

# เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุ สำหรับงานวิจัยทางทันตกรรม Equipments in Morphological Analysis for Dental Research

ธารินทร์ เพียงสุข<sup>1</sup>, กษาปณ์ พิเชฐโชติ<sup>2</sup>, ชุตikul เขื่อนแก้ว<sup>2</sup>, ณัฏฐิณี กิตติวินิชนันท์<sup>2</sup>, ปานไพลิน แสงอุทัย<sup>2</sup>, ทวีศักดิ์ ประสานสุทธิพร<sup>1</sup>, สุมนา จิตติเดชารักษ์<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
<sup>2</sup>นักศึกษาลงปริญญาของวิชาทันตกรรมบูรณะ สาขาทันตแพทยศาสตร์บัณฑิต  
Tarin Piangsuk<sup>1</sup>, Kasarb Pichetshote<sup>2</sup>, Chutikul Khuankaew<sup>2</sup>, Neeranuch Kittiwinchnan<sup>2</sup>, Panpailin Sanguthai<sup>2</sup>,  
Taweesak Prasansuttiporn<sup>1</sup>, Sumana Jittidecharaks<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University  
<sup>2</sup>Postgraduate 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

ในการทดสอบวัสดุทางทันตกรรมบูรณะเพื่อให้ได้ ข้อมูลคุณสมบัติของวัสดุ ต้องอาศัยเครื่องมือที่ให้ความ แม่นยำและมีความเหมาะสมตรงกับวัตถุประสงค์ของ การทดสอบ ในปัจจุบันพบว่าเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะรูปร่าง ความเรียบ รวมถึงข้อมูล ของสารประกอบบริเวณพื้นผิวของทันตวัสดุมีการพัฒนา ไปมาก ทำให้สามารถทดสอบลักษณะต่างๆ ของวัสดุได้ หลากหลายกว่าในอดีต ผู้ทำการทดลองควรมีความเข้าใจใน คุณสมบัติ วิธีการใช้งาน ทราบถึงข้อดี ข้อเสียของเครื่องมือ ที่ใช้ทดสอบและข้อจำกัดของเครื่องมือ จึงจะสามารถเลือก

## Abstract

In dental material research, precise and reliable investigating 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 capabilities, 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](mailto: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 เป็นเหตุให้การวิจัยทดสอบวัสดุมีความซับซ้อนมากขึ้น ดังนั้นการทดลองและทดสอบวัสดุจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเลือกใช้เครื่องมือในการทดลองที่มีความแม่นยำ มีความสามารถและประสิทธิภาพตอบสนองกับวัสดุที่ถูกคิดค้นใหม่และคำถามงานวิจัยได้

การทดสอบคุณสมบัติของทันตวัสดุแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพคือคุณสมบัติของสารที่สังเกตได้จากภายนอก ลักษณะทางกายภาพสามารถถูกทดสอบได้โดยใช้การทดสอบแรงเฉือน การทดสอบแรงดึง การทดสอบความแข็งผิวรวมถึงการศึกษาพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุเป็นต้น สมบัติทางเคมีจะมีความเกี่ยวข้องกับการมีปฏิสัมพันธ์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางอิเล็กทรอนิกส์ของวัสดุ เช่น คุณสมบัติในการนำไฟฟ้า คุณสมบัติการเป็นแม่เหล็ก<sup>(1,2)</sup>

การตรวจสอบพื้นผิวและรูปร่างของวัสดุทางทันตกรรมเป็นการทดสอบหนึ่งที่สามารถบอกคุณสมบัติของวัสดุเหล่านั้นได้ เช่น การตรวจสอบความขรุขระของพื้นผิว ความหนาของชั้นสารยึดติด และลักษณะของเรซินแทก (resin tag)<sup>(3,4)</sup> การทบทวนวรรณกรรมฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอข้อมูลของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ในส่วนของลักษณะพื้นผิวหรือรูปร่างของวัสดุและอุปกรณ์ทางทันตกรรมบูรณะในแง่ของหลักการทำงาน 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 ควรมีการเลือกให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ขั้นต้นในการทดสอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่พอเพียง และต้องมีการวิเคราะห์ถึงข้อดีข้อเสียและความเหมาะสมของอุปกรณ์ต่างๆ ร่วมด้วย

## กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ใช้หลักการการทำงานของแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามนุษย์มองเห็นได้และเลนส์ในการขยายภาพซึ่งกล้องจุลทรรศน์แต่ละชนิดมีลักษณะของแหล่งกำเนิดแสงและเลนส์ที่ต่างกัน<sup>(5)</sup>

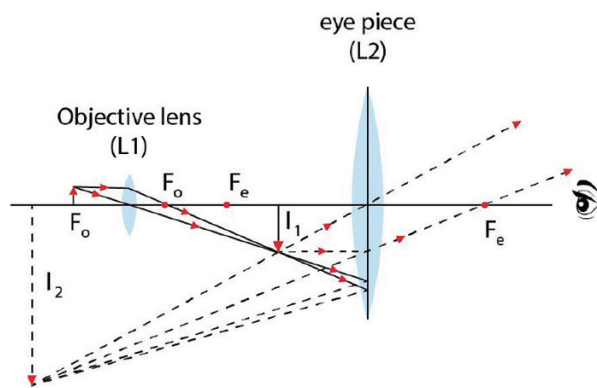
**1. กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (compound microscope)**

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



**รูปที่ 1** แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน  
**Figure 1** Compound microscope

(Modified from [www.barska.com](http://www.barska.com)[URL of homepage on the internet]. Pomona: Barska. Available from: HYPERLINK "http://www.barska.com/Microscopes-Monocular\_Compound\_Microscope\_40x\_100x\_400x\_w.html" "http://www.barska.com/Microscopes-Monocular\_Compound\_Microscope\_40x\_100x\_400x\_w.html"<sup>(6)</sup>)



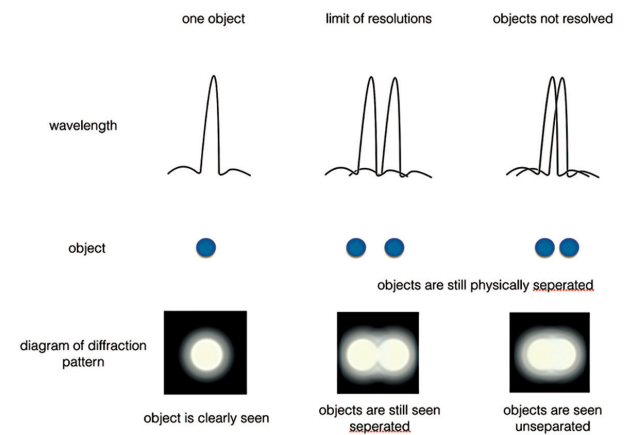
**รูปที่ 2** แสดงหลักการการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดเชิงซ้อน  
**Figure 2** Principle of compound microscope

(Modified from Shaw P.J. Chapter 1 Introduction to optical microscope for plant cell biology. Plant Cell Biology A Practical Approach. Oxford: Oxford university press; 2001: 1-33<sup>(3)</sup>)

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)

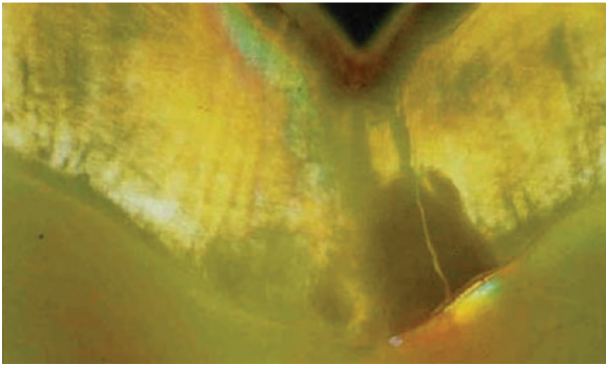


**รูปที่ 3** แสดงการเกิดปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่น

**Figure 3** Diffraction effect

(Modified from [cnx.org](http://cnx.org)[URL of homepage on the internet]. Houston.: Rice University; 1999-2017 Available from: HYPERLINK "http://cnx.org/contents/9ANhisjh@5/Limits-of-Resolution-The-Rayle" "http://cnx.org/contents/9ANhisjh@5/Limits-of-Resolution-The-Rayle"<sup>(7)</sup>)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีกำลังขยายที่จำกัด จึงสามารถใช้ในการตรวจเซลล์ในลักษณะของภาพวงกว้าง โดยไม่สามารถดูองค์ประกอบภายในเซลล์เพิ่มเติมได้ และสามารถใช้ในการตรวจสอบพื้นผิวที่ถูกทดสอบในลักษณะกด (indentation test) หรือการตรวจสอบความแข็งผิวของวัสดุ (hardness test) อย่างหายบ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจสอบการรั่วซึมของรอย



