ตำรา/เอกสารประกอบการสอน

สำนักหอสมุด

คู่มือการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM) ยี่ห้อLEO รุ่น 1455 VP

ประกายทิพย์ กิติคุณ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน ๒๖ ส.ค. ๒๕๕๗
เลขทะเบียน เ. 7028054
เลขเรียกหนังสือ ๑ QH 201 .S3 ป191ค 2558

เอกสารประกอบการปฏิบัติงาน
สำหรับ นักวิทยาศาสตร์ นิสิต นักศึกษา บุคลากร
และผู้ขอรับบริการศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์
งานห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

คำนำ

การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เป็นงานที่ต้องอาศัยเทคนิคและประสบการณ์ในการเตรียมตัวอย่างมาก และเป็นงานที่ยุ่งยากสำหรับผู้ที่ไม่เคยทำมาก่อน เอกสารคู่มือการเตรียมตัวอย่างชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นั้น จึงจัดทำขึ้นเพื่อช่วยผู้ที่ต้องการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ความเข้าใจในกระบวนการเตรียมตัวอย่างและสามารถประยุกต์ใช้กับชิ้นงานตัวอย่างของตนเองได้

ผู้เขียนจึงได้รวบรวมเอกสารวิชาการ ความรู้ และประสบการณ์จากการเข้าฝึกอบรม ประชุม สัมมนาและแลกเปลี่ยนความรู้กับผู้เชี่ยวชาญ โดยผู้เขียนเป็นนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจึงจัดทำเป็นคู่มือเล่มนี้ขึ้น โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้นิสิต นักศึกษา นักวิทยาศาสตร์ บุคลากร และผู้ขอใช้บริการงานศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ งานห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่ต้องการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างของตนเอง ประหยัด และเพื่อใช้เป็นผลงานในการขอกำหนดตำแหน่งให้สูงขึ้น เป็นผู้ชำนาญการ ผู้เชี่ยวชาญ ของมหาวิทยาลัยต่อไป

(ประกายทิพย์ กิติคุณ)

พฤศจิกายน 2558

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
	ขอบเขตของการศึกษา	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	**โครงสร้างและหน้าที่ความรับผิดชอบ**	7
	โครงสร้างหน่วยงาน	7
	บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	13
	ภาระงานของนางประกายทิพย์ กิติคุณ	15
3	**หลักการและเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงาน**	19
	หลักการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	19
	การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างขั้นต้น (Specimen)	24
	การคงสภาพปฐมภูมิ (Primary Fixation)	26
	การล้างน้ำยาคงสภาพ (Buffer Wash)	27
	การคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation)	30
	การขจัดน้ำ (Dehydration)	31
	หลักการทำให้ตัวอย่างแห้ง (drying)	32
	การติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่งยึดตัวอย่าง (mounting)	34
	การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก (metal coating)	35
	การเก็บรักษาตัวอย่างที่ฉาบผิวตัวอย่างแล้ว	39

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับงาน SEM และวิธีการปฏิบัติงาน**	40
	วิธีการเตรียมชิ้นงานตัวอย่าง (Specimen)	40
	วิธีการการคงสภาพปฐมภูมิ (Primary Fixation)	40
	วิธีการล้างน้ำยาคงสภาพ (Buffer Wash)	41
	วิธีการคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation)	42
	วิธีการขจัดน้ำออกจากชิ้นงานตัวอย่าง (Dehydration)	42
	วิธีการทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤติ (critical point drying :CPD)	43
	วิธีการติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่งยึดตัวอย่าง (mounting)	45
	วิธีการฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก (Sputter coater)	47
	วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างที่ฉาบผิวตัวอย่างแล้ว	49
5	**ปัญหาอุปสรรคและข้อเสนอแนะ**	50
บรรณานุกรม		51
ประวัติผู้เขียน		52

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 การเตรียม 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตาม pH ที่ต้องการ..... 29

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 โครงสร้างของสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์..... 8
2 โครงสร้างการบริหารสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์..... 9
3 โครงสร้างการปฏิบัติงานสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์..... 10
4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ..... 18
5 Scanning Electron Microscope รุ่น 1455 VP..... 19
6 ระบบการทำงานของ High vacuum mode..... 21
7 ระบบการทำงานของ Variable Pressure mode..... 23
8 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..... 24
9 แผนภาพแสดงการฉาบทองด้วยเครื่อง sputter coater..... 36
10 กราฟแสดงความหนาของผิวฉาบ..... 36
11 ลักษณะการจัดแท่งคาร์บอนสำหรับฉาบผิวด้วยเครื่อง Vacuum evaporator.. 37
12 ลักษณะการพันเส้นคาร์บอน (ก) เส้นเดียว (ข) สองเส้น..... 38
13 Carbon coater สำหรับฉาบผิวด้วยคาร์บอนแบบเส้น..... 38
14 การตัดชิ้นงานตัวอย่าง เช่น ใบพืช..... 40
15 การเปลี่ยนน้ำยาปฐมภูมิ (Primary Fixation)..... 41
16 การล้างสารละลายตัวอย่าง (Buffer wash)..... 41
17 การคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation)..... 42
18 การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration)..... 43
19 การนำตัวอย่างมาใส่ตลับ (sample holder)..... 44
20 การนำตัวอย่างมาใส่ตลับ (sample holder) ใส่เครื่อง CPD..... 44
21 การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration) CPD รุ่น 7501..... 45
22 เทปกาวสำหรับยึดชิ้นงานตัวอย่างกับแท่นวางตัวอย่าง..... 46
23 การติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่นวางตัวอย่าง (stub)..... 46
24 การนำ stub ตัวอย่าง เข้าเครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater)..... 47

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพ หน้า

25 เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater) ยี่ห้อQuorum รุ่น Q150RS..... 48

26 เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater) ยี่ห้อPolaron รุ่น SC7620..... 48

27 การเขียนของข้อมูลชิ้นงานตัวอย่างและเก็บในตู้ดูดความชื้น (Desiccator)..... 49

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพ หน้า

25 เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater) ยี่ห้อQuorum รุ่น Q150RS..... 48
26 เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater) ยี่ห้อPolaron รุ่น SC7620..... 48
27 การเขียนของข้อมูลชิ้นงานตัวอย่างและเก็บในตู้ดูดความชื้น (Desiccator)..... 49

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก จึงมีการพัฒนาเครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำและที่เชื่อถือได้ ซึ่งกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ electron เป็นแหล่งกำเนิดแสง เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาลักษณะสัณฐานของวัสดุในระดับจุลภาคซึ่งเห็นรายละเอียดที่เล็กมาก และเนื่องจากข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์แบบแสงที่มีความยาวคลื่นแสงขนาดใหญ่กว่าลักษณะสัณฐานบางชนิดที่ต้องการศึกษา และกำลังความสามารถในการแยกชัดของกล้องจุลทรรศน์แบบแสงธรรมดามีค่าต่ำ ใช้ดูวัตถุเล็กสุดประมาณ 0.2 ไมโครเมตร และให้กำลังขยายสูงสุดไม่เกิน 3000 เท่า ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบรายละเอียดของวัตถุที่มีขนาดเล็กมากๆ ได้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายสูง มีความสามารถในการแยกชัดดี เนื่องจากมีความยาวคลื่นสั้น เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของวัสดุ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีกำลังขยายมากกว่า 3000 เท่า จนถึงระดับมากกว่า 100000 เท่า และสามารถแจกแจงรายละเอียดของภาพ ซึ่งขึ้นกับลักษณะตัวอย่างได้ตั้งแต่ 3 ถึง 100 นาโนเมตร อีกทั้งยังสามารถใช้งานร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์อื่น เช่น Energy Dispersive Spectrometry (EDS) ที่เป็นข้อมูลทางเคมี จึงทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน[1] ซึ่งศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ติดตั้งกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) ยี่ห้อ LEO รุ่น 1455VP เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนแบบ Thermionic Emission (Hairpin tungsten filament) ศักย์เร่งอิเล็กตรอนปรับเปลี่ยนได้ในช่วง 1-30 kV ติดตั้งพร้อม secondary electron detector, backscattered electron detector และระบบ energy-dispersive X-ray microanalysis สามารถทำงานในภาวะสุญญากาศสูง (HV Mode) และภาวะสุญญากาศต่ำ (VP Mode) ได้ ซึ่งในภาวะสุญญากาศต่ำ (VP mode) เหมาะสำหรับงานทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่ไม่ต้องการความแยกชัดของตัวอย่างสูงมาก จึงสามารถลดขั้นตอนกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากไปได้ แต่ตัวอย่างทางชีวภาพมีความหลากหลายและบางตัวอย่างต้องการความแยกชัดและรายละเอียดของภาพสูง จึงจำเป็นต้องทำในภาวะสุญญากาศสูง (HV Mode) [2]

ดังนั้น กระบวนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพจึงเป็นขั้นตอนที่มีความจำเป็นและความสำคัญอย่างมาก เพื่อทำให้ผิวชิ้นงานคงสภาพอยู่ได้ภายใต้สุญญากาศสูง (HV Mode) ไม่แตกหรือยุบตัว และให้ตัวอย่างมีรูปร่าง โครงสร้าง และขนาดใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติมากที่สุด จะทำให้ภาพที่ปรากฏออกมาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นภาพที่มีคุณภาพ เพราะตัวอย่างทางชีวภาพส่วนใหญ่ประกอบด้วย เซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ กระบวนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วย การเลือกเก็บตัวอย่าง (Specimen collection) การหยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพให้คงเดิมมากที่สุด ส่วนใหญ่นิยมใช้ 2.5% glutaraldehyde มีผลต่อการคงตัวของโปรตีนได้ดีมาก (Primary Fixation) การล้างนิยมใช้ 0.1M Phosphate buffer เพราะมีความคล้ายคลึงกับตัวอย่างมาก (Buffer wash) การคงสภาพตัวอย่างและสามารถรวมกับองค์ประกอบต่างๆของเซลล์เนื้อเยื่อได้ดี ทำให้มีความทนทานและมีสภาพที่ใช้ fix membraneและโครงสร้างที่ประกอบด้วยไขมันได้ (Post-fixation) การขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยการแทนที่ด้วยตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่ายนิยมใช้ethanol/acetone (Dehydration) การขจัดเอาของเหลวในเนื้อเยื่อออกให้หมดโดยที่โครงสร้างและลักษณะของผิวเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (Drying) การนำตัวอย่างไปติดบน stub และเคลือบผิวตัวอย่างให้นำอิเล็กตรอนด้วยโลหะหนัก (Coating) เมื่อผ่านขั้นตอนดังกล่าวแล้วจึงจะสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในสภาวะสุญญากาศสูง (HV Mode) ได้ ซึ่งชิ้นงานตัวอย่างต้องแห้งและนำไฟฟ้าเท่านั้น จึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ซับซ้อนและหลายขั้นตอน เพื่อให้ชิ้นงานตัวอย่างคงสภาพเดิมให้มากที่สุดจะนำมาซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ

จากประสบการณ์ทำงานที่ผ่านพบว่า ตัวอย่างชิ้นงานที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมตัวอย่างที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อสภาพของชิ้นงานตัวอย่าง ทำให้ชิ้นงานตัวอย่าง แตก เหี่ยว และยุบตัว ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการวิเคราะห์ชิ้นงานและผลงานวิจัยอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นความเป็นมาและความสำคัญดังกล่าวจึงเป็นเหตุให้ผู้เขียนจัดทำ คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ยี่ห้อLEO รุ่น 1455 VP) นี้ จัดทำขึ้นเพื่อให้เป็นประโยชน์แก่ นิสิต นักศึกษา อาจารย์ เจ้าหน้าที่ ผู้ช่วยวิจัย นักวิทยาศาสตร์ ผู้ดูแลกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และผู้สนใจงานทางด้านนี้ แต่ขาดความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพในเบื้องต้น และหลักการของเครื่องมือต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้นนั้น จึงรวบรวมเอกสารเพื่อ ใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ไม่เคยเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพมาก่อน สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยของตนเองได้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิเคราะห์และวิจัยในขั้นสูง ส่งผลต่อการพัฒนาประเทศในด้านต่างๆ ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้สามารถเตรียมสารเคมีที่เกี่ยวข้องในการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพได้
2. เพื่อให้เข้าใจหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อ LEO รุ่น 1455 VP
3. เพื่อให้เข้าใจหลักการการทำงานของเครื่องมือการเตรียมตัวอย่าง
4. เพื่อลดข้อผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่าง เพื่อจะให้ได้ผลการศึกษาที่ดี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเตรียมสารเคมีที่เกี่ยวข้องในการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพได้
2. เข้าใจหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น 1455 VPได้
3. เข้าใจหลักการการทำงานของเครื่องมือการเตรียมตัวอย่างได้
4. ผู้ปฏิบัติงาน ปฏิบัติได้ถูกต้อง ลดข้อผิดพลาดและลดเวลาในการทำปฏิบัติการ โดยได้รับผลงานที่มีคุณภาพตรงตามความต้องการ

