

เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุ สำหรับงานวิจัยทางทันตกรรม Equipments in Morphological Analysis for Dental Research

ธารินทร์ เพียงสุข¹, กษาปณ์ พิเชฐโชติ², ณัฏฐ์ กิตติวินิชนันท์¹, ปานไพลิน แสงอุทัย², ทวีศักดิ์ ประสานสุทธิพร¹, สุมณา จิตติเดชารักษ์¹

¹ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²นักศึกษาล้างปริญญาแขนงวิชาทันตกรรมบูรณะ สาขาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต

Tarin Piangsuk¹, Kasarb Pichetshote², Chutikul Khuankaew², Neeranuch Kittiwinnichan², Panpailin Sanguthai²,
Taweesak Prasansuttiorn¹, Sumana Jittidecharaks¹

¹Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

²Postgraduate student (Restorative dentistry), Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม. ทันตสาร 2560; 38(1) : 13-28

CM Dent J 2017; 38(1) : 13-28

บทคัดย่อ

ในการทดสอบวัสดุทางทันตกรรมบูรณะเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลคุณสมบัติของวัสดุ ต้องอาศัยเครื่องมือที่ให้ความแม่นยำและมีความเหมาะสมตรงกับวัตถุประสงค์ของการทดสอบ ในปัจจุบันพบว่าเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะรูปร่าง ความเรียบ รวมถึงข้อมูลของสารประกอบบริเวณพื้นผิวของทันตวัสดุมีการพัฒนาไปมาก ทำให้สามารถทดสอบลักษณะต่างๆ ของวัสดุได้หลากหลายกว่าในอดีต ผู้ทำการทดลองควรมีความเข้าใจในคุณสมบัติ วิธีการใช้งาน ทราบถึงข้อดี ข้อเสียของเครื่องมือที่ใช้ทดสอบและข้อจำกัดของเครื่องมือ จึงจะสามารถเลือก

Abstract

In dental material research, precise and reliable investigation machines are indispensable. Morphological analysing tools have been developed to be able to detect variety of delicate details, for example smoothness and shape of tiny materials. This development has helped research personal to be able to attain much more information than in the past. As a consequence, researchers are required to understand capability, indications, advantages and disadvantages of the

Corresponding Author:

ธารินทร์ เพียงสุข

ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Tarin Piangsuk

Department of Restorative Dentistry and Periodontology,
Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, 50200

E-mail: Tarin.p@cmu.ac.th

ใช้เครื่องมือเพื่อทดสอบคุณสมบัติของทันตวัสดุและฟันได้อย่างถูกต้องตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่ได้กำหนดไว้

คำสำคัญ: การตรวจสอบพื้นผิว เครื่องมือตรวจสอบ วัสดุทันตกรรมบูรณะ สมบัติทางกายภาพ

instruments to achieve the objective of research.

Keywords: Morphological analysis, testing machine, dental restorative materials, physical properties

บทนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีในงานทันตกรรมได้มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว เกิดการพัฒนาการผลิตทันตวัสดุให้มีประสิทธิภาพทางคลินิก และมีทันตวัสดุถูกคิดค้นออกมาใหม่อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้เกิดการวิจัยทดสอบวัสดุที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ดังนั้นการทดลองและทดสอบวัสดุจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเลือกใช้เครื่องมือในการทดลองที่มีความแม่นยำ มีความสามารถและประสิทธิภาพตอบสนองกับวัสดุที่ถูกคิดค้นใหม่และคำถามงานวิจัยได้

การทดสอบคุณสมบัติของทันตวัสดุแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพคือคุณสมบัติของสารที่สังเกตได้จากภายนอก ลักษณะทางกายภาพสามารถถูกทดสอบได้โดยใช้การทดสอบแรงเฉือน การทดสอบแรงดึง การทดสอบความแข็งผิวรวมถึงการศึกษาพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุเป็นต้น สมบัติทางเคมีจะมีความเกี่ยวข้องกับการมีปฏิสัมพันธ์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางอิเล็กทรอนิกส์ของวัสดุ เช่น คุณสมบัติในการนำไฟฟ้า คุณสมบัติการเป็นแม่เหล็ก^(1,2)

การตรวจสอบพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุทางทันตกรรมเป็นการทดสอบหนึ่งที่สามารถบอกคุณสมบัติของวัสดุเหล่านั้นได้ เช่น การตรวจสอบความขรุขระของพื้นผิว ความหนาของชั้นสารยึดติด และลักษณะของเรซินแท็ก (resin tag)^(3,4) การทบทวนวรรณกรรมฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอข้อมูลของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ในส่วนของลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุและอุปกรณ์ทางทันตกรรมบูรณะในแง่ของหลักการทำงาน การใช้งาน รวมถึงข้อดีและข้อจำกัด

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของวัสดุทางทันตกรรม

ในการตรวจสอบพื้นผิวและรูปร่างของทันตวัสดุนั้นต้องอาศัยภาพที่มีความละเอียดสูง แต่ความสามารถในการมองเห็นของตามนุษย์มีจำกัด ทำให้การตรวจสอบพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความละเอียดซับซ้อนมากขึ้น อุปกรณ์ที่ถูกพัฒนาเพื่อตรวจสอบลักษณะพื้นผิวและรูปร่างมีดังนี้

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (optical microscope)
2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)
3. กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscope)
4. ออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี (Optical coherence tomography)

การเลือกใช้อุปกรณ์เหล่านี้ในการทำการทดสอบวัสดุทางทันตกรรม ควรมีการเลือกให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ขั้นต้น ในการทดสอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่พอเพียง และต้องมีการวิเคราะห์ถึงข้อดีข้อเสียและความเหมาะสมของอุปกรณ์ต่างๆ ร่วมด้วย

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ใช้หลักการทำงานของแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามนุษย์มองเห็นได้และเลนส์ในการขยายภาพซึ่งกล้องจุลทรรศน์แต่ละชนิดมีลักษณะของแหล่งกำเนิดแสงและเลนส์ที่ต่างกัน⁽⁵⁾

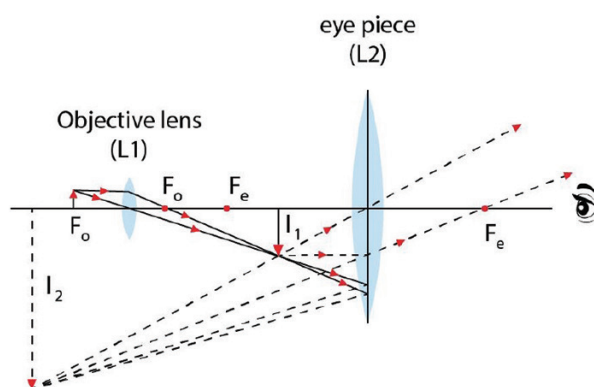
1. กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (compound microscope)

กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (รูปที่ 1) ประกอบด้วยเลนส์ใกล้วัตถุและเลนส์ใกล้ตา วัตถุจะถูกวางบนระนาบโฟกัส (focal plane) และมีแหล่งกำเนิดแสงอยู่ด้านล่างเมื่อแสงผ่านวัตถุและถูกขยายภาพด้วยเลนส์ใกล้วัตถุจะเกิดการสร้างภาพจริงหัวกลับที่มีขนาดเท่าวัตถุ ตำแหน่งของภาพจริงจะตกที่หน้าเลนส์ใกล้ตา ภาพที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์เป็นภาพเสมือนที่มีขนาดใหญ่กว่าวัตถุ ดังนั้นแสงจะผ่านวัตถุ



รูปที่ 1 แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน⁽⁶⁾

Figure 1 Compound microscope



รูปที่ 2 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดเชิงซ้อน⁽⁵⁾

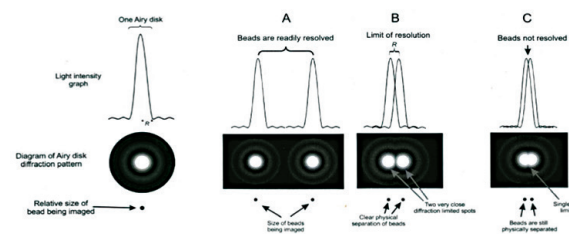
Figure 2 Principle of compound microscope

และใช้หลักการสะท้อนแสงของวัตถุทำให้ได้ภาพเสมือนที่มีขนาดใหญ่ และมีลักษณะหัวกลับมีการกลับด้านซ้ายด้านขวา (รูปที่ 2)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีจุดเด่นที่สามารถใช้งานได้ง่าย รวมถึงการเตรียมชิ้นตัวอย่างไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามภาพที่เห็นจะเป็นภาพ 2 มิติหัวกลับทำให้ขาดรายละเอียดของความตื้นลึก นอกจากนี้ยังมีแสงนอกโฟกัสรบกวน รวมถึงเกิดปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่น (diffraction effect) ทำให้ภาพที่ได้ไม่คมชัด และไม่สามารถขยายภาพได้เกิน 1500 เท่า

ปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่นจะเกิดขึ้นเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงตรวจสอบวัตถุที่ไม่สัมพันธ์กัน และมีระยะห่างน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวแสง คือ 0.2 ไมโครเมตร เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แล้วภาพที่เกิดจากแสงที่สะท้อนออกมาทำให้ดูเหมือนว่าจุด 2 จุดนี้มีการสัมผัสกันทำให้ภาพไม่ชัดเจนและจำกัดกำลังขยายของกล้องในกลุ่มนี้ (รูปที่ 3)

Resolution limited by wavelength of light (diffraction)



รูปที่ 3 แสดงการเกิดปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่น

Figure 3 Diffraction effect

กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีกำลังขยายที่จำกัด จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบเซลล์ในลักษณะของภาพวงกว้าง โดยไม่สามารถดูองค์ประกอบภายในเซลล์เพิ่มเติมได้ และสามารถใช้ในการตรวจสอบพื้นผิวที่ถูกทดสอบในลักษณะกด (indentation test) หรือการตรวจสอบความแข็งผิวของวัสดุ (hardness test) อย่างหยาบ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจสอบการรั่วซึมของรอยต่อและบริเวณขอบของพื้นผิวในระดับเบื้องต้น หรือสามารถตรวจสอบรอยร้าวรอยแตกบริเวณพื้นผิวของวัสดุได้⁽⁷⁾ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างภาพที่พบจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเชิงซ้อนเพื่อใช้ดูรอยร้าวของฟัน⁽⁷⁾

Figure 4 Crack line observed in compound microscope

2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสเตอริโอ (stereo microscope)

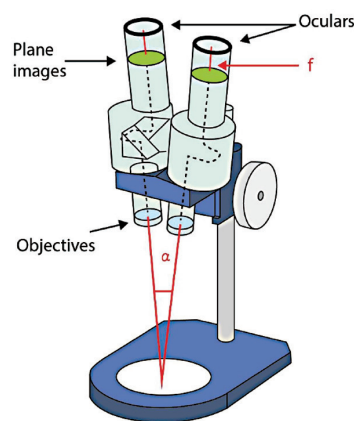
เนื่องจากข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน ที่ไม่สามารถตรวจสอบความตื้นลึกกรวมถึงลักษณะแบบ 3 มิติได้ จึงได้มีการพัฒนาหลักการของกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสเตอริโอขึ้น (รูปที่ 5) โดยหลักการของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือ ใช้แหล่งกำเนิดแสงที่อยู่เหนือต่อชิ้นตัวอย่างและใช้หลักการสะท้อนของแสงจากวัตถุ จากนั้นจะมีเลนส์ใกล้ตา 2 ชั้นที่รับภาพในมุมที่ต่างกัน ในการขยายภาพโดยการนำกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้สามารถมองด้วยตา 2 ข้างทำให้สามารถตรวจชิ้นตัวอย่างได้โดยไม่ต้องทำให้มีความบางมากนัก โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีกำลังขยายไม่เกิน 100 เท่าและให้ภาพที่เป็นภาพเสมือนหัวตั้งไม่กลับซ้ายขวา สามารถมองความตื้นลึกของพื้นผิวรวมถึงการมองแบบ 3 มิติได้ เนื่องจากการมี 2 เส้นทางเดินแสง รวมถึงมีเลนส์วัตถุและเลนส์ใกล้ตา 2 ชั้นที่ทำมุมต่างกัน ทำให้สามารถมองเห็นมุมที่ต่างกันในตัวและตาซ้ายและตาขวาของผู้ใช้ (รูปที่ 6)⁽⁸⁾

พบว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ยังคงมีข้อจำกัดเดียวกับกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน คือมีกำลังขยายภาพได้เพียง 100 เท่า ยังมีปัญหาของแสงนอกโฟกัสและการเกิดปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่น นอกจากนี้การตรวจสอบวัตถุที่มีความมืดหรือสามารถกระเจิงแสงได้มากจะทำให้ภาพสะท้อนออกมาผิดปกติส่งผลต่อความคมชัด



รูปที่ 5 แสดงภาพของกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ

Figure 5 Stereo microscope



รูปที่ 6 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ

Figure 6 Principle of stereo microscope

การใช้งานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มักใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับพื้นผิวต่าง ๆ เช่นพื้นผิวที่ถูกทดสอบด้วยการกด การทดสอบความแข็งผิวของวัสดุ ตรวจสอบการรั่วซึมของรอยต่อ รวมถึงบริเวณขอบของวัสดุหลังการทดสอบวัสดุทางทันตกรรมเช่น การทดสอบลักษณะความล้มเหลวของรอยต่อวัสดุรวมถึงรอยแตกและรอยร้าวบริเวณพื้นผิวของชิ้นตัวอย่าง⁽³⁾ โดยการทดลองของ Zhang และคณะในปี 2015 ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอทำการตรวจสอบลักษณะการแตกหักของรอยต่อเรซินคอมโพสิต (resin composite) กับเนื้อฟันรวมถึงตรวจสอบรอยแตกระหว่างเนื้อฟันในการทำการทดสอบการต้านต่อการแตกหักของฟันที่ได้รับการบูรณะด้วย

เดือยฟันสำเร็จรูปชนิดไฟเบอร์ (fiber post)⁽⁹⁾

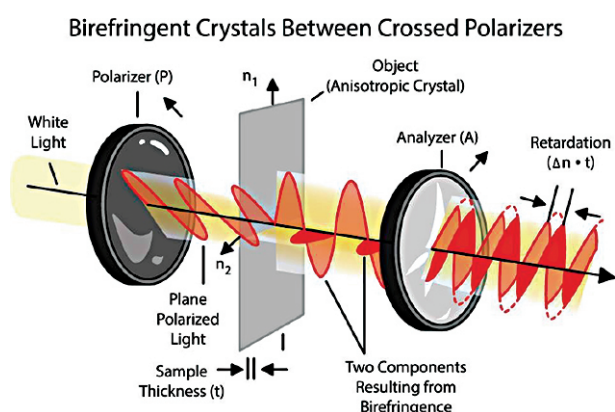
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์ (polarising Microscope)

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอไม่สามารถจำแนกองค์ประกอบของทันตวัสดุได้ในการทดลองที่ต้องการความละเอียดที่มากขึ้น เช่น เมื่อต้องการตรวจสอบชั้นของเคลือบฟันที่มีการสูญเสียแร่ธาตุ ทำให้ต้องมีการพัฒนา กล้องจุลทรรศน์ที่มีศักยภาพที่ดีขึ้นคือกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์⁽¹⁰⁾

Figure 7 Polarising microscope



รูปที่ 8 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์

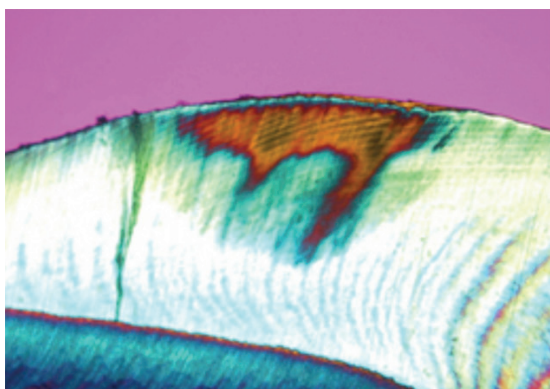
Figure 8 Principle of polarising microscope

หลักการของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือการใช้แสงโพลาไรซ์เป็นแหล่งกำเนิด โดยใช้แผ่นกรองกรองแสงปกติซึ่งมีแนวคลื่นในทุกทิศทางให้เหลือเพียงทิศทางที่เรากำหนด จากนั้นจะมีแผ่นกรองตัวที่ 2 เรียกว่าอะนาไลเซอร์ (analyzer) ซึ่งหากวางตั้งฉากกับตัวที่ 1 จะทำให้แสงที่ผ่านมาไม่สามารถผ่านออกไปได้อีก ดังนั้นแสงที่สะท้อนจากชิ้นตัวอย่างจะถูกบันทึกไว้ในตัวอะนาไลเซอร์ (รูปที่ 8)

เนื่องจากคลื่นแสงที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะถูกกำหนดด้วยตัวกรอง ภาพที่เกิดขึ้นจึงเป็นภาพที่มีความเปรียบต่างของภาพ (contrast) ที่ดีทำให้สามารถตรวจสอบองค์ประกอบที่ต้องการของชิ้นตัวอย่างได้ละเอียดขึ้น⁽¹¹⁾