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างภาพที่พบจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเชิงซ้อน เพื่อใช้ดูรอยร้าวของฟัน

**Figure 4** Crack line observed in compound microscope (From The Center For Special Dentistry[internet].Newyork. Available from: HYPERLINK "http://www.nycdentist.com/dental-photos/1523/Photos-Photomicrographs-dental-histology-pictures-SEM-microscope" "http://www.nycdentist.com/dental-photos/1523/Photos-Photomicrographs-dental-histology-pictures-SEM-microscope with permission<sup>(8)</sup>) (Copyright 2016 NYCdentist.com)

ต่อและบริเวณขอบของพื้นผิวในระดับเบื้องต้น หรือสามารถตรวจดูรอยร้าวรอยแตกบริเวณพื้นผิวของวัสดุได้<sup>(8)</sup> (รูปที่ 4)

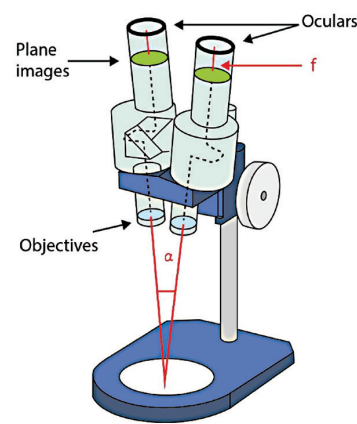
## 2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสเตอริโอ (stereo microscope)

เนื่องจากข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน ที่ไม่สามารถตรวจสอบความตื้นลึกรวมถึงลักษณะแบบ 3 มิติได้ จึงได้มีการพัฒนาหลักการของกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสเตอริโอขึ้น (รูปที่ 5) โดยหลักการของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือ ใช้แหล่งกำเนิดแสงที่อยู่เหนือต้อขึ้นตัวอย่างและใช้หลักการสะท้อนของแสงจากวัตถุ จากนั้นจะมีเลนส์ใกล้ตา 2 ชั้นที่รับภาพในมุมที่ต่างกัน ในการขยายภาพโดยการใช้อุปกรณ์จุลทรรศน์ชนิดนี้สามารถมองด้วยตา 2 ข้างทำให้สามารถตรวจชิ้นตัวอย่างได้โดยไม่ต้องทำให้มีความบางมากนัก โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีกำลังขยายไม่เกิน 100 เท่า และให้ภาพที่เป็นภาพเสมือนหัวตั้งไม่กลับซ้ายขวา สามารถมองความตื้นลึกของพื้นผิวรวมถึงการมองแบบ 3 มิติได้ เนื่องจากการมี 2 เส้นทางเดินแสง รวมถึงมีเลนส์วัตถุและเลนส์ใกล้ตา 2 ชั้นที่ทำมุมต่างกัน ทำให้สามารถมองเห็นมุมที่ต่างกันในตาซ้ายและตาขวาของผู้ใช้<sup>(9)</sup> (รูปที่ 6)

พบว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ยังคงมีข้อจำกัดเดียวกับกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน คือมีกำลังขยายภาพได้เพียง 100 เท่า ยังมีปัญหาของแสงนอกโพกัสและการเกิดปรากฏการณ์การ



รูปที่ 5 แสดงภาพของกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ  
**Figure 5** Stereo microscope



รูปที่ 6 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ

**Figure 6** Principle of stereo microscope (Modified from Rosas H. chapter 6 Perception and Reality in Stereo Vision: Technological Applications Advances in Stereo Vision, Rijeka: Intech; 2011.<sup>(10)</sup>)

เลี้ยวเบนของคลื่น นอกจากนี้การตรวจสอบวัตถุที่มีความมืดหรือสามารถกระเจิงแสงได้มากจะทำให้ภาพสะท้อนออกมาผิดปกติส่งผลต่อความคมชัด

การใช้งานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มักใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับพื้นผิวต่าง ๆ เช่นพื้นผิวที่ถูกทดสอบด้วยการกด การทดสอบความแข็งผิวของวัสดุ ตรวจสอบการรั่วซึมของรอยต่อ รวมถึงบริเวณขอบของวัสดุหลังการทดสอบวัสดุทางทันตกรรมเช่น การทดสอบลักษณะความล้มเหลวของรอยต่อวัสดุรวมถึงรอยแตกและรอยร้าวบริเวณพื้นผิวของชิ้นตัวอย่าง<sup>(3)</sup> โดยการทดลองของ Zhang และคณะในปี 2015 ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอทำการตรวจสอบลักษณะการแตกหักของรอยต่อเรซินคอมโพสิท (resin composite) กับ

เนื้อฟันรวมถึงตรวจสอบรอยแตกระหว่างเนื้อฟันในการทำการทดสอบการต้านต่อการแตกหักของฟันที่ได้รับการบูรณะด้วยเดือยฟันสำเร็จรูปชนิดไฟเบอร์ (fiber post)<sup>(11)</sup>

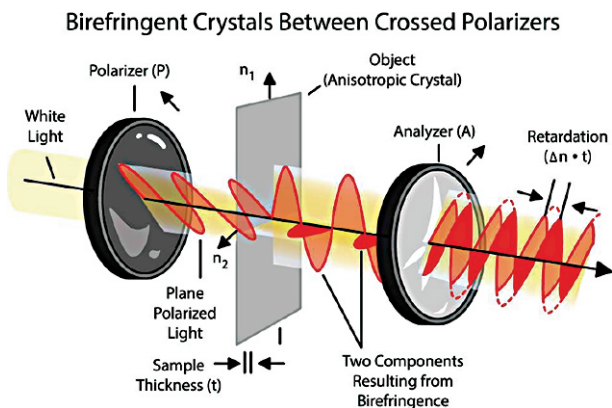
**3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์ (polarising Microscope)**



รูปที่ 7 แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์

Figure 7 Polarising microscope

(Modified from [www.meijitechno.com](http://www.meijitechno.com) [URL of homepage on the internet]. Saitama: Meiji Techno Co., Ltd. Available from: HYPERLINK "http://www.meijitechno.com/meiji\_old/ml9700.htm" http://www.meijitechno.com/meiji\_old/ml9700.htm<sup>(12)</sup>)



รูปที่ 8 แสดงหลักการการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์

Figure 8 Principle of polarising microscope

(Modified from [www.olympusmicro.com](http://www.olympusmicro.com) [URL of homepage on the internet]. New York: Olympus America Inc. Available from: HYPERLINK "http://www.olympusmicro.com/primer/lightand-color/birefringence.html" http://www.olympusmicro.com/primer/lightand-color/birefringence.html<sup>(13)</sup>)

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอไม่สามารถจำแนกองค์ประกอบของฟันวัสดุได้ในการทดลองที่ต้องการความละเอียดที่มากขึ้น เช่น เมื่อต้องการตรวจสอบชั้นของเคลือบฟันที่มีการสูญเสียแร่ธาตุ ทำให้ต้องมีการพัฒนา กล้องจุลทรรศน์ที่มีศักยภาพที่ดีขึ้นคือกล้องจุลทรรศน์แบบ

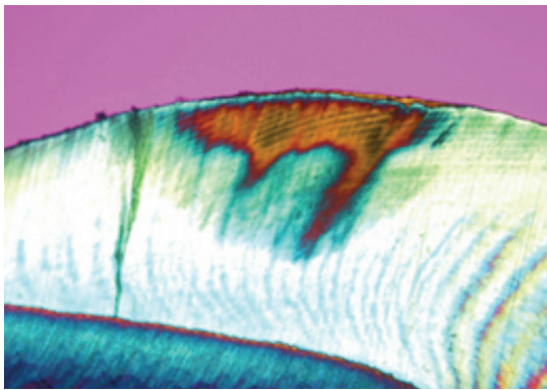
ใช้แสงโพลาไรซ์ (รูปที่ 7)

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

เนื่องจากคลื่นแสงที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะถูกกำหนดด้วยตัวกรอง ภาพที่เกิดขึ้นจึงเป็นภาพที่มีความเปรียบต่างของภาพ (contrast) ที่ดีทำให้สามารถตรวจสอบองค์ประกอบที่ต้องการของชิ้นตัวอย่างได้ละเอียดขึ้น<sup>(14)</sup>