ขอบเขตของการศึกษา

คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อLEO รุ่น 1455 VP นี้ ครอบคลุมตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง จนถึงหลักการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและเครื่องมือต่างๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งหน่วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ได้จัดทำคู่มือนี้ เพื่อให้นิสิต นักศึกษา อาจารย์ เจ้าหน้าที่ ผู้ช่วยวิจัย นักวิทยาศาสตร์ผู้ดูแลกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และผู้สนใจงานทางด้านนี้ สามารถใช้คู่มือนี้ศึกษาและประยุกต์ใช้กับตัวอย่างของตนได้ทุกครั้งก่อนส่งตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นิยามศัพท์เฉพาะ

BSE	หมายถึง	อิเล็กตรอนแบบกระเจิงกลับ (Back scattered electron) คือ Primary Electron ที่กระเจิงกลับออกมาจากผิวตัวอย่างกล่าวคือเมื่อ Primary Electron วิ่งเข้าใกล้หรือชน Nucleus ของอะตอมบนผิวของตัวอย่างก็จะเกิดการเปลี่ยนทิศทางและกระเจิงกลับออกมาจาก

ผิวตัวอย่าง ซึ่งจะเกิด BSE มากับธาตุที่มีเลขอะตอมสูงๆ สำหรับความเข้มของสัญญาณ BSE จะขึ้นกับมุมที่ Primary Electron ตกใส่ตัวอย่างและเลขอะตอมของธาตุที่ผิวตัวอย่าง [3]

BEI หมายถึง Backscattered Electron Image (BEI) เป็นสัญญาณภาพที่ได้จาก Backscattered Electron Detector (BED) ที่รับเอาพลังงานจาก Backscattered Electron ที่สะท้อนจากพื้นผิวของชิ้นงานมาประมวลผล โดยสัญญาณที่ได้ในแต่ละบริเวณจะแปรตามเลขอะตอม (atomic number, Z) ในเนื้อสารบริเวณนั้นๆ ภาพที่ได้จึงมีความสว่าง เข้มหรืออ่อนตามเลขอะตอมของธาตุที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อสาร (atomic contrast) BEI จึงสามารถแสดงภาพที่แยกแยะความแตกต่างของแต่ละบริเวณที่มีธาตุหรือสารประกอบต่างชนิดกันได้ หัววัด BED เป็นแบบ retractable สั่งการให้เลื่อนเข้าไปยังตำแหน่งเหนือชิ้นงานในระหว่างใช้งานและเลื่อนออกเมื่อไม่ได้ใช้งานได้เพื่อความปลอดภัยของหัววัด [4]

EDS หมายถึง Energy Dispersive X-Ray Spectrometer เป็นชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุเชิงพลังงาน การทำงานอาศัยหลักการ Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy ใช้การเร่งอิเล็กตรอนให้มีพลังงานสูงพอเหมาะพุ่งเข้าชนชิ้นงานซึ่งประกอบไปด้วยอะตอมของธาตุที่อยู่ในสถานะพื้นจนทำให้อิเล็กตรอนในระดับชั้นพลังงานวงในได้รับพลังงานจากการชนจนหลุดออกไปจากอะตอม แล้วอิเล็กตรอนจากวงนอกจึงคายพลังงานออกมาบางส่วนพร้อมกับเปลี่ยนชั้นพลังงานเข้ามาแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดออกไป พลังงานที่อิเล็กตรอนคายออกมานี้จะอยู่ในรูปรังสีเอกซ์และมีค่าเฉพาะตามธาตุนั้น เมื่อวัดค่าพลังงานรังสีเอกซ์นี้ด้วย EDS จะสามารถวิเคราะห์ได้ว่าชิ้นงานประกอบด้วยธาตุชนิดใด [4]

HV Mode หมายถึง High Voltage Mode เป็นระบบสภาวะสุญญากาศสูงของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งกราด จะให้รายละเอียดสูงกำลังขยายสูง ภาพคมชัดดี โดยตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ต้องนำไฟฟ้า ไม่มีความชื้น หากตัวอย่างไม่นำไฟฟ้า จะต้องสามารถเคลือบทองหรือ

คาร์บอนได้ โดยไม่ทำลายลักษณะผิวตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ทดสอบ [1]

Primary Electron หมายถึง อิเล็กตรอนปฐมภูมิ เป็นอิเล็กตรอนจาก Column เมื่อตกกระทบลงบนผิวของตัวอย่าง จะเหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อยอนุภาคและคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าตามคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างออกมา อนุภาคและคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาเหล่านี้ในเครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเรียกว่า "สัญญาณอิเล็กตรอน (Electron Signal) [3]

SE หมายถึง Secondary Electron (อิเล็กตรอนทุติยภูมิ) เป็นอิเล็กตรอนพลังงานต่ำที่เกิดจาก Primary Electron ไปชนเอาอิเล็กตรอนที่ผิวตัวอย่างหลุดออกมา ซึ่งอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะหลุดออกมาจากผิวตัวอย่างที่มีความลึกจากผิวไม่เกิน 10 นาโนเมตรและให้ภาพที่มีรายละเอียดสูง โดยความเข้มของ SE จะขึ้นอยู่กะมุมที่ Primary Electron ตกใส่ตัวอย่างและสภาพพื้นผิวของตัวอย่าง [3]

SEI หมายถึง Secondary Electron Image (SEI) เป็นสัญญาณภาพที่ได้จาก Secondary Electron Detector (SED) ที่รับเอาพลังงานจาก secondary electron ที่หลุดออกมาจากพื้นผิวของชิ้นงานเมื่อถูกลำอิเล็กตรอนชนมาประมวลผล ภาพที่ได้แสดงให้เห็นลักษณะของพื้นผิวของตำแหน่งที่สนใจบนชิ้นงาน (Morphology) ศักย์เร่งอิเล็กตรอนปรับเปลี่ยนได้ในช่วง 0.5-30 kV ตามประเภทของชิ้นงาน สามารถเพิ่มกำลังขยายได้สูงถึงประมาณ 1,000,000 เท่า ภายใต้สภาวะการใช้งานที่เหมาะสม โดยทั่วไปการใช้งานปกติ มักจะได้กำลังขยายถึงประมาณ 300,000 เท่า และยังสามารถเลือกโหมดป้องกันการสะสมของประจุบนชิ้นงานโดยใส่ความต่างศักย์ไปยังชิ้นงานเพื่อไล่ประจุสะสม [4]

SEM หมายถึง Scanning Electron Microscope เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การสร้างภาพทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็นภาพลักษณะของ 3 มิติ ดังนั้นเครื่อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิว

ของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น [5]

TEM หมายถึง Transmission Electron Microscope เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบางซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนั่นเอง เครื่อง TEM เหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (กำลังขยายสูงสุดประมาณ 0.1นาโนเมตร) [5]

VP Mode หมายถึง Variable Pressure Mode เป็นระบบสภาวะสุญญากาศต่ำของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จะให้รายละเอียดที่ต่ำ กำลังขยายต่ำ โดยตัวอย่างต้องไม่มีความชื้นอาจไม่ต้องนำไฟฟ้าก็ได้ ไม่ต้องมีการเคลือบผิวตัวอย่างด้วยทองหรือคาร์บอน [1]

X-ray หมายถึง รังสีเอกซ์ (X-ray) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้น มีความถี่สูง เกิดจากการที่ลำอิเล็กตรอนพลังงานสูงวิ่งเข้าชนชิ้นงาน ทำให้อิเล็กตรอนในระดับชั้นโคจรต่างๆ (K, L, M, ...) ได้รับพลังงานมากพอจนหลุดออกจากวงโคจร แล้วอิเล็กตรอนจากชั้นโคจรถัดไปเข้ามาแทนที่ ทำให้มีการปลดปล่อยรังสีเอกซ์ออกมา ซึ่งสเปกตรัมของรังสีเอกซ์ที่ปล่อยออกมานี้สามารถนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยค่าพลังงานนี้จะขึ้นกับเลขอะตอมของธาตุ ซึ่งจะใช้หัววัดรังสีเอกซ์ (EDS) ในการวิเคราะห์ข้อมูลประกอบกับ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกวาด (SEM) [1]

บทที่ 2

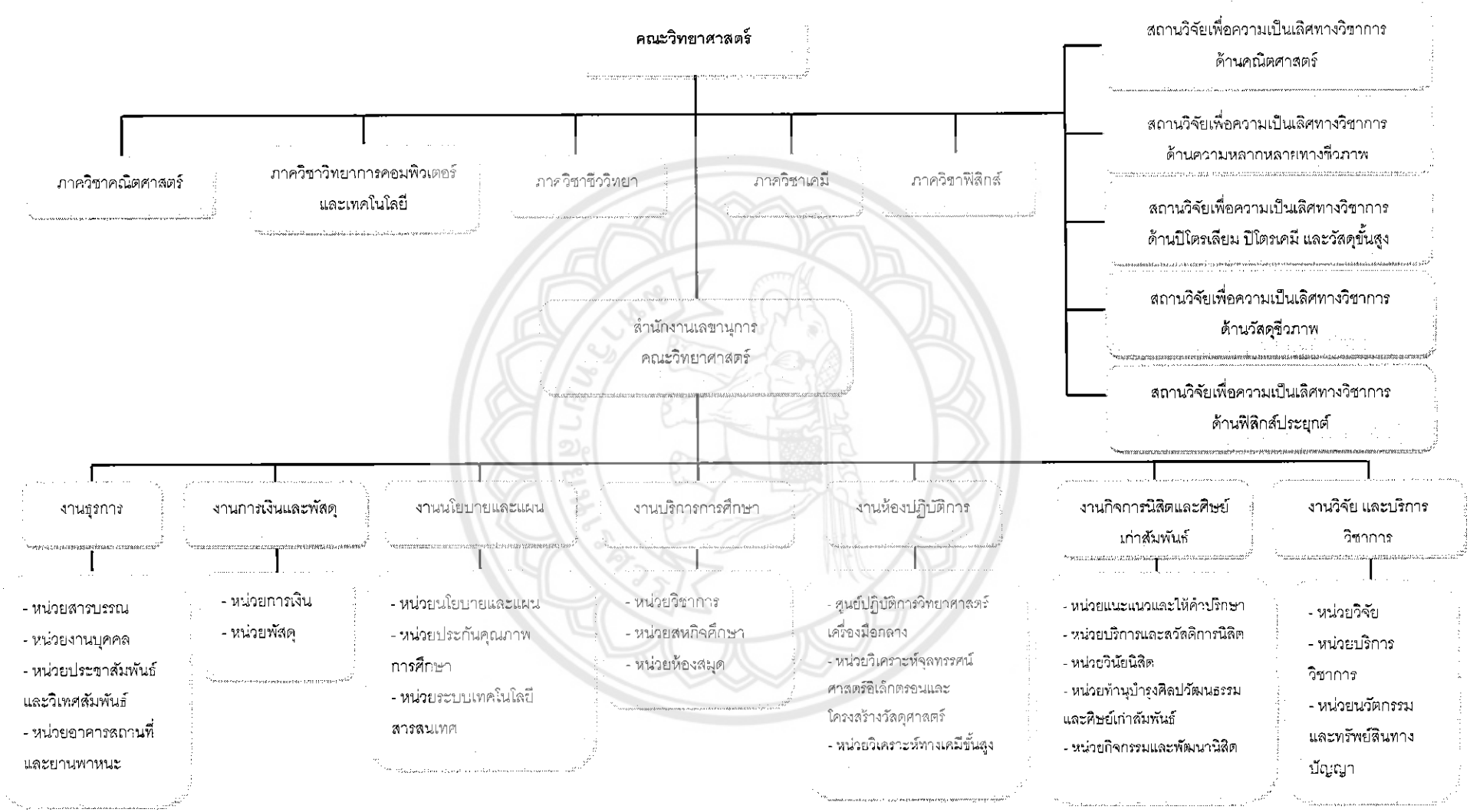
โครงสร้าง และหน้าที่ความรับผิดชอบ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เดิมคือ คณะวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ วิทยาลัยวิชาการศึกษาพิษณุโลก ซึ่งเป็นวิทยาเขตหนึ่งของวิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร ได้ก่อตั้งขึ้นเมื่อปี พ.ศ.2510 ต่อมาในปี พ.ศ. 2517 วิทยาลัยวิชาการศึกษาได้รับการยกฐานะเป็นมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดังนั้น วิทยาลัยวิชาการศึกษา พิษณุโลกจึงเปลี่ยนชื่อเป็นมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พิษณุโลก ต่อมามหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พิษณุโลก ได้รับการยกฐานะเป็นมหาวิทยาลัยนเรศวร โดยพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานนามมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อวันที่ 9 ตุลาคม 2532 และได้ตราพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. 2533 ประกาศในราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษเล่มที่ 107 ตอนที่ 131 ลงวันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2533 คณะวิทยาศาสตร์ จึงได้รับการจัดตั้งตามพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. 2533 เป็นต้นมา (มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2535) ปัจจุบันคณะวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย 11 หน่วยงาน คือ สำนักงานเลขานุการ ภาควิชาคณิตศาสตร์ ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาฟิสิกส์ และภาควิชาวิทยาการคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านคณิตศาสตร์ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมี และวัสดุขั้นสูง สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านวัสดุชีวภาพ (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, ม.ป.ป.) และสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านฟิสิกส์ประยุกต์ (สภามหาวิทยาลัยนเรศวร, 21 มกราคม 2557)