อย่างไรก็ตามพบว่าการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีข้อจำกัดคือชิ้นตัวอย่างต้องมีคุณสมบัติไบรีฟรินเจนซ์ (birefringence specimen) ซึ่งเป็นวัตถุที่สามารถหักเหแสงได้สองทิศทางเนื่องจากมีผลึก มีค่าดัชนีหักเห 2 ค่าเนื่องจากแสงเคลื่อนที่ด้วยความเร็วไม่เท่ากันในแต่ละทิศทาง ทำให้เมื่อใช้แสงปกติส่องผ่านวัตถุเหล่านี้แสงที่ออกมาจะเป็นแสงโพลาไรซ์ ตัวอย่างของวัตถุเหล่านี้ ได้แก่ เคลือบฟัน แร่แคลไซต์ (calcite) นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดเช่นเดียวกับกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงชนิดอื่นคือ เกิดปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่น สามารถขยายภาพได้ 1500 เท่า และยังคงมีแสงนอกโฟกัสที่มีผลต่อความคมชัดของภาพ

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีความสามารถในการกรองและตรวจสอบการหักเหแสง จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบค่า ไบรีฟรินเจนซ์ของชั้นเคลือบฟัน รวมทั้งการตรวจสอบฟันที่มีการหักเหแสงที่เปลี่ยนไปจากองค์ประกอบของฟันธรรมชาติ (รูปที่ 9) การดูเนื้อเยื่อคอลลาเจนที่ต้องการแยกจากองค์ประกอบอื่นให้เห็นอย่างชัดเจนและศึกษาลักษณะความล้มเหลวระหว่างวัสดุ หลังการทดสอบทางกายภาพ⁽¹²⁾ จากการศึกษาของ Meidiros และคณะในปี 2012 พบว่าค่าไบรีฟรินเจนซ์ของชั้นเคลือบฟันจะเปลี่ยนไปเมื่อชั้นเคลือบฟันนั้นมีการสูญเสียแร่ธาตุ และการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ในการตรวจสอบฟันในงานวิจัยต้องมีการเตรียมชิ้นตัวอย่างที่ถูกต้องก่อนตรวจสอบโดยใช้การจุ่มชิ้นตัวอย่างลงในสารละลายที่มีค่าดัชนีหักเห (refractive index) ต่างๆ เป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนนำชิ้นตัวอย่างไปทดสอบ⁽¹³⁾



ภาพที่ 9 แสดงตัวอย่างภาพฟันที่พบจากกล้องจุลทรรศน์โพลาไรซ์⁽¹⁴⁾

Figure 9 Dental caries observed in polarising microscope

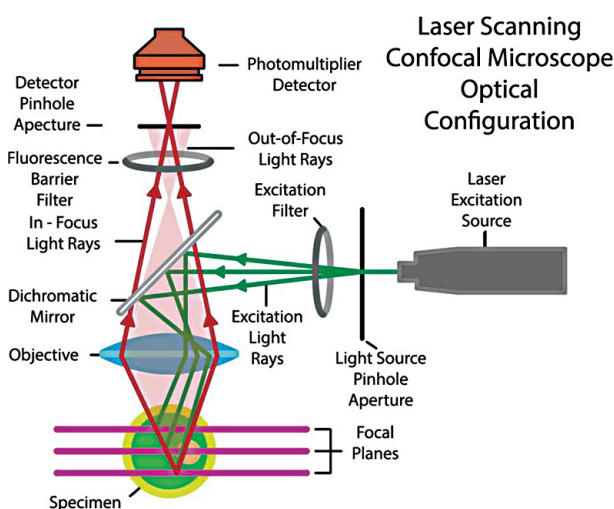
4. กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (confocal laser scanning microscope)

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์แบบแสงชนิดอื่นๆ ยังไม่สามารถป้องกันแสงนอกโฟกัส จึงได้มีการพัฒนากล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกนขึ้น (รูปที่ 10) โดยอาศัยหลักการทำงานของเลเซอร์เป็นการให้แสงที่เป็นแบบจุดและมีรูรับแสงที่มีขนาดเล็กมากสามารถกำจัดแสงนอกโฟกัส (รูปที่ 11) ส่งผลให้มีความคมชัดของภาพมากขึ้นกว่ากล้องจุลทรรศน์ใช้แสงอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเลือกกระนาบโฟกัสที่เฉพาะเจาะจงได้เนื่องจากมีลำแสงขนาดเล็ก ทำให้เวลาสแกนภาพจะสามารถตรวจสอบความลึกของพื้นผิวรวมถึงสร้างภาพ 3 มิติได้



ภาพที่ 10 แสดงภาพของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน⁽¹⁵⁾

Figure 10 Confocal laser scanning microscope



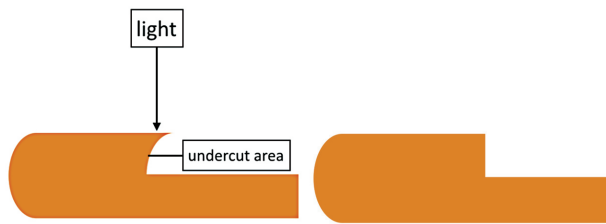
ภาพที่ 11 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน

Figure 11 Principle of confocal laser scanning microscope

ในการทดสอบที่ต้องการเลือกชั้นของพื้นผิวหรือภาพ 3 มิติ สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ได้เนื่องจากคุณสมบัติของแหล่งกำเนิดแสงที่มีขนาดเล็กและภาพที่ได้จะมีความคมชัดกว่ากล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิดอื่นๆ เนื่องจากไม่มีแสงนอกโฟกัส นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในเรื่องมีชีวิตได้เนื่องจากไม่ต้องมีการตัดชิ้นตัวอย่างให้มีความบาง⁽¹⁶⁾

ข้อจำกัดที่พบจากการใช้งานกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือการที่แสงเลเซอร์วิ่งเป็นทางตรงทำให้บางพื้นผิวที่อยู่ใต้ส่วนคอดไม่ได้รับแสงทำให้ภาพที่ได้มีความผิดพลาด (รูปที่ 12) รวมถึงการใช้งานที่ยากและราคาแพง ไม่สามารถลดข้อจำกัดที่เกิดจากปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่นและกำลังขยายไม่เกิน 1500 เท่า⁽¹⁶⁾

เนื่องจากความสามารถในการระบุความลึกและการเลือกกระนาบโฟกัสได้ ทำให้มีการใช้งานการตรวจวัดความหนาของสารยึดติดและการเกิดขึ้นไฮบริด (hybrid layer) โดยมีการศึกษาของ Bitter และคณะในปี 2014 ได้ทำการศึกษาความหนาชั้นไฮบริดที่เกิดขึ้นระหว่างเนื้อฟันกับสารยึดติด 2 ชนิดในการยึดติดด้วยฟันสำเร็จรูป 4 ชนิด⁽⁴⁾ รวมถึงสามารถใช้ในการตรวจการอุดฟันท่อนเนื้อฟันของยาสีฟัน (รูปที่ 13) เช่นในการศึกษาของ Lavender และคณะในปี 2010⁽¹⁷⁾



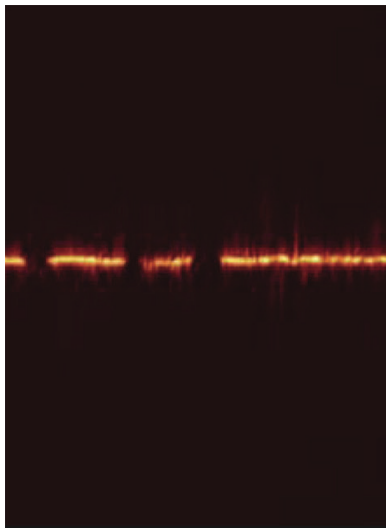
รูปที่ 12-1
Figure 12-1

รูปที่ 12-1 แสดงลักษณะของพื้นผิวที่มีความคอดทำให้ภาพที่ได้มีความผิดเพี้ยน

Figure 12-1 Undercut area can result in picture distortion

รูปที่ 12-2 แสดงลักษณะของพื้นผิวที่พบจากกล้องจุลทรรศน์ที่ไม่สามารถแสดงความคอดของวัตถุ

Figure 12-2 Microscope can not detect undercut area



รูปที่ 13 แสดงสารที่อุดในท่อเนื้อฟันจากกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน⁽¹⁷⁾

Figure 13 Dentinal tubule occlusion by calcium observed in confocal laser scanning microscope⁽¹⁷⁾

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

เนื่องจากข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงในเรื่องของกำลังขยายและความคมชัดของภาพ จึงมีการพัฒนาเครื่องมือให้มกำลังขยายที่มากขึ้นโดยใช้ลำอิเล็กตรอนที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าแสงที่มองเห็นเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานทำให้ภาพที่ได้มีความคมชัดและได้รายละเอียดมากกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบแสง รวมถึงมีการใช้เลนส์อิเล็กโตรแมกเนติก (electromagnetic) ในการขยายภาพทำให้ได้ภาพที่มีกำลังขยายสูงขึ้น