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

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีความสามารถในการกรองและตรวจสอบการหักเหแสง จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบค่า ไบรีฟรินเจนซ์ของชั้นเคลือบฟัน รวมทั้งการตรวจสอบฟันผุที่มีการหักเหแสงที่เปลี่ยนไปจากองค์ประกอบของฟันธรรมชาติ (รูปที่ 9) การดูเนื้อเยื่อคอลลาเจนที่ต้องการแยกจากองค์ประกอบอื่นให้เห็นอย่างชัดเจนและศึกษาลักษณะความล้มเหลวระหว่างวัสดุ หลังการทดสอบทางกายภาพ<sup>(15)</sup> จากการศึกษาของ Medeiros และคณะในปี 2012 พบว่าค่าไบรีฟรินเจนซ์ของชั้นเคลือบฟันจะเปลี่ยนไปเมื่อชั้นเคลือบฟันนั้นมีการสูญเสียแร่ธาตุ และการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ในการตรวจสอบฟันผุในงานวิจัยต้องมีการเตรียมชิ้นตัวอย่างที่ถูกตัดก่อนตรวจสอบโดยใช้การจุ่มชิ้นตัวอย่างลงในสารละลายที่มีค่าดัชนีหักเห (refractive index) ต่างๆ เป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนนำชิ้นตัวอย่างไปทดสอบ<sup>(16)</sup>



**รูปที่ 9** แสดงตัวอย่างภาพฟันผุที่พบจากกล้องจุลทรรศน์โพลาไรซ์  
**Figure 9** Dental caries observed in polarising microscope  
 (from 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](http://www.dentalcare.co.uk/media/en_GB/education/ce73/ce73.pdf)" "[http://www.dentalcare.co.uk/media/en\\_GB/education/ce73/ce73.pdf](http://www.dentalcare.co.uk/media/en_GB/education/ce73/ce73.pdf) with permission<sup>(17)</sup>)

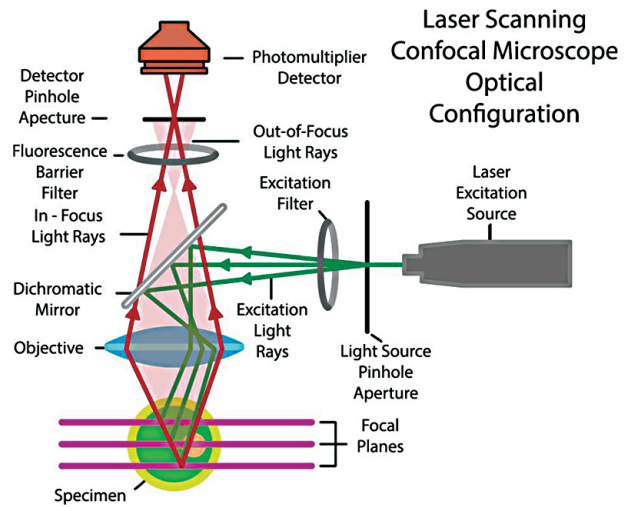
#### 4. กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (confocal laser scanning microscope)

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



**รูปที่ 10** แสดงภาพของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน

**Figure 10** Confocal laser scanning microscope  
 (Modified from [www.nikoninstruments.com](http://www.nikoninstruments.com). [Internet] Melville: Nikon Instruments Inc. Available from: HYPERLINK "<https://www.nikoninstruments.com/Products/Confocal-Microscopes>" "<https://www.nikoninstruments.com/Products/Confocal-Microscopes><sup>(18)</sup>)



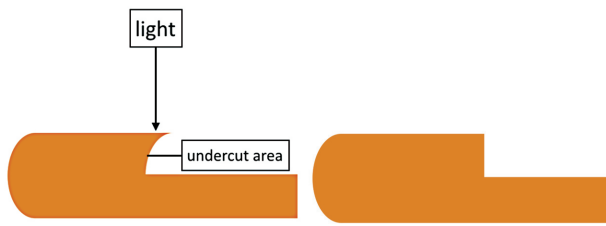
**รูปที่ 11** แสดงหลักการการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน

**Figure 11** Principle of confocal laser scanning microscope  
 (Modified from [www.olympusmicro.com](http://www.olympusmicro.com) [URL of homepage on the internet]. New York: Olympus America Inc. Available from: HYPERLINK "<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>" "<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html><sup>(19)</sup>)

ในการทดสอบที่ต้องการเลือกชั้นของพื้นผิวหรือภาพ 3 มิติ สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ได้เนื่องจากคุณสมบัติของแหล่งกำเนิดแสงที่มีขนาดเล็กและภาพที่ได้จะมีความคมชัดกว่ากล้องจุลทรรศน์ใช้แสงชนิดอื่นๆ เนื่องจากไม่มีแสงนอกโฟกัส นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในสิ่งมีชีวิตได้เนื่องจากไม่ต้องมีการตัดชิ้นตัวอย่างให้ได้ความบาง<sup>(20)</sup>

ข้อจำกัดที่พบจากการใช้งานกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือการที่แสงเลเซอร์วิ่งเป็นทางตรงทำให้บางพื้นผิวที่อยู่ใต้ส่วนคอดไม่ได้รับแสงทำให้ภาพที่ได้มีความผิดพลาด (รูปที่ 12) รวมถึงการใช้งานที่ยากและราคาแพง ไม่สามารถลดข้อจำกัดที่เกิดจากปรากฏการณ์การเลี้ยวเบนของคลื่นและกำลังขยายไม่เกิน 1500 เท่า<sup>(21)</sup>

เนื่องจากความสามารถในการระบุความลึกและการเลือกระนาบโฟกัสได้ ทำให้มีการใช้งานการตรวจวัดความหนาของสารยึดติดและการเกิดขึ้นไฮบริด (hybrid layer) โดยมีการศึกษาของ Bitter และคณะในปี 2014 ได้ทำการศึกษาความหนาชั้นไฮบริดที่เกิดขึ้นระหว่างเนื้อฟันกับสารยึดติด 2 ชนิดในการยึดติดผิวสำเร็จรูป 4 ชนิด<sup>(4)</sup> รวมถึงสามารถใช้ในการตรวจการอุดฟันท่อนเนื้อฟันของยาสีฟัน เช่นในการศึกษาของ Lavender และคณะในปี 2010<sup>(21)</sup>



รูปที่ 12-1  
Figure 12-1

รูปที่ 12-2  
Figure 12-2

**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** แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์ชนิดอิเล็กตรอนส่องกราด

**Figure 13** Scanning electron microscope

(Modified from [www.jeol.co.jp](http://www.jeol.co.jp)[URL of homepage on the Internet] Tokyo: JEOL Ltd.;1996-2017. Available from: HYPERLINK "http://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html" "http://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html"<sup>(22)</sup>)

### กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

เนื่องจากข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงในเรื่องของกำลังขยายและความคมชัดของภาพ จึงมีการพัฒนาเครื่องมือให้มีกำลังขยายที่มากขึ้นโดยใช้ลำอิเล็กตรอนที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าแสงที่มองเห็นเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานทำให้ภาพที่ได้มีความคมชัดและได้รายละเอียดมากกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบแสง รวมถึงมีการใช้เลนส์อิเล็กโตรแมกเนติก (electromagnetic) ในการขยายภาพทำให้ได้ภาพที่มีกำลังขยายสูงขึ้น

#### 1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (SEM; scanning electron microscope)

ลำอิเล็กตรอนจะถูกปล่อยออกมาผ่านแหล่งกำเนิดอนุภาคอิเล็กตรอน และเมื่อกระทบกับพื้นผิวของชิ้นตัวอย่างจะมีอิเล็กตรอนทั้งส่วนที่ผ่านทะลุออกไปและส่วนที่มีการสะท้อนกลับมา ซึ่งหลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (รูปที่ 13) นั้นจะใช้อิเล็กตรอนส่วนที่สะท้อนกลับมายังอุปกรณ์ตรวจจับ (detector) ที่อยู่ฝั่งเดียวกับเครื่องกำเนิดอิเล็กตรอนในการสร้างภาพ (รูปที่ 14) โดยสัญญาณที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างอิเล็กตรอนกับชิ้นตัวอย่างสามารถนำมาวิเคราะห์ให้ได้ข้อมูลแตกต่างกัน<sup>(23,24)</sup> กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีความนิยมในงานวิจัยทางทันตกรรมมาก สามารถใช้ในการตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์หรือการรั่วซึมของแบคทีเรียในคลองรากฟันหรือการตรวจสอบพื้น