โครงสร้างหน่วยงาน

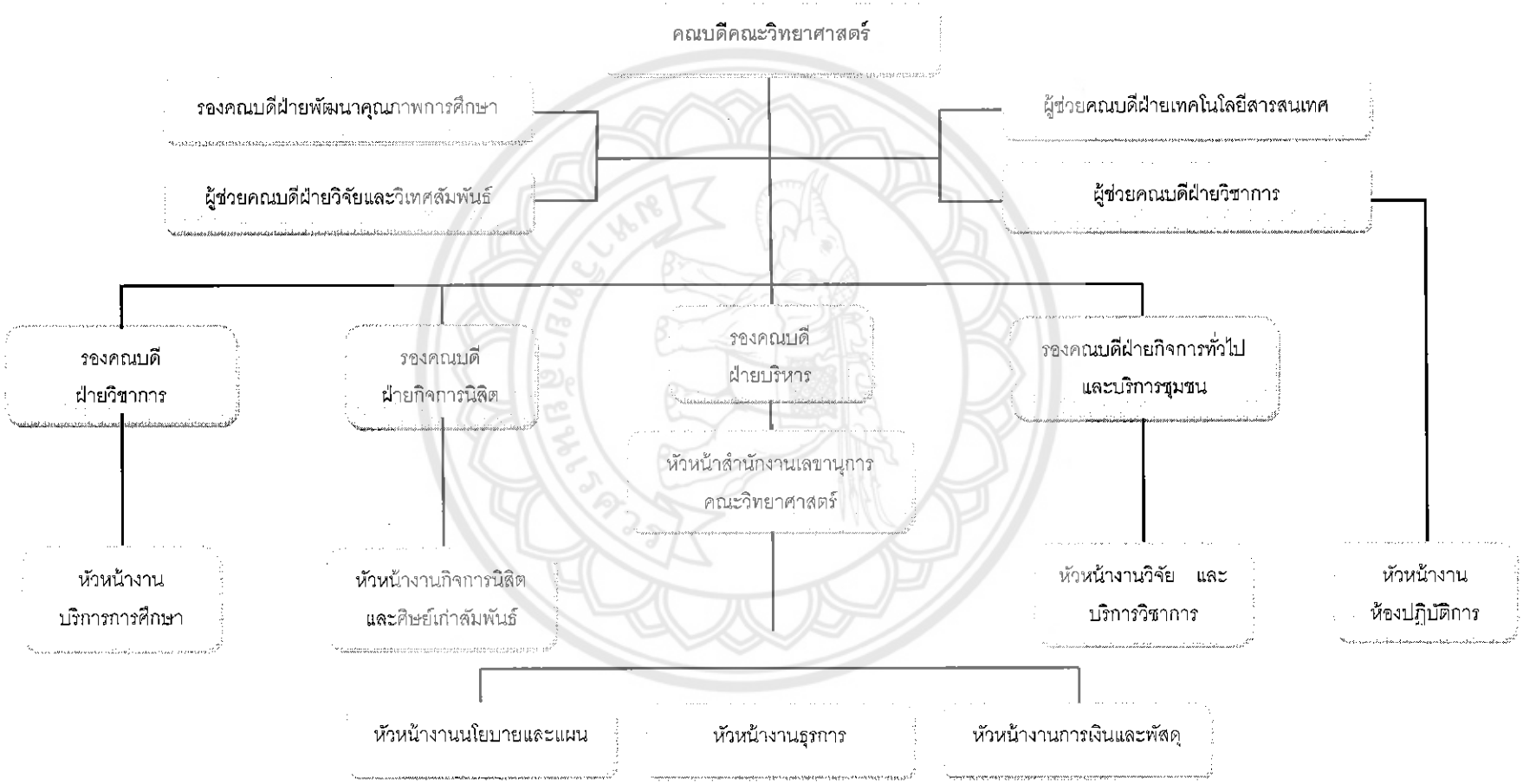
สำนักงานเลขานุการ คณะวิทยาศาสตร์ มีโครงสร้างของหน่วยงาน โครงสร้างการบริหาร โครงสร้างการปฏิบัติงาน และภาระหน้าที่ของหน่วยงาน ดังนี้

1) โครงสร้างของสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์



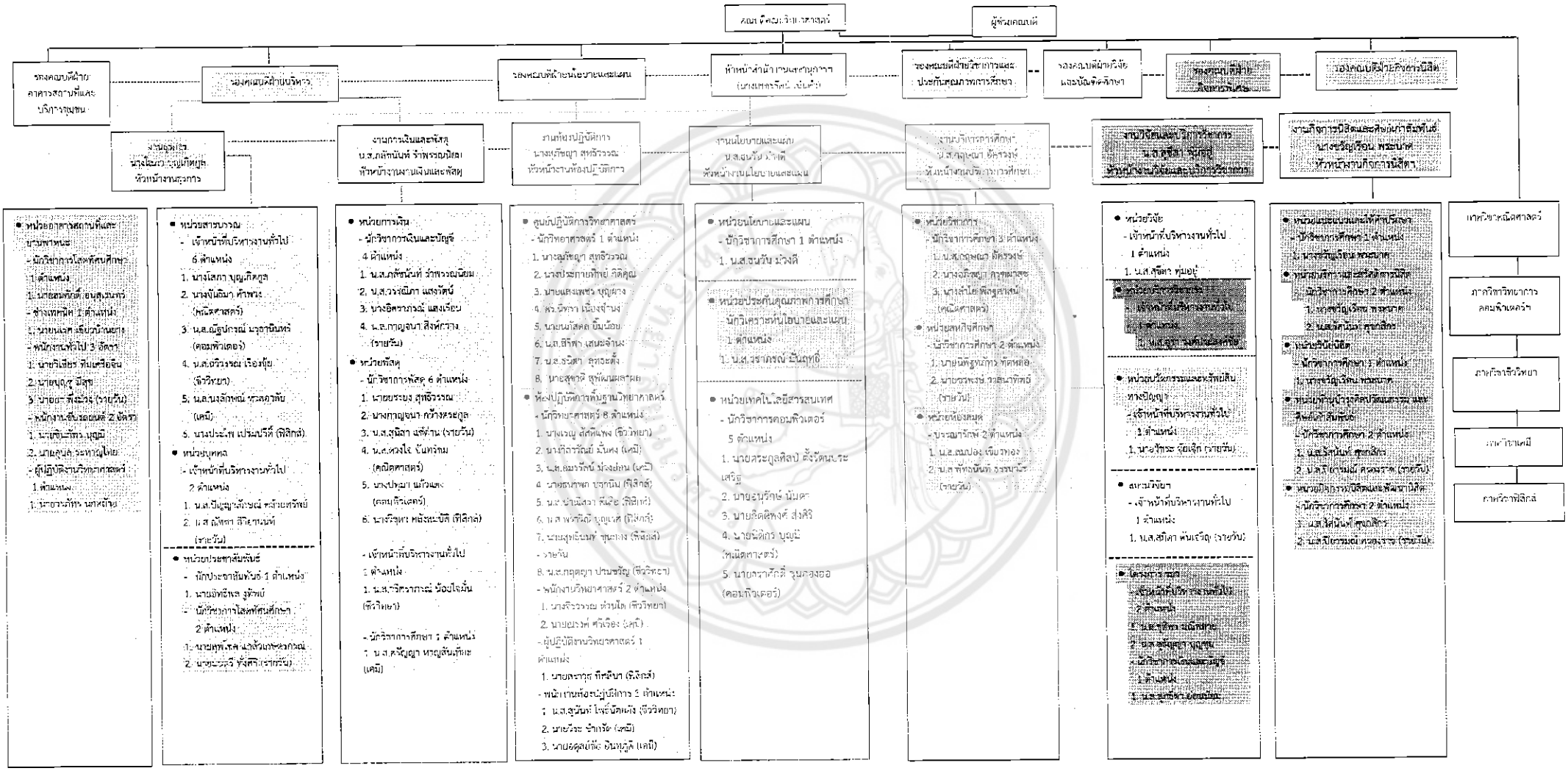
รูปที่ 1 โครงสร้างของสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์

2) **โครงสร้างการบริหารสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์**



รูปที่ 2 โครงสร้างการบริหารสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์

3) โครงสร้างการปฏิบัติงานสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์



รูปที่ 3 โครงสร้างการปฏิบัติงานสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์

4) **ภาระหน้าที่ของสำนักงานเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์**

สำนักงานเลขานุการ เป็นหน่วยงานกลางในการบริหารคณะวิทยาศาสตร์ ทำหน้าที่สนับสนุนให้งานของคณะเป็นไปอย่างราบรื่นและบรรลุผลสำเร็จ ได้แก่ งานด้านการเรียนการสอน งานวิจัย งานบริการวิชาการ และงานทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม โดยสำนักงานเลขานุการมีหน้าที่ในการประสานงานดำเนินการ และติดตามประเมินผล เพื่อให้งานของคณะบรรลุวัตถุประสงค์ตามเป้าหมายและนโยบายที่ผู้บริหารกำหนดไว้ นอกจากนั้นยังมีหน้าที่ในการกำกับ ตรวจสอบ วิเคราะห์ กลั่นกรองงานในด้านต่างๆ ให้เป็นไปอย่างถูกต้องตาม กฎ ระเบียบ ข้อบังคับของทางราชการ เพื่อให้การปฏิบัติงานมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น สำนักงานเลขานุการ คณะวิทยาศาสตร์ มีภาระหน้าที่ แบ่งตามงาน 7 งาน ประกอบด้วย งานธุรการ งานการเงินและพัสดุ งานนโยบายและแผน งานบริการการศึกษา งานห้องปฏิบัติการ งานกิจการนิสิตและศิษย์เก่าสัมพันธ์ และงานวิจัยและบริการวิชาการ

(1) **งานธุรการ** มีหน้าที่ในการรับ-ส่งหนังสือ การเสนอหนังสือ การโต้-ตอบหนังสือ การจัดเก็บเอกสาร และการทำลายเอกสาร (ตามระเบียบสำนักนายกรัฐมนตรี ว่าด้วยงานสารบรรณ พ.ศ. 2526 และที่แก้ไขเพิ่มเติม)

หน่วยบุคคล มีหน้าที่ในการบริหารงานบุคคลของบุคลากรภายในคณะวิทยาศาสตร์ ทุกประเภทที่เกี่ยวข้องกับบุคลากร ในเรื่องการบรรจุและแต่งตั้ง การคัดเลือก การสรรหา การรับโอน การย้าย การปรับวุฒิ การประเมินผลการทดลองปฏิบัติงาน การขอตำแหน่งทางวิชาการ การเลื่อน ระดับตำแหน่งที่สูงขึ้น การเลื่อนขั้นเงินเดือนข้าราชการและลูกจ้างประจำ การจัดทำแฟ้มประวัติของ บุคลากร การลาของบุคลากร การเสนอขอพระราชทานเครื่องราชอิสริยาภรณ์ประจำปี การศึกษาต่อ ของบุคลากร การจ้างผู้มีความรู้ความสามารถเป็นอาจารย์ การจ้างผู้เชี่ยวชาญชาวต่างประเทศ การเกษียณอายุราชการ เป็นต้น

หน่วยประชาสัมพันธ์ มีหน้าที่จัดทำสื่อประชาสัมพันธ์ของคณะวิทยาศาสตร์ ดำเนินการและประสานงานโครงการสหกิจศึกษาภายนอกประเทศ ประสานงานกับงานวิเทศสัมพันธ์ของทางมหาวิทยาลัย

หน่วยอาคารสถานที่และยานพาหนะ มีหน้าที่ควบคุมดูแลระบบไฟฟ้า ระบบโทรศัพท์ ระบบประปา ควบคุมดูแลโสตทัศนูปกรณ์ในห้องประชุม ห้องสัมมนา ดูแลปรับปรุงต้นไม้บริเวณรอบอาคารเรียนรวม ตรวจเช็ค ซ่อมบำรุงอุปกรณ์ สื่อโสตทัศนูปกรณ์ ดูแลซ่อมแซมอุปกรณ์ต่างๆ และให้บริการด้านยานพาหนะให้กับบุคลากรภายในคณะวิทยาศาสตร์