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (SEM; scanning electron microscope)

ลำอิเล็กตรอนจะถูกปล่อยออกมาผ่านแหล่งกำเนิดอนุภาคอิเล็กตรอน และเมื่อกระทบกับพื้นผิวของชิ้นตัวอย่างจะมีอิเล็กตรอนทั้งส่วนที่ผ่านทะลุออกไปและส่วนที่มีการสะท้อนกลับมา ซึ่งหลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (รูปที่ 14) นั้นจะใช้อิเล็กตรอนส่วนที่สะท้อนกลับมายังอุปกรณ์ตรวจจับ (detector) ที่อยู่ฝั่งเดียวกับเครื่องกำเนิดอิเล็กตรอนในการสร้างภาพ (รูปที่ 15) โดยสัญญาณที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างอิเล็กตรอนกับชิ้นตัวอย่างสามารถนำมาวิเคราะห์ให้ได้ข้อมูลแตกต่างแ่งมุม^(19,20) กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีความนิยมในงานวิจัยทางทันตกรรมมาก สามารถใช้ในการตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์หรือการรั่วซึมของแบคทีเรียในคลองรากฟันหรือการตรวจสอบพื้นผิวไทเทเนียมบนรากเทียม

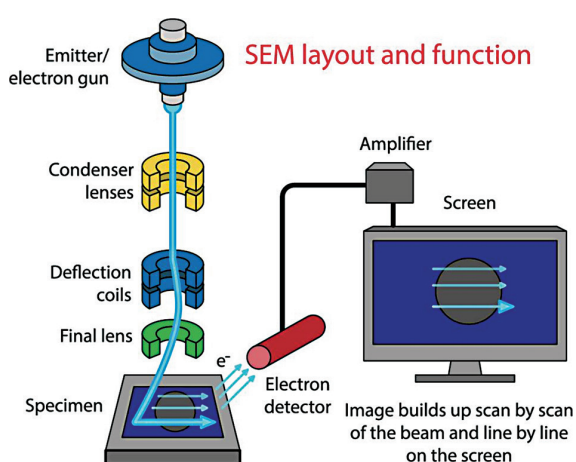


รูปที่ 14 แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์ชนิดอิเล็กตรอนส่องกราด⁽¹⁸⁾

Figure 14 Scanning electron microscope⁽¹⁸⁾

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดอาศัยลำอิเล็กตรอนในการสร้างภาพ จึงต้องมีการเตรียมชิ้นงานแบบพิเศษยุ่งยากและซับซ้อนกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จึงอธิบายเพิ่มเติมโดยสังเขปดังนี้

ในการนำชิ้นตัวอย่างมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดจะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นงานด้วยวิธีการพิเศษหลัก 3 ขั้นตอน คือการคงสภาพชิ้นตัวอย่าง (fixation) การกำจัดน้ำ (dehydration) การเคลือบพื้นผิวของชิ้นงาน (coating)



รูปที่ 15 แสดงหลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

Figure 15 Principle of scanning electron microscope

การคงสภาพชิ้นงาน (fixation)

วัตถุประสงค์ของการคงสภาพชิ้นตัวอย่างทำขึ้นเพื่อรักษารูปร่างและรายละเอียดของสิ่งที่ต้องการศึกษาให้เหมือนจริงที่สุด เนื่องจากเมื่อมีการดึงน้ำออกจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของชิ้นตัวอย่างจึงต้องทำการคงสภาพชิ้นงานให้เหมือนสภาพก่อนการสูญเสีย โดยใช้สารกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และออสเมียมเตทรอกไซด์ (osmium tetroxide) โดยสารที่นิยมมากที่สุดคือกลูตารัลดีไฮด์

อย่างไรก็ตามลำดับในการเตรียมชิ้นงานในขั้นตอนคงสภาพกับดึงน้ำนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของชิ้นตัวอย่างและข้อมูลที่ต้องการศึกษา เช่น หากต้องการศึกษาโครงสร้างของแมลงวันจะต้องทำการคงสภาพชิ้นตัวอย่างก่อนดึงน้ำเพื่อคงสภาพให้ สมบูรณ์ที่สุด แต่หากต้องการศึกษารอยต่อระหว่าง

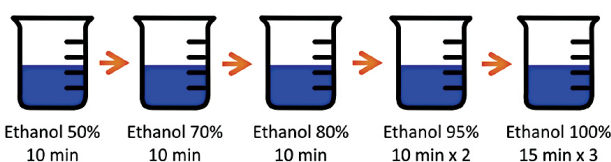
เรซินกับเนื้อฟันสามารถทำการดึงน้ำก่อนได้ เนื่องจากส่วนเนื้อฟันได้ถูกคงสภาพไว้ด้วยเรซินแล้ว การทำการดึงน้ำก่อนจึงไม่มีผลต่อโครงสร้างของเนื้อฟัน

การดึงน้ำออกจากชิ้นตัวอย่าง (dehydration)

หลังจากที่ทำการคงสภาพชิ้นตัวอย่างจะต้องนำชิ้นตัวอย่างมากำจัดโมเลกุลน้ำออก เนื่องจากโมเลกุลของน้ำจะรบกวนการสร้างภาพทำให้ได้ภาพที่ไม่ชัด ดังนั้นจึงต้องกำจัดน้ำที่ตกค้างในชิ้นงานที่ต้องการทดลอง โดยการดึงน้ำสามารถทำได้สองวิธีคือซีเรียลดีไฮเดรชัน (serial dehydration) กับคริติคอลพอยท์ไดรเออร์ (critical point dryer)

ซีเรียลดีไฮเดรชัน

เป็นวิธีการกำจัดน้ำด้วยสารเคมีเช่น แอลกอฮอล์ (alcohol) หรืออะซิโตน (acetone) โดยวิธีการทำคือนำตัวอย่างแช่ในสารเคมีเหล่านี้ โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งวิธีการนี้มักทำให้เกิดการหดตัวของชิ้นตัวอย่างเนื่องจากทำให้เกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) รวมถึงส่วนประกอบของชิ้นตัวอย่างบางชนิดที่สามารถละลายในแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 แสดงขั้นตอนการทำซีเรียลดีไฮเดรชัน

Figure 16 Serial dehydration

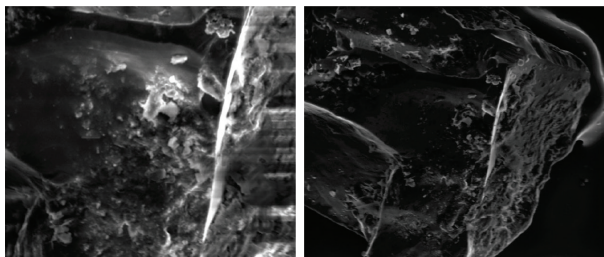
คริติคอลพอยท์ไดรเออร์

วิธีการกำจัดน้ำอีกวิธีคือการใช้เครื่องคริติคอลพอยท์ไดรเออร์ โดยเป็นระบบการกำจัดน้ำออกจากชิ้นตัวอย่างซึ่งจะทำการแทนที่น้ำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว (liquid carbon dioxide) ที่มีจุดวิกฤติของการเปลี่ยนวัฏภาค (critical point) ที่ 31 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเจอกับอุณหภูมิวิกฤติจะเปลี่ยนสถานะเป็นก๊าซ และระเหยออกจากชิ้นงานจนหมดทำให้ชิ้นตัวอย่างมีการหดตัวน้อยกว่า เกิดความเสียหายน้อยกว่าวิธีซีเรียลดีไฮเดรชันแต่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ

การเคลือบผิวของชิ้นตัวอย่าง (coating)

ขั้นตอนสุดท้ายคือการเคลือบผิวชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่องเคลือบสปัตเตอร์ (sputter coater module) เพื่อเพิ่มความสามารถในการสะท้อนอิเล็กตรอน โดยที่ความหนาของสารเคลือบผิวจะขึ้นอยู่กับลักษณะข้อมูลที่ต้องการศึกษา เช่น หากต้องการศึกษาโครงสร้างโดยรวมจะต้องทำการเคลือบสารให้หนากว่ากรณีที่ต้องการศึกษาลักษณะเฉพาะเจาะจงจะมีความละเอียดมากกว่า

สารที่นำมาเคลือบผิวนั้นจะขึ้นอยู่กับข้อมูลที่ต้องการศึกษา เช่น การวิเคราะห์ปริมาณธาตุมักจะใช้สารเคลือบผิวชนิดคาร์บอน แต่กรณีที่ต้องการศึกษาลักษณะทางกายภาพซึ่งต้องการภาพที่มีความคมชัดสูงมักจะใช้สารเคลือบชนิดโลหะ นอกจากนี้ความหนาของสารเคลือบผิวมีผลต่อภาพที่ออกมา เช่น การเคลือบทองที่บางเกินไปจะทำให้ได้ภาพที่มีรายละเอียดที่ไม่ชัดเจนทั้งภาพเนื่องจากทำให้ความเปรียบต่างของภาพสูงเกินไป (รูปที่ 17)^(21,22)