ผิวไทเทเนียมบนรากเทียม<sup>(25)</sup>

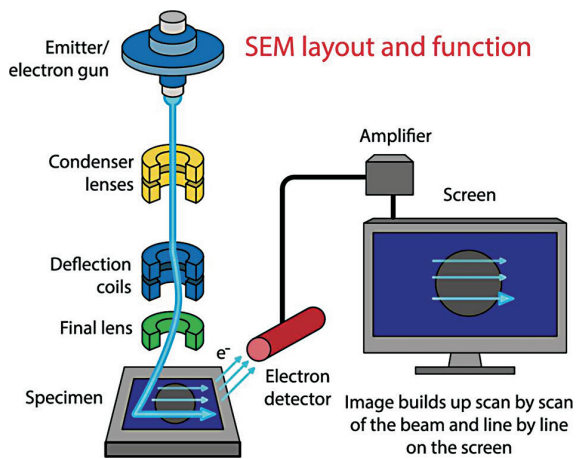
เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดอาศัยลำอิเล็กตรอนในการสร้างภาพ จึงต้องมีการเตรียมชิ้นงานแบบพิเศษยุ่งยากและซับซ้อนกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จึงอธิบายเพิ่มเติมโดยสังเขปดังนี้

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

#### การคงสภาพชิ้นงาน (fixation)

วัตถุประสงค์ของการคงสภาพชิ้นตัวอย่างทำขึ้นเพื่อรักษารูปร่างและรายละเอียดของสิ่งที่ต้องการศึกษาให้เหมือนจริงที่สุด เนื่องจากเมื่อมีการดิงน้ำออกจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของชิ้นตัวอย่างจึงต้องทำการคงสภาพชิ้นงานให้เหมือนสภาพก่อนการสูญเสียน้ำ โดยใช้สารกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และออสเมียมเตทรอไซด์ (osmium tetroxide) โดยสารที่นิยมมากที่สุดคือกลูตารัลดีไฮด์

อย่างไรก็ตามลำดับในการเตรียมชิ้นงานในขั้นตอนคงสภาพกับดิงน้ำนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของชิ้นตัวอย่างและข้อมูลที่ต้องการศึกษา เช่น หากต้องการศึกษาโครงสร้างของแมลงวันจะต้องทำการคงสภาพชิ้นตัวอย่างก่อนดิงน้ำเพื่อคง



รูปที่ 14 แสดงหลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

Figure 14 Principle of scanning electron microscope (Modified from www.ammr.org.au [URL of homepage on the internet]. Sydney: Australian Centre for Microscopy & Micro-analysis. Available from: HYPERLINK "http://www.ammr.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php" "http://www.ammr.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php"<sup>(26)</sup>)

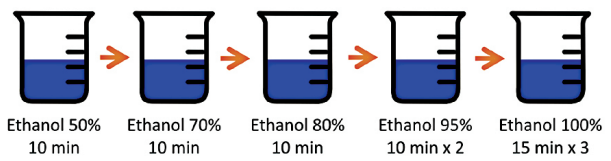
สภาพให้ สมบูรณ์ที่สุด แต่หากต้องการศึกษารายต่อระหว่าง เรซินกับเนื้อฟันสามารถทำการดิงน้ำก่อนได้ เนื่องจากส่วน เนื้อฟันได้ถูกคงสภาพไว้ด้วยเรซินแล้ว การทำการดิงน้ำก่อน จึงไม่มีผลต่อโครงสร้างของเนื้อฟัน

**การดิงน้ำออกจากชิ้นตัวอย่าง (dehydration)**

หลังจากที่ทำการคงสภาพชิ้นตัวอย่างจะต้องนำชิ้น ตัวอย่างมากำจัดโมเลกุลน้ำออก เนื่องจากโมเลกุลของ น้ำจะรบกวนการสร้างภาพทำให้ได้ภาพที่ไม่ชัด ดังนั้นจึง ต้องกำจัดน้ำที่ตกค้างในชิ้นงานที่ต้องการทดลอง โดยการ ดิงน้ำสามารถทำได้สองวิธีคือซีเรียลดีไฮเดรชัน (serial dehydration) กับคริติคอลพอยท์ไดรเออร์ (critical point dryer)

**ซีเรียลดีไฮเดรชัน**

เป็นวิธีการกำจัดน้ำด้วยสารเคมีเช่น แอลกอฮอล์ (alcohol) หรืออะซิโตน (acetone) โดยวิธีการทำคือนำตัวอย่างแช่ ในสารเคมีเหล่านี้ โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งวิธีการนี้มักทำให้เกิดการหดตัวของชิ้นตัวอย่าง เนื่องจากทำให้เกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) รวมถึง ส่วนประกอบของชิ้นตัวอย่างบางชนิดที่สามารถละลายใน แอลกอฮอล์หรืออะซิโตน (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการทำซีเรียลดีไฮเดรชัน

Figure 15 Serial dehydration

**คริติคอลพอยท์ไดรเออร์**

วิธีการกำจัดน้ำอีกวิธีคือการใช้เครื่องคริติคอลพอยท์ไดรเออร์ โดยเป็นระบบการกำจัดน้ำออกจากชิ้นตัวอย่างซึ่งจะ ทำการแทนที่น้ำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว (liquid carbon dioxide) ที่มีจุดวิกฤติของการเปลี่ยนวิญภาค (critical point) ที่ 31 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อคาร์บอนไดออกไซด์เหลว เจอกับอุณหภูมิวิกฤติจะเปลี่ยนสถานะเป็นก๊าซ และระเหยออกจากชิ้นงานจนหมดทำให้ชิ้นตัวอย่างมีการหดตัวน้อยกว่า เกิด ความเสียหายน้อยกว่าวิธีซีเรียลดีไฮเดรชันแต่ต้องใช้เครื่องมือ เฉพาะ

**การเคลือบผิวของชิ้นตัวอย่าง (coating)**

ขั้นตอนสุดท้ายคือการเคลือบผิวชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่อง เคลือบสเปคเตอร์ (sputter coater module) เพื่อเพิ่มความ สามารถในการสะท้อนอิเล็กตรอน โดยที่ความหนาของสาร เคลือบผิวจะขึ้นอยู่กับลักษณะข้อมูลที่ต้องการศึกษา เช่น หาก ต้องการศึกษาคือโครงสร้างโดยรวมจะต้องทำการเคลือบสารให้ หนากว่ากรณีที่ต้องการศึกษาส่วนประกอบที่เฉพาะเจาะจงมี ความละเอียดมากกว่า

สารที่นำมาเคลือบผิวนั้นจะขึ้นอยู่กับข้อมูลที่ต้องการ ศึกษา เช่น การวิเคราะห์ปริมาณธาตุมักจะใช้สารเคลือบผิว ชนิดคาร์บอน แต่กรณีที่ต้องการศึกษาลักษณะทางกายภาพ ซึ่งต้องการภาพที่มีความคมชัดสูงมักจะใช้สารเคลือบชนิด โลหะ นอกจากนี้ความหนาของสารเคลือบผิวมีผลต่อภาพที่ ออกมา เช่น การเคลือบทองที่บางเกินไปจะทำให้ได้ภาพที่มี รายละเอียดที่ไม่ชัดเจนทั้งภาพเนื่องจากทำให้ความเปรียบต่าง ของภาพสูงเกินไป (25,26)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนให้ความละเอียดของชิ้น ตัวอย่างได้มากเนื่องจากกำลังขยายที่สูงถึง 50-10000 เท่า (27) และการแยกความละเอียดของภาพที่ระดับ 50-100 นาโน- เมตร โดยที่การควบคุมใช้งานง่ายสามารถนำข้อมูลไป



วิเคราะห์ได้เร็วหากสร้างเป็นไฟลด์จิตอล อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเป็นการตรวจดูบริเวณพื้นผิวของชิ้นตัวอย่างเท่านั้น จึงทำให้การใช้งานจะจำกัดอยู่ที่บริเวณพื้นผิว เช่น การตรวจดูชั้นเสมียร์ (smear layer) หรือการดูรูเปิดของท่อเนื้อฟัน<sup>(21)</sup>