(2) **งานการเงินและพัสดุ** มีหน้าที่ควบคุมการเบิกจ่ายเงินงบประมาณแผ่นดินและเงินนอกงบประมาณของคณะวิทยาศาสตร์ให้เป็นไปตามแผนการเบิกจ่ายที่ได้วางไว้ตามแผนปฏิบัติการประจำปีที่

วางไว้ และดูแลการเบิกจ่ายงบประมาณแผ่นดินและเงินนอกงบประมาณของหน่วยงานให้เป็นไปตามระเบียบกระทรวงการคลัง ระเบียบพัสดุ ระเบียบเงินรายได้มหาวิทยาลัย และระเบียบต่างๆที่เกี่ยวข้อง

(3) **งานนโยบายและแผน** มีหน้าที่วิเคราะห์นโยบายและการวางแผน กำหนดนโยบาย จัดทำแผนหรือโครงการ วิเคราะห์ค่าใช้จ่าย ติดตามประเมินผลการดำเนินงานตามแผนและโครงการต่างๆ ประสานการจัดทำแผนต่างๆ เพื่อให้การปฏิบัติงาน แผนงาน โครงการ หรือกิจกรรมได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

หน่วยประกันคุณภาพ มีหน้าที่ในการดูแลงานด้านประกันคุณภาพการศึกษา ของคณะวิทยาศาสตร์ โดยเป็นศูนย์กลางของคณะ และภาควิชาในการดำเนินงานด้านการประกันคุณภาพการศึกษา ในการตรวจสอบและประเมินการดำเนินงานของภาควิชา และคณะ ตามระบบคุณภาพและกลไกที่สถาบันกำหนดขึ้น โดยมีการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามตัวบ่งชี้ในทุกองค์ประกอบคุณภาพว่าเป็นไปตามเกณฑ์และได้มาตรฐาน เพื่อให้ทราบสถานภาพของตนเองอันจะนำไปสู่การกำหนดแนวทางในการพัฒนาคุณภาพไปสู่ เป้าหมาย และเป้าประสงค์ ที่ตั้งไว้ และมีการพัฒนาสิ่งใหม่ๆ เกี่ยวกับการประกันคุณภาพการศึกษาอย่างต่อเนื่อง และเรียนรู้ตลอดไปตามเกณฑ์การประเมินที่มีการเปลี่ยนแปลง และมีการนำหลัก PDCA เข้ามาใช้ในการประกันคุณภาพอย่างต่อเนื่อง

หน่วยเทคโนโลยีสารสนเทศ มีหน้าที่พัฒนาและปรับปรุงเว็บไซต์ของคณะวิทยาศาสตร์ให้มีความทันสมัยอยู่เสมอ ดูแลควบคุมจัดการระบบอินเตอร์เน็ตและระบบเครือข่ายคอมพิวเตอร์ ควบคุมดูแลและออกแบบพัฒนาระบบฐานข้อมูลเพื่อตอบสนองความต้องการของหน่วยงานต่างๆ ให้คำปรึกษาและซ่อมบำรุงเกี่ยวกับระบบคอมพิวเตอร์ของคณะวิทยาศาสตร์ ควบคุมดูแลระบบคอมพิวเตอร์ระบบเน็ตเวิร์ค และระบบฐานข้อมูลทั้งหมดของคณะวิทยาศาสตร์

(4) **งานบริการการศึกษา** มีหน้าที่ สนับสนุนการให้บริการวิชาการ ตรวจสอบ รักษา ควบคุมมาตรฐานทางวิชาการ ให้บริการด้านการจัดการเรียนการสอน อำนวยความสะดวกการใช้ห้องเรียน ห้องประชุม และพื้นที่ใช้สอยอื่นๆ แก่ผู้รับบริการ

(5) **งานห้องปฏิบัติการ** มีหน้าที่ ให้บริการด้านการวิเคราะห์ทดสอบชิ้นงานประเภทต่างๆ อบรมสัมมนาให้ความรู้เกี่ยวกับเครื่องมือต่างๆ ให้บริการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตลอดจนสร้างความร่วมมือทางวิชาการ งานวิจัย ระหว่างคณะวิทยาศาสตร์กับหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย รวมทั้งภาครัฐและเอกชน เพื่อสนับสนุนอาจารย์ นิสิต และบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในมหาวิทยาลัยนเรศวรได้มีโอกาสคิดค้นคว้างานวิจัย และสิ่งประดิษฐ์ใหม่ๆ ได้กว้างขวางมากขึ้น โดยใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ชั้นสูง

(6) **งานกิจการนิสิตและศิษย์เก่าสัมพันธ์** มีหน้าที่เป็นศูนย์กลางพัฒนานิสิต ส่งเสริม สนับสนุนการเรียนรู้ และพัฒนาประสบการณ์ของนิสิต จัดบริการและสวัสดิการ แนะแนวและให้คำปรึกษาที่เอื้อต่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตนิสิต และส่งเสริมสนับสนุน ประสานความร่วมมือระหว่างนิสิตเก่ากับนิสิตปัจจุบัน และมหาวิทยาลัย

(7) **งานวิจัยและบริการวิชาการ** หน้าที่เกี่ยวกับการดูแลประสานงานในการจัดโครงการ/กิจกรรมต่างๆ เพื่อสนับสนุนการทำวิจัย การบริการวิชาการ การสร้างนวัตกรรม การจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญาของบุคลากรภายในคณะวิทยาศาสตร์ การประชาสัมพันธ์ และจัดหาแหล่งทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ทุนโครงการบริการวิชาการ จากทั้งหน่วยงานภายในและภายนอก รวมถึงการสร้างความร่วมมือด้านการวิจัยและบริการวิชาการระหว่างหน่วยงานกับบุคคลภายนอกมหาวิทยาลัย เพื่อตอบสนองความต้องการชุมชน อาทิ โรงเรียน โรงพยาบาล องค์การบริหารส่วนท้องถิ่น หรือชุมชนใกล้เคียง ในเชิงบูรณาการวิจัยและบริการวิชาการเพื่อพัฒนาท้องถิ่น

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

2.1 ภาระงานตามมาตรฐานกำหนดตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการ

1) ลักษณะงานโดยทั่วไป

สายงานนี้คลุมถึงตำแหน่งต่างๆที่ปฏิบัติงานวิเคราะห์ วิจัย และทดสอบทางวิทยาศาสตร์และทางเทคโนโลยี ซึ่งมีลักษณะงานที่ปฏิบัติเกี่ยวกับการทดสอบ วิเคราะห์และวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสาขาต่างๆ เช่นการวิเคราะห์วัตถุดิบ แร่ธาตุ อาหาร และผลิตภัณฑ์ การวิจัยทรัพยากรธรรมชาติเกษตรกรรม การวิจัยเรื่องถนอมอาหาร เป็นต้น เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ เทคนิควิธีการและเทคโนโลยีใหม่ๆ หรือเพื่อใช้ประโยชน์ในวงการอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม และเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน และปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง ซึ่งตำแหน่งต่างๆเหล่านี้มีลักษณะงานที่จำเป็นต้องใช้ผู้มีความรู้ความชำนาญในวิชาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

2) ชื่อตำแหน่งในสายงานและระดับตำแหน่ง

ตำแหน่งในสายงานนี้มีชื่อและระดับของตำแหน่งดังนี้

นักวิทยาศาสตร์	ระดับเชี่ยวชาญพิเศษ
นักวิทยาศาสตร์	ระดับเชี่ยวชาญ
นักวิทยาศาสตร์	ระดับชำนาญการพิเศษ
นักวิทยาศาสตร์	ระดับชำนาญการ
นักวิทยาศาสตร์	ระดับปฏิบัติการ

2.2.3 หน้าที่ความรับผิดชอบหลักของนักวิทยาศาสตร์ระดับตำแหน่งปฏิบัติการ

ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานระดับต้นที่ต้องใช้ความรู้ความสามารถทางวิชาการในการทำงานปฏิบัติงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้การกำกับ แนะนำ ตรวจสอบ และปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย

โดยมีลักษณะงานที่ปฏิบัติในด้านต่างๆ ดังนี้

1) ด้านการปฏิบัติการ

(1) ศึกษา ค้นคว้า ทดลอง วิเคราะห์ข้อมูล และร่วมดำเนินการวิจัย เผยแพร่ผลงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อสร้างองค์ความรู้และพัฒนาอุตสาหกรรม

(2) วิเคราะห์ ทดสอบ ตรวจสอบ ตรวจวัด ตรวจพิสูจน์ วินิจฉัย ทางวิทยาศาสตร์ของวัตถุตัวอย่าง สอบเทียบเครื่องมือ อุปกรณ์วัด เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้อง จัดทำฐานข้อมูลปฏิบัติการ ส่งเสริมพัฒนาห้องปฏิบัติการ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน

(3) ให้บริการวิชาการด้านต่างๆ เช่นให้คำปรึกษา แนะนำ ในการปฏิบัติงานแก่เจ้าหน้าที่ระดับรองลงมาและแก่นักศึกษาที่มาฝึกปฏิบัติงาน ตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่างๆเกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง มีประสิทธิภาพ และปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง

2) ด้านการวางแผน

วางแผนการทำงานที่รับผิดชอบ ร่วมวางแผนการทำงานของหน่วยงานหรือโครงการเพื่อให้การดำเนินงานบรรลุตามเป้าหมายและผลสัมฤทธิ์ที่กำหนด

3) ด้านการประสานงาน

(1) ประสานการทำงานร่วมกันระหว่างทีมงานหรือหน่วยงาน ทั้งภายในและภายนอก เพื่อให้เกิดความร่วมมือและผลสัมฤทธิ์ตามที่กำหนดไว้

(2) ชี้แจงและให้รายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูล ข้อเท็จจริง แก่บุคคลหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างความเข้าใจหรือความร่วมมือในการดำเนินงานตามที่ได้รับมอบหมาย

4) ด้านการบริการ

(1) ให้คำปรึกษา แนะนำเบื้องต้น เผยแพร่ ถ่ายทอดความรู้ ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมทั้งตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่างๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้ผู้รับบริการ ได้รับทราบข้อมูลความรู้ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์

(2) จัดเก็บข้อมูลเบื้องต้น และให้บริการข้อมูลทางวิชาการ เกี่ยวกับด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อให้บุคลากรทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน นักศึกษา ตลอดจน

ผู้รับบริการ ได้ทราบข้อมูลและความรู้ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ สอดคล้อง และสนับสนุนภารกิจของหน่วยงาน และใช้ประกอบการพิจารณากำหนดนโยบาย แผนงาน หลักเกณฑ์ มาตรการต่างๆ

2.2.4 คุณสมบัติเฉพาะสำหรับตำแหน่ง

มีคุณวุฒิอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้

1) ได้รับปริญญาตรีหรือเทียบได้ไม่ต่ำกว่านี้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหรือในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

2) ได้รับปริญญาโทหรือเทียบได้ไม่ต่ำกว่านี้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหรือในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

3) ได้รับปริญญาเอกหรือเทียบได้ไม่ต่ำกว่านี้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหรือในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

2.2.5 ความรู้ความสามารถ ทักษะ และสมรรถนะที่จำเป็นสำหรับตำแหน่ง

ความรู้ความสามารถ ทักษะ และสมรรถนะที่จำเป็นสำหรับตำแหน่งให้เป็นไปตามที่สภาสถาบันอุดมศึกษากำหนด

ภาระงานของนางประกายทิพย์ กิติคุณ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการตามที่ได้รับมอบหมาย

ภาระงานที่ได้รับมอบหมายของนางประกายทิพย์ กิติคุณ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการ ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานระดับต้น ที่ต้องใช้ความรู้ ความสามารถทางวิชาการในการทำงาน ปฏิบัติงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยมีลักษณะงานที่ปฏิบัติในด้านต่างๆ ดังนี้

1) ด้านการปฏิบัติการ

รับผิดชอบงานหน่วยบริการกล้องจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนและโครงสร้างวัสดุสาสตร์ ให้บริการตรวจวิเคราะห์ และให้คำปรึกษา แนะนำ เป็นวิทยากรบรรยาย จัดอบรม เตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาและทางวัสดุศาสตร์ บำรุงรักษาเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่รับผิดชอบทำการซ่อมแซมและเปลี่ยนอุปกรณ์บางอย่างที่ชำรุดและสามารถทำการเปลี่ยนด้วยตัวเองได้ งานระบบสารสนเทศของเวปไซต์ของศูนย์ปฏิบัติการ ดูแลจัดการระบบในส่วนของเปิดคิวจอง การตรวจรับการจองงาน งานจัดทำคู่มือ การลงบันทึกการใช้งานเครื่องมือที่รับผิดชอบ ประกอบด้วย เครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูง เครื่องมือการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยา และเครื่องมือตรียมทางวัสดุศาสตร์ มีดังนี้