รูปที่ 17-1

Figure 17-1

รูปที่ 17-2

Figure 17-2

รูปที่ 17-1 แสดงตัวอย่างการเคลือบผิวที่บางเกินไป⁽²¹⁾

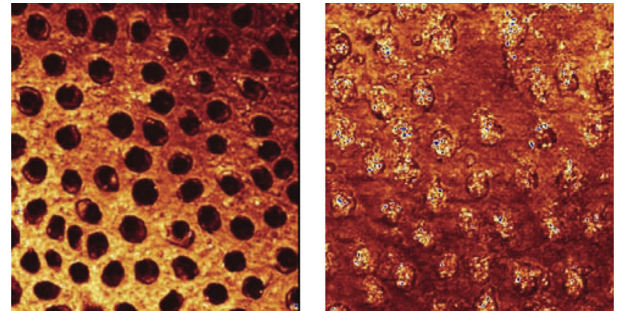
Figure 17-1 Picture is blurred because coating is too thin⁽²¹⁾

รูปที่ 17-2 แสดงตัวอย่างการเคลือบผิวได้พอดี⁽²¹⁾

Figure 17-2 Picture is clear because of proper coating⁽²¹⁾

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนให้ความละเอียดของชิ้นตัวอย่างได้มากเนื่องจากกำลังขยายที่สูงถึง 50-10000 เท่า⁽²³⁾ และการแยกความละเอียดของภาพที่ระดับ 50-100 นาโนเมตร โดยที่การควบคุมใช้งานง่ายสามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ได้เร็วหากสร้างเป็นไฟล์ดิจิทัล อย่างไรก็ตามเนื่องจากการตรวจดูบริเวณพื้นผิวของชิ้นตัวอย่างเท่านั้น

จึงทำให้การใช้งานจะจำกัดอยู่ที่บริเวณพื้นผิว เช่น การตรวจดูชั้นเสมียร์ (smear layer) หรือการดูรูเปิดของท่อเนื้อฟัน (รูปที่ 18)⁽¹⁷⁾



รูปที่ 18 แสดงสารที่อุดในท่อเนื้อฟันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดในการทดสอบความสามารถในการอุดท่อเนื้อฟันของยาสีฟัน⁽¹⁷⁾

Figure 18 Dentinal tubule occluded by dentrifice observed in SEM⁽¹⁷⁾

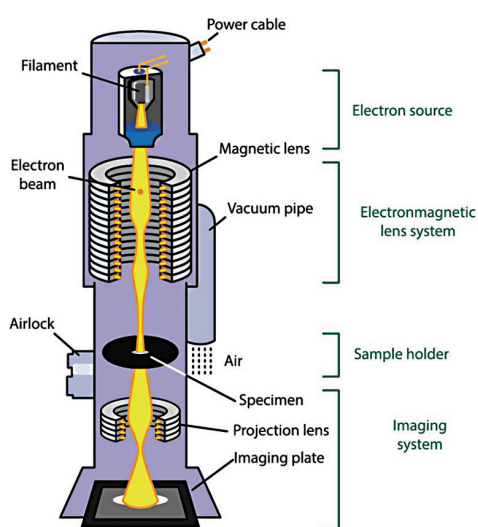
เครื่องมือวิเคราะห์ธาตุและสารประกอบ (energy dispersive spectroscopy on the SEM)

นอกจากการตรวจสอบพื้นผิวกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ยังสามารถวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณธาตุเชิงสัมพัทธ์ที่แสดงถึงองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นตัวอย่างได้ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจจับในการตรวจจับรังสีเอกซ์ (x-ray) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไปในธาตุต่างชนิดกัน แล้วนำมาวิเคราะห์เป็นสเปกตรัมของพลังงานของธาตุแต่ละชนิดให้เป็นข้อมูลที่แสดงถึงปริมาณสัดส่วนของธาตุพื้นฐานของชิ้นตัวอย่างนั้นๆ โดยข้อมูลจะถูกนำมาวิเคราะห์และแปลผลออกมาเป็นกราฟซึ่งแสดงปริมาณธาตุเชิงสัมพัทธ์ของธาตุพื้นฐานบนพื้นผิวที่ต้องการศึกษา^(24,25)

ในงานวิจัยทางทันตกรรมที่ต้องมีการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของชิ้นตัวอย่าง ทั้งการวิเคราะห์ปริมาณหรือปริมาณเชิงสัมพัทธ์ของธาตุ (รูปที่ 19) การใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ช่วยวิเคราะห์จะทำให้ได้ผลที่รวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดคือไม่สามารถตรวจจับธาตุที่มีเลขอะตอมต่ำกว่าธาตุโซเดียมได้ รวมถึงการซ้อนทับกันของสเปกตรัมของพลังงานที่ใกล้เคียงกันอาจทำให้ค่าที่ได้ไม่ถูกต้อง⁽²⁶⁾

2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM;- transmission electron microscope)

การตรวจสอบองค์ประกอบภายในของชิ้นตัวอย่างนั้น ไม่สามารถทำได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จึงมีการผลิตกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านขึ้น โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ใช้การเตรียมตัวอย่างแบบพิเศษ เพื่อให้ตัวอย่างบางและใช้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนส่องผ่าน (ภาพที่ 19) เมื่อลำอิเล็กตรอนส่องผ่านจะมีตัวรับอยู่ตรงข้ามกับแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนเพื่อให้เห็นองค์ประกอบภายใน ซึ่งรายละเอียดของภาพจะขึ้นกับความการสะท้อนและกระเจิง ลำอิเล็กตรอนของชิ้นตัวอย่าง โดยตำแหน่งที่อิเล็กตรอนไม่สามารถผ่านได้จะปรากฏเป็นสีดำ และบริเวณที่อิเล็กตรอนผ่านได้จะเป็นสีขาว เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งลักษณะของภาพนี้ช่วยแก้ไขข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่สามารถศึกษาได้เฉพาะบริเวณพื้นผิวของชิ้นตัวอย่างเท่านั้น โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสามารถให้กำลังขยายและรายละเอียดได้คล้ายกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่แตกต่างกันเพียงลำอิเล็กตรอนสามารถทะลุผ่านชิ้นตัวอย่างได้ ให้รายละเอียดสูงที่สุดที่ประมาณ 0.1 นาโนเมตร⁽²⁷⁾

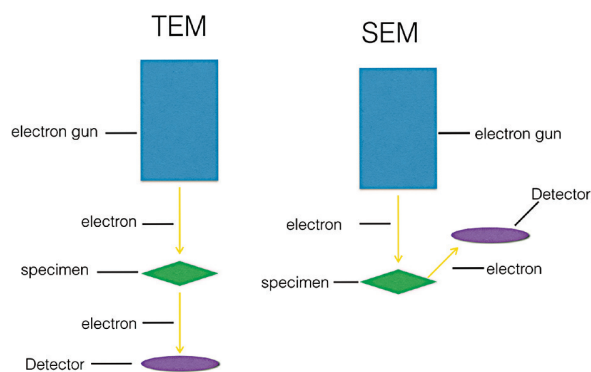


รูปที่ 19 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

Figure 19 Transmission electron microscope

ความแตกต่างของ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกับส่องผ่าน

หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะตรวจจับอิเล็กตรอนที่กระเจิงหรือสะท้อนมาจากผิวของชิ้นตัวอย่าง ตัวรับที่ตรวจจับอิเล็กตรอนจึงอยู่ด้านเดียวกับแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน ซึ่งการสะท้อนนี้ทำให้ได้ภาพของพื้นผิวตรงข้ามกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่จะตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ผ่านชิ้นตัวอย่างออกมาทำให้แสดงลักษณะและองค์ประกอบภายในของชิ้นตัวอย่าง อย่างไรก็ตามกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งสองแบบสามารถให้กำลังขยายและรายละเอียดได้สูงกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบแสง (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 แสดงหลักการทำงานที่แตกต่างกันของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกับแบบส่องกราด

Figure 20 Difference between SEM and TEM

การเตรียมชิ้นตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การเตรียมชิ้นตัวอย่างจะต้องมีการตัดเตรียมชิ้นตัวอย่าง (sections of embedded material) ซึ่งจะมีการเตรียมตัวอย่างโดยการคงสภาพและดึงน้ำออกจากตัวอย่างเหมือนกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่ต่างกันที่จะมีการนำชิ้นตัวอย่างไปใส่ในแบบพิมพ์ที่มีอีพ็อกซีเรซินซึ่งจะแข็งตัวหลังจากทิ้งไว้ จากนั้นแท่งอีพ็อกซีที่มีชิ้นตัวอย่างฝังอยู่จะถูกนำมาตัดแต่งให้ได้รูปร่างเหมือนกับชิ้นตัวอย่าง เมื่อทำการตัดแต่งเสร็จจะต้องทำให้ชิ้นตัวอย่างมีความบางขึ้นละ 50-100 นาโนเมตรเพื่อให้ลำอิเล็กตรอนผ่านได้ เครื่องตัดจะมีใบมีดที่ใช้ตัด 2 แบบ