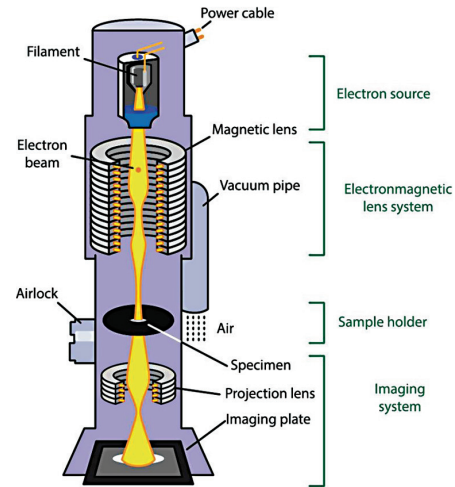
**เครื่องมือวิเคราะห์ธาตุและสารประกอบ (energy dispersive spectroscopy on the SEM)**

นอกจากการตรวจสอบพื้นผิวกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ยังสามารถวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณธาตุเชิงสัมพัทธ์ที่แสดงถึงองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นตัวอย่างได้ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจจับในการตรวจจับรังสีเอกซ์ (x-ray) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไปในธาตุต่างชนิดกัน แล้วนำมาวิเคราะห์ที่เป็นสเปกตรัมของพลังงานของธาตุแต่ละชนิดให้เป็นข้อมูลที่แสดงถึงปริมาณสัดส่วนของธาตุพื้นฐานของชิ้นตัวอย่างนั้นๆ โดยข้อมูลจะถูกนำมาวิเคราะห์และแปลผลออกมาเป็นกราฟซึ่งแสดงปริมาณธาตุเชิงสัมพัทธ์ของธาตุพื้นฐานบนพื้นผิวที่ต้องการศึกษา<sup>(29,30)</sup>

ในงานวิจัยทางทันตกรรมที่ต้องมีการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของชิ้นตัวอย่าง ทั้งการวิเคราะห์ปริมาณหรือปริมาณเชิงสัมพัทธ์ของธาตุการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ช่วยวิเคราะห์จะทำให้ได้ผลที่รวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดคือไม่สามารถตรวจจับธาตุที่มีเลขอะตอมต่ำกว่าธาตุโซเดียมได้ รวมถึงการซ้อนทับกันของสเปกตรัมของพลังงานที่ใกล้เคียงกันอาจทำให้ค่าที่ได้ไม่ถูกต้อง<sup>(31)</sup>

**2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM;- transmission electron microscope)**

การตรวจสอบองค์ประกอบภายในของชิ้นตัวอย่างนั้น ไม่สามารถทำได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จึงมีการผลิตกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านขึ้น โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ใช้การเตรียมตัวอย่างแบบพิเศษเพื่อให้ตัวอย่างบางและใช้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนส่องผ่าน (รูปที่ 16) เมื่อลำอิเล็กตรอนส่องผ่านจะมีตัวรับอยู่ตรงข้ามกับแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนเพื่อให้เห็นองค์ประกอบภายใน ซึ่งรายละเอียดของภาพจะขึ้นกับความการสะท้อนและกระเจิงลำอิเล็กตรอนของชิ้นตัวอย่าง โดยตำแหน่งที่อิเล็กตรอนไม่สามารถผ่านได้จะปรากฏเป็นสีดำ และบริเวณที่อิเล็กตรอนผ่านได้จะเป็นสีขาว เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ฟันงเซลล์ เป็นต้น



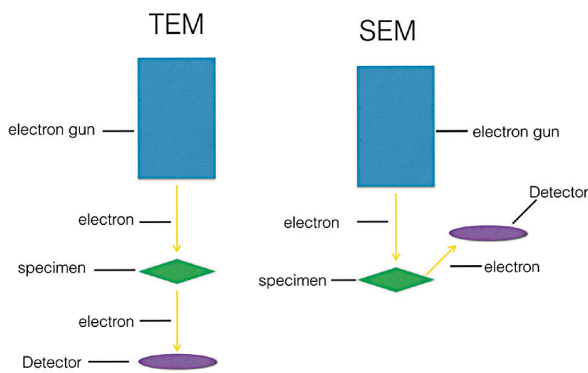
รูปที่ 16 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

**Figure 16** Transmission electron microscope (Modified from [www.hk-phy.org](http://www.hk-phy.org) [URL of homepage on the internet]. Hongkong: Department of Physics, The Chinese University of Hong Kong. Available from: HYPERLINK "[http://www.hk-phy.org/atomic\\_world/tem/tem02\\_e.html](http://www.hk-phy.org/atomic_world/tem/tem02_e.html)" "[http://www.hk-phy.org/atomic\\_world/tem/tem02\\_e.html](http://www.hk-phy.org/atomic_world/tem/tem02_e.html)"<sup>(32)</sup>)

ซึ่งลักษณะของภาพนี้ช่วยแก้ไขข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดที่สามารถศึกษาได้เฉพาะบริเวณพื้นผิวของชิ้นตัวอย่างเท่านั้น โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสามารถให้กำลังขยายและรายละเอียดได้คล้ายกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่แตกต่างกันเพียงลำอิเล็กตรอนสามารถทะลุผ่านชิ้นตัวอย่างได้ ให้รายละเอียดสูงที่สุดที่ประมาณ 0.1 นาโนเมตร<sup>(33)</sup>

**ความแตกต่างของ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกับส่องผ่าน**

หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะตรวจจับอิเล็กตรอนที่กระเจิงหรือสะท้อนมาจากผิวของชิ้นตัวอย่าง ตัวรับที่ตรวจจับอิเล็กตรอนจึงอยู่ด้านเดียวกับแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน ซึ่งการสะท้อนนี้ทำให้ได้ภาพของพื้นผิวตรงข้ามกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่จะตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ผ่านชิ้นตัวอย่างออกมาทำให้แสดงลักษณะและองค์ประกอบภายในของชิ้นตัวอย่าง อย่างไรก็ตามกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งสองแบบสามารถให้กำลังขยายและรายละเอียดได้สูงกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบแสง (รูปที่ 17)



**รูปที่ 17** แสดงหลักการการทำงานที่ต่างกันของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกับแบบส่องกราด  
**Figure 17** Difference between SEM and TEM

**การเตรียมชิ้นตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน**

การเตรียมชิ้นตัวอย่างจะต้องมีการตัดเตรียมชิ้นตัวอย่าง (sections of embedded material) ซึ่งจะมีการเตรียมตัวอย่างโดยการคงสภาพและดึงน้ำออกจากตัวอย่างเหมือนกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่ต่างกันที่จะมีการนำชิ้นตัวอย่างไปใส่ในแบบพิมพ์ที่มีอีพ็อกซีเรซินซึ่งจะแข็งตัวหลังจากทิ้งไว้ จากนั้นแท่งอีพ็อกซีที่มีชิ้นตัวอย่างฝังอยู่จะถูกนำมาตัดแต่งให้ได้รูปร่างเหมือนกับชิ้นตัวอย่าง เมื่อทำการตัดแต่งเสร็จจะต้องทำให้ชิ้นตัวอย่างมีความบางขึ้นละ 50-100 นาโนเมตรเพื่อให้ลำอิเล็กตรอนผ่านได้ เครื่องตัดจะมีใบมีดที่ใช้ตัด 2 แบบ ได้แก่ ใบมีดเพชร ที่มักใช้ตัดตัวอย่างที่ไม่แข็งมาก เช่น เนื้อฟัน และใบมีดเลเซอร์ที่สามารถใช้ตัดตัวอย่างได้ทุกชนิดแต่ราคาตัดค่อนข้างสูงมาก จากนั้นชิ้นตัวอย่างจะถูกย้อมด้วยโลหะหนัก เช่น ยูเรเนียม ตะกั่ว ที่สามารถกระเจิงอิเล็กตรอนได้ดีและช่วยปรับความเปรียบต่างของภาพที่ออกมาเพื่อนำไปศึกษาต่อ<sup>(34)</sup>

จุดเด่นของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้คือภาพที่มีรายละเอียดและกำลังขยายสูงถึง 620,000 เท่า สามารถแยกสองตำแหน่งที่ห่างจากกันได้มากกว่า 1 นาโนเมตร และสามารถให้รายละเอียดภายในรวมถึงโครงสร้างผลึกของชิ้นตัวอย่างที่ศึกษาซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลถึงความสมมาตรและการเรียงตัวของวัสดุได้ ดังนั้นจึงมีการใช้ในการตรวจสอบลักษณะความล้มเหลวของสารยึดติดอย่างละเอียดได้ ดังเช่นในงานวิจัยของ Hashimoto และคณะในปี 2003<sup>(35)</sup> รวมถึงการดูเซลล์หรือ