(1) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)

(2) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

(3) วิเคราะห์ด้วยระบบไมโครอะนาไลซีส (Energy Dispersive X-ray Spectrometer)

(4) เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทองและคาร์บอน (Sputter Coater)

(5) เครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ อุณหภูมิวิกฤต (Critical Point Drier)

(6) เครื่องตัดชิ้นงานแบบบางพิเศษ (Ultramicrotome)

(7) เครื่องเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติ (Automatic Tissue Processor)

(8) เครื่องตัดใบมีดแก้ว (Glass Knife Maker)

(9) เครื่องหมุนเหวี่ยงชิ้นงาน (Specimen Rotary Shaker)

(10) เครื่องทำความสะอาดด้วยคลื่นเสียง (Ultrasonic Cleaner)

(11) เครื่องตัดชิ้นงานตัวอย่างและอุปกรณ์ประกอบ

(12) เครื่องขัดผิวงานชิ้นหยาบและละเอียดชนิดจานเดี่ยว

(13) เครื่องอัดยึดชิ้นงานด้วยเรซิ่นและอุปกรณ์ประกอบ

(14) เครื่องเตรียมชิ้นงานชนิดฟิล์มบางและอุปกรณ์ประกอบ

2) ด้านการวางแผน

ดำเนินการจัดทำแผนการจัดซื้อจัดวัสดุวิทยาศาสตร์ จัดทำแผนการจัดซื้อครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ จัดทำแผนค่าใช้จ่าย จัดทำแผนบำรุงรักษาเครื่องมือที่รับผิดชอบ จัดทำแผนการควบคุมการเบิก-จ่ายสารเคมี จัดทำแผนการจัดซื้อแก๊สทุกชนิดที่ต้องใช้เป็นประจำ จัดทำแผนการเข้าตรวจสอบและบำรุงรักษาเครื่องมือ โดยวิศวกรผู้ชำนาญการ จัดทำแผนการปฏิบัติงานของนิสิตช่วยงาน,นิสิตฝึกงานและนักวิทยาศาสตร์ ของหน่วยงานกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและโครงสร้างวัสดุศาสตร์ ศูนย์ปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานเลขานุการ คณะวิทยาศาสตร์

3) ด้านการประสานงาน

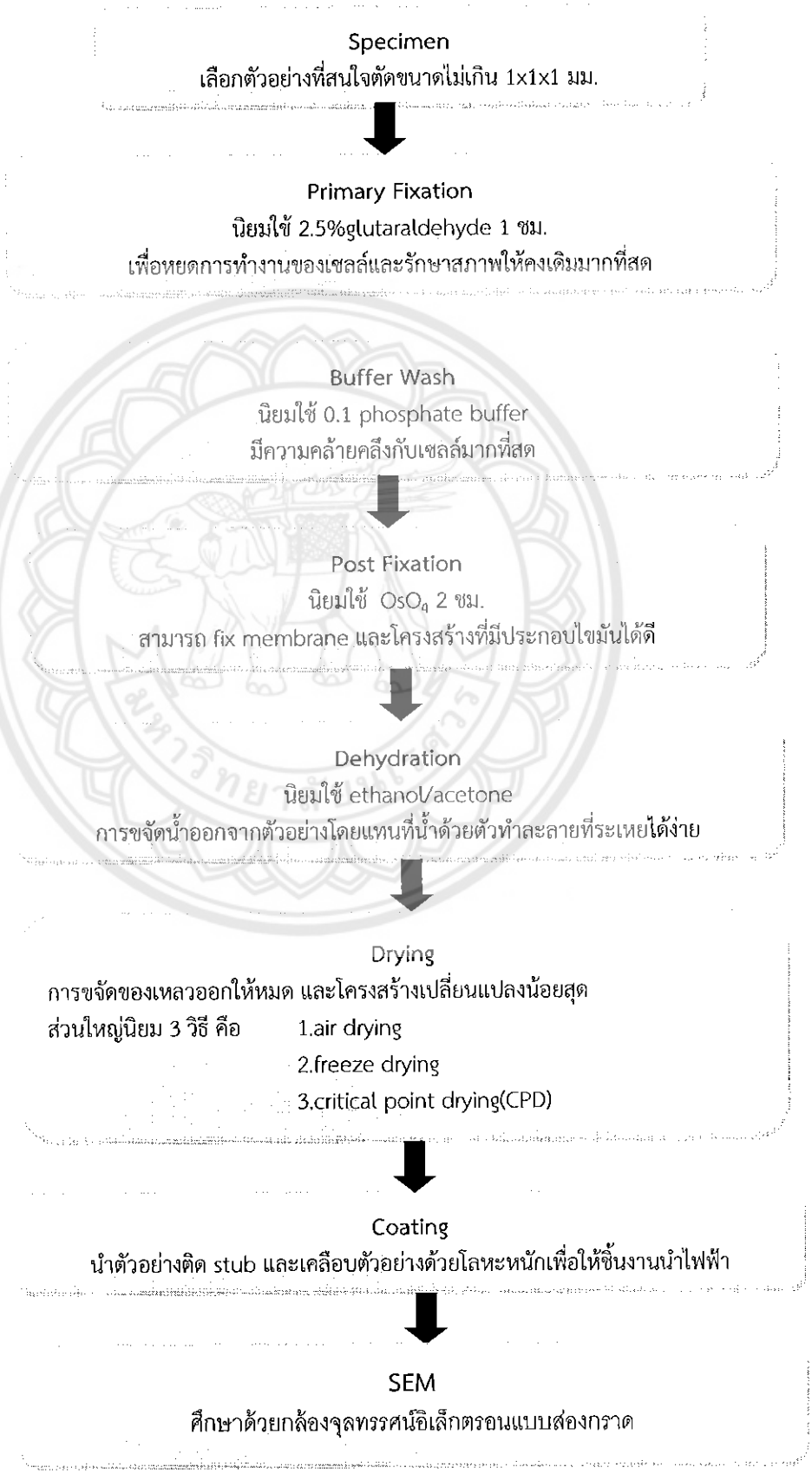
ติดต่อประสานงานวิศวกรประจำเครื่องมือที่รับผิดชอบในการซ่อมบำรุงเครื่องมือ ติดต่อประสานงานอาจารย์ที่ปรึกษา เกี่ยวกับการจัดซื้อครุภัณฑ์และวัสดุ รวมถึงการตรวจรับและตรวจสอบสินค้าให้ตรงตามรายละเอียดครุภัณฑ์ ติดต่อประสานงานกับงานด้านพัสดุ ครุภัณฑ์ รวมถึงการจัดจ้างซ่อมบำรุงเครื่องมือในส่วนของ ห้องปฏิบัติการที่รับผิดชอบ ติดต่อประสานงานกับบริษัทตัวแทนจำหน่ายเพื่อขอรายละเอียดวัสดุและครุภัณฑ์ ติดต่อประสานงานกับระบบงานสารสนเทศเพื่อการปรับปรุงเวปไซต์ของศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ จัดประชุมกลุ่มย่อยและประชุมคณะกรรมการเกี่ยวกับการวางแผน การปรึกษาหาแนวทางแก้ไขปัญหาด้านการปฏิบัติงานร่วมกัน ของศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ สำนักงานเลขานุการ คณะวิทยาศาสตร์

4) ด้านการบริการ

งานบริการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูง เครื่องมือเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาและทางวัสดุศาสตร์ ในการเรียนการสอนและงานวิจัย งานบริการตอบข้อสงสัยทางจดหมายอิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) งานบริการการจองคิวและตรวจรับการจองด้วยระบบสารสนเทศของศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ งานบริการเป็นวิทยากรนำเยี่ยมชมเพื่อขอศึกษาดูงาน เครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูง ของหน่วยจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนและโครงสร้างวัสดุศาสตร์ และงานบริการวิชาการโดยเป็นผู้ช่วยสอนภาคปฏิบัติการเรื่องการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาและทางวัสดุศาสตร์และเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง อบรมการใช้งานกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และเครื่องมือเตรียมตัวอย่างที่เกี่ยวข้องแก่ นิสิต อาจารย์ และบุคลากรภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย

ในภาระงานหลายอย่างที่ได้รับมอบหมายให้ปฏิบัติงานนั้น ข้าพเจ้าได้นำภาระงานด้านการปฏิบัติการเกี่ยวกับการให้บริการและคำนำเกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ สำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มาจัดทำ "**คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด** (SEM **รุ่น** 1455 VP)" และมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ



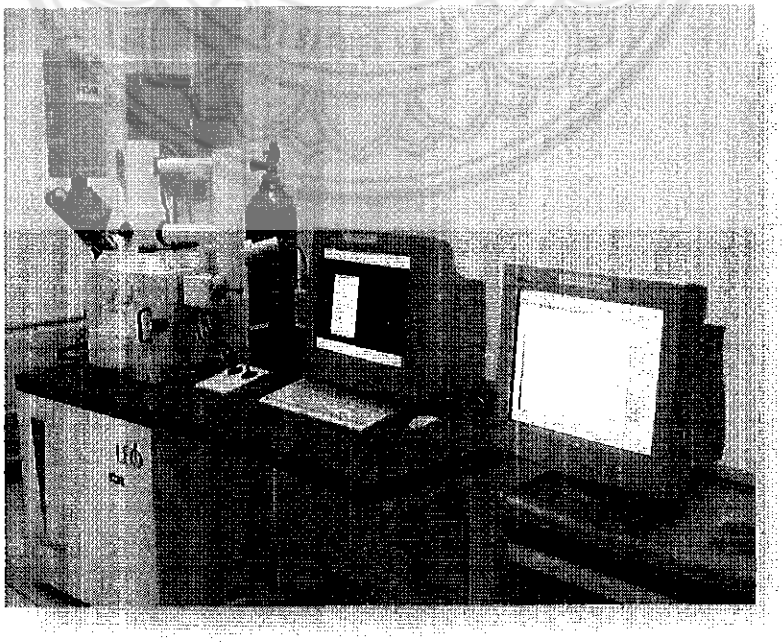
รูปที่ 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ

บทที่ 3
หลักการและเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงาน

คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สำหรับ SEM รุ่น 1455 VP นั้น ต้องอาศัยทฤษฎีและ หลักการที่เกี่ยวข้องมีดังนี้

- หลักการ Scanning Electron Microscope(SEM) รุ่น 1455 VP
- การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างขั้นต้น(Specimen)
- การคงสภาพปฐมภูมิ(Primary Fixation)
- การล้างน้ำยาคงสภาพ(Buffer Wash)
- การคงสภาพทุติยภูมิ(Post Fixation)
- การขจัดน้ำ(Dehydration)
- การทำแห้ง(drying)
- การติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่งยึดตัวอย่าง(mounting)
- การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก(metal coating)

หลักการ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)



รูปที่ 5 Scanning Electron Microscope รุ่น 1455 VP [2]

ชื่อรุ่น	LEO 1455 VP
	ติดตั้งพร้อมระบบ energy-dispersive X-ray microanalyser
ที่อยู่บริษัทผู้ผลิต	LEO Electron Microscopy Ltd
	Clifton Road Cambridge CB1 3QH England
ติดตั้งเมื่อ	30 กรกฎาคม พ.ศ. 2545
สถานที่ติดตั้ง	ภาควิชาฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

กล้อง LEO 1455VP เป็นกล้องแบบส่องกราดที่มีแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนแบบ Thermionic Emission [Hairpin tungsten filament] ศักย์เร่งอิเล็กตรอนปรับเปลี่ยนได้ในช่วง 1-30 kV ทำงานในภาวะสุญญากาศสูงและสุญญากาศต่ำ ในช่วง 1-400 Pa เหมาะสำหรับงานทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ในอดีตกล้องแบบส่องกราดจะทำงานในภาวะสุญญากาศสูง การศึกษาชิ้นงานทางชีววิทยาจึงต้องผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นงานที่ยุ่งยากซับซ้อนเพื่อทำให้ผิวชิ้นงานคงสภาพอยู่ได้ภายใต้สุญญากาศสูง ไม่แตกหรือยุบตัว ความยุ่งยากซับซ้อนของการเตรียมชิ้นงานดังกล่าวจะลดลงไปมากหากใช้กล้องแบบส่องกราดที่สามารถทำงานในภาวะสุญญากาศต่ำ กล้อง LEO 1455VP มีความแยกชัด (resolution) ในภาวะสุญญากาศต่ำเท่ากับ 4.5 นาโนเมตร ชิ้นงานขนาดใหญ่ที่สุดที่สามารถบรรจุได้คือ 20 เซนติเมตร นั่นคือดอกกุหลาบดอกใหญ่ทั้งดอกก็สามารถใส่เข้าไปในห้องสุญญากาศของกล้องได้ ติดตั้งพร้อม secondary electron detector, backscattered electron detector และ energy-dispersive X-ray microanalyser ระบบ energy-dispersive X-ray microanalyser ที่ติดตั้งกับกล้อง ควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ LEO32 ของบริษัท ZESS ทำงานภายใต้ Microsoft Windows การใช้งานจึงง่ายมาก โดยเฉพาะการศึกษาด้วยเทคนิค X-ray mapping หรือ X-ray line scanning ก็ไม่ใช่เรื่องยุ่งยากอีกต่อไป สามารถโอนภาพหรือสเปกตรัมเข้าสู่โปรแกรมอื่น ๆ ที่ทำงานภายใต้ Microsoft Windows ได้รวดเร็วและมีรูปแบบการนำเสนอผลงานได้หลากหลายตามความต้องการของผู้ใช้บริการ [2]

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM) สามารถแบ่งระบบการทำงานออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

(1) High vacuum mode ระบบภายใน Column, Specimen chamber จะมี ความเป็นสุญญากาศสูงประมาณ 10^{-5} - 10^{-6} mBar

(2) Variable Pressure mode ระบบภายใน Column จะมีความเป็นสุญญากาศสูงแต่ภายใน Specimen chamber จะสามารถปรับแรงดันสุญญากาศได้ตั้งแต่ 1 – 400 Pa.

