ฟิล์มพอลิพรอพิลีน (g)	น้ำหนักฟิล์มหลังการกราฟต์ 25 % w/w maleic anhydride (g)	% กราฟต์ 25 % w/w maleic anhydride $\pm$ SD
1	0.0222	0.0231	4.05 $\pm$ 0.07
2	0.0227	0.0236	3.96 $\pm$ 0.03
3	0.0218	0.0226	3.67 $\pm$ 0.09
4	0.0216	0.0224	3.70 $\pm$ 0.07
5	0.0231	0.0240	3.90 $\pm$ 0.01
6	0.0226	0.0235	3.98 $\pm$ 0.04

# ภาคผนวก ค

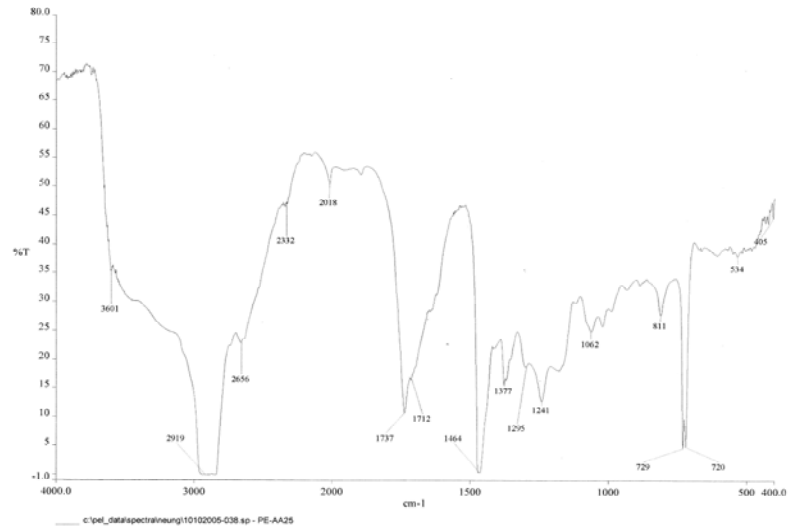
## รูปภาพ



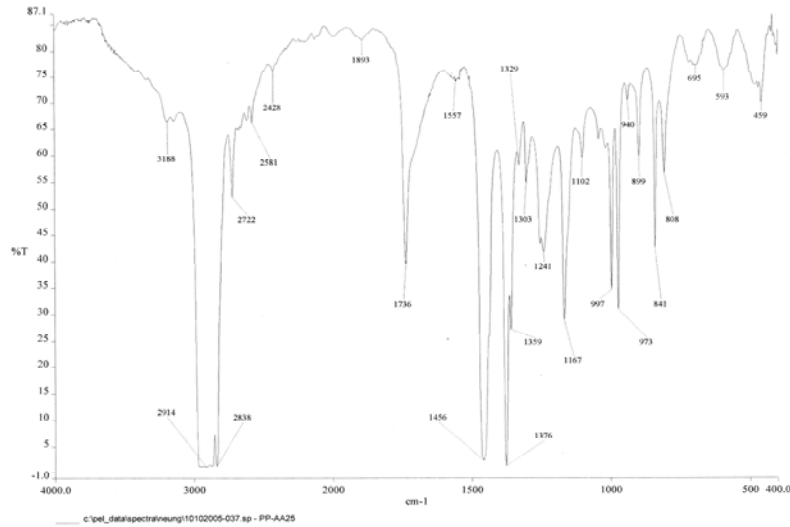
ภาพที่ ผค-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีน



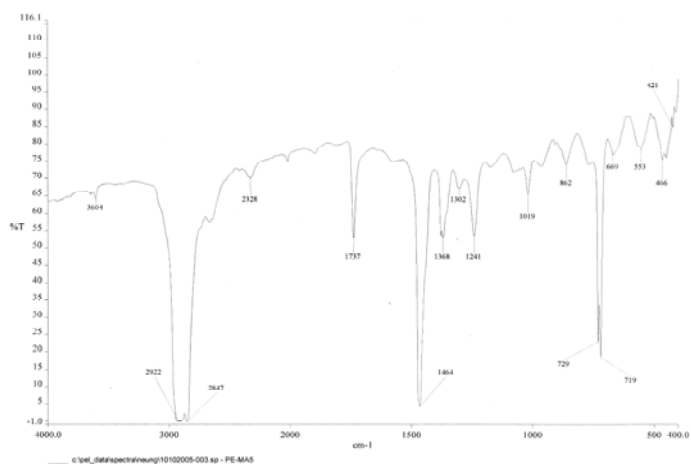
ภาพที่ ผค-2 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีน



ภาพที่ ผค-3 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่กราฟต์ด้วย 25% w/w acrylic acid

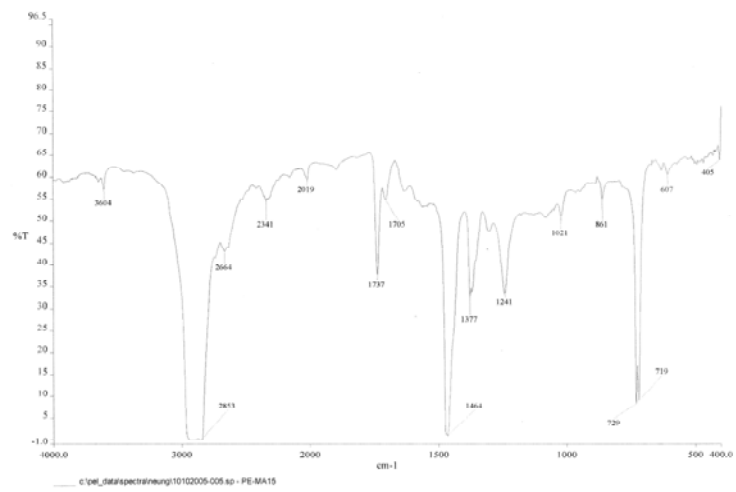


ภาพที่ ผค-4 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีนที่กราฟต์ด้วย 25 % w/w acrylic acid

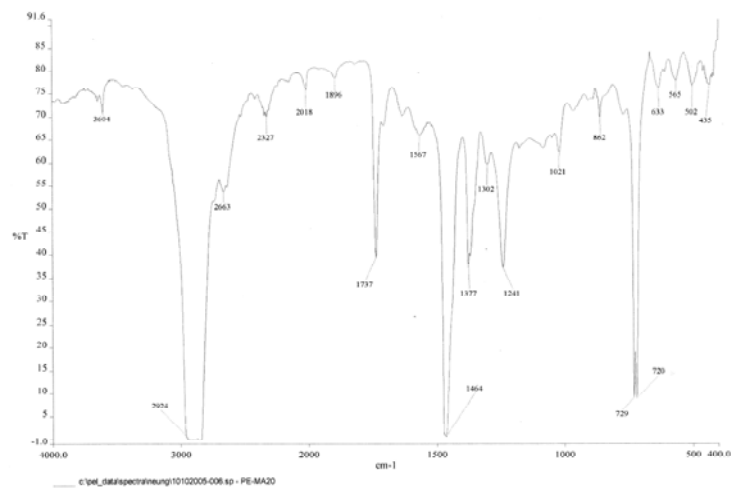


ภาพที่ ผค-5 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่กราฟต์ด้วย 5 % w/w maleic anhydride

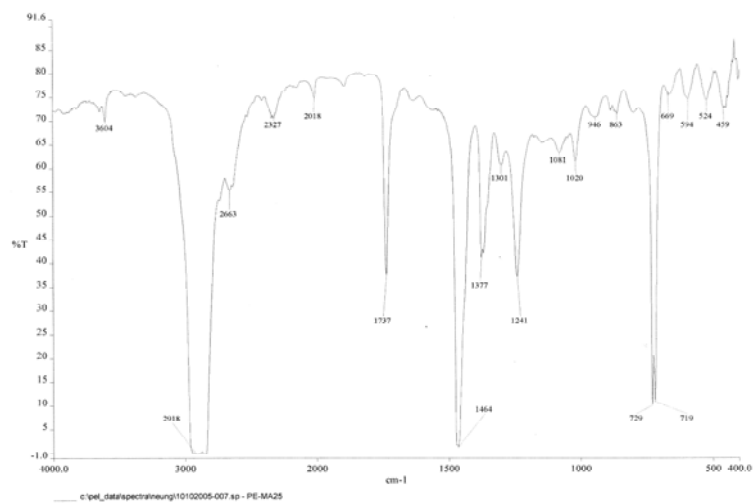
ภาพที่ ผค-6 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่กราฟต์ด้วย 10 % w/w maleic anhydride



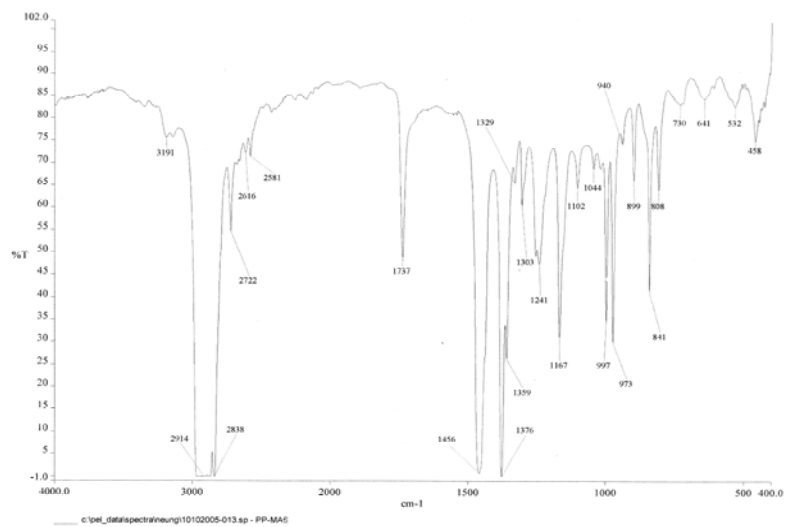
ภาพที่ ผค-7 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่กราฟต์ด้วย 15 % w/w maleic anhydride



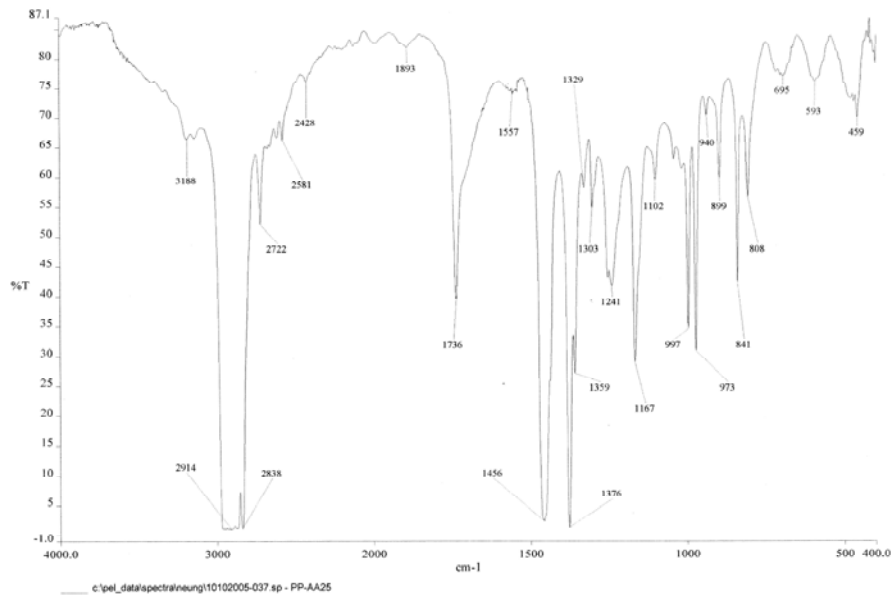
ภาพที่ ผค-8 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่กราฟต์ด้วย 20 % w/w maleic anhydride