เส้นใยคอลลาเจนในการศึกษาของ Basinis และคณะในปี 2016<sup>(36)</sup>

อย่างไรก็ตามการประมวลผลภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะเป็นลักษณะภาพ 2 มิติซึ่งไม่มีข้อมูลในความลึก รวมถึงลำอิเล็กตรอนอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อชิ้นตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้ เนื่องจากความร้อนและกระบวนการไอออไนเซชันเรดิโอไลซิส (ionization radiolysis) โดยเฉพาะตัวอย่างจำพวกพอลิเมอร์และเซรามิกส์ ข้อด้อยอีกประการคือการเตรียมชิ้นตัวอย่างมีกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องมีความบางน้อยกว่า 100 นาโนเมตร และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านต้องทำงานในภาวะสุญญากาศทำให้ไม่สามารถศึกษาชิ้นตัวอย่างที่มีชีวิตได้<sup>(34)</sup>

**กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscope)**

ในปัจจุบันความสามารถในการขยายภาพของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ 620,000 เท่า<sup>(33)</sup> พบว่าความละเอียดไม่เพียงพอในการศึกษารายละเอียดของพื้นผิวระดับนาโนเมตรได้ จึงทำให้มีการพัฒนากล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมซึ่งมีกำลังขยายสูงขึ้นและสามารถบอกความตื้นลึกของพื้นผิวได้ โดยอาศัยหลักการของการทำให้เกิดภาพของผิววัสดุโดยการวัดแรงกระทำระหว่างผิววัสดุกับตัวตรวจวัดที่ทำจากเข็มขนาดเล็กใช้เคลื่อนไปตามบริเวณต่างๆ ของพื้นผิววัสดุ โดยตัวเข็มตรวจวัดจะถูกควบคุมโดยเครื่องสแกนเพโซอิเล็กทริก (piezoelectric scanner) ซึ่งสภาพผิวที่แตกต่างกันไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับระดับเข็มตรวจแตกต่างกัน ตัวคานที่มีเข็มเกาะติดจะมีการโค้งงอเกิดขึ้น ซึ่งถูกตรวจวัดโดยตัวรับภาพ (photo detector) ทำให้ได้ภาพออกมาสอดคล้องกับสภาพพื้นผิวในแต่ละบริเวณที่เข็มวิ่งผ่าน การโค้งงอของคานที่มีเข็มเกาะอยู่นั้นเกิดขึ้นเมื่อมีแรงกระทำระหว่างอะตอม ซึ่งเป็นแรงดึงดูดหรือแรงผลักรั้งขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างเข็มปลายแหลม ดังนั้นภาพที่สร้างออกมาจะเป็นภาพเสมือนที่สร้างจากการขยับขึ้นลงของคาน<sup>(37)</sup> (รูปที่ 18)

โดยทั่วไปปลายของเข็มจะถูกสร้างจากซิลิกอน (silicon) แต่สามารถใช้แก้วโบโรซิลิเกตและซิลิคอนไนเตรดทดแทน โดยบริเวณปลายของเข็มจะถูกเคลือบไว้ด้วยสารเพื่อใช้ในวัตถุประสงค์ที่ต่างกันเช่น ทอง ใช้เพื่อตรวจสอบพันธะโค

วาเลนซ์ของโมเลกุลชีวและตรวจสอบปฏิสัมพันธ์กับพื้นผิว เพชร ใช้เพิ่มการคงทนต่อความสึก และแม่เหล็ก ใช้เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นแม่เหล็กของพื้นผิว

ในการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมจะสามารถศึกษาได้อย่างน้อย 3 รูปแบบที่สำคัญคือ

- มีการสัมผัส (contact mode)
- ไม่มีการสัมผัส (non contact mode)
- การตรวจแบบแตะ (tapping mode)<sup>(39)</sup>

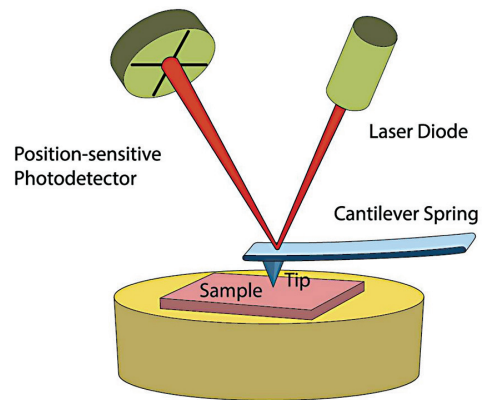
**การทดสอบกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบมีการสัมผัส**

เป็นการวัดรูปทรงของสภาพผิวชิ้นงาน (topography) โดยการขยับให้เข็มโกล (slide) ไปบนผิวงานซึ่งจะทำให้เกิดแรงผลึกขึ้นเนื่องจากเข็มกับผิวงานจะอยู่ใกล้กันประมาณ 1-2 อังสตรอม (angstrom) แรงผลึกดังกล่าวนี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามรูปทรงของผิวงานทำให้มีการโค้งงอของคาน และขนาดของการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องเป็นไปตามลักษณะรูปทรงของผิวงาน

ข้อเสียของการทดสอบแบบมีการสัมผัสคือการลากเข็มตรวจวัดเคลื่อนที่ไกลเข้าไปยังบริเวณต่าง ๆ บนผิวงานจะทำให้เกิดตำหนิและความเสียหายแก่ผิวงาน<sup>(40)</sup>

**การทดสอบกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบไม่มีการสัมผัส**

เนื่องจากข้อเสียของการสัมผัสพื้นผิวจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคแบบไม่สัมผัสขึ้น โดยปลายเข็มจะถูกยกขึ้นมาให้มีระยะห่างเหนือผิวงานสูงมากขึ้นคือประมาณ 10-100 อังสตรอม จึงไม่มีปัญหาเรื่องการทำลายผิวของชิ้นตัวอย่าง โดยในกรณีนี้แรงกระทำระหว่างตัวคานกับพื้นผิวจะเป็นลักษณะแรงดึงดูดซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามรูปทรงของสภาพผิวชิ้นตัวอย่าง เช่นเดียวกันแรงดึงดูดประเภทแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals) ที่เกิดขึ้นระหว่างปลายเข็มกับพื้นผิว ในกรณีนี้จะเป็นแรงที่อ่อนกว่าเมื่อเทียบกับแรงผลึกที่เกิดขึ้นในกรณีที่มีการสัมผัสปกติอยู่ที่ประมาณ 10-12 นิวตัน ดังนั้นสัญญาณการเปลี่ยนแปลงจึงอาจจะไว (sensitive) ต่อสิ่งแปลกปลอมที่อยู่บนผิวงาน เช่น หยดน้ำที่เกาะอยู่บนผิว ทำให้ได้ภาพที่ผิดไป<sup>(39)</sup> (รูปที่ 19)



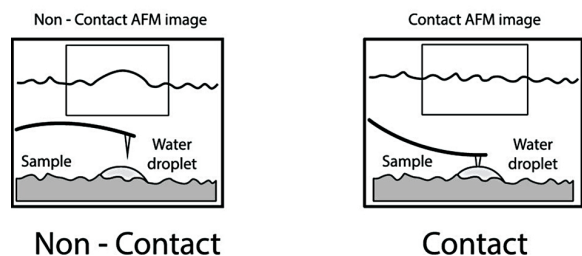
รูปที่ 18 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

**Figure 18 Principle of atomic force microscope**  
(Modified from [physik.uni-greifswald.de](http://physik.uni-greifswald.de) [URL of homepage on the internet]. Greifswald: Universtat Greifswald. Available from: HYPERLINK "<https://physik.uni-greifswald.de/en/biophysics-and-soft-matter-prof-christiane-helm/methods/afm-atomic-force-microscope>" "<https://physik.uni-greifswald.de/en/biophysics-and-soft-matter-prof-christiane-helm/methods/afm-atomic-force-microscope/><sup>(38)</sup>)

**การทดสอบกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแบบแตะ**

เป็นเทคนิคที่รวมเอาลักษณะของการวัดทั้งในแบบที่มีและไม่มีการสัมผัสเข้าด้วยกัน กล่าวคือยังคงให้มีการสัมผัสกันระหว่างเข็มกับผิวงานในระยะที่ใกล้กันมากเหมือนกับกรณีที่มีการสัมผัสเพื่อให้เกิดภาพที่ชัดเจน ในขณะที่เดียวกันก็ยังมี การสั่นหรือขยับเข็มปลายแหลมให้เคลื่อนที่ขึ้นลงไปพร้อมกับ การเคลื่อนที่สแกนไปยังบริเวณผิวงาน ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวหลังการทดสอบ<sup>(40)</sup>