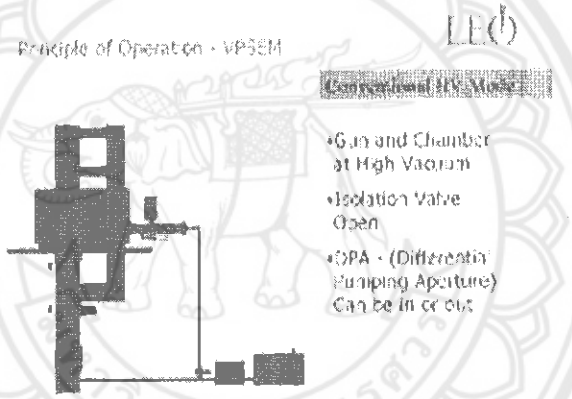
ลักษณะตัวอย่างที่จะสามารถดูในโหมด High Vacuum Mode (HV Mode)

(1) ต้องมีคุณสมบัตินำไฟฟ้า ถ้าตัวอย่างไม่นำไฟฟ้าต้องทำการเตรียมตัวอย่างให้นำไฟฟ้าเสียก่อน

(2) ต้องมีลักษณะแห้งไม่มีการระเหยของสารใดๆ

(3) ต้องมีขนาดเล็กที่จะสามารถวางบนที่ติดตัวอย่างได้ โดยปกติอยู่ที่ กว้าง ยาว สูง ไม่เกิน ประมาณ 1 เซนติเมตรหรือมีลักษณะเป็นผง

ประโยชน์ของ High Vacuum Mode เป็นโหมดที่ใช้ความสามารถของเครื่อง SEM ได้เต็มที่ที่สุดในการดูพื้นผิวของตัวอย่าง ซึ่งจะให้ภาพที่คมชัด และใช้กำลังขยายที่สูงกว่า VP MODE ซึ่งความคมชัดของภาพขึ้นกับความนำไฟฟ้าของตัวอย่างด้วย[6]



รูปที่ 6 ระบบการทำงานของ High vacuum mode[6]

ลักษณะตัวอย่างที่จะสามารถดูในโหมด Variable Pressure Mode(VP Mode)

(1) สามารถดูตัวอย่างได้โดยตรง โดยลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างและไม่ต้องเคลือบผิวด้วยวัตถุนำไฟฟ้า ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยไม่ทำลายพื้นผิว (Non Destructive Analysis)

(2) สามารถดูตัวอย่างได้ทุกชนิดที่มีความชื้น เช่น งานทางด้านวัสดุศาสตร์ และชีววิทยา

(3) ลดการ Charge up ที่เกิดขึ้นซึ่งทำให้พื้นผิวตัวอย่างถูกทำลาย

(4) ทำให้วิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็วขึ้น โดยลดแรงดันสุญญากาศลง

โครงสร้างของ VP SEM สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

(1) ส่วนที่เป็น (High Vacuum) ประกอบด้วย :-Electron Gun, Column(CL, OL), Differential Pumping Aperture (DPA), Pumping System (TMP, RP), Chamber Isolation Valve,Penning Gauge

(2) ส่วนที่สามารถปรับแรงดันสุญญากาศ (Variable Pressure) ประกอบด้วย : Specimen Chamber, Leak Valve, Pirani Gauge, 3 way Valve.

หลักการทำงานของ VP SEM

(1) ในส่วนของคอลัมน์ที่เป็น High Vacuum จะทำงานภายใต้สุญญากาศตั้งแต่ 8.50e-005 mBar จนถึง1.65e-006mBar

(2) ในห้องใส่ตัวอย่าง (Specimen Chamber) สามารถปรับแรงดันสุญญากาศได้ระหว่าง 1 - 400Pa. โดยมี Chamber Isolation Valve ปิดกั้นระหว่าง Pumping System กับ Specimen Chamberและด้านบนจะมี Differential Pumping Aperture ซึ่งเป็นแผ่นโลหะกลมเจาะรูเล็กๆตรงกลาง ปิดกั้นแรงดันสุญญากาศระหว่าง Specimen Chamber กับ Electron Column

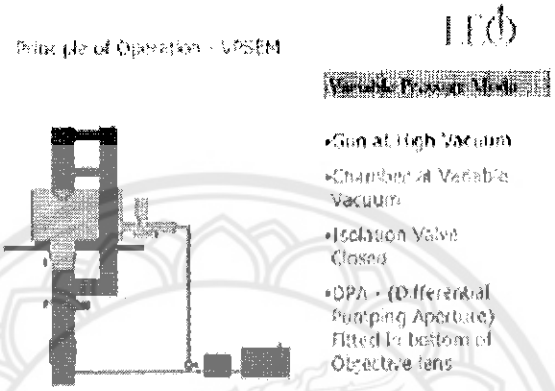
(3) Leak Valve จะทำหน้าที่ปล่อยให้อากาศภายนอกเข้าไปภายในห้องใส่ตัวอย่างตามจำนวนที่กำหนด เพื่อให้มี Gas Molecules เป็นตัวกลางลดประจุอิเล็กตรอนที่สะสมอยู่บนพื้นผิวตัวอย่าง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการ Charge Up ในกรณีที่ตัวอย่างไม่นำกระแสไฟฟ้า และ 3 way Valve จะเปิดดูดอากาศออกจากภายในห้องใส่ตัวอย่างเพื่อให้ได้สุญญากาศตามที่ต้องการ

(4) เมื่อ Incident Electron Beam กระทบกับพื้นผิวตัวอย่างทำให้เกิดพลังงานสัญญาณต่างๆ เช่น Secondary Electron , Backscattered Electron and X-Ray etc.

(5) โดยทั่วไปกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน ที่ปรับแรงดันสุญญากาศได้ จะรับเพียงสัญญาณของ Backscattered Electron ซึ่งมีความเข้มของพลังงานที่สามารถผ่านโมเลกุลแก๊สไปได้ ดังนั้นในระบบ VP mode ทั่วไปจึงต้องใช้ Backscattered Electron Detector (BSD) ไปดักจับสัญญาณ ทำให้ได้ภาพที่มีรายละเอียดแสดงส่วนประกอบโครงสร้างของตัวอย่าง
(Compositional Image)เท่านั้น

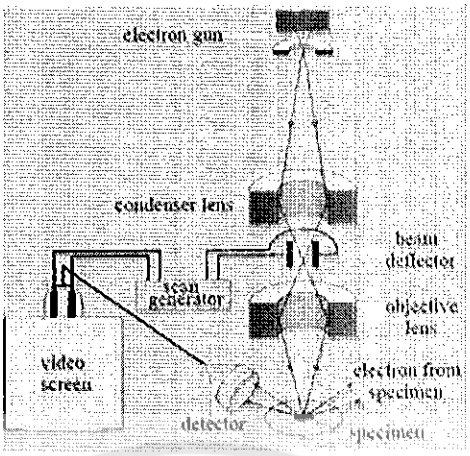
(6) LEO ได้ผลิต Detector ที่สามารถดักจับสัญญาณจากพื้นผิวของตัวอย่างภายใต้ระบบ VP mode ซึ่งเรียก Detector นี้ว่า VPSE detector เนื่องจาก Secondary Electron ส่งออกมา กระทบเข้ากับโมเลกุลของแก๊สที่อยู่ภายในห้องใส่ตัวอย่างทำให้

เกิดสัญญาณของ Photons Emission ซึ่งเป็นสัญญาณที่มีรายละเอียดพื้นผิวของตัวอย่าง เหมือนกับดูจาก Secondary Electron โดยตรง[6]



รูปที่ 7 ระบบการทำงานของ Variable Pressure mode[6]

หลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน ด้านบนจะมีแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน (electron gun) ซึ่งทำหน้าที่ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา (primary electron) โดยจะควบคุมจำนวนอิเล็กตรอนนั้นด้วยศักย์ไฟฟ้าสูงๆ (high voltage) โดยใช้เลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic lens) โฟกัสให้อิเล็กตรอนนั้นตกกระทบชิ้นงาน และเมื่ออิเล็กตรอนตกกระทบชิ้นงานจะ ได้สัญญาณแบบต่าง ๆ เช่น สัญญาณจากอิเล็กตรอนในชิ้นงานที่หลุดออกมา (secondary electron) อิเล็กตรอนที่กระดอนกลับ (backscattered electron) หรือ x-ray สัญญาณแต่ละชนิดจะถูกตรวจวัดโดย detector แต่ละชนิด และแปลผลเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า และแปลเป็นภาพและกราฟในที่สุด จากภาพแสดงถึงระบบกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบสแกน โดยเริ่มตั้งแต่แหล่งกำเนิดพลังงานอิเล็กตรอน (Electron Gun) , ระบบเลนส์ (Electro Magnetic Lens), สัญญาณภาพ ต่างๆ (Signal Images) ตลอดจนหัวดักจับสัญญาณต่างๆ (Signal Detectors) ที่ให้ข้อมูลและผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 8 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (เปลี่ยนภาพ) [9]

ลักษณะของสัญญาณชนิดต่าง Secondary Electrons ให้ข้อมูลในลักษณะเป็นภาพพื้นผิวจริงของวัตถุมีลักษณะสูงต่ำและร่องรอยที่เกิดขึ้นจริงบนวัตถุ Back scattered Electrons ให้ข้อมูลในลักษณะเป็นภาพพื้นผิวของวัตถุ แต่ให้ความแตกต่างบนพื้นผิวของวัตถุในลักษณะ แบ่งเป็นเฟสสว่างและเฟสมืด ขึ้นอยู่กับเลขอะตอมของธาตุ(Z) ที่ผสมอยู่ในวัตถุนั้น ธาตุที่มีเลขอะตอมสูงกว่าจะมีเฟสที่สว่างกว่าธาตุที่มีเลขอะตอมต่ำกว่า X - Ray ให้ข้อมูลลักษณะบอกเป็นธาตุที่ประกอบอยู่ในวัตถุนั้นโดยแสดงออกมาเป็นกราฟหรือพื้นที่ภาพที่แทนด้วยสีเพื่อบอกตำแหน่งที่อยู่ของธาตุนั้นๆ[6]

จากหลักการ SEM ดังกล่าวข้างต้น เมื่อต้องการนำตัวอย่างทางชีวภาพมาศึกษาในสภาวะสุญญากาศสูง (High Vacuum Mode) เป็นโหมดที่ใช้ความสามารถของเครื่อง SEM ได้เต็มที่ที่สุดในการดูพื้นผิวของตัวอย่าง ซึ่งจะให้ภาพที่คมชัด และใช้กำลังขยายได้ที่สูงกว่า VP MODE ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ

การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างขั้นต้น (Specimen) [7]

ตัวอย่างที่นำศึกษาโดยวิธี SEM ในแง่ของวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จะประกอบด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ อาจเป็นส่วนหนึ่งหรืออาจเป็นองค์ประกอบทั้งหมดที่เป็นพืชแต่ละชนิดหรือสัตว์ทั้งตัว เช่นแบคทีเรีย อะมีบา มด หรือแมลงขนาดเล็ก