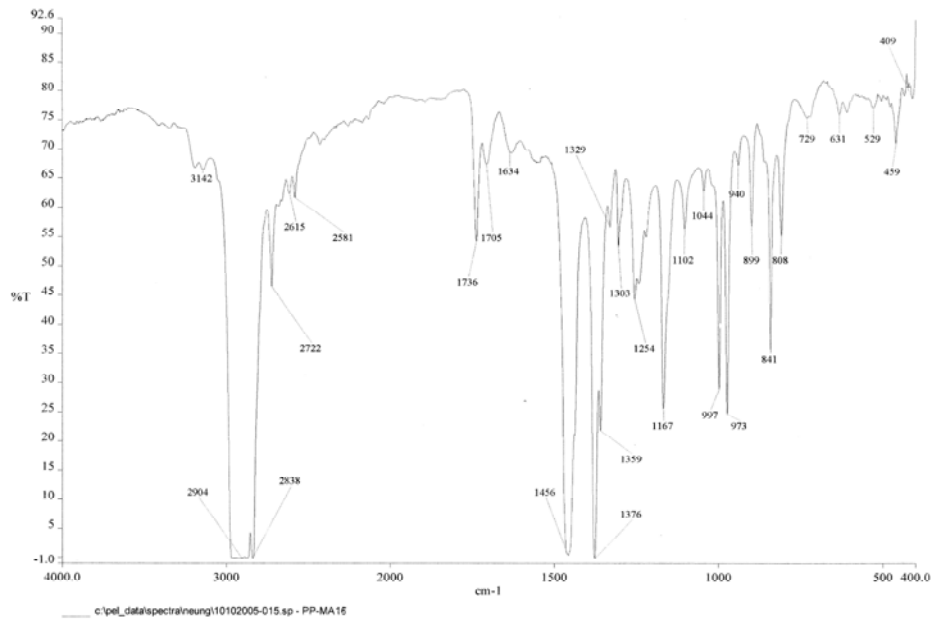
ภาพที่ ผค-9 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่กราฟต์ด้วย 25 % w/w maleic anhydride



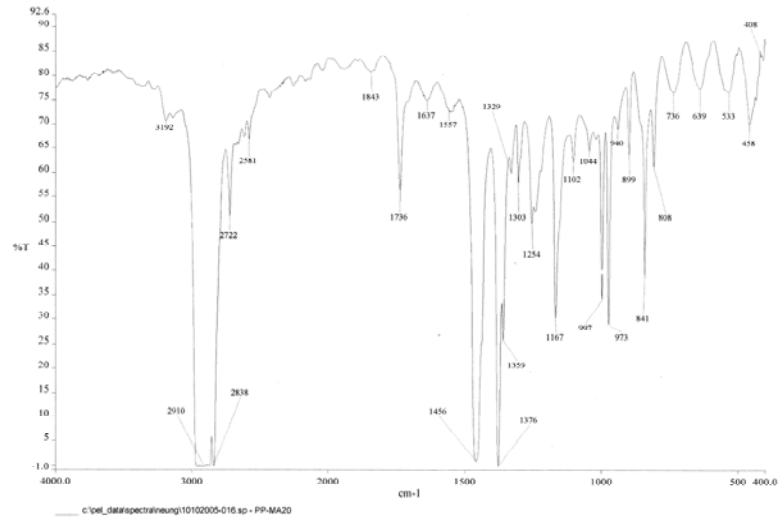
ภาพที่ ผค-10 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีนที่กราฟต์ด้วย 5 % w/w maleic anhydride



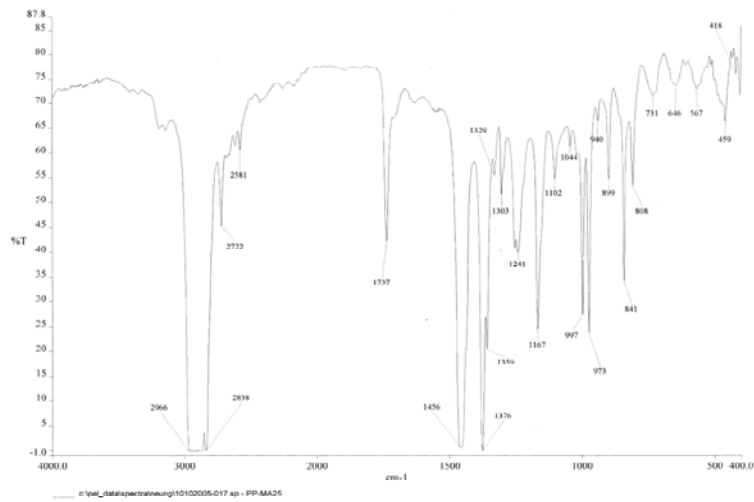
ภาพที่ ผล-11 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีนที่กราฟต์ด้วย 10 % w/w maleic anhydride



ภาพที่ ผล-12 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีนที่กราฟต์ด้วย 15 % w/w maleic anhydride



ภาพที่ ผล-13 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีนที่กราฟต์ด้วย 20 % w/w maleic anhydride



ภาพที่ ผล-14 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์มพอลิพรอพิลีนที่กราฟต์ด้วย 25 % w/w maleic anhydride

## ภาคผนวก ง

### เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

#### 1. เครื่องฟูรีเออร์ทรานฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer FT-IR)

โดยทั่วไปเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมักใช้หลักการ กระจายแสงของสเปกตรัมการแผ่รังสีแม่เหล็ก ไฟฟ้าในช่วงที่สนใจเป็นตัวกำหนด เช่น ในช่วงอินฟราเรด ข้อดีของการใช้เทคนิค Fourier Transform คือช่วยให้การวิเคราะห์หรือการวัดสเปกตรัมของสารตัวอย่างได้รวดเร็วกว่าเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ธรรมดาหลายเท่า เพราะการวัดแบบเครื่องธรรมดาเป็นการวัดทีละความถี่ แต่ FT-IR วัดที่ความถี่ต่างๆ อย่างต่อเนื่อง

##### 1.1 กระบวนการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (The Infrared Absorption Process)

โมเลกุลของสารจะดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดได้เช่นเดียวกับช่วงแสงขาวต่างกันที่ IR มีพลังงานน้อยกว่า เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง IR โมเลกุลจะถูกกระตุ้น เป็นโมเลกุลที่มีพลังงานสูงกว่าที่อยู่ที่สภาวะพื้นซึ่งเป็นพลังงานที่จะกระทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นหรือการหมุน โมเลกุลของสารจะดูดกลืนแสงได้ต้องมีลักษณะ เฉพาะสภาวะเหมาะสม

ก.รังสีหรือแสงต้องมีพลังงานที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการทรานซิชัน

ข.จะต้องเกิดการควบคู่ (coupling) พอดีระหว่างสนามไฟฟ้าจากการแผ่รังสีกับสารนั้นเมื่อมีการดูดกลืนพลังงานแล้วทำให้เกิดโมเมนต์ขั้วคู่<sup>ขั้วคู่</sup>ที่เปลี่ยนไป

การยืดและการงอแบบต่างๆ (Types of Vibration and Bending)

1.1 การยืด (stretching หรือ Valency Vibration) เป็นการเปลี่ยนแปลงความยาวระหว่างอะตอมที่เกิดพันธะมีทั้ง symmetric stretching และ asymmetric stretching

1.2 การงอ (Bending) คือ การเกิดการเปลี่ยนแปลงมุมระหว่าง 2 พันธะ

##### 1.2 สมบัติของพันธะกับการดูดกลืนแสงอินฟราเรด

การสั่นแบบยืดถือเป็นการสั่นแบบ simple harmonic oscillator สามารถใช้ Hooke's law แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ของการยืดกับมวลของอะตอมนั้นได้

Hooke's law	F	=	- ky
	F	=	แรง
	k	=	ค่าคงที่ ( force constant )
	y	=	เป็นระยะทางที่มวลเคลื่อนที่จากตำแหน่งที่หยุดนิ่ง

### 1.3 การสั่นคู่ควบ (Vibrational Coupling)

พลังงานที่เกิดจากการสั่นอาจถูกรบกวนจากอิทธิพล ของการสั่นจากโมเลกุลอื่นๆ ในโมเลกุล ทำให้ฟังก์ชันที่วัดได้เปลี่ยนแปลงไปเพราะ

1.3.1 สมมาตรของโมเลกุล ( symmetry) เมื่อโมเลกุลเกิดการสั่นแล้วไม่ทำให้โมเมนต์ขั้วคู่เปลี่ยนแปลง (dipole moments)

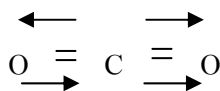
1.3.2 พลังงานของการสั่นนั้นเท่ากัน หรือเกือบเท่ากัน จึงทำให้ฟังก์ชันลดลงได้

1.3.3 พลังงานที่เกิดจากการสั่นมีค่าน้อย ทำให้วัดไม่ได้

1.3.4 พลังงานที่เกิดจากการสั่นอยู่ในช่วงความยาวคลื่นยาวเกินไปที่จะวัดได้

ปัจจัยต่างๆ ที่ผลต่อการสั่นคู่ควบมีดังต่อไปนี้

ก. การสั่นคู่ควบจะรุนแรง (strong coupling) เมื่อเป็นการสั่นแบบยืดหดที่เกิดขึ้นมีการใช้อะตอมร่วมกัน เช่น



ทำให้ CO<sub>2</sub> มีการดูดกลืนแสง IR และให้ฟังก์ชันที่ 2,330 cm<sup>-1</sup> และ 667 cm<sup>-1</sup> แทนที่จะให้ฟังก์ชัน 1,700 cm<sup>-1</sup> เช่นเดียวกับพวกคีโตน

ข. เกิดอันตรกิริยาหรือการสั่นคู่ควบระหว่างการสั่นแบบยืดหดกับการสั่นแบบงอของกลุ่มที่มีพันธะร่วมกัน

ค. เกิดการสั่นคู่ควบระหว่างการสั่นแบบยืดหดกับการสั่นแบบงอ ถ้าการสั่นแบบยืดหดของพันธะอยู่ในด้านที่เกิดการงอ

ง. การสั่นคู่ควบหรือการเกิดอันตรกิริยาจะรุนแรงที่สุดถ้ากลุ่มที่เกิดอันตรกิริยานั้นมีพลังงานเท่าๆ กัน

จ. การสั่นคู่ควบหรือการเกิดอันตรกิริยาจะมีน้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลยขึ้นอยู่กับกลุ่มที่มีสองพันธะหรือมากกว่า

ฉ. การสั่นคู่ควบจะเกิดขึ้นจะต้องเป็นการสั่นของสปีซีส์ที่มีสมมาตรเหมือนกัน

#### 1.4 ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (IR Spectrophotometer Components)

ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีส่วนประกอบคล้ายเครื่อง ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ส่วนประกอบที่สำคัญคือ

1.4.1 ต้นกำเนิดแสงอินฟราเรด

1.4.2 เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง

1.4.3 โมโนโครเมเตอร์

1.4.4 เครื่องวัดแสงอินฟราเรด

1.4.5 เครื่องบันทึกสเปกตรัม

**1.4.1 ต้นกำเนิดแสงอินฟราเรด (IR Sources)** ที่ใช้ทั่วไปเป็นของแข็งที่เฉื่อย จะให้แสงที่มีความเข้มสูงสูงเนินสต์ โกลเวอร์ (The Nernst glower) เป็นแหล่งกำเนิดที่ใช้กันมากที่สุด ทำด้วยออกไซด์ของพวกทาคูเรอร์ เอิร์ท เป็นทรงกระบอกโกลบาร์ (Globar) เป็นแท่งสิริกอนคาร์ไบด์

**1.4.2 โมโนโครเมเตอร์** ซึ่งประกอบด้วยช่องแสงผ่าน(slits) เกรตติง grating) รืออาจมีฟิวเตอร์ (filter) ประกอบด้วย

**1.4.3 เครื่องวัดแสงอินฟราเรด (IR Detectors)** จุจุบันที่ใช้ยู่มี 2 พวก

**1.4.3.1 อาศัยหลักการทาง Photoconductive effect** เกิดขึ้นเช่นเดียวกับสารกึ่งตัวนำเป็นแบบ photon detector

**1.4.3.2 อาศัยหลักการ Heating effect** โดยที่แสงอินฟราเรดจะถูกดูดกลืนจะเกิดความร้อนทำให้ความต้านทานเปลี่ยนแปลง เรียกว่า Thermal Detector ซึ่งเป็นเครื่องวัดที่มีความยาวคลื่นได้กว้างขวาง