**Non - Contact VS. Contact Through Water**



รูปที่ 19 อธิบายการเคลื่อนผ่านหยดน้ำของกล้อง จุลทรรศน์แรงอะตอมแบบไม่มีการสัมผัสเปรียบเทียบกับแบบมีการสัมผัส

**Figure 19 Illustrates difference between contact mode and non-contact mode passing through water droplet**  
(Modified from [www.eng.utah.edu](http://www.eng.utah.edu)[URL of homepage on the internet]. Salt Lake City: College of Engineering, University of Utah Availble from:HYPERLINK "[http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture\\_10\\_AFM.pdf](http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture_10_AFM.pdf)" "[http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture\\_10\\_AFM.pdf](http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture_10_AFM.pdf)<sup>(41)</sup>)

เนื่องจากการเคลื่อนที่ของปลายเข็มไปตามพื้นผิววัสดุ ทำให้สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ตรวจสอบความหยาบของพื้นผิววัสดุได้ในระดับที่ละเอียดกว่ากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมถึงสามารถตรวจสอบบริเวณท่อเปิดของเนื้อฟันในระดับละเอียด สามารถแยกแยะผิวของเนื้อฟันที่เป็นแร่ธาตุกับอินทรีย์สารได้ทั้งในสภาพของเหลวและอุณหภูมิที่ต่างกันดี เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ภาพของผิวงานที่ใกล้เคียงกับสภาพการใช้งานจริงตามธรรมชาติได้ ดังเช่นในงานวิจัยของ Sharma และคณะ ในปี 2010 ซึ่งเป็นการศึกษาองค์ประกอบของฟันในระดับนาโนเมตร และงานวิจัยของ Zuryati และคณะในปี 2013 ซึ่งศึกษาความขรุขระของ พื้นผิววัสดุเรซินคอมโพสิตหลังจากการฟอกสีฟัน (bleaching) ในระดับนาโนเมตรเช่นกัน<sup>(42,43)</sup>

ถึงแม้กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะสามารถตรวจชิ้นตัวอย่างขนาดเล็กได้แต่สามารถตรวจสอบความต่างระดับพื้นผิวได้ไม่เกิน 10-20 ไมโครเมตร และพื้นที่ผิว ไม่เกิน 150x150 ไมโครเมตร รวมถึงการตรวจสอบทำได้ช้า<sup>(39)</sup>

**ออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี (optical coherence tomography)**

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดต่าง ๆ จะพบว่าส่วนใหญ่ต้องเตรียมชิ้นตัวอย่างก่อนทำให้สภาพของชิ้นตัวอย่างเปลี่ยนแปลงหรือผิดรูปไปจากสภาวะปกติ ทำให้มีการพัฒนากล้องจุลทรรศน์ชนิดออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี โดยอาศัยการถ่ายภาพตัดขวางด้วยแสงอินฟราเรดช่วงสั้น (near infrared) ซึ่งนอกจากความสามารถในการถ่ายภาพตัดขวางโดยไม่ต้องทำลาย วัตถุตัวอย่าง (non-destructive) แล้วยังไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใดๆ ต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (non-invasive) ลักษณะคล้ายการทำอัลตราซาวด์ (ultrasound) แต่ใช้คลื่นแสงแทนคลื่นเสียง กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้สามารถให้ความละเอียดในการถ่ายภาพสูงในระดับไมโครเมตรและแสดงภาพออกมาแบบปัจจุบัน อีกทั้งยังสามารถเรียกได้ว่าเป็นออปติคัลไบออปซี (optical biopsy) คือการตรวจดูชิ้นเนื้อเยื่อโดยไม่ต้องตัดหรือผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นตัวอย่างเหมือนวิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)<sup>(45,46)</sup> ในปัจจุบันออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี (รูปที่ 20) ได้ถูกพัฒนาและได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจ

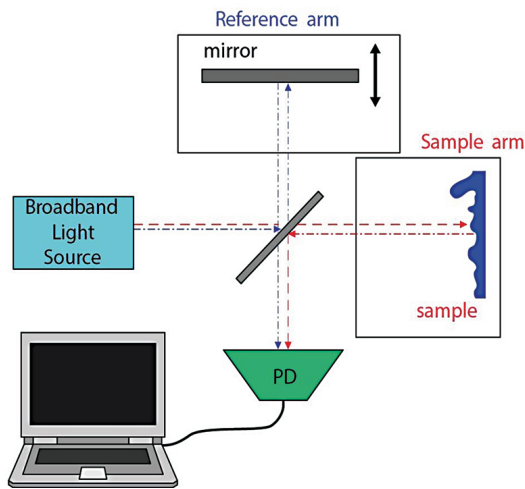


**รูปที่ 20** แสดงภาพของเครื่องออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี  
**Figure 20** Optical coherence tomography  
(Modified from santec.com [URL on the Internet] Aichi: Santec Corporation. Available from HYPERLINK “http://www.santec.com/jp/wp-content/uploads/IVS-300-C-E-v1.41503.pdf”<http://www.santec.com/jp/wp-content/uploads/IVS-300-C-E-v1.41503.pdf>)<sup>(44)</sup>

วินิจฉัยทางทันตกรรม โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายภาพรังสีและออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี พบว่าออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟีจะให้ภาพที่มีความละเอียดมากกว่ามีการแสดงผลออกมาเป็นภาพแบบปัจจุบันซึ่งมีการพัฒนาออกมาเป็นภาพสามมิติด้วย<sup>(47)</sup>

หลักการทำงานพื้นฐานของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้เริ่มจาก แสงบรอดแบนด์เลเซอร์ (broadband laser) จะถูกลำเลียงเข้าสู่ระบบการแทรกสอดของแสง (interferometer) แล้วแสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นแสงอ้างอิง (reference beam) ซึ่งจะถูกสะท้อนกลับด้วยกระจก (reference mirror) และลำเลียงต่อไปยังอุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มแสง (photodetector) แสงส่วนที่สองจะถูกโฟกัสด้วยเลนส์ไปยังตัวอย่างที่ต้องการถ่ายภาพ ซึ่งเลนส์ตัวเดียวกันนี้ก็จะทำหน้าที่ในการรับสัญญาณที่สะท้อนกลับมาจากตัวอย่าง (backscattering light) ซึ่งเกิดจากความไม่สม่ำเสมอของค่าดัชนีหักเหของแสงที่ตำแหน่งต่างๆ ในชิ้นตัวอย่าง (refractive index variation) แสงสะท้อนจากตัวอย่างจะถูกแทรกสอดกับแสงอ้างอิง โดยการเลื่อนตำแหน่งของกระจกในแขนอ้างอิง (reference arm) เป็นระยะทางที่ต้องการวัดภาพตัดขวางของตัวอย่าง จะสร้างจากแอมพลิจูดที่แตกต่างกันของการสะท้อนที่ความลึกต่างๆ จากผิวของตัวอย่าง<sup>(47,48,49)</sup> (รูปที่ 21)

ภาพที่ออกมาจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะเป็นภาพปัจจุบันทำให้ช่วยในแง่งานการรักษา เช่น สามารถใช้ในการตรวจรอยร้าวของฟัน โดยสามารถตรวจได้ถึงความลึกของ



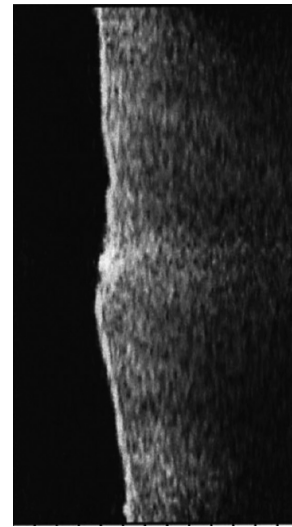
**รูปที่ 21** แสดงหลักการทำงานของออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี  
**Figure 21** Principle of optical coherence tomography  
 (Modified from Hsieh YS, Ho YC, Lee SY et al. Review Dental Optical Coherence Tomography. Sensors 2013; 13: 8928–8949<sup>(47)</sup>)

รอยร้าว รอยร้าวของวัสดุอุด ตำแหน่งที่มีการทะลุโพรงประสาทฟัน การเกิด การสูญเสียแร่ธาตุ (demineralize) (รูปที่ 22) หินน้ำลายใต้เหงือก และมะเร็งในช่องปาก โดยจะพบตัวอย่างการใช้งานจากในงานวิจัยของ Baumgartner และคณะในปี 2000<sup>(49)</sup>