ในการเก็บตัวอย่าง ต้องคำนึงถึงการป้องกันไม่ให้มีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาปะปน หรือเกิดขึ้นกับตัวอย่างที่จะนำมาเตรียม เพื่อศึกษาด้วย SEM ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาจะต้องทำความสะอาดโดยวิธีการง่ายๆ ในขณะดำเนินการเก็บ หรือทันทีภายหลังจากการเก็บมาจากพืชและสัตว์ เช่น การเก็บแบคทีเรียจากน้ำยาเลี้ยงเชื้อ หากจะศึกษาลักษณะของแบคทีเรียชนิดนั้น ควรชำระล้างน้ำยาเลี้ยงเชื้อออกให้หมดโดยเร็วเสียก่อน เพื่อจะได้ลักษณะของแบคทีเรียที่แท้จริง ถ้าหากจะดูลักษณะอวัยวะภายนอก

๑ QH
212
.S3
ป๑๑๓
๒๕๕๔

สำนักหอสมุด
1.7023054 ๒๖ ส.ค. ๒๕๕๔

ของแมลง เช่น ดูหัวหรือตาของตัวปลวก ควรชำระล้างตัวปลวกนั้นให้สะอาดเพื่อไม่ให้มีผง ฝุ่น หรือสิ่งปฏิกูลต่างๆ ที่อาจจับอยู่บนผิวของอวัยวะดังกล่าวเหลืออยู่ ซึ่งทำให้มีผลออกมาไม่ชัดเจน หรือผิดจากความเป็นจริง

การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

(1) ตัวอย่างที่จัดอยู่ในประเภทผลิตภัณฑ์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ รวมทั้งเนื้อเยื่อชนิดแข็ง เช่น ผม ขน เล็บ กระดูก ฟัน เหล่านี้สามารถเก็บมาศึกษา โดย SEM ได้อย่างง่ายดาย คือ อาจตัด ขริบ หรือเลื่อย ตัวอย่างให้มีขนาดพอควรหรือหนาไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ตามต้องการล้างเอาสิ่งที่ไม่ต้องการ เช่น ไขมัน ฝุ่นที่เกิดจากการเลื่อยหรือตัดออกเสียก่อน โดยล้างในน้ำยาอะซีโตนหรือเอทิลแอลกอฮอลล์ ก่อนที่จะนำไปคงสภาพ หรือวางบนฐานตัวอย่างที่ต้องการจะตรวจสอบ ตัวอย่างบางประเภทที่เป็นผลิตภัณฑ์ของเซลล์ เช่น ผม ขน เล็บ สามารถเก็บไปเตรียมเพื่อดูด้วย SEM ได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนมากนัก แต่ควรล้างตัวอย่างประเภทนี้เสียก่อน โดยใช้อะซีโตน หรือ แอลกอฮอล์ดังกล่าวแล้ว ส่วนตัวอย่างประเภท ฟัน หรือกระดูก ที่เก็บมาจากซากสัตว์ หรืออวัยวะต่างๆของร่างกายหรือการผ่าตัดจะต้องตัดหรือเฉือนให้เป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำเกลือแล้วจึงนำไปคงสภาพเพื่อเตรียมตัวอย่างขั้นต่อไป

(2) ตัวอย่างประเภทเซลล์อิสระ เซลล์ที่หลุดออกมาหรือเซลล์ในของเหลว เช่นสัตว์เซลล์เดียว เซลล์ที่อยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง (cultured cell) เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวฯลฯ อาจเก็บโดยวิธีการทำแผ่นฟิล์มบาง (smear) บนแผ่นกระจก แผ่นกระดาษกรอง หรือป้ายบนเนื้อเยื่อบางประเภทมิลลิพอร์และยูนิพอร์ (millipore และ unipore membrane) ก่อนที่จะนำไปจุ่มน้ำยาคงสภาพ

(3) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเชื้อต้องผ่านการล้างด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์หรือน้ำเกลือ ก่อนที่จะนำไปคงสภาพตัวอย่างประเภทนี้ได้สองวิธี คือ ไบออปซี (biopsy) และออตทอปซี (autopsy) การเก็บตัวอย่างโดย 2 วิธีดังกล่าวต้องระมัดระวังในเรื่องของเหลวที่ออกมาจากชิ้นเนื้อ ซึ่งอาจเคลือบผิวตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ทำให้ได้ผลไม่ชัดเจน ดังนั้นทันทีที่เลือกตำแหน่งจากอวัยวะที่จะเก็บ ให้รีบตัดหรือเฉือนชิ้นเนื้อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่สุด โดยความหนาของตัวอย่างไม่ควรเกิน 3 มิลลิเมตร หลังจากตัดชิ้นเนื้อออกมาจากอวัยวะใดๆ ก็ตามให้รีบล้างตัวอย่างในบัฟเฟอร์ หรือน้ำเกลือเพื่อชำระล้างของเหลวที่ออกมาจากเนื้อเยื่อนั้น เช่น เลือดหรือน้ำเหลืองให้หมดไปเท่าที่จะทำได้ ก่อนที่จะนำไปคงสภาพเพื่อดำเนินการต่อไป ในขณะที่ทำการตัด การล้าง จะต้องระมัดระวังไม่ให้เนื้อเยื่อหรือพื้นผิวที่

ต้องการจะศึกษา ได้รับการกระทบกระเทือนหรือบอบช้ำ เพราะจะทำให้ผลผิดไปจากความเป็นจริง เครื่องมือที่ใช้เช่น มีด กรรไกร จะต้องคมและสะอาด การจับตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาให้ใช้ปากคีบจับมุมใดมุมหนึ่งของตัวอย่าง เพื่อป้องกันไม่ให้กระทบกระเทือนตัวอย่างหลายๆจุดโดยไม่จำเป็น

การล้างตัวอย่างอาจทำก่อนเก็บตัวอย่างจากอวัยวะ ในกรณีที่จะเก็บตัวอย่างจากอวัยวะขนาดใหญ่สามารถทำการล้างจากภายใน โดยการฉีดน้ำยาล้าง เช่นบัฟเฟอร์และน้ำเกลือ เข้าสู่ท่อกลวงของอวัยวะหรือท่อเลือดแดงหรือดำของอวัยวะนั้น อวัยวะที่จำเป็นต้องล้างก่อนเก็บตัวอย่างมาคงสภาพคือ ตับ ปอด หัวใจ ไต ลำไส้ กระเพาะอาหาร และอวัยวะอื่นๆที่มีท่อกลวง หรือมีระบบหมุนเวียนโลหิตที่ค่อนข้างจะซับซ้อน เมื่อทำการล้างจนเห็นว่าอวัยวะนั้นๆปราศจากเลือด หรือของเหลวที่อาจมีส่วนเป็นสิ่งแปลกปลอมภายในเนื้อเยื่อโดยวิธีนี้แล้ว ก็สามารถฉีดน้ำยาคงสภาพอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้ได้ผลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น [7]

การคงสภาพปฐมภูมิ (Primary Fixation)

นิยมใช้กลูตาราดีไฮด์หรือกลูตาริกไดอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde หรือ glutaric acid dialdehyde) เป็นอัลดีไฮด์ที่มีผลต่อการคงตัวของโปรตีนได้ดีมาก เพราะเป็นน้ำยาที่ใช้ในการคงสภาพปฐมภูมิตัวเดียวที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) 2 หมู่ที่ปลายทั้งสองข้าง ซึ่งอัลดีไฮด์แต่ละหมู่มีความสามารถในการคงสภาพได้ทั้งคู่ ดังนั้นจึงให้ผลการคงสภาพที่ดีและนิยมกันแพร่หลาย มีอัตราการแทรกซึม (penetration) ช้า แต่ทำปฏิกิริยาครอสลิงกับโปรตีนได้เร็ว โดยสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนและกรดอะมิโนได้ทั้งในเนื้อเยื่อและที่อยู่ในสารละลายและในระดับแมคโครโมเลกุล (submacromolecule) กลูตาราลดีไฮด์สามารถสร้างครอสลิงภายในและระหว่างโมเลกุล (intra and intermolecular crosslink) กับกลุ่มอะมิโน (amino group) ได้ด้วย

พวกสับแมคโครโมเลกุลกลุ่มอื่น อาจทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ได้แต่ไม่ดีเท่าโปรตีน เช่น คาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะไกลโคเจนในตับและหัวใจ ถูกคงสภาพได้ประมาณ 40-65 % ส่วนไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated lipid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid) จะไม่คงสภาพด้วยกลูตาราลดีไฮด์ แต่จะถูกคงสภาพด้วย OsO_4 ในการคงสภาพทุติยภูมิ อย่างไรก็ตามจากการที่ไขมันไม่ถูกคงสภาพนี้จะทำให้ไขมันสลายตัวได้ถึง 95% ในระหว่างการขจัดน้ำ

ข้อเสียของกลูตาราลดีไฮด์ คือความไม่สะดวกในการปฏิบัติ เพราะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการจะคงสภาพตัวอย่าง หากเตรียมไว้นานๆจะเสื่อมคุณภาพ และจะเกิดกรดจากการออกซิเดชั่น (oxidation) หากต้องการจะเก็บไว้ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำในขวดที่ปิดมิดชิด การคงสภาพด้วยน้ำยาที่มีกลูตาราลดีไฮด์ต้องเริ่มทำที่อุณหภูมิ 4 °C ความเข้มเข้นของกลูตาราลดีไฮด์ที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 1.5 -

4.0% กลูตาราลดีไฮด์มีราคาแพง โดยเฉพาะที่ใช้งานด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (E.M.grade) แต่อย่างไรก็ยังได้รับความนิยมสูง เพราะมีประสิทธิภาพในการคงสภาพสูง[7]

การเตรียมสารละลายสต๊อกของ 2.5% glutaraldehyde (เตรียมในตู้ดูดควัน)

(1)	เตรียม 0.2 M PBS	จำนวน	50	ml.
(2)	เตรียม 50%gluraldehyde	จำนวน	5	ml.
(3)	เตรียม 10%parafoemaildehyde	จำนวน	20	ml.
(4)	ผสมส่วนที่ 1 , 2 และ3 จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ครบ		100	ml.

การเตรียมสต๊อกของ 10% paraformaldehyde (เตรียมในตู้ดูดควัน)

ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde: CH2O) เป็นโมโนอัลดีไฮด์ (monoaldehyde) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สภาพปกติเป็นแก๊สที่สามารถละลายน้ำได้ ชื่อทางการค้าคือ ฟอร์มาลิน (formaldehyde 37-40% ในน้ำ) ส่วนในรูปของแข็งเป็นพอลิเมอร์ คือพาราฟอร์มาลดีไฮด์ (CH_2O_n) ซึ่งนำมาใช้ในงานด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถรักษาตัวอย่างโดยเกิดครอสลิงกับกลุ่มอะมิโนของโปรตีน เช่นเดียวกับกลูตาราลดีไฮด์ พาราฟอร์มาลดีไฮด์แตกตัวได้ช้าในการเตรียมสารละลาย จึงต้องใช้สารละลายด่าง (NaOH) ช่วยให้โมเลกุลยาวแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก แล้วจึงค่อยปรับ pH ที่ต้องการ

พาราฟอร์มาลดีไฮด์ไม่สลายตัวหรือเปลี่ยนสภาพง่าย เพราะออกซิเดชั่นเกิดขึ้นช้ากว่ากลูตาราลดีไฮด์จึงสามารถเตรียมได้ล่วงหน้านานๆและปริมาณมากได้ ใช้ได้ดีในการคงสภาพตัวอย่างที่ใช้กับงานด้านกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) ส่วนงานด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ไม่แนะนำให้ใช้พาราฟอร์มาลดีไฮด์เพียงตัวเดียว เพราะทำปฏิกิริยากับโปรตีนช้าแม้ว่าจะแทรกซึมได้เร็วก็ตาม มักใช้ร่วมกับ กลูตาราลดีไฮด์ซึ่งจะทำให้ผลการคงสภาพดีมาก[6]

การเตรียมสารละลายสต๊อกของ 10% paraformaldehyde (เตรียมในตู้ดูดควัน)

(1)	เตรียม parafoemadehyde	จำนวน	10	กรัม
(2)	เตรียมน้ำกลั่น	จำนวน	80	มิลลิลิตร
(3)	ทำการปั่นและให้ความร้อนถึง 65 °C ถ้าไม่ละลายให้หยด NaOH 0.1 N จำนวน 2-3 หยด จนสารละลายสีใส			
(4)	เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ		100	ml[7]

การล้างน้ำยาคงสภาพ(Buffer Wash) [7]

น้ำยาคงสภาพแต่ละสูตรควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ(1) pH ของน้ำยาคงสภาพต้องคงที่ตลอดเวลาที่คงสภาพตัวอย่าง โดยการใช้บัฟเฟอร์ (2) ควรมีออสโมลาริตี้ (osmolarity) ที่เหมาะสมไม่ทำ