ได้แก่ โบมิตเพอร์ ที่มักใช้ตัดตัวอย่างที่ไม่แข็งมาก เช่น เนื้อฟัน และโบมิตเลเซอร์ที่สามารถใช้ตัดตัวอย่างได้ทุกชนิดแต่ราคาตัดต่อชิ้นสูงมาก จากนั้นชิ้นตัวอย่างจะถูกย้อมด้วยโลหะหนัก เช่น ยูเรเนียม ตะกั่ว ที่สามารถกระเจิงอิเล็กตรอนได้ดีและช่วยปรับความเปรียบต่างของภาพที่ออกมาเพื่อนำไปศึกษาต่อ⁽²⁸⁾

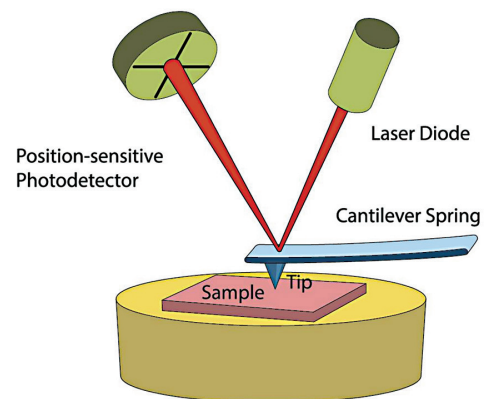
จุดเด่นของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือภาพที่มีรายละเอียดและกำลังขยายสูงถึง 620,000 เท่า สามารถแยกสองตำแหน่งที่ห่างจากกันได้มากกว่า 1 นาโนเมตร และสามารถให้รายละเอียดภายในรวมถึงโครงสร้างผลึกของชิ้นตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลถึงความสมมาตรและการเรียงตัวของวัสดุได้ ดังนั้นจึงมีการใช้ในการตรวจสอบลักษณะความล้มเหลวของสารยึดติดอย่างละเอียดได้ ดังเช่นในงานวิจัยของ Hashimoto และคณะในปี 2003⁽²⁹⁾ รวมถึงการดูเซลล์หรือเส้นใยคอลลาเจนในการศึกษาของ Basins และคณะในปี 2016⁽³⁰⁾

อย่างไรก็ตามการประมวลผลภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะเป็นลักษณะภาพ 2 มิติซึ่งไม่มีข้อมูลในความลึก รวมถึงลำอิเล็กตรอนอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อชิ้นตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้ เนื่องจากความร้อนและกระบวนการไอออไนเซชันเรดิโอไลซิส (ionization radiolysis) โดยเฉพาะตัวอย่างจำพวกพอลิเมอร์และเซรามิกส์ ข้อด้อยอีกประการคือการเตรียมชิ้นตัวอย่างมีกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องมีความบางน้อยกว่า 100 นาโนเมตร และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านต้องทำงานในภาวะสุญญากาศทำให้ไม่สามารถศึกษาชิ้นตัวอย่างที่มีชีวิตได้⁽²⁸⁾

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscope)

ในปัจจุบันความสามารถในการขยายภาพของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ 620,000 เท่า⁽²⁷⁾ พบว่าความละเอียดไม่เพียงพอในการศึกษารายละเอียดของพื้นผิวระดับนาโนเมตรได้ จึงทำให้มีการพัฒนากล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมซึ่งมีกำลังขยายสูงชันและสามารถบอกความตื้นลึกของพื้นผิวได้ โดยอาศัยหลักการของการทำให้เกิดภาพของผิววัสดุโดยการวัดแรงกระทำระหว่างผิววัสดุกับตัวตรวจวัดที่ทำจากเข็มขนาดเล็กใช้เคลื่อนไปตามบริเวณต่างๆ ของพื้นผิววัสดุ โดย

ตัวตรวจวัดจะถูกควบคุมโดยเครื่องสแกนเพียโซอิเล็กทริก (piezoelectric scanner) ซึ่งสภาพผิวที่แตกต่างกันไปจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับระดับเข็มตรวจแตกต่างกัน ตัวคานที่มีเข็มเกาะติดจะมีการโค้งงอเกิดขึ้น ซึ่งถูกตรวจวัดโดยตัวรับภาพ (photo detector) ทำให้ได้ภาพออกมาสอดคล้องกับสภาพพื้นผิวในแต่ละบริเวณที่เข็มวิ่งผ่าน การโค้งงอของคานที่มีเข็มเกาะอยู่นั้นเกิดขึ้นเมื่อมีแรงกระทำระหว่างอะตอม ซึ่งจะเป็นแรงดึงดูดหรือแรงผลักระหว่างอะตอมระหว่างเข็มปลายแหลม ดังนั้นภาพที่สร้างออกมาจะเป็นภาพเสมือนที่สร้างจากการขยับขึ้นลงของคาน (รูปที่ 21)⁽³¹⁾



รูปที่ 21 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

Figure 21 Principle of atomic force microscope

โดยทั่วไปปลายของเข็มจะถูกสร้างจากซิลิกอน (silicon) แต่สามารถใช้แก้วโบโรซิลิเกตและซิลิกอนไนเตรดทดแทน โดยบริเวณปลายของเข็มจะถูกเคลือบไว้ด้วยสารเพื่อใช้ในวัตถุประสงค์ที่ต่างกันเช่น ทอง ใช้เพื่อตรวจสอบพันธะโควาเลนต์ของโมเลกุลชีวและตรวจสอบปฏิสัมพันธ์กับพื้นผิวเพชร ใช้เพิ่มการคงทนต่อความสึก และแม่เหล็ก ใช้เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นแม่เหล็กของพื้นผิว

ในการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมจะสามารถศึกษาได้อย่างน้อย 3 รูปแบบที่สำคัญคือ

- มีการสัมผัส (contact mode)
- ไม่มีการสัมผัส (non contact mode)
- การตรวจแบบแตะ (tapping mode)⁽³²⁾

การทดสอบกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบมีการสัมผัส

เป็นการวัดรูปทรงของสภาพผิวชิ้นงาน (topography) โดยการขยับให้เข็มไกล (slide) ไปบนผิวงานซึ่งจะทำให้เกิดแรงผลักขึ้นเนื่องจากเข็มกับผิวงานจะอยู่ใกล้กันประมาณ 1-2 อังสตรอม (angstrom) แรงผลักดังกล่าวนี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามรูปทรงของผิวงานทำให้มีการโค้งงอของคาน และขนาดของการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องเป็นไปตามลักษณะรูปทรงของผิวงาน

ข้อเสียของการทดสอบแบบมีการสัมผัสคือการลากเข็มตรวจวัดเคลื่อนที่ไกลข้ามไปยังบริเวณต่างๆ บนผิวงานจะทำให้เกิดตำหนิและความเสียหายแก่ผิวงาน⁽³³⁾

การทดสอบกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบไม่มีการสัมผัส

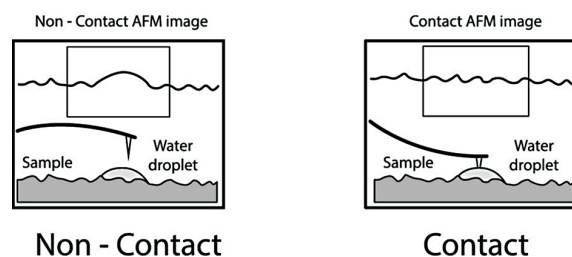
เนื่องจากข้อเสียของการสัมผัสพื้นผิวจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคแบบไม่สัมผัสขึ้น โดยปลายเข็มจะถูกยกขึ้นมาให้มีระยะห่างเหนือผิวงานสูงมากขึ้นคือประมาณ 10-100 อังสตรอม จึงไม่มีปัญหาเรื่องการทำลายผิวของชิ้นตัวอย่าง โดยในกรณีนี้แรงกระทำระหว่างตัวคานกับพื้นผิวจะเป็นลักษณะแรงดึงดูดซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามรูปทรงของสภาพผิวชิ้นตัวอย่าง เช่นเดียวกันแรงดึงดูดประเภทแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals) ที่เกิดขึ้นระหว่างปลายเข็มกับพื้นผิว ในกรณีนี้จะเป็นแรงที่อ่อนกว่าเมื่อเทียบกับแรงผลักที่เกิดขึ้นในกรณีที่มีการสัมผัสปกติอยู่ที่ประมาณ 10-12 นิวตัน ดังนั้นสัญญาณการเปลี่ยนแปลงจึงอาจจะไว (sensitive) ต่อสิ่งแปลกปลอมที่อยู่บนผิวงาน เช่น หยดน้ำที่เกาะอยู่บนผิว ทำให้ได้ภาพที่ผิดไป (รูปที่ 22)⁽³²⁾

การทดสอบกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบแตะ

เป็นเทคนิคที่รวมเอาลักษณะของการวัดทั้งในแบบที่มีและไม่มีการสัมผัสเข้าด้วยกัน กล่าวคือยังคงให้มีการสัมผัสกันระหว่างเข็มกับผิวงานในระยะที่ใกล้กันมากเหมือนกับกรณีที่มีการสัมผัสเพื่อให้เกิดภาพที่ชัดเจน ในขณะที่เดียวกันก็ยังมี การสั่นหรือขยับเข็มปลายแหลมให้เคลื่อนที่ขึ้นลงไปพร้อมกับ การเคลื่อนที่สแกนไปยังบริเวณผิวงาน ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวหลังการทดสอบ⁽³³⁾

เนื่องจากการเคลื่อนที่ของปลายเข็มไปตามพื้นผิววัสดุ ทำให้สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ตรวจสอบความหยาบ

Non - Contact VS. Contact Through Water



รูปที่ 22 อธิบายการเคลื่อนผ่านหยดน้ำของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบไม่มีการสัมผัสเปรียบเทียบกับแบบมีการสัมผัส

Figure 22 Illustrates difference between contact mode and non-contact mode passing through water droplet

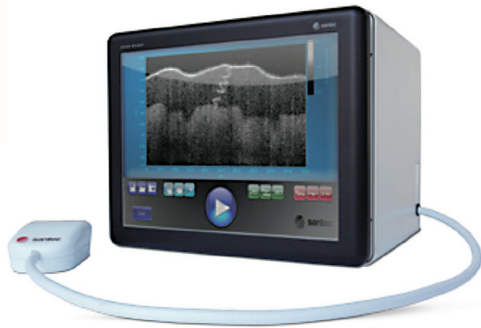
ของพื้นผิววัสดุได้ในระดับที่ละเอียดกว่ากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมถึงสามารถตรวจสอบบริเวณที่เปิดของเนื้อฟันในระดับละเอียด สามารถแยกแยะผิวของเนื้อฟันที่เป็นแร่ธาตุกับอินทรีย์สารได้ทั้งในสภาพของเหลวและอุณหภูมิที่ต่างกันได้ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ภาพของผิวงานที่ใกล้เคียงกับสภาพการใช้งานจริงตามธรรมชาติได้ ดังเช่นในงานวิจัยของ Sharma และคณะ ในปี 2010 ซึ่งเป็นการศึกษาองค์ประกอบของฟันในระดับนาโนเมตร และงานวิจัยของ Zuryati และคณะในปี 2013 ซึ่งศึกษาความซรุขระของ พื้นผิววัสดุเรซินคอมโพสิตหลังผ่านการฟอกสีฟัน (bleaching) ในระดับนาโนเมตรเช่นกัน^(34,35)

ถึงแม้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะสามารถตรวจชิ้นตัวอย่างขนาดเล็กได้แต่สามารถตรวจสอบความต่างระดับพื้นผิวได้ไม่เกิน 10-20 ไมโครเมตร และพื้นที่ผิว ไม่เกิน 150x150 ไมโครเมตร รวมถึงการตรวจสอบทำได้ช้า⁽³²⁾

ออฟติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี (optical coherence tomography)

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดต่างๆ จะพบว่าส่วนใหญ่ต้องเตรียมชิ้นตัวอย่างก่อน ทำให้สภาพของชิ้นตัวอย่างเปลี่ยนแปลงหรือผิดรูปไปจากสภาวะปกติ ทำให้มีการพัฒนากล้องจุลทรรศน์ชนิดออฟติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี โดยอาศัยการถ่ายภาพตัดขวางด้วยแสงอินฟราเรดช่วงสั้น (near infrared) ซึ่ง

นอกจากความสามารถในการถ่ายภาพตัดขวางโดยไม่ต้องทำลาย วัตถุตัวอย่าง (non-destructive) แล้วยังไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใดๆ ต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (non-invasive) ลักษณะคล้ายการทำอัลตราซาวด์ (ultrasound) แต่ใช้คลื่นแสงแทนคลื่นเสียง กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้สามารถให้ความละเอียดในการถ่ายภาพสูงในระดับไมโครเมตรและแสดงภาพออกมาแบบปัจจุบัน อีกทั้งยังสามารถเรียกได้ว่าเป็นออปติคัลไบออปซี (optical biopsy) คือการตรวจดูชิ้นเนื้อเยื่อโดยไม่ต้องตัดหรือผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นตัวอย่างเหมือนวิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)^(37,38) ในปัจจุบันออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี (รูปที่ 23) ได้ถูกพัฒนาและได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางทันตกรรม โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายภาพรังสีและออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี พบว่าออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟีจะให้ภาพที่มีความละเอียดมากกว่ามีการแสดงผลออกมาเป็นภาพแบบปัจจุบันซึ่งมีการพัฒนาออกมาเป็นภาพสามมิติด้วย⁽³⁹⁾

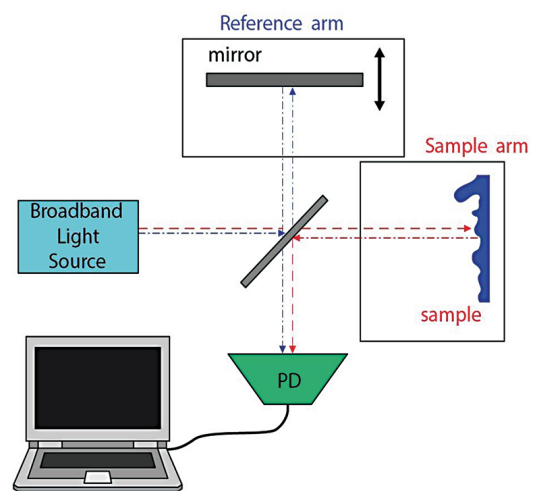


รูปที่ 23 แสดงภาพของเครื่องออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี⁽³⁶⁾

Figure 23 Optical coherence tomography

หลักการทำงานพื้นฐานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้เริ่มจาก แสงบรอดแบนด์เลเซอร์ (broadband laser) จะถูกลำเลียงเข้าสู่ระบบการแทรกสอดของแสง (interferometer) แล้วแสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นแสงอ้างอิง (reference beam) ซึ่งจะถูกสะท้อนกลับด้วยกระจก (reference mirror) และลำเลียงต่อไปยังอุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มแสง (photodetector) แสงส่วนที่สองจะถูกโฟกัสด้วยเลนส์ไปยังตัวอย่างที่ต้องการถ่ายภาพ

ซึ่งเลนส์ตัวเดียวกันนี้จะทำหน้าที่ในการรับสัญญาณที่สะท้อนกลับมาจากตัวอย่าง (backscattering light) ซึ่งเกิดจากความไม่สม่ำเสมอของค่าดัชนีหักเหของแสงที่ตำแหน่งต่างๆ ในชิ้นตัวอย่าง (refractive index variation) แสงสะท้อนจากตัวอย่างจะถูกแทรกสอดกับแสงอ้างอิง โดยการเลื่อนตำแหน่งของกระจกในแขนอ้างอิง (reference arm) เป็นระยะทางที่ต้องการวัดภาพตัดขวางของตัวอย่าง จะสร้างจากแอมพลิจูดที่แตกต่างกันของการสะท้อนที่ความลึกต่างๆ จากผิวของตัวอย่าง (รูปที่ 24)^(39,40,41)



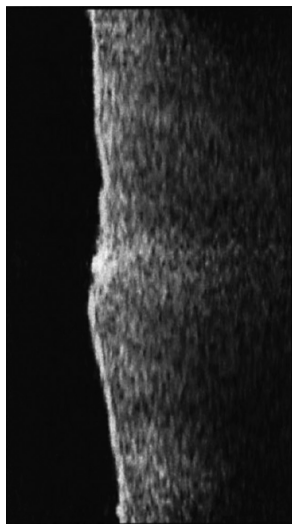
รูปที่ 24 แสดงหลักการทำงานของออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี⁽³⁹⁾

Figure 24 Principle of optical coherence tomography

ภาพที่ออกมาจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะเป็นภาพปัจจุบันทำให้ช่วยในแง่การรักษา เช่น สามารถใช้ในการตรวจรอยร้าวของฟัน โดยสามารถตรวจได้ถึงความลึกของรอยร้าว รอยร้าวของวัสดุอุด ตำแหน่งที่มีการทะลุโพรงประสาทฟัน การเกิด การสูญเสียแร่ธาตุ (demineralize) (รูปที่ 25) หินน้ำลายใต้เหงือก และมะเร็งในช่องปาก โดยจะพบตัวอย่างการใช้งานจากในงานวิจัยของ Baumgartner และคณะในปี 2000⁽⁴¹⁾