1) โฟตอน ดีเทคเตอร์ (Photon Detector) ประกอบด้วยแผ่นแก้วที่เป็นฉนวนที่ฉาบบางๆ ด้วยสารกึ่งตัวนำ เช่น ตะกั่วซัลไฟด์ ตะกั่วเทลลูไรด์ เพื่อไม่ให้สารกึ่งตัวนำทำปฏิกิริยากับบรรยากาศ เครื่องวัดนี้เมื่อถูกแสงที่มีพลังงานสูงพอจะทำให้ลดความต้านทานลง

**2) เทอร์มัลดีเทคเตอร์ (Thermal Detector)** โดยอาศัยสมบัติการเปลี่ยนแปลงทางด้านความร้อนของสารเมื่อได้รับแสงอินฟราเรด ได้ใช้นำถูกมาทำดีเทคเตอร์วัดแสงอินฟราเรดจำแนกเป็น 4 แบบ

แบบที่ 1 เป็นเทอร์โมคัลเปิล (Thermocouple) เป็นชนิดที่นิยมใช้กันมากสำหรับวัดแสงอินฟราเรด ประกอบด้วยแผ่นทองสีดำ เชื่อมเข้ากับลวดโลหะเล็กๆ 2 ชนิดที่ต่างกัน หรือเป็นลวดแพนทินัมเชื่อมกับลวดเงิน เมื่อทำให้ปลายทั้งสองมีอุณหภูมิต่างกันจะมีแรงเคลื่อนไฟฟ้าเกิดขึ้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ต่างกัน โดยที่ปลายหนึ่งจะป้องกันไม่ให้ถูกแสงเลยให้อุณหภูมิคงที่และที่ปลายอีกด้านให้รับแสงอินฟราเรด

แบบที่ 2 เรียกว่า เทอร์มิสเตอร์ (thermister) หรือ โปโลมิเตอร์ (Bolometer) สำหรับ โปโลมิเตอร์ เป็นประเภทอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต้านทานของลวดโลหะเมื่อทำให้อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง เช่น ลวดที่ประกอบด้วยลวดแพนทินัม ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความต้านทานเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิเปลี่ยนมีค่าสูงขึ้น แต่ถ้าเป็นเทอร์มิสเตอร์ จะทำด้วยออกไซด์โลหะบางชนิด เช่น ออกไซด์ของโคบอลต์หรือนิกเกิล มีค่าสัมประสิทธิ์เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิสูงขึ้น

แบบที่ 3 เรียกว่า โกลาย์ (Golay) หรือนิวมาติกดีเทคเตอร์ (Pneumatic Detector) เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดความดันของแก๊สเฉื่อยในภาชนะปิดเปลี่ยนแปลง

แบบที่ 4 เรียกว่า ไพโรอิเล็กทริกดีเทคเตอร์ (Pyroelectric Detector) ดีเทคเตอร์นี้เพิ่งได้รับการนำมาใช้สำหรับวัดแสงอินฟราเรด โดยใช้ผลึกของสารบางชนิด เช่น โครไกลซินซัลเฟต หรือแบเรียมไททานเต โมเลกุลเหล่านี้เกี่ยวกับโมเมนต์ขั้วคู่จะไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเกิดกระแสเนื่องจากความร้อนขึ้นขึ้นอยู่กับอัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

#### 1.4.4 เครื่องบันทึกสเปกตรัม หรือ Read Out Devices

สัญญาณที่ได้จากการดีเทคเตอร์เป็นสัญญาณที่น้อยจำเป็นจะต้องเข้าเครื่องขยายสัญญาณเสียก่อน ก่อนที่จะเป็นเครื่องบันทึกหรืออ่านสัญญาณ ซึ่งอาจเป็นเครื่อง recorders, printers , video display.

### 1.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีนำมาวิเคราะห์สารได้ทั้งที่เป็นของแข็ง ของเหลวและ แก๊ส การเลือกวัสดุสำหรับทำเซลล์ใส่สารจึงค่อนข้างจำกัด โดยจะไม่ดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงที่

วิเคราะห์สาร โดยทั่วไปจะใช้ พวกอัลคาไลไฮไลต์ สารพวกนี้ดูความชื้นได้ดี จะต้องเก็บไว้ใน เดซิเคเตอร์ แต่ใช้ไปนานๆ อาจขึ้นฝ้าได้ จะต้องนำมาขัดเป็นครั้งคราว

### 1.5.1 การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นแก๊ส (Gaseous Samples)

ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นแก๊สด้วยเทคนิคทางอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยทั่วไปจะใช้เซลล์สำหรับใส่แก๊ส และมักมีความกว้างของเซลล์ประมาณ 10 เซนติเมตร ตัว windows สามารถเลือกใช้ได้ความดันของแก๊สภายในเซลล์อาจเป็น 2-3 ซม. ถึงหลาย บรรยากาศก็ได้ขึ้นอยู่กับสารนั้นดูคลื่นอินฟราเรดหรือไม่

### 1.5.2 การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของเหลว (Liquid and Solution Samples)

ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นของเหลวหรือสารละลายอยู่แล้วนำสารตัวอย่างมาใส่เซลล์ สำหรับของเหลวมีอยู่ 3 ชนิดที่สามารถเลือกใช้ได้ก็คือ

1.5.2.1 เป็น sealed cells ซึ่งมีความหนาคงที่

1.5.2.2 เป็น demountable cells สามารถปรับความหนาของสารตัวอย่างได้ โดยใช้ spacers ระหว่าง windows ทั้งสอง

1.5.2.3 เป็น variable thickness cells ซึ่งสามารถปรับความหนาของสารตัวอย่างได้ใน กรณีที่ทำเพียงคุณภาพวิเคราะห์ หรือสารตัวอย่างเป็นของเหลวชั้น อาจทำได้โดยหยดของเหลวไปบน แผ่น windows แล้วใช้ windows อีกแผ่นประกบลงไปแล้วนำไปใส่ใน cell holder นำไปวัดในเครื่อง อินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สามารถหาสเปกตรัมได้เลย

ในการวิเคราะห์สารที่เป็นของเหลวมักใช้เซลล์ที่มีความหนาน้อยกว่า 1 มม. ถ้าเป็นสาร บริสุทธิ์มักใช้ความหนา 0.01-0.025 มม. ในการศึกษาเกี่ยวกับสารละลายของแข็ง ของเหลว และ ของแก๊สการเลือกใช้ตัวทำละลายเป็นสิ่งสำคัญ คือตัวทำละลายต้องไม่ดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วง เดียวกับสารตัวอย่าง สิ่งที่ต้องพิจารณาควบคู่คือการเกิดอันตรกิริยาของตัวทำละลายและสารตัวอย่าง ซึ่ง มีผลต่อสเปกตรัมอินฟราเรดอันเนื่องมาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนของพวกหมู่ที่มี -NH และ -OH ซึ่ง อาจทำให้ความถี่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้

การระวังรักษาเซลล์ อินฟราเรดเซลล์ถ้ามีการใช้โดยไม่ถูกต้อง และไม่บำรุงรักษาแล้วจะชำรุด เสียหายได้ง่าย แล้วส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์ สิ่งที่ต้องระวังอย่างมาก คือ เซลล์และ windows ซึ่งเป็นผลึกของเกลือไฮไลต์ของอัลคาไล จะต้องไม่ให้ถูกน้ำหรือไอน้ำ เพราะน้ำจะไปละลาย หรือทำให้ windows เกิดฝ้า เมื่อแสงตกกระทบจะเกิดการกระเจิงแสงได้ เมื่อทำความสะอาดแล้วให้เก็บ ไว้ในเดซิเคเตอร์ ถ้าเซลล์นั้นทำด้วย AgCl การระวังไม่ให้ถูกแสงมากนักเพราะจะทำให้เกิดเป็นสีดำ

ได้ นอกจากนี้เมื่อเวลาใช้เซลล์หรือ windows ไม่ควรมือจับ เวลาใช้ควรต้องใส่ถุงมือยางหรือพลาสติก อีกประการหนึ่ง การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ละลายได้ง่าย หรือสารละลายที่ตัวทำละลายระเหยได้ง่าย หรือสารที่มีลักษณะข้นเหนียว เมื่อวิเคราะห์เสร็จต้องรีบทำความสะอาดทันที

### 1.5.3 การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (Solid Samples)

ต้องทำให้สารตัวอย่างมีลักษณะบางๆ เป็นฟิล์ม ที่หนาประมาณ 0.01-0.1 มม. เพื่อให้แสงผ่านได้ เทคนิคต่างๆ ที่จะเลือกใช้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของสารตัวอย่าง เทคนิคต่างๆ มีดังนี้

1.5.3.1 ใช้วิธีอัดและรีดให้เป็นแผ่นบางๆ ด้วยโลหะบนแผ่นโลหะเรียบหรือแผ่นพลาสติก หรือแผ่นโลหะที่ฉาบด้วยพวกพอลิเมอร์ที่ทนความร้อน เทคนิคนี้เหมาะกับสารตัวอย่างที่เป็นพลาสติก ถ้าสารที่ไม่แข็งมากนักอาจใช้ windows 2 แผ่น รีดสารตัวอย่างก็ได้ แต่ต้องระวังการแตกของ windows ด้วย

1.5.3.2 ใช้วิธีหลอม ถ้าสารตัวอย่างมีมวลโมเลกุลต่ำ อาจหลอมเหลวได้ง่าย แล้วนำสารตัวอย่างที่หลอมเหลวเทลงไปในบนแผ่นโลหะให้เป็นแผ่นบางๆ หรือเทลงไปในระหว่างแผ่น windows 2 แผ่นประกบกันแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

1.5.3.3 ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นพวกชีวสาร พลาสติกหรือจีเอ็มที่อยู่ในรูปก้อนหรือแท่งสามารถใช้ไมโครโทมตัดให้เป็นแผ่นบางๆ ได้

1.5.3.4 ใช้วิธีทำให้เป็นสารละลายโดยให้สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่ายๆ แล้วนำสารไปเทลงบนแผ่นกระจก หรือแผ่นโลหะที่ขัดมัน หรือแผ่นพลาสติก หลังจากตัวทำละลายระเหยออกไปแล้ว ใช้มีดตัดแผ่นฟิล์มออกมา ถ้าสารตัวอย่างนั้นไม่ละลายน้ำให้นำแผ่นฟิล์มไปจุ่มลงในน้ำหลังจากทำให้แห้งแล้วจะสังเกตเห็นว่าแผ่นฟิล์มตรงกลางจะบางกว่าที่ขอบ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้สารละลายให้มีความเข้มข้นมากที่สุด วิธีนี้ยังคงมีตัวทำละลายเหลืออยู่เล็กน้อย

1.5.3.5 ใช้ Mull technique วิธีนี้ได้รับความนิยมมากสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ในการเตรียมสารตัวอย่างในเทคนิคนี้คือ ใช้สารตัวอย่าง 2-3 มก. บดให้ละเอียดและหยด Nujol ลงไป 2-3 หยด แล้วบดต่อจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารตัวอย่างที่บดได้ไปใส่ลงบน NaCl windows หรือ windows อื่นๆ เพียงเล็กน้อย แล้วเอาอีกแผ่นประกบ หนีไปมาจนทั่วแผ่นนำไปใส่ใน Simple holder เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป ที่ใช้ Nujol เนื่องจากส่วนใหญ่จะศึกษาอินฟราเรดสเปกตรัมในช่วง  $400-1330\text{ cm}^{-1}$  แต่ Nujol ดูดกลืนแสงในช่วง  $1330-720\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งไม่รบกวนสเปกตรัมในช่วงที่ต้องการศึกษา

1.5.3.6 ใช้ KBr-pellet technique นับเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากเทคนิคหนึ่ง โดยใช้สารพวก อัลคาไลเฮไลด์ เช่น ใช้ KBr ที่เป็นของแข็งผสมกับสารตัวอย่าง บดให้เข้ากันแล้วนำไปอัดจะได้สารเป็นแผ่นใส

ข้อดีของวิธีนี้คือ

- 1) background absorption ของสารประกอบเฮไลด์มีค่าน้อยและใช้โดยทั่วไป
- 2) แผ่นใสที่อัดได้อาจเก็บไว้ใช้วิเคราะห์ใหม่ได้
- 3) สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างระดับไมโครได้

สิ่งที่สำคัญของเทคนิคนี้คือ ต้องใช้ KBr เกรดที่ดีที่สุด อย่างน้อยต้องเป็น AR เกรด และจะต้องแห้ง

## 1.6 การ Calibrate เครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ดีให้ weve number และความยาวคลื่นที่ถูกต้องอยู่แล้ว แต่เมื่อใช้ไปนานอาจเกิดความคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่แท้จริงได้ จึงต้องทำการ Calibrate เครื่องเสมอๆ โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบสเปกตรัมแน่นอนแล้ว

## 1.7 การหาความหนาของเซลล์ (Cell path length) หรือแผ่นฟิล์ม

ความหนาของ sealed cell เมื่อใช้ไปนานๆ จะเกิดการสึกหรอ ทำให้ความหนาของเซลล์เปลี่ยนไป ดังนั้นเมื่อจะใช้งานเกี่ยวกับการหาปริมาณ (quantitative analysis) จำเป็นต้องทราบความหนาที่แน่นอนเทคนิคที่ใช้เรียกว่า interference fringe technique ดังนั้นความหนาของเซลล์ (d) หรือแผ่นฟิล์มสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{สำหรับเซลล์ } d = \Delta m / 2(V_1 - V_2)$$

$$\text{สำหรับแผ่นฟิล์ม } d = \Delta m / 2n(V_1 - V_2)$$

ให้  $d$  = ความหนาของเซลล์หรือแผ่นฟิล์ม

$V_1$  = ความถี่เริ่มแรก ดูจากจุดสูงสุด หรือต่ำสุดก็ได้ในหน่วย weve number ( $\text{cm}^{-1}$ )

$V_2$  = ความถี่ที่จุดสุดท้ายคิดเป็นหน่วย weve number ( $\text{cm}^{-1}$ )

$\Delta m$  = จำนวนริ้วที่สมบูรณ์ในระหว่าง  $V_1 - V_2$

$n$  = ค่าดัชนีหักเหของแผ่นฟิล์ม

นำเซลล์เปล่าไปหารสเปกตรัมในช่วงความถี่ 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

การทำคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Qualitative Analysis by IR Spectroscopy)

เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีนิยมใช้เป็นเทคนิคสำหรับหาหรือพิสูจน์เกี่ยวกับโครงสร้างของสารอินทรีย์ เช่นหาหมู่ฟังก์ชันนัลกรุปต่างๆ ซึ่งจะปรากฏออกมาที่ความถี่ต่างๆ กัน

### 1.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างจากอินฟราเรดสเปกตรัม

ถ้ามีอินฟราเรดสเปกตรัมอยู่ให้เริ่มดูพีกที่เด่นๆ ก่อนว่าเป็นพีกของอะไร ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญ เช่น  $C=O$ ,  $O-H$ ,  $N-H$ ,  $C-O$ ,  $C=C$ ,  $C\equiv C$ ,  $C\equiv N$  และ  $NO_2$  หรือไม่ เพราะเป็นข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับโครงสร้าง รายละเอียดเอาไว้ดูภายหลัง ขั้นตอนต่อไปนี้จะจัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่ควรต้องตรวจสอบ คือ

1.8.1 ถ้ามีคาร์บอนิลกรุปใหม่(ถ้ามี  $C=O$  จะต้องมิพีกใหญ่ที่  $1820-1660\text{cm}^{-1}$  ( $5.5-6.1\ \mu$ ))

1.8.2 ถ้ามี  $C=O$  ให้ตรวจต่อไปว่าเป็นสารประเภทไหน(ถ้าไม่มีข้ามไปข้อ3)

- ถ้าเป็นกรดจะต้องมีพีก  $OH$  ที่กว้างใกล้  $3400-2400\text{cm}^{-1}$  (โดยปกติจะทับกับพีกของ  $C-H$ )

-ถ้าเป็นอะไมด์ พีก  $N-H$  จะต้องปรากฏ และมีขนาดกลางที่ใกล้กับ  $3500\text{cm}^{-1}$  ( $2.85\ \mu$ ) และบางครั้งมี 2 พีกขนาดเท่าๆกัน

-ถ้าเป็นเอสเทอร์ พีก  $C-O$  จะต้องปรากฏที่ใกล้  $1300-1000\text{cm}^{-1}$  ( $7.7-10\ \mu$ )

-ถ้าเป็นแอนไฮไดรด์ซึ่งมี  $2C=O$  จะมีพีกปรากฏที่ใกล้ๆ  $1810$  และ  $1760\text{cm}^{-1}$  ( $5.5$  และ  $5.7\ \mu$ ) 2 พีก

-ถ้าเป็นอัลดีไฮด์ คือมี  $C-H$  อยู่ จะมีพีกซึ่งเล็ก (weak) 2 พีก ใกล้  $2850$  และ  $2750\text{cm}^{-1}$  ( $3.5$  และ  $3.65\ \mu$ ) อยู่ทางขวามือของ  $C-H$  พีก

-ถ้าเป็นคีโตน สิ่งที่คุณคิดว่าเห็นทั้ง 5 อย่างข้างบนตัดทิ้งได้

1.8.3 ถ้าไม่มี  $C=O$  ควรตรวจ

ถ้าเป็นแอลกอฮอล์ } ให้ตรวจดูพีกของ  $-OH$  ซึ่งจะให้การดูดกลืนแสงเป็นพีก

ถ้าเป็นฟีนอล } กว้างที่ใกล้ๆ  $3600-3000\text{cm}^{-1}$  ( $2.8-3.0\ \mu$ )

เพื่อให้แน่ใจ จะให้ดูพีก  $C-O$  ใกล้ๆ  $1300-1000\text{cm}^{-1}$  ( $7.7-10\ \mu$ )

ถ้าเป็นอะมีน ควรตรวจหา  $NH$  พีก ซึ่งเป็นพีกขนาดกลางใกล้ๆ  $3500\text{cm}^{-1}$  ( $2.85\ \mu$ )

ถ้าเป็นอีเทอร์ ตรวจหา  $C-O$  (และถ้าไม่มี  $OH$ ) พีกใกล้ๆ  $1300-1000\text{cm}^{-1}$  ( $9.7-10\ \mu$ )

1.8.4 ดูว่ามีพันธะคู่ และ/หรือวงอะโรมาติกหรือไม่

ถ้ามี  $\text{-C=C-}$  จะมีพีกเล็กๆ ใกล้ๆ  $1650\text{ cm}^{-1}$  ( $6.1\ \mu$ )

และมีพีกปานกลางถึงใหญ่ในช่วง  $1650\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  ( $6\text{-}7\ \mu$ ) และใช้ดูพวกวงแหวนอะโรมาติก

ตรวจให้แน่ใจอีกครั้งว่า  $\text{C-H}$  พีกเป็นอะโรมาติก และไวบิล  $\text{C-H}$  จะมีพีกที่ทางซ้ายของ  $3000\text{ cm}^{-1}$  ( $3.33\ \mu$ ) ถ้าเป็น  $\text{C-H}$  อะลิฟาติก จะได้พีกทางขวา

#### 1.8.5 ถ้าเป็นพันธะสาม

ถ้ามี  $\text{-C}\equiv\text{N-}$  จะมีพีกขนาดกลางใกล้  $2250\text{ cm}^{-1}$  ( $4.5\ \mu$ )

$\text{-C}\equiv\text{C-}$  จะมีพีกเล็กๆ และแหลมใกล้  $2150\text{ cm}^{-1}$  ( $4.65\ \mu$ )

ตรวจสอบอีกครั้งว่าเป็น acetylenic  $\text{C-H}$  หรือไม่ ถ้าเป็นจะมีพีกใกล้  $3300\text{ cm}^{-1}$

( $3.0\ \mu$ )

6) ถ้าเป็นหมู่ไนโตร จะมีพีกที่ใหญ่ที่  $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  ( $6.25\text{-}6.67\ \mu$ ) และ  $1390\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  ( $7.2\text{-}7.7\ \mu$ )

7) ถ้าเป็นไฮโดรคาร์บอนจะไม่พบพีกต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว แต่จะมีพีกใหญ่ของ  $\text{C-H}$  ในช่วงใกล้  $3000\text{ cm}^{-1}$  ( $3.3\ \mu$ ) สเปกตรัมมีลักษณะง่ายๆ โดยมีพีกใกล้กับ  $1450\text{ cm}^{-1}$  และ  $1375\text{ cm}^{-1}$  ( $7.27\ \mu$ )

### 1.9 สารประกอบอัลดีไฮด์ (aldehydes)

$\text{C}=\text{O}$  stretching ปรากฏที่ความถี่ประมาณ  $1,725\text{ cm}^{-1}$  ( $5.80\ \mu$ ) ถ้ามี conjugation จะทำให้พีกนี้เคลื่อนไปทางขวามือ

$\text{C}-\text{H}$  stretching จากหมู่  $\text{CHO}$  จะเกิดขึ้นที่ประมาณ  $2,750\text{ cm}^{-1}$  ( $3.65\ \mu$ ) และที่  $2,850\text{ cm}^{-1}$  ( $3.5\ \mu$ ) แต่พีกหลังอาจจะถูกบังด้วย  $\text{C}-\text{H}$  stretching จากหมู่ alkyl และพีกทั้งสองประเภทนี้เป็นพีกที่บ่งบอกที่ค่อนข้างแน่นอนสำหรับอัลดีไฮด์

ตัวอย่างเช่น nonanal crotonaldehyde และ benzaldehyde

### 1.10 สารประกอบคีโตน (ketones)

$\text{C}=\text{O}$  stretching มีพีกปรากฏที่ความถี่ประมาณ  $1,715\text{ cm}^{-1}$  ( $5.83\ \mu$ )

ถ้ามี conjugation พีกจะเคลื่อนไปทางขวา ถ้าเป็น cyclic ketone การเกิดความเครียดกับวงแหวน (ring strain) จะทำให้พีกเคลื่อนที่ไปทางซ้าย

ตัวอย่างเช่น methyl isopropyl ketone mesityl oxide acetophenone และ cyclopentanone

### 1.11 สารประกอบกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids)

O – H stretching เป็นแถบที่กว้างมาก (very broad) ในย่าน  $3,400 - 2,400 \text{ cm}^{-1}$  ( $2.94 - 4.17 \mu$ ) และมักจะถูกรบกวนด้วยพีคของ C – H stretching

C = O stretching เป็นพีคกว้างอยู่ที่  $1,730 - 1,700 \text{ cm}^{-1}$  ( $5.8 - 5.9 \mu$ ) ถ้ามี conjugation จะทำให้พีคเคลื่อนไปทางขวา

C – O stretching เป็นพีคอยู่ที่ย่าน  $1,320 - 1,210 \text{ cm}^{-1}$  ( $7.6 - 8.3 \mu$ ) และมีความเข้มปานกลาง ตัวอย่างเช่น isobutyric acid และ benzoic acid

### 1.12 สารประกอบพวกแอซิดคลอไรด์ (acid chlorides)

C = O stretching เกิดพีคที่ประมาณ  $1,800 \text{ cm}^{-1}$  ( $5.56 \mu$ ) ในสารพวกนี้ทุกๆ ไป ถ้ามี conjugation ก็จะทำให้พีคเคลื่อนที่ไปทางขวาตัวอย่างเช่น acetyl chlorides benzoyl chloride

### 1.13 สารประกอบพวกแอนไฮไดรด์ (anhydrides)

C = O stretching ปรากฏให้เห็น 2 พีคเสมอ คือ ที่ตำแหน่ง  $1,830 - 1,800 \text{ cm}^{-1}$  ( $5.46 - 5.56 \mu$ ) และที่  $1,775 - 1,740 \text{ cm}^{-1}$  ( $5.63 - 5.75 \mu$ ) ความเข้มสัมพัทธ์ของพีคทั้งสองอาจจะแปรเปลี่ยนได้ ถ้ามี unsaturation จะทำให้ตำแหน่งของพีคเคลื่อนที่ไปทางขวา แต่ถ้ามี ring strain ซึ่งเป็นพวก cyclic anhydrides จะทำให้ตำแหน่งของพีคเคลื่อนที่ไปทางซ้ายตัวอย่างเช่น acetic anhydride

### 1.14 สารประกอบพวกเอมีน (amines)

N – H stretching ปรากฏในย่าน  $3,500 - 3,300 \text{ cm}^{-1}$  ( $2.86 - 3.03 \mu$ ) ถ้าเป็นพวก aliphatic จะให้ความเข้มต่ำกว่า และถ้าเป็นพวก secondary aromatic amines ด้วยแล้วจะให้พีคที่สูงตัวอย่างเช่น butylamine dibutylamine tributylamine N – methylaniline meta – toluidine

### 1.15 สารประกอบพวกไนโตร (nitro compounds)

N = O stretching จะให้พีคของการดูดกลืนแสง 2 พีคที่มีความเข้มสูง คือ การดูดกลืนที่ไม่สมมาตร (assym.) ปรากฏพีคที่  $1,600 - 1,500 \text{ cm}^{-1}$  ( $6.25 - 6.67 \mu$ ) และการดูดกลืนอย่างสมมาตร (sym) ปรากฏพีคที่  $1,390 - 1,300 \text{ cm}^{-1}$  ( $7.19 - 7.69 \mu$ ) ตัวอย่างเช่น I – nitropropane และ nitrobenzene

### 1.16 สารประกอบของกรดอะมิโนและเกลือ (amino acids and salts)

เกลือของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylate salts) และเกลือของเอมีน (amine salts) กรดอะมิโนและเกลือเหล่านั้นมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบ คือ อยู่ในรูปของ Zwitterion ถ้าอยู่ในรูปของเกลือไฮโดรคลอไรด์หรือกรดอื่นๆ หรืออยู่ในรูปเกลือโซเดียม

### 1.17 เกลือเอมีน (Amine Salts) อาจอยู่ในรูปของ $\text{NH}_4^+$ , $\text{RNH}_3^+$ , $\text{R}_2\text{NH}_2^+$ , $\text{R}_3\text{NH}^+$

N – H stretching ให้แบนด์กว้างที่ตำแหน่ง  $3,300 - 2,600 \text{ cm}^{-1}$  ( $3.03 - 3.85 \mu$ ) แอมโมเนียมไอออนจะดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งทางซ้ายมือของย่านที่กล่าวนี้ แต่ถ้าเป็นเกลือของ tertiary amine จะดูดกลืนแสงในตำแหน่งทางขวามือของย่านนี้ และถ้าเป็นเกลือของ primary และ secondary amines จะดูดกลืนแสงอินฟราเรดในย่านกลางของ  $3,000 - 2,700 \text{ cm}^{-1}$  ( $3.33 - 3.70 \mu$ )

N – H bending ให้พีกที่แสดงการดูดกลืนแสงดีในตำแหน่ง  $1,610 - 1,500 \text{ cm}^{-1}$  ( $6.21 - 6.67 \mu$ ) ถ้าเป็นเกลือของ primary amine จะมี 2 พีก คือ ถ้าเป็น asymmetric จะเกิดพีกที่  $1,610 \text{ cm}^{-1}$  และถ้าเป็น symmetric จะเกิดที่  $1,500 \text{ cm}^{-1}$  ถ้าเป็นเกลือของ secondary amines จะดูดกลืนแสงในย่าน  $1,610 - 1,550 \text{ cm}^{-1}$  ( $6.21 - 6.45 \mu$ ) ส่วนเกลือของ tertiary amine ให้พีกเล็กมาก สำหรับสารประกอบกรดอะมิโนและเกลือของกรดอะมิโนจะได้สเปกตรัมซึ่งเป็นผลรวมของคาร์บอกซิเลต และเกลือของ primary amine ดังได้กล่าวมาแล้วข้างบนนี้ โดยมีพีกของ N – H stretching,  $\text{NH}_3^+$  (asymmetric/symmetric) bending และ  $\text{COO}^-$  (asymmetric/symmetric) stretching

### 1.18 สารประกอบของกำมะถัน (sulphur compounds)

สารเมอร์แคปแทน (mercaptans) R – SH S – H stretching จะมีพีกที่ค่อนข้างต่ำ (weak band) ที่บริเวณใกล้  $2,550 \text{ cm}^{-1}$  ( $3.92 \mu$ ) แต่เนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ให้พีกหรือแบนด์ในย่านนี้น้อยมาก จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจหมู่ – S – H ได้ แต่ถ้าโมเลกุลมีหมู่ – COOH ด้วยจะให้พีกทับกันหรือบดบังกันได้

### 1.19 สารอัลคิลและเอริสเฮไลด์ (alkyl และ aryl halides)

การใช้อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจสอบว่าสารตัวอย่างมีเฮไลด์หรือไม่นั้นค่อนข้างยาก ทางที่ดีควรใช้วิธีวิเคราะห์อย่างอื่นจะทำให้แน่ใจได้ดีกว่า เช่น วิเคราะห์หาเฮไลเจนด้วยวิธีธรรมดาหรือใช้แมสสเปกโทรสโกปี หรือวิธีอื่นๆ

## 1.20 สารฟลูออไรด์ (Fluorides)

C – F stretching จะให้พีคเข้มที่  $1,400 - 1,000 \text{ cm}^{-1}$  ( $7.14 - 10.0 \text{ }\mu$ ) ถ้าเป็น monofluoroalkanes จะดูดกลืนแสงอินฟราเรดทางขวาของย่านนี้ แต่ถ้าเป็น polyfluoroalkanes จะให้แบนด์เข้มในย่าน  $1,350 - 1,100 \text{ cm}^{-1}$  ( $7.41 - 9.09 \text{ }\mu$ ) หลายแบนด์และถ้าเป็น aryl fluorides จะให้พีคอยู่ในระหว่าง  $1,250$  และ  $1,100 \text{ cm}^{-1}$  ( $8.0$  และ  $9.09 \text{ }\mu$ )

## 1.21 สารคลอไรด์ (chlorides)

C – Cl stretching ถ้าเป็น aliphatic chlorides จะให้พีคเข้มที่  $800 - 600 \text{ cm}^{-1}$  ( $12.5 - 16.7 \text{ }\mu$ ) ถ้าเป็น multiple substitution ที่ C อะตอมเดียวกัน จะทำให้ความเข้มเพิ่มขึ้นและพีคอาจเคลื่อนที่ไปทางซ้ายของสเปกตรัม สำหรับ aryl chlorides จะให้แบนด์อยู่ในระหว่าง  $1,100$  และ  $1,050 \text{ cm}^{-1}$  ( $9.09$  และ  $9.52 \text{ }\mu$ )

$\text{CH}_2 - \text{Cl}$  bending (wagging) จะให้พีคที่  $1,300 - 1,200 \text{ cm}^{-1}$  ( $7.69 - 8.33 \text{ }\mu$ ) ตัวอย่างเช่น carbon tetrachloride ortho – chlorotoluene para – chlorotoluene และ chloroform เป็นต้น

## 1.22 วิธีทำ calibration curve

1.22.1 หาสารมาตรฐานที่บริสุทธิ์แล้วทดลองหาอินฟราเรดสเปกตรัมของแต่ละชนิด

1.22.2 ผสมตัวทำละลายทั้งสามชนิดนี้ให้มีความเข้มข้น (% โดยปริมาตร) ต่างๆ กันแล้วนำไปหาอินฟราเรดสเปกตรัม

1.22.3 เลือกแบนด์ของสเปกตรัมที่เห็นว่าดีที่สุดของสารแต่ละชนิด นั่นคือใช้แบนด์ที่  $817 \text{ cm}^{-1}$  สำหรับหา isopropyl alcohol และใช้แบนด์ที่  $695 \text{ cm}^{-1}$  สำหรับหา toluene สำหรับ methyl ethyl ketone หาได้จากผลต่างจาก 100%

1.22.4 หาค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละสารแล้วนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจะได้กราฟมาตรฐาน แล้วนำสารตัวอย่างไปหาอินฟราเรดสเปกตรัมอย่างน้อย 2 สเปกตรัม เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำไปอ่านจากกราฟมาตรฐาน ก็จะทราบปริมาตรหรือความเข้มข้นได้

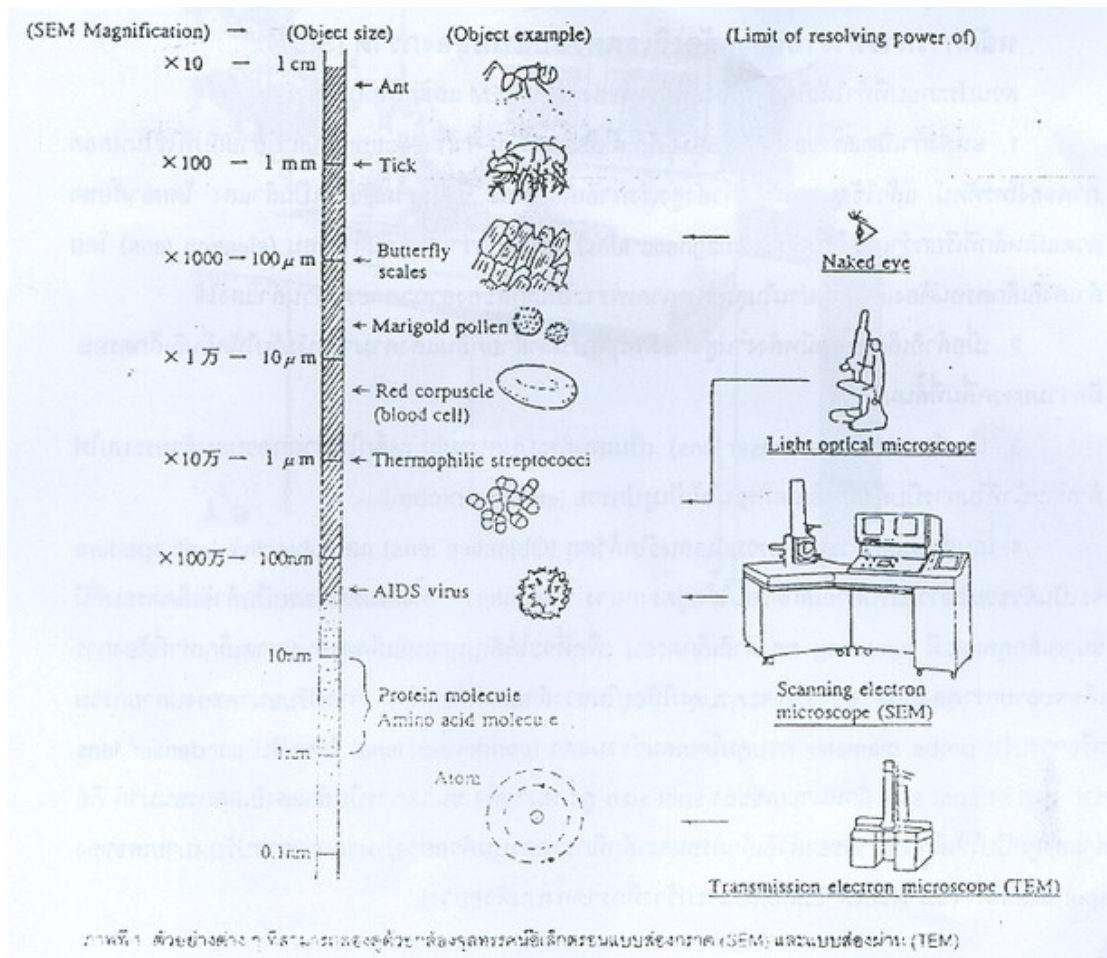
## 2. การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy

### 2.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นเครื่องมือขนาดใหญ่ที่ช่วยขยายวัตถุหรือชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ให้มองเห็นโครงสร้างภายในและพื้นผิวภายนอกได้ โดยสามารถขยายชิ้นตัวอย่างได้เป็นแสน ๆ เท่ามีประโยชน์มากสำหรับงานทางชีววิทยาและทางด้านอื่นๆ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบ่งออกเป็น

**2.1.1 จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)** ใช้ส่องเพื่อแสดงรายละเอียดของพื้นผิวของตัวอย่างตลอดจนมีอุปกรณ์เสริมช่วยในการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของธาตุต่างๆ ได้

**2.1.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)** ใช้ส่องผ่านตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีพิเศษและถูกตัดให้บางมาก เพื่อใช้ศึกษาโครงสร้างภายในชิ้นตัวอย่างอย่างละเอียด



ภาพที่ ผง-1 ตัวอย่างต่างๆ ที่สามารถส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และแบบส่องผ่าน (TEM)

## 2.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope : SEM)

### 2.2.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยา (Study of electron microscope and biological specimen preparation)

ความสามารถของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) อักษรย่อ คือ SEM อ่านว่า เอส อี เอ็ม เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ช่วยให้มองเห็นวัตถุที่มีขนาดเล็ก ขยายให้เห็นลักษณะโครงสร้างพื้นผิวของตัวอย่างให้เห็นภาพในลักษณะสามมิติ สามารถใช้ศึกษาตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 100 นาโนเมตร จนถึง 1 เซนติเมตร

ปัจจุบันพบว่าประโยชน์ของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีใช้เพียงแต่จะใช้ในการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ (medical science) และทางชีววิทยา (biology) เท่านั้น ยังแผ่ขยายไปถึงการศึกษาทางด้านวัสดุ และทางโลหะกรรม (material science) เช่น การปรับปรุงวัสดุ (materials development) เซรามิก (ceramics) และพวกวัสดุกึ่งตัวนำ (semiconductors) ซึ่งสามารถใช้งานวิเคราะห์รายละเอียดที่มีความแม่นยำสูงมาก

## 2.2.2 หลักการทำงานของกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ส่วนประกอบที่ทำให้เกิดการมองเห็นภาพของกล้อง SEM และกลไกการทำงาน

2.2.2.1 แหล่งกำเนิดแสงของกล้อง SEM คือ ลำอิเล็กตรอน จาก electron gun คล้ายกับที่ใช้ในหลอดภาพของโทรทัศน์ แล้วใช้สนามไฟฟ้ากำลังสูงเร่งพาอิเล็กตรอนซึ่งจะรวมตัวกันเป็นลำแสง โดยอาศัยขดลวดแม่เหล็กที่เรียกว่าเลนส์แม่เหล็ก (magnetic lens) หรือเรียกว่าเลนส์อิเล็กตรอน (electron lens) โดยลำแสงอิเล็กตรอนต้องเดินทางผ่านในสุญญากาศเพราะโมเลกุลของอากาศจะรบกวนลำแสงได้

2.2.2.2 เมื่อลำอิเล็กตรอนมีพลังงานสูง จะมีพฤติกรรมคล้ายคลื่นแสงสามารถบังคับให้คลื่นอิเล็กตรอนมีความยาวคลื่นที่สั้นมากได้

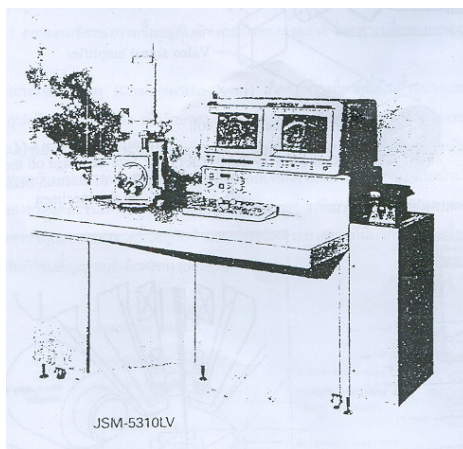
2.2.2.3 เลนส์รวมแสง (condenser lens) เป็นเลนส์ระบบสนามแม่เหล็กไฟฟ้าถูกควบคุมด้วยระบบไฟฟ้าทำหน้าที่ในการบีบลำแสงอิเล็กตรอนให้เป็นรูปกรวย (electron probe)

2.2.2.4 เลนส์รวมแสงจะทำงานร่วมกับเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective lens) และ objective lens aperture จะเป็นตัวช่วยในการปรับลำอิเล็กตรอนให้อยู่ตรงกลาง (center) ทั้งหมดเพื่อช่วยบีบอิเล็กตรอนที่มีขนาดเล็กสุดและมี centering ของลำอิเล็กตรอน เพื่อที่จะได้สัญญาณอิเล็กตรอนขนาดเล็กเท่าที่ต้องการเพื่อจะฉายกราดลงบนตัวอย่าง ซึ่งจะควบคุมให้อยู่ในช่วงลำแสงที่ต้องการ การปรับขนาดของปลายกรวยหรือการรับ probe diameter ควบคุมโดยเลนส์รวมแสง (condenser lens) โดยปรับ condenser lens จากปุ่มของ spot size ถ้าหมายเลขของ spot size สูง หมายถึง ขนาดการบีบลำแสงอิเล็กตรอนมาก คือ ลำแสงถูกบีบให้เล็ก (ขนาดของลำอิเล็กตรอนจะเล็กที่กราดลงบนตัวอย่างมากกว่าการปรับหมายเลขของ spot size ที่ต่ำ (ขนาดของลำอิเล็กตรอนจะกว้างที่กราดลงบนตัวอย่าง)

2.2.2.5 จากนั้นลำอิเล็กตรอน (electron probe) หรือจะเรียกว่า อิเล็กตรอนปฐมภูมิ (primary electron) ที่ปรับได้ตามต้องการ จะถูกบังคับให้กราดตรวจไปบนผิวของตัวอย่าง ในแนวแกน

นอน (แกน X) และแกนตั้ง (แกน Y) เป็นพัลส์เหลี่ยมนำค้ำระบบสแกนของโทรทัศน์โดยการควบคุมด้วยชุดควบคุมการสแกน (scanning coil) ซึ่งเป็นระบบสนามแม่เหล็กไฟฟ้า

**2.2.2.6 เมื่ออิเล็กตรอนปฐมภูมิตกกระทบชิ้นตัวอย่าง** จะเกิดปฏิกิริยากับองค์ประกอบของวัตถุ กระทบในระดับและลึกแตกต่างกัน จะทำให้เกิดสัญญาณอิเล็กตรอนที่ออกมาแตกต่างกัน ซึ่งเราสามารถรับสัญญาณอิเล็กตรอนที่แตกต่างกันได้ตามชนิดของตัวรับสัญญาณ (detector) ที่มีอยู่ในกล้อง



ภาพที่ผง-2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

### 2.2.3 สัญญาณอิเล็กตรอน

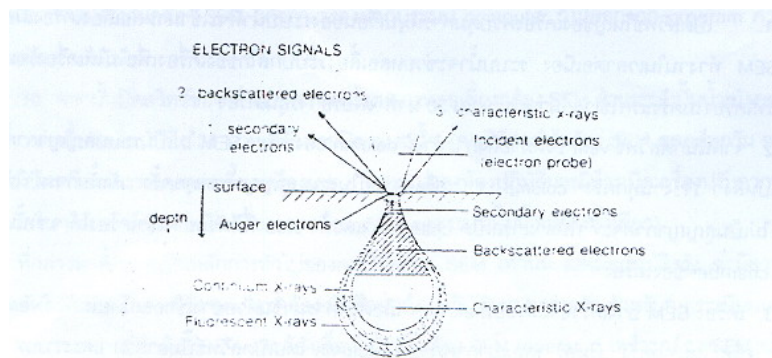
สัญญาณอิเล็กตรอนที่พบในแต่ละระดับความลึก เมื่ออิเล็กตรอนปฐมภูมิจากกราดลงบนพื้นชิ้นตัวอย่างมีดังนี้

**2.2.3.1 อิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary electrons)** เกิดจากการถ่ายโอนพลังงานจากอิเล็กตรอนปฐมภูมิ เมื่อกระทบผิวของตัวอย่าง ในความลึกประมาณ 6-10 nm. จะเกิดได้ดีกับตัวอย่างที่มีแรงยึดเหนี่ยวที่ผิวต่ำ ภาพที่ได้เป็น secondary electron image = SEI ภาพจะให้การแจ่มแจ้งรายละเอียด (resolution) ดีที่มีความชัดของภาพขึ้นอยู่กับมุมของการเอียงตัวอย่าง (tilt angle) และพื้นผิวของตัวอย่างเหมาะสมสำหรับงานทางชีววิทยา

**2.2.3.2 อิเล็กตรอนแบบกระเจิงกลับ (Backscattered electrons)** เกิดจากการที่อิเล็กตรอนปฐมภูมิสูญเสียพลังงานบางส่วนให้กับอะตอมของชิ้นตัวอย่างและกระเจิงกลับออกมามีพลังงานสูงใกล้เคียงกับอิเล็กตรอนปฐมภูมิเหมาะสำหรับธาตุที่มีเลขอะตอมสูง จะเกิดภาพที่เรียกว่า

backscattered electron image= BEI ความคมชัดของภาพขึ้นอยู่กับลักษณะผิวของตัวอย่างและค่าเฉลี่ยของเลขอะตอมของตัวอย่าง

**2.2.3.3 รังสีเอกซ์เฉพาะธาตุ (Characteristic X-ray)** เกิดจากการที่ธาตุที่เป็นตัวอย่างปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เพื่อรักษาสมดุลของโครงสร้างเมื่อธาตุนั้นถูกกระตุ้น (excited atom) ด้วยอิเล็กตรอนปฐมภูมิ ภาพที่ได้จะเป็น X-ray image โดยสัญญาณภาพกลุ่มนี้มีประโยชน์ในการดูระดับความแตกต่างของลักษณะเฉพาะของธาตุที่มีการปลดปล่อยพลังงานออกมา โดยสามารถนำมาหาปริมาณและคุณภาพของธาตุแต่ละชนิดที่มีอยู่ในก้อนตัวอย่างได้ เหมาะสำหรับงานทางด้านวัสดุศาสตร์ (material science) การตรวจคุณภาพของธาตุนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนของชนิดตัวอย่างธาตุที่มีมากับเครื่องเพื่อเป็นตัวอย่าง (sample) ให้กับตัวจับสัญญาณอิเล็กตรอน (detector)



ภาพที่ 3 สัญญาณอิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละชั้นความลึกของตัวอย่างอันเกิดจากอิเล็กตรอนปฐมภูมิ ตกกระทบผิวตัวอย่าง

### ภาพที่ ผง-3 สัญญาณจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากนั้นสัญญาณอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณภาพตามอุปกรณ์วัดสัญญาณเฉพาะ Signal detector = Selector + Scintillator เช่น อุปกรณ์วัดสัญญาณเฉพาะของอิเล็กตรอนทุติยภูมิ อิเล็กตรอนกระเจิงกลับ และ X-ray จากนั้นสัญญาณอิเล็กตรอนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าและถูกส่งไปยังเครื่องขยายแสง (Photomultiplier tube) สัญญาณจะถูกส่งไปยังหลอดภาพปรากฏเป็นภาพอยู่จอรับภาพ (Cathode ray tube = CRT) ระบบการแสดงผลของภาพบนจอ CRT สามารถเลือก scan ภาพได้ดังนี้

**2.2.3.4 การแสดงภาพระบบโทรทัศน์ (TV mode)** แสดงภาพด้วยการ scan ภาพเร็วและสูง เกิดภาพเต็มพื้นที่ เป็นการ scan หยิบๆ เพื่อเลือกพื้นที่ที่จะทำการศึกษา เพื่อมองโครงสร้างแบบ หยิบ ก่อน

**2.2.2.5 การแสดงภาพแบบเร็ว (rapid scan)** เป็นการ scan ภาพสุดท้ายก่อนการบันทึกภาพ จะได้ภาพที่มีความละเอียดมากขึ้น การขยายภาพ (magnification) ของกล้อง SEM มิได้เกิดจากเลนส์ใกล้วัตถุ แต่ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนขนาดของความกว้างของเส้นสแกนบนจอรับภาพ (L) กับความกว้างของเส้นสแกนบนพื้นผิวตัวอย่าง (1) โดยจะบันทึกภาพได้หลายวิธี เช่น บนฟิล์มขาว-ดำ (SEM-film) Polaroid film แผ่น diskette หรือพิมพ์ออกมาเป็นภาพจาก printer

## 2.3 หลักการทั่วไปของการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สามารถแบ่งขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.1 เปิดสวิตช์ใหญ่ของเครื่องควบคุมการหมุนเวียนของระบบน้ำที่จะเข้ามาหล่อเลี้ยงเครื่องเมื่อเครื่อง SEM งานในเวลาต่อเนื่อง ระบบน้ำจะช่วยหล่อเลี้ยงระบบกลไกของเครื่องไม่ให้เครื่องร้อนการสตาร์ทเครื่องในครั้งแรกใช้เวลานานประมาณ 30 นาที เพื่อรอการอุ่นเครื่อง

2.3.2 จากนั้นกดสวิตช์ vent ซึ่งหมายถึง การทำให้ column ของเครื่อง SEM ไม่เป็นระบบสุญญากาศ (โดยทั่วไปหลังการใช้งานทุกครั้ง column ของเครื่องจะอยู่ในระบบสุญญากาศทุกครั้ง ดังนั้นการทำให้ column ไม่เป็นสุญญากาศจะทำให้สามารถเปิด chamber และนำ stub ที่มีตัวอย่างเข้าเครื่องได้ จากนั้น ปิด lock chamber ของเครื่อง

2.3.3 เครื่อง SEM บางเครื่องอาจมีระบบ air lock เมื่อต้องการนำชิ้นตัวอย่างเข้าออกโดยไม่ต้อง vent แล vac เครื่องใหม่ทุกครั้ง เริ่มสร้างสุญญากาศภายใน column โดยเปิดสวิตช์ปั๊มอากาศ และระบบทำสุญญากาศโดยใช้ปั๊ม pump หรือปั๊ม cacum โดยทั่วไปเครื่อง SEM จะมีไฟหรือสัญญาณบอกเมื่อเครื่องพร้อมทำงาน

2.3.4 กดสวิตช์เพื่อเลือก Secondary electron detector เป็นสวิตช์ไฟฟ้าแรงสูง (high voltage) และเลือก high voltage ในช่วง 15-20 KV

2.3.5 บังคับกระแสไฟฟ้าให้เข้าสู่ electron gun เพื่อให้ได้ลำแสงอิเล็กตรอน

2.3.6 ปรับให้เกิดภาพบนหน้าจอ โดยใช้ปั๊มควบคุมความเปรียบต่างของภาพ (contrast) และปั๊มควบคุมความสว่างของภาพ (brightness) เพื่อให้ปรากฏภาพบนจอ แสดงภาพและบันทึกภาพ (CRT display and recording unit)

2.3.7 เมื่อเลือกบริเวณของตัวอย่างที่จะศึกษาได้แล้ว ให้เลือกกำลังขยายของภาพ (magnification) ที่ต้องการให้สูงกว่าความเป็นจริงที่ต้องการศึกษาเสียก่อนเพื่อปรับให้ได้ชัดที่สุดตามความต้องการภาพให้คมชัด (focus) แก้วความบิดเบี้ยวของภาพ (stigmator) ปรับภาพให้อยู่ที่ศูนย์กลาง (centering) เรียกว่า การแก้ wob เมื่อได้ภาพคมชัดตามต้องการแล้ว และความสว่างของภาพอีกครั้งหนึ่งจากนั้นสามารถถ่ายภาพหรือ print ภาพได้ตามต้องการ (เราสามารถใช้เวลาของการเคลื่อนตัวของลำ electron beam ได้โดยใช้ปุ่ม scan speed ต่าง ๆ ซึ่งมี speed เร็ว กลางและช้า ซึ่งจะ scan ภายใต้มุมความละเอียดของภาพมากขึ้นตามต้องการเพื่อการถ่ายภาพ แต่สำหรับเครื่อง SEM ที่ใช้ program computer เป็นตัวควบคุมกล้อง SEM นั้น หลังจากทำให้ column เป็นสุญญากาศแล้วให้เปิดหน้าจอเครื่อง computer ที่เชื่อมโยงกับกล้อง SEM และใช้คำสั่งต่างๆ เช่น คำสั่ง กำหนดค่าไฟฟ้าแรงสูงที่ต้องการให้คำสั่งต่างๆ ตามต้องการ ที่กล่าวมาตั้งแต่ข้อ 4-7 ได้ทั้งหมด จะเมื่อถ่ายภาพ print ภาพ หรือเก็บข้อมูลภาพเข้า computer เรียบร้อยแล้วต้องการเลิกงาน หรือต้องการเปลี่ยนตัวอย่างใหม่ ต้องปิดปุ่มสวิตซ์ filament heating และ high voltage

2.3.8 ปรับ column ระบบสุญญากาศ ให้ไม่เป็นสุญญากาศ (โดยทำเหมือนเริ่มต้น) แล้วนำตัวอย่างออกจากเครื่องหรือเปลี่ยนตัวอย่าง จากนั้นทำให้ column เป็นสุญญากาศอีกครั้ง

2.3.9 ถ้าไม่ใช้งานกล้อง SEM แล้วถ้าเครื่องต่อกับระบบ computer ก็ให้ออกจาก program คำสั่ง และปิดเครื่อง computer

10. จากนั้นปิดสวิตซ์ของกล้อง SEM แต่ระบบการหล่อเลี้ยงกล้อง SEM ด้วยระบบปั้มน้ำ ยังคงให้ระบบน้ำหล่อเลี้ยงเครื่องไปอีก 30 นาที แล้วค่อยปิดระบบน้ำ (กรณีมีการใช้กล้อง SEM ตลอดทุกวัน อาจจะไม่ต้องปิดเครื่องและระบบหล่อเลี้ยงเครื่องเลย ถ้าระบบของห้องปฏิบัติการมีการเปิดเครื่องปรับอากาศตลอดภายใน 1 สัปดาห์ อาจจะไม่เปิดเครื่องของกล้อง SEM และระบบปั้มน้ำเพียงครั้งเดียว)

ที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นหลักการทั่วไปของการใช้กล้อง SEM เท่านั้น แต่เมื่อปฏิบัติจริง จะมีความแตกต่างกันไปในขั้นตอนการใช้งานแต่ละกล้อง นักศึกษาต้องปฏิบัติอย่างเคร่งครัด สำหรับกฎระเบียบ และขั้นตอนต่างๆ ของการใช้กล้อง SEM และต้องเชื่อฟังผู้ดูแลกล้อง SEM (operator) เพราะกล้อง SEM จะมีราคาแพงมาก และค่าดูแลรักษาแพงมาก

## 2.4 การเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาสำหรับการศึกษางานทางด้านกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Biological specimen preparation for Scanning Electron microscope)

การศึกษาตัวอย่างทางชีววิทยาสำหรับงานทางอิเล็กตรอนแบบส่องกราด เริ่มตั้งแต่การเก็บตัวอย่างที่สนใจศึกษาโดยตัวอย่างจะมีความหลากหลายมาก ในบทเรียนนี้จะกล่าวถึงตัวอย่างทางชีววิทยาเท่านั้น โดยแยกประเภทเป็นตัวอย่างจาก พืช สัตว์ และสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ (microorganism) เช่น พวกโปรโตซัว สาหร่ายเซลล์เดียว รา แบคทีเรีย เป็นต้น หลักของการเก็บและการเตรียมตัวอย่างคือ ทำเช่นไรจะได้ตัวอย่างที่คงสภาพเดิมเหมือนตอนที่ยังมีชีวิตอยู่และรักษาลักษณะโครงสร้างเดิมให้ได้มากที่สุด การรักษารูปร่างของตัวอย่างอาจใช้สารเคมี (chemical method) ช่วยในการรักษารูปร่างในกรณีตัวอย่างที่ไม่มีโครงสร้างแข็ง เช่น พวกเซลล์และเนื้อเยื่อของสัตว์ หรืออาจใช้การทำให้แห้งและแข็งอย่างรวดเร็ว (Freeze-drying method) ในการรักษาสภาพโครงสร้างก็ได้ แต่ในกรณีนี้ต้องมีเครื่อง freeze-dry แต่สำหรับตัวอย่างที่มีโครงสร้างแข็ง เช่น เปลือกหอย เปลือกไม้ เรณูของดอกไม้ที่มีโครงสร้างแข็งบางชนิดอาจจะมีต้องผ่านกระบวนการรักษารูปร่าง เป็นเพียงทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) หรือค่อย ๆ ทำให้แห้งอย่างช้า ๆ ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) ก็ยังคงได้โครงสร้างที่เหมือนกับธรรมชาติ จากนั้นต้องทำตัวอย่างให้แห้งมากที่สุด (โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ของตัวอย่างให้หมด) แล้วนำตัวอย่างมาฉาบผิวเพื่อให้ตัวอย่างนำไฟฟ้าได้ (เพราะตัวอย่างทางชีววิทยาเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ จะไม่นำไฟฟ้า) จากนั้นจึงสามารถนำตัวอย่างไปส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดต่อไป โดยสามารถดูด้วยระบบภาวะสุญญากาศต่ำ (Low vacuum) หรือภาวะสุญญากาศสูง (High vacuum)

2.4.1 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection) เนื่องจากตัวอย่างมีความหลากหลาย จึงทำให้มีวิธีการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกันออกไปจึงแยกการเก็บตัวอย่างเป็นกลุ่มต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.4.1.1 ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ (tissue) เมื่อผ่าตัดออกมา (biopsy) ให้แช่เลือดหรือของเหลวออกด้วยผ้าขาวบางสะอาดจากนั้นล้างในน้ำยาที่เป็นกลาง (Isotonic solution) จนขึ้นเนื้อหมดจากคราบของของเหลวต่างๆ ถ้าชิ้นตัวอย่างมีขนาดใหญ่ต้องตัดให้เล็กลง มีขนาดกว้างยาวประมาณ 4.5-5 มิลลิเมตร และความหนาประมาณ 2.5-3 มิลลิเมตร

2.4.1.2 ตัวอย่างที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (tissue culture) หรือเซลล์ที่อยู่ในสารละลาย ให้ปั่นล้างเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็วประมาณ 1500-2000 รอบ/นาทิตานครั้งละ 10 นาที โดยรอบแรกให้ดูดสารละลายด้านบน (supernatant) ซึ่งเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยง หรือสารละลายเดิมออกทิ้งไป จากนั้นเติมน้ำยาล้างตัวอย่างและปั่นล้างเช่นเดิม ล้างเซลล์ประมาณ 2-3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายให้ดูด

น้ำยาล้างตัวอย่างออกเหลือแต่เซลล์ตัวอย่างอยู่ที่ก้นหลอด จึงเขี่ยเซลล์ที่ต้องการศึกษามาป้ายลงบนแผ่น cover slide แผ่นเล็ก ๆ ที่เตรียมไว้ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.4.1.3 ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อพืช ส่วนมากจะพบว่ามี cutin เคลือบให้ล้างตัวอย่าง detergent ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นล้างด้วยน้ำยาล้างตัวอย่างประมาณ 2-3 ครั้ง ตัดชิ้นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ถ้ามียางไม้ไหลออกมาก็ให้ซับออกแล้วค่อย ใส่น้ำยาดองสำหรับตัวอย่างที่เป็นละอองเรณูของดอกไม้ ถ้าเรณูแห้งและติดอยู่ที่ดอกไม้ใกล้จะหลุดให้นำกระดาษขาว 2 หน้าไปรองละอองเรณูได้เลย แต่ถ้าละอองเรณูเป็นผงให้เคาะลงใน 50 % อัลกอฮอล์ในภาชนะที่สะอาด (เป็นการดึงน้ำออกด้วย) จะทำให้ละอองเรณูสะอาด (เป็นการดึงน้ำออกด้วย) จะทำให้ละอองเรณูสะอาดไม่ติดสิ่งแปลกปลอม