ให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อเหี่ยวหรือบวมได้ (3) ต้องมีองค์ประกอบของอิออน (ion composition) ที่เหมาะสมที่จะไม่ทำให้เซลล์แตกหรือเหี่ยวได้ pH หรือบัฟเฟอร์ เนื้อเยื่อสัตว์จะมี pH อยู่ระหว่าง 7.0-7.4 แม้ว่าในธรรมชาติเซลล์จะมีระบบบัฟเฟอร์ของตัวเอง แต่การคงสภาพด้วยสารเคมีพวกอัลดีไฮด์ หรือ OsO_4 ที่ไม่มีบัฟเฟอร์ จะมีผลต่อ pH และออสโมติก (osmotic) ของเซลล์ จนทำให้โครงสร้างละเอียดและอื่นๆเสียหาย ส่งผลให้เซลล์เหี่ยวหรือบวมได้ เช่น ถ้าเซลล์ถูกคงสภาพด้วย OsO_4 ที่ไม่มีบัฟเฟอร์ pHของเซลล์จะลดจาก 6.2 ลงถึง 4.4 ทำให้องค์ประกอบพวกโปรตีนขนาดใหญ่ (macroprotein) ที่ช่วยทำให้โครงสร้างละเอียดคงรูปร่างได้นั้น มีขนาดเล็กลงและแตกหักได้หรือทำให้โปรตีนเสียรูปร่างไปนั่นเอง ในที่สุดเซลล์ก็จะตาย ปรากฏการณ์นี้คล้ายกับการตายของเซลล์ตามธรรมชาติ คือ pH ของเซลล์ลดลงโดยเกิดการย่อยสลายตัวเองของพวกโมเลกุลขนาดใหญ่นั่นเอง ดังนั้นในกระบวนการคงสภาพจึงต้องใช้บัฟเฟอร์ เพื่อรักษา pH ของเซลล์ให้คงที่ในขณะคงสภาพ

บัฟเฟอร์มีหลายชนิดได้แก่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ คาโคไดเลตบัฟเฟอร์ คอลิดีนบัฟเฟอร์ (collidine buffer) เวอร์โรนอลอะซีเทตบัฟเฟอร์ (veronal acetate buffer) ทรีสบัฟเฟอร์ (triss buffer) โซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (sodium-bicarbonate buffer) และพีเอ็มบัฟเฟอร์ (PM buffer) เป็นต้น แต่ได้รับความนิยมมี 2 ชนิด คือฟอสเฟตและคาโคไดเลตบัฟเฟอร์

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้รับความนิยมมากที่สุดกว่าชนิดอื่น เพราะมีความคล้ายคลึงกับของเหลวภายในเซลล์ ราคาไม่แพงและไม่มีพิษ ใช้ได้ทั้งคงสภาพปฐมภูมิและทุติยภูมิ pH ของบัฟเฟอร์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถเก็บไว้ได้หลายสัปดาห์ในตู้เย็น อย่างไรก็ตามอาจมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนและอาจตกตะกอนได้ในขณะเก็บ

วิธีเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีดังนี้

(1) สารละลายสต๊อก(stock solution)

0.2 M โซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิก (sodium phosphate monobasic)

$NaH_2PO_4.H_2O$	27.6	กรัม
หรือ $NaH_2PO_4.2H_2O$	31.21	กรัม

0.2 M โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิก (sodium phosphate dibasic)

$Na_2HPO_4.2H_2O$	35.61	กรัม
หรือ $Na_2HPO_4.7H_2O$	53.65	กรัม
หรือ$Na_2HPO_4.12H_2O$	71.64	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

(2) 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตาม pH ที่ต้องการ

ใช้สารละลาย ก. จำนวน x มล.(ดูตาราง)ผสมกับสารละลาย ข. จำนวน Y มล.(ดูตาราง)

X มล.ของสารละลาย ก.	Y. มล. ของสารละลาย ข.	pH
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5

ตารางที่ 1 การเตรียม0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตาม pH ที่ต้องการ

(3) 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตาม pH ที่ต้องการ

ใช้ 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์(จากตาราง)	1	ส่วน
เติมน้ำกลั่น	1	ส่วน

การคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation) [7]

นิยมใช้ 4% Osmium tetraoxide (Osmic acid) มีน้ำหนักโมเลกุลสูง(254.20) จัดเป็นการคงสภาพทุติยภูมิ มีอัตราการแทรกซึมและเกิดปฏิกิริยาช้าโดยจะคงสภาพเป็นลำดับจากผิวจนถึงส่วนกลางของเนื้อเยื่อ ถ้าตัวอย่างมีขนาดโตกว่า 1 ลบ.มม. บริเวณกลางของตัวอย่างจะไม่ถูกคงสภาพ OsO_4 จะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเซลล์ได้หลายชนิด แต่ส่วนใหญ่จะทำปฏิกิริยาได้ดีกับไขมันไม่อิ่มตัว โดยจะเกิดครอสลิงกับไขมันไม่อิ่มตัวที่พันธะคู่ ดังนั้น OsO_4จึงเป็นน้ำยาคงสภาพที่เหมาะสำหรับคงสภาพเนื้อเยื่อ (membrane) และโครงสร้างที่ประกอบด้วยไขมันทำให้คงทนต่อการขจัดน้ำ

โดยปกติแล้วการคงสภาพโดยใช้สารละลาย OsO_4 เริ่มจากอุณหภูมิต่ำ ($4^{\circ}C$)เช่นเดียวกับการคงสภาพในน้ำยาอัลดีไฮด์ แล้วปล่อยให้อุณหภูมิสูงขึ้นอุณหภูมิปกติ ระยะเวลาการคงสภาพอยู่ระหว่าง 1-3 ชั่วโมง หากปล่อยไว้นานเกินควร โปรตีนและพวกไขมันจะถูกทำลายในบางส่วน การเพิ่มประสิทธิภาพของการคงสภาพด้วย OsO_4 เพื่อรักษาคุณลักษณะของส่วนประกอบของนิวเคลียส ฟอสโฟลิปิด และเยื่อบุเซลล์ (cell membrane) ทำได้โดยการเติม $CaCl_2$ ในความเข้มข้น 0.005% (เวคิน , 2528)

OsO_4 บรรจุอยู่ในหลอดแก้ว (vial) ที่ปิดสนิท มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน ขนาดบรรจุ มีตั้งแต่ 0.5-1 กรัม ปัจจุบันมีน้ำยา OsO_4 (ละลายน้ำ) ในความเข้มข้น 1-2% ผลิตขึ้นจำหน่าย โดยบรรจุในหลอดแก้วที่ปิดสนิทขนาด 5-10 มล. OsO_4 ไม่ว่าจะเป็นสภาพของแข็งหรือของเหลวก็ตาม จะมีราคาแพงมาก จึงควรใช้อย่างประหยัดที่สุด การเตรียมสารละลาย OsO_4 จากผลึก OsO_4 ที่ปราศจากน้ำ (anhydrous) ควรทำอย่างระมัดระวัง เพราะไอของสารนี้เป็นพิษและทำลายเยื่อบุทางเดินหายใจตอนต้น รวมทั้งการทำให้กระจกตาบวมน้ำ (cornel edema) นอกจากนี้แล้ว หากสัมผัสอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของผู้ปฏิบัติจะเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อบริเวณที่สัมผัสให้เป็นสีดำและจะใช้เวลานานกว่าจะสลายตัวกลับคืนสู่สภาพเดิม ฉะนั้นการเตรียมควรเตรียมในตู้ดูดไอสารเคมีที่ระบบดูดอากาศหรือควันพิษออก สารละลาย OsO_4 ควรเตรียมไว้เป็นสารละลายสต๊อก (stock solution) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 2% โดยใส่ภาชนะประเภทขวดแก้วที่สะอาดใช้เฉพาะให้เก็บขวดแก้วที่บรรจุสารละลาย OsO_4 ในขวดแก้วขนาดใหญ่กว่าที่ปิดฝาอีกชั้นหนึ่ง โดยพยายามเลี่ยงไม่ให้ถูกแสงสว่างอาจใช้ขวดแก้วสีชาหรือขวดแก้วใสแต่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ (ถ้าใช้ขวดแก้วใสจะสามารถสังเกตสีของ OsO_4 ว่าสีเปลี่ยนแปลงหรือไม่) ที่สำคัญคือต้องเก็บ OsO_4 ไว้ในตู้เย็น

สีของน้ำยา OsO_4 มีสีเหลืองอ่อนคล้ายฟางข้าว หากมีสีแตกต่างไปจากนี้ (น้ำตาลแดง ม่วงดำ) แสดงว่า OsO_4 เสื่อมสภาพ ไม่สามารถนำมาคงสภาพตัวอย่างได้อีกต่อไปในการคงสภาพตัวอย่างโดยทั่วไปจำเป็นต้องใช้ OsO_4 เนื่องจากตัวอย่างทางชีวภาพประกอบไปด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อที่อ่อนนิ่มไม่ทนต่อลำแสงอิเล็กตรอน จึงใช้โลหะหนักประเภทออสเมียม ที่สามารถรวมกับองค์ประกอบต่างๆของเซลล์

และเนื้อเยื่อได้ดี พร้อมทั้งทำให้องค์ประกอบเหล่านั้นมีความทนทานและมีสภาพคงที่ นอกจากนั้นการที่โลหะหนักรวมตัวอยู่ในตัวอย่างทำให้ตัวอย่างมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดีกว่าเดิม ช่วยเพิ่มความเปรียบต่าง(contrast) ให้แก่ตัวอย่างเมื่อศึกษาด้วย TEM จะทำให้ภาพที่ปรากฏชัดเจนยิ่งขึ้น ดังนั้นตัวอย่างที่ถูกคงสภาพด้วยกลูตาราลดีไฮด์อย่างเดียว จึงถูกจำกัดให้ศึกษาด้วย TEM ได้ที่กำลังขยายต่ำ โดยเฉพาะตัวอย่างที่อ่อนนุ่มมากๆ สำหรับงานTEM จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ OsO_4

การเตรียมน้ำยาคงสภาพออสเมียมเทตทรอกไซด์(osmic acid fixative)

(1) นำหลอดแก้วที่มีผลึก OsO_4 บรรจุอยู่ (ขนาด 1 กรัม) มาทำความสะอาดโดยล้างน้ำเช็ดให้สะอาดและแห้ง

(2) ห่อหลอดแก้วที่มี OsO_4 อยู่ ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ตามยาว

(3) ทุบหลอดแก้วในข้อ 2 ให้แตก และแกะห่อออก ถ่ายลงในเออร์เลนไมเออร์ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มล.

(4) เติมน้ำกลั่น 50 มล.(เพื่อจะได้สารละลาย OsO_4 ที่มีความเข้มข้น 2%) เขย่าให้ดี ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นฟาราฟิล์ม (parafilm) 2 ชั้น นำฟลาสก์นี้ไปใส่ในขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง แช่ในตู้เย็นทิ้งไว้ข้ามคืน OsO_4 จะละลายน้ำได้ช้า

(5) วันรุ่งขึ้นให้กรองเศษแก้วออกจากสารละลายดังกล่าว ด้วยกระดาษกรองเนื้อหยาบ เทสารละลายลงในขวดแก้วมีจุก เก็บขวดแก้วในภาชนะขนาดใหญ่มีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง และเขียนป้ายหรือทำสลาก เก็บไว้เป็นสารละลายสำรองเพื่อจะเตรียมน้ำยาคงสภาพต่อไป แต่ต้องเก็บไว้ในตู้เย็นตลอดเวลา

การขจัดน้ำ (Dehydration) [7]

ตัวอย่างที่จะใช้กับงาน SEM นั้นต้องผ่านการทำให้ตัวอย่างแห้ง (drying) แต่ก่อนที่จะทำให้ตัวอย่างแห้งได้นั้น ต้องขจัดน้ำออกจากตัวอย่างให้หมดด้วยสารเคมีที่ใช้ขจัดน้ำหรือดีไฮแดรนต์ (dehydrant) ที่สามารถเข้ากันได้กับของเหลวทรานซิชันนอล (transitional fluid) เช่น ฟรีออนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ (Freon or CO_2) ที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ (critical point drying) ซึ่งไม่รวมตัวกับน้ำ

โดยปกติตัวทำละลายที่ใช้ขจัดน้ำ เป็นตัวทำละลายที่ดีของไขมัน ดังนั้นในขั้นตอนขจัดน้ำนี้ไขมันถูกสกัด (extract) ออกได้ เช่น ที่ความเข้มข้นของเอทธานอลหรืออะซีโตนมากกว่า 70% ทำให้สกัดไขมันได้ถึง 95% นอกจากนั้นโปรตีนอาจถูกสกัดได้ในขั้นตอนนี้ที่ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ขจัด 95%

และ 100% การสกัดไขมันและโปรตีนในขั้นตอนนี้จะเป็นผลให้ตัวอย่างเหี่ยวได้