ข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ คือการสแกนจะให้เป็นแนวเส้นทำให้การจะเห็นรอยโรคทั้งหมดต้องใช้หลายร้อยหรือหลายพันภาพมารวมกันจึงจะเห็นครบ รวมถึงความลึกของการสแกนต่ำในระยะ 3-4 มม. ถ้าทำการตรวจชิ้นงาน

ที่เป็นฟันเนื่องจากความสามารถในการผ่านของแสงในวัตถุต่าง ๆ ทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับการใช้งานทางคลินิก⁽⁴¹⁾



รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างชั้นเคลือบฟัน (ด้านขวาของภาพ) จากการตรวจขึ้นตัวอย่างด้วยออปติคัลไฮเรสซ์โทโมกราฟี⁽³⁹⁾

Figure 25 Enamel observed in optical coherence tomography

สรุป

ในการเลือกใช้อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ผู้ใช้ควรมีความเข้าใจในหลักการทำงาน วิธีการใช้งาน ข้อดีข้อเสียต่างๆ และข้อจำกัดร่วมกับการพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ตอบสนองต่อคำถามงานวิจัย โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงได้แก่ข้อมูลที่ต้องการจากการทดลอง ลักษณะและชนิดของชิ้นงานที่ทดลอง ความละเอียดของภาพกำลังขยาย ความสามารถในการเตรียมชิ้นงาน ซึ่งเป็นอีกขั้นตอนที่มีความสำคัญเพราะผลการทดลองที่ดีนั้นควรผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์ผลที่ถูกต้องเหมาะสมและมาจากชิ้นงานตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมอย่างถูกต้องและวัดผลด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมเที่ยงตรง

เอกสารอ้างอิง

1. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillips' science of dental materials*. 12th ed. St. Louis: elsevier saunders; 2013: 48-68.
2. Sakaguchi RL, Powers JM. *Craig's restorative dental materials* 13th ed. St.louis: Elsevier Mosby; 2012: 17-45.
3. Scotti N, Comba A, Gambino A et al. Microleakage at enamel and dentin margins with a bulk fills flowable resin *Eur J Dent* 2014; 8: 1-8.
4. Bitter K, Glaser C, Neumann K, Blunck U, Frankenberger R. Analysis of Resin-Dentin Interface Morphology and Bond Strength Evaluation of Core Materials for One Stage Post-Endodontic Restorations. *PLOS ONE*[serial on the internet].2014 Feb [cited 2015 Feb 2:[about 9 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0086294.PDF>
5. Shaw PJ. Chapter 1 Introduction to optical microscope for plant cell biology. *Plant Cell Biology A Practical Approach*. Oxford: Oxford university press; 2001: 1-33.
6. www.barska.com [URL of homepage on the internet]. Pomona. Available from: http://www.barska.com/Microscopes-Monocular_Compound_Microscope_40x_100x_400x_w.html
7. The Center For Special Dentistry[internet]. Newyork. available from: <http://www.nycdentist.com/dental-photos/1523/Photos-Photomicrographs-dental-histology-pictures-SEM-microscope>
8. Kreindler RJ. The Stereo Microscope Part 1: Introduction and Background 3rd Edition Micscape Magazine [monograph on theinternet]. Available from <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjun12/jk-stereo1.pdf>

9. Zhang YY, Peng MD, Wang YN, Li Q. The effects of ferrule configuration on the anti-fracture ability of fiber post-restored teeth. *J Dent*. 2015; 43: 117-125.
10. www.meijitechno.com[URL of homepage on the internet].Saitama. available from http://meijitechno.com/meiji_old/ml9700.htm
11. Patzel JW *Polarized light microscopy Principles, Instruments, applications* 3rd edition; 1985: 19-43
12. Sundfeld RH, Neto DS, Machado LS et al. Microabrasion in tooth enamel discoloration defects: three cases with long-term follow-ups *J Appl Oral Sci* 2014; 22: 347-354.
13. Medeiros RCG, Soares JD, Sousa FB. Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence *J Microsc* 2012; 246: 177-189
14. Jensen ME. An Update on Demineralization/Remineralization. Crest® Oral-B® at dentalcare.com Continuing Education Course. [Monograph on the Internet]; 2010. [cited 2010 Jun 24]. Available from: http://www.dentalcare.co.uk/media/en_GB/education/ce73/ce73.pdf
15. www.nikoninstruments.com.[Internet] Melville. Available from: <https://www.nikoninstruments.com/Products/Confocal-Microscopes>
16. Inoué S, chapter 1 Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light. *Microscopy Handbook of Biological Confocal*. New York. Springer Science and Business Media ;2006: 1-19.
17. Lavender SA, Petrou I, Heu R et al. Mode of action studies on a new desensitizing dentifrice containing 8.0% arginine, a high cleaning calcium carbonate system and 1450 ppm fluoride. *Am J dent* 2010; 23: 14A-19A
18. www.jeol.co.jp [URL of homepage on the Internet] Tokyo. Available from: <http://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html>
19. MCMULLAN D. Scanning Electron Microscopy 1928-1965. *Scanning* 1995; 17: 175-185
20. Smith KC and Oatley CW. The scanning electron microscope and its fields of application *Br. J. Appl. Phys.* 1955; 6, 391-400
21. Paradella TC. Scanning Electron Microscopy in modern dentistry research. *Braz Dent Sci* 2012; 15(2): 43-48
22. Moran P, Coats B. Biological Sample Preparation for SEM Imaging of Porcine retina *Microscopy today* 2012; 20: 10-12
23. Dale JG, Newbury D, Joy C et al. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis* 3rd Edition. New York: Springer; 2003: 591-619
24. Fan W, Wu D, Tay FR, Ma T, Wu Y, Fan B effects of adsorbed and templated nanosilver in mesoporous calcium-silicate nanoparticles on inhibition of bacteria colonization of dentin. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 5217-5230
25. Sadiasa A, Franco RA, Seo HS, Lee BT. Hydroxyapatite delivery to dentine tubules using carboxymethyl cellulose dental hydrogel for treatment of dentine hypersensitivity *J. Biomedical Science and Engineering* [serial on the internet]. 2013; 6: 987-995 Available from: <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2013.610123>
26. Arnold WH, Benz LB, Naumova EA. Resin infiltration into differentially extended experimental carious lesions. *Open Dent J*, 2014; 8: 251-256
27. Williams DB et al. Chapter 1 The Transmission electron microscope. Williams DB. *Transmission electron microscopy a text book for materials science*. second edition. New York. Springer; 2009: 3-16

28. Williams DB et al. Chapter 10 specimen preparation. Williams DB,ed. *Transmission electron microscopy a text book for materials science. second edition.* New York. Singer; 2009: 173-193
29. Hashimoto M, Ohnob H,Kagaa HS, Oguchia H. In vitro degradation of resin–dentin bonds analyzed by microtensile bondtest,scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003; 24: 3795–3803
30. Basinis A, Noort RV, Martin N. The use of acetone to enhance the infiltration of HA nanoparticles into a demineralized dentin collagen matrix. *Dentmater* 2016; 32: 385-393
31. Binnig G, F.C. Quate,C. Gerber. Atomic-Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986; 56: 930-933.
32. Cappella B, Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.* 1999; 34: 1-3, 5-104
33. Zhong, Q; Inniss, D; Kjoller, K; Elings, V . “Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic-force microscopy”. *Surface Science Letters* 1993;290: 688-692
34. Sharma S, Cross SE, Hsue C, Wali RP, Stieg AZ, Gimzewski JK. Nanocharacterization in dentistry *Int J Mol Sci* 2010; 11(6): 2523-2545.
35. Zuryati AG, Qian O, Dasmawati M. Effects of home bleaching on surface hardness and surface roughness of an experimental nano composite. *J Conserv Dent.* 2013; 16(4): 356-361
36. [santec.com](http://www.santec.com/jp/wp-content/uploads/IVS-300-C-E-v1.41503.pdf) [URL on the Internet] Aichi. Available from: <http://www.santec.com/jp/wp-content/uploads/IVS-300-C-E-v1.41503.pdf>
37. Huang D, Swanson EA, Lin CP et al. Optical Coherence Tomography *Science* 1991; 254(5035): 1178-1181
38. Haidekker MA. Trends in medical imaging technology. *Medical Imaging Technology.* New York: Springer, 2013. p111-119
39. Hsieh YS, Ho YC, Lee SY et al.Review Dental Optical Coherence Tomography. *Sensors* 2013; 13: 8928-8949
40. Colston BW, Sathyam US Jr, DaSilva LB, Everett MJ,Stroeve P, Otis LL. Dental OCT. *Opt. Express* 1998; 3: 230-238.
41. Baumgartner A, Dichtl S, Hitzenberger CK, Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Res.* 2000; 34: 59-69.