2.4.1.4 ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพวกจุลชีพ (microorganism) ต่างๆ ถ้าจุลชีพเหล่านั้นเลี้ยงในอาหารเหลวให้กรองผ่านที่กรองที่มีรูขนาด 0.2-0.4 ไมครอน เพื่อกรองเอาน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออก ส่วนจุลชีพที่ต้องการศึกษาจะติดอยู่บนกระดาษกรอง ถ้าจุลชีพนี้เพาะเลี้ยงในวุ้นแข็ง ก็ให้ตัดวุ้นแข็งออกเป็นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ สามารถจุ่มลงในน้ำยารักษาโครงสร้างของเซลล์ได้เลย

## 2.4.2 การดองตัวอย่าง (Fixation)

ตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วยน้ำยาล้าง (washing medium) หรือเรียกว่า buffer ให้ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ตามที่ต้องการศึกษาจากนั้นรีบดองตัวอย่างทันทีในน้ำยาดอง (fixative) เพื่อต้องการคงสภาพของเซลล์ให้เหมือนหรือใกล้เคียงเซลล์ตอนมีชีวิตอยู่ให้มากที่สุด น้ำยาดองนี้ยังมีผลช่วยในการป้องกันมิให้เซลล์ย่อยสลายตัวเอง (autolysis) น้ำยาดองที่ใช้เป็นที่นิยมในการเตรียมตัวอย่างทางอิเล็กทรอนิกส์คือ glutaraldehyde ใช้เป็น primary fixative และตามด้วย Osmium tetroxide ( $OsO_4$ ) เป็นสารพวก aldehyde ใช้เป็น secondary fixative

Glutaraldehyde ทำปฏิกิริยาได้ดีกับพวกโปรตีน ส่วน  $OsO_4$  ทำปฏิกิริยาได้ดีกับไขมัน และยังทำให้ตัวอย่างสามารถนำไฟฟ้าได้ดีกว่าเดิม ป้องกันการเกิดประจุที่เรียกว่า charge up บนผิวตัวอย่าง

## 2.4.3 การกำจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration)

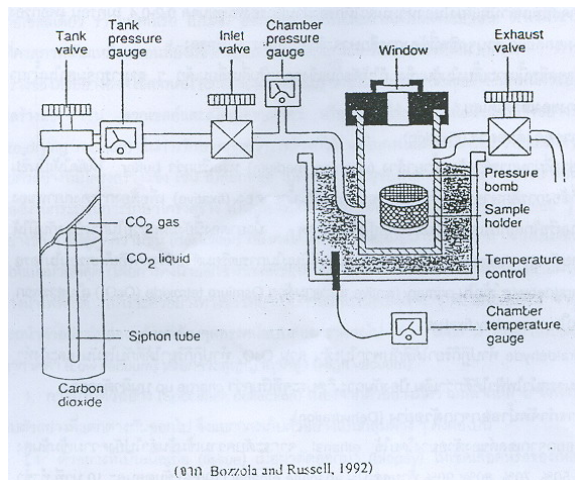
ดึงน้ำออกจากเซลล์ของตัวอย่างโดยใช้ ethanal จากระดับความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูงเริ่มจาก 30% ,50%,70%,80%,90% ท้ายสุดเป็น absolute ethanal (100%) ขึ้นตอนละ 10 นาที ทำซ้ำขึ้นตอนละ 2 ครั้ง)

## 2.4.4 การทำให้ตัวอย่างแห้ง (Drying)

เมื่อตัวอย่างผ่านการดึงน้ำออก (dehydration) แล้วจากนั้นต้องทำให้ ethanal alcohol เหล่านั้น ระเหยออกไป โดยสามารถแยกการทำตัวอย่างให้แห้งได้หลายวิธี

2.4.4.1 Air drying ปล่อยให้ตัวอย่างแห้งเอง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือใส่ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีโครงสร้างแข็งอยู่แล้ว เช่น พวงกระดุก แผลง หรือละอองเรณูที่มีโครงสร้างแข็ง

2.4.4.2 Critical point drying (CPD) เป็นการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต เหมาะสำหรับงานทางด้านชีววิทยาโดยของเหลวทุกประเภทจะกลายเป็นไอ ณ ความดัน และอุณหภูมิที่เป็นจุดวิกฤต (critical point temperature) โดยสภาพของพื้นผิวจะคงเดิม มีหลักการคือ เมื่อตัวอย่างผ่านการคั่งน้ำออกแล้วให้นำตัวอย่างใส่ใน chamber แล้วผ่านของเหลวพวก CO<sub>2</sub> เหลว หรือ feon เหลว เข้าแทนที่ ethana alcohol โดยผ่านของเหลวเข้า chamber หลายครั้งและให้ท่วมตัวอย่างเพื่อให้แน่ใจว่ามีการแทนที่จนสมบูรณ์จากนั้นเพิ่มความดัน และอุณหภูมิของ chamber ให้ถึงจุดวิกฤตของเหลวที่เข้าไปแทนที่ (CO<sub>2</sub> เหลว หรือ feon เหลว) ณ จุดวิกฤตของเหลวและ gas จะมีความหนาแน่นเท่ากันทำให้ของเหลวกลายเป็นไอจนหมดซึ่งผลคือ ชิ้นตัวอย่างจะแห้งสนิท และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเลย



ภาพที่ ผง-4 แผนภาพการทำงานของเครื่องมือ

2.4.4.3 นำชิ้นตัวอย่างที่แห้งสนิทติดบนฐานวางตัวอย่าง ฐานตัวอย่างนิยมทำด้วยอะลูมิเนียมหรือทองเหลือง (stub) อาจติดโดยใช้เทตติดหรืออาจใช้กาวเฉพาะมีผงถ่านผสมในการ (carbon colloidal adhesive) หรือยาทาเล็บ หรือกาวผสมโลหะ (silver and carbon paste)

2.4.4.4 นำชิ้นตัวอย่างไปจาบผิวด้วยโลหะเพื่อให้นำไฟฟ้า โดยทั่วไปตัวอย่างทางชีววิทยาจะไม่นำไฟฟ้า การจาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะจะทำให้ผิวมีคุณสมบัตินำไฟฟ้าซึ่งเมื่ออิเล็กทรอนิกส์

(อิเล็กตรอนปฐุมภูมิ) มากระทบผิวตัวอย่าง จะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิได้เพียงพอ โลหะหนักที่นิยมนำมาฉาบผิวต้องเป็นธาตุหนักมีโมเลกุลขนาดเล็กนิยมใช้ทอง (Au) และแพลทตินัม(Pt) หรือเป็นโลหะผสมระหว่างทองกับพาลาเดียม (Au-Pd) การฉาบผิวอาจทำได้หลายวิธี

เริ่มต้นฉาบผิวตัวอย่างด้วยผงถ่านโดยใช้เครื่อง carbon coat เพื่อเพิ่มการนำไฟฟ้า และตามด้วยการฉาบด้วยทองผสมพาลาเดียม

ปัจจุบันนิยมใช้วิธีง่ายๆ โดยฉาบด้วยผงถ่านอย่างเดียว หรือฉาบด้วยผงทองอย่างเดียว เครื่องมือที่ใช้ฉาบผิวตัวอย่างเรียกว่า Ion sputter หรือ sputter coater หลักการทำงานของเครื่องมือคือ วางชิ้นตัวอย่างตรงขั้ว anode และโลหะที่จะใช้ฉาบอยู่ที่ขั้ว cathode สภาวะการฉาบอยู่ในกรอบแก้วสุญญากาศ โดยใช้ไอออนบวกของอากาศหรือของก๊าซอาร์กอน วิ่งชนแผ่นโลหะเกิดการแตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็กโรยผงโลหะกระจายไปทั่วกรอบแก้ว ผงโลหะจะค่อย ๆ ปกคลุมผิวตัวอย่าง ความหนาของผิวโลหะที่โรยตัวควรอยู่ระหว่าง 10-20 nm.ระบบทั้งหมดถูกควบคุมด้วยกระแสไฟฟ้า การฉาบตัวอย่างจะหนาหรือบางขึ้นกับระยะห่างของตัวอย่างกับโลหะ (working distance) และขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการฉาบ ถ้าระยะเวลาฉาบนานจะเกิดความหนาของผลโลหะทำให้ปากปิโตรรอยของผิวตัวอย่างทำให้ภาพที่ได้ผิดเพี้ยนจากความจริงขาดรายละเอียดของภาพ ถ้า working distance แคบลงก็จะทำให้ความหนาของผิวโลหะหนาขึ้นถ้าใช้ระยะเวลาน้อยลงและ working distance กว้างขึ้น จะทำให้การแบผิวบางเกินไป จะทำให้เกิดประจุที่ผิวที่เรียกว่า charge up เกิดภาพไม่ชัดเจน แสงสว่างจะจ้าเป็นจุด ๆ และไม่ควรรอบโลหะทิ้งไว้นานเกินไป เพราะผงโลหะหนักจะซึมตัวเข้าชิ้นตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างที่ฉาบผิวแล้วควรเก็บในที่ที่ไม่มีฝุ่นผง และเก็บในที่แห้งและระวังการกระทบกระเทือนของชิ้นตัวอย่าง

## 2.5 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope:TEM)

การศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope : TEM) และการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยา (Study of electron microscope and biological specimen preparation)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน สามารถมองสิ่งที่มีขนาดเล็กมาก ๆ โดยกล้องมีกำลังขยายเป็นแสนเท่า แหล่งกำเนิดแสงเป็นลำอิเล็กตรอน ส่องบนแผ่นตัวอย่างที่ตัดบางมาก (ขนาดประมาณ 60-100 นาโนเมตร) ภาพที่ได้จะปรากฏบนแผ่นเรืองแสง (fluorescent screen) สามารถมอง

ภาพเห็นด้วยตาเปล่า หลักการของกล้องจุลทรรศน์แบบนี้มีได้แตกต่างจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) ถักเท่าไคนัก

ส่วนประกอบหลักของกล้องประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่อกกลมใหญ่เป็นแท่งยาว (column) และส่วนที่เป็นส่วนควบคุม (console unit) โดยควบคุมด้วยอุปกรณ์ไฟฟ้า

ส่วนที่อกกลม (column) ปลายสูงสุดเป็นแหล่งกำเนิดของลำอิเล็กตรอน (Electron gun) ต่ำลงมาเป็น condenser lens (CL) ต่ำลงมาอีกเป็นช่องสำหรับวางชิ้นตัวอย่างที่ตัดบางมาก ๆ (Specimen chamber) ต่ำลงมาจากนั้นเป็น objective lens (OL), intermediate lens (IL) และ projector lens (PL) ปลายล่างสุดของที่อกกลมนี้จะมีช่องกระจกเมื่อให้ผู้ใช้งานสามารถมองเห็นภาพที่ปรากฏได้เรียก viewing chamber และมีจอรับภาพ (screen)

ส่วนควบคุม (console unit) จะวางนอนอยู่พื้นฐานของส่วนที่อกกลม (column) ตรงส่วนควบคุมจะมีปุ่มต่างๆ สำหรับควบคุมการทำงานของกล้องทั้งหมด และจะมีส่วนที่มีกล้องบันทึกภาพ (camera) ถ่ายภาพออกมาเป็นขาวดำ อุปกรณ์ทางด้านหลังของส่วนควบคุม จะมีสายไฟ อุปกรณ์ไฟฟ้า หม้อแปลง ระบบสุญญากาศ ตลอดจนระบบระบายความร้อนต่างๆ