ข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ คือการสแกนจะทำงานเป็นแนวเส้นทำให้การจะเห็นรอยโรคทั้งหมดต้องใช้หลายร้อยหรือหลายพันภาพมารวมกันจึงจะเห็นครบ รวมถึงความลึกของการสแกนต่ำในระยะ 3-4 มม. ถ้าทำการตรวจชิ้นงานที่เป็นฟันเนื่องจากความสามารถในการผ่านของแสงในวัตถุต่างๆ ทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับการใช้งานทางคลินิก<sup>(49)</sup>

**สรุป**

ในการเลือกใช้อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ผู้ใช้ควรมีความเข้าใจในหลักการทำงาน วิธีการใช้งาน ข้อดีข้อเสียต่างๆ และข้อจำกัดร่วมกับการพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ตอบสนองต่อคำถามงานวิจัย โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงได้แก่ข้อมูลที่ต้องการจากการทดลอง ลักษณะและชนิดของชิ้นงานที่ทดลอง ความละเอียดของภาพกำลังขยาย ความสามารถในการเตรียมชิ้นงาน ซึ่งเป็นอีกขั้นตอนที่มีความสำคัญเพราะผลการทดลองที่ได้นั้นควรผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเหมาะสม



**รูปที่ 22** แสดงตัวอย่างชั้นเคลือบฟัน (ด้านขวาของภาพ) จากการตรวจชิ้นตัวอย่างด้วยออปติคัลโคฮีเรนซ์โทโมกราฟี  
**Figure 22** Enamel observed in optical coherence tomography  
 (From Hsieh YS, Ho YC, Lee SY et al. Review Dental Optical Coherence Tomography. Sensors 2013; 13: 8928–8949 with permission<sup>(47)</sup>)

และมาจากชิ้นงานตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมอย่างถูกต้องและวัดผลด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมโดยตรง

**เอกสารอ้างอิง**

1. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillipps' 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: HYPERLINK “http://journals.plos.org/plosone/ar-

- article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0086294.PDF”<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: HYPERLINK “[http://www.barska.com/Microscopes-Monocular\\_Compound\\_Microscope\\_40x\\_100x\\_400x\\_w.html](http://www.barska.com/Microscopes-Monocular_Compound_Microscope_40x_100x_400x_w.html)”[http://www.barska.com/Microscopes-Monocular\\_Compound\\_Microscope\\_40x\\_100x\\_400x\\_w.html](http://www.barska.com/Microscopes-Monocular_Compound_Microscope_40x_100x_400x_w.html)
  7. cnx.org[URL of homepage on the internet]. Houston. :Rice University; 1999-2017. Available from: HYPERLINK “<http://cnx.org/contents/9ANhisjh@5/Limits-of-Resolution-The-Rayle>”<http://cnx.org/contents/9ANhisjh@5/Limits-of-Resolution-The-Rayle>
  8. The Center For Special Dentistry[internet]. Newyork. Available from: HYPERLINK “<http://www.nycdentist.com/dental-photos/1523/Photos-Photomicrographs-dental-histology-pictures-SEM-microscope>”<http://www.nycdentist.com/dental-photos/1523/Photos-Photomicrographs-dental-histology-pictures-SEM-microscope>
  9. Kreindler RJ. The Stereo Microscope Part 1: Introduction and Background 3rd Edition Micscape Magazine [monograph on theinternet]. Available from: HYPERLINK “<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjun12/jk-stereo1.pdf>”<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjun12/jk-stereo1.pdf>
  10. Rosas H. chapter 6 Perception and Reality in Stereo Vision: Technological Applications Advances in Stereo Vision. Intech Rijeka; 2011
  11. 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;43:117-25.
  12. www.meijitechno.com[URL of homepage on the internet].Saitama. Available from: HYPERLINK “[http://meijitechno.com/meiji\\_old/ml9700.htm](http://meijitechno.com/meiji_old/ml9700.htm)”[http://meijitechno.com/meiji\\_old/ml9700.htm](http://meijitechno.com/meiji_old/ml9700.htm)
  13. www.olympusmicro.com [URL of homepage on the internet]. New York Olympus America Inc. Available from: HYPERLINK “<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/birefringence.html>”<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/birefringence.html>
  14. Patzel JW *Polarized light microscopy Principles, Instruments, applications* 3rd edition; 1985: 19-43
  15. 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.
  16. 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; 246:177-89
  17. 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](http://www.dentalcare.co.uk/media/en_GB/education/ce73/ce73.pdf)”[http://www.dentalcare.co.uk/media/en\\_GB/education/ce73/ce73.pdf](http://www.dentalcare.co.uk/media/en_GB/education/ce73/ce73.pdf)
  18. www.nikoninstruments.com.[Internet] Melville. Available from: HYPERLINK “<https://www.nikoninstruments.com/Products/Confocal-Microscopes>”<https://www.nikoninstruments.com/Products/Confocal-Microscopes>

19. www.olympusmicro.com [URL of homepage on the internet]. New York Olympus America Inc. Available from: HYPERLINK "<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>"
20. 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.
21. 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
22. www.jeol.co.jp[URL of homepage on the Internet] Tokyo. Available from: HYPERLINK "<http://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html>"
23. MCMULLAN D. Scanning Electron Microscopy 1928-1965. *Scanning* 1995;17:175–185
24. Smith KC and Oatley CW. The scanning electron microscope and its fields of application *Br. J. Appl. Phys.* 1955; 6, 391-400
25. Paradella TC. Scanning Electron Microscopy in modern dentistry research. *Braz Dent Sci* 2012; 15(2): 43-48
26. www.ammr.org.au [URL of homepage on the internet]. Sydney Australian Centre for Microscopy & Microanalysis. Available from: HYPERLINK "<http://www.ammr.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php>"
27. Moran P, Coats B. Biological Sample Preparation for SEM Imaging of Porcine Retina *Microscopy-today* 2012; 20: 10-12
28. Dale JG, Newbury D, Joy C et al. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis* 3<sup>rd</sup> Edition. New York: springer; 2003: 591-619
29. 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
30. 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: HYPERLINK "<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2013.610123>"
31. Arnold WH, Benz LB, Naumova EA. Resin Infiltration into Differentially Extended Experimental Carious Lesions. *Oper Dent J*, 2014; 8: 251-256
32. www.hk-phy.org [URL of homepage on the internet]. Department of Physics, The Chinese University of Hong Kong. Available from: HYPERLINK "[http://www.hk-phy.org/atomic\\_world/tem/tem02\\_e.html](http://www.hk-phy.org/atomic_world/tem/tem02_e.html)"
33. 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
34. 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

35. 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
36. 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
37. Binnig G, F.C. Quate, C. Gerber. Atomic-Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986; 56: 930–933.
38. physik.uni-greifswald.de [URL of homepage on the internet]. Universtat Greifswald. Availble from: HYPERLINK “<https://physik.uni-greifswald.de/en/biophysics-and-soft-matter-prof-christiane-helm/methods/afm-atomic-force-microscope/>”
39. Cappella B, Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.* 1999; 34: 1-3, 5-104
40. 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
41. www.eng.utah.edu[URL of homepage on the internet]. College of Engineering, University of Utah. Availble from: HYPERLINK “[http://www.eng.utah.edu/~lzung/images/Lecture\\_10\\_AFM.pdf](http://www.eng.utah.edu/~lzung/images/Lecture_10_AFM.pdf)”
42. Sharma S, Cross SE, Hsue C, Wali RP, Stieg AZ, Gimzewski JK. Nanocharacterization in Dentistry *Int J Mol Sci* 2010; 11(6): 2523–2545.
43. 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
44. santec.com [URL on the Internet] Aichi. Available from: HYPERLINK “<http://www.santec.com/jp/wp-content/uploads/IVS-300-C-E-v1.41503.pdf>”
45. Huang D, Swanson EA, Lin CP et al. Optical Coherence Tomography *Science* 1991; 254(5035): 1178-1181
46. Haidekker MA. Trends in Medical Imaging Technology. *Medical Imaging Technology*. New York: Springer, 2013. p111-119
47. Hsieh YS, Ho YC, Lee SY et al. Review Dental Optical Coherence Tomography. *Sensors* 2013; 13: 8928-8949
48. Colston BW, Sathyam US Jr, DaSilva LB, Everett MJ, Stroeve P, Otis LL. Dental OCT. *Opt. Express* 1998; 3: 230-238.
49. Baumgartner A, Dichtl S, Hitzenberger CK, Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Res.* 2000; 34: 59-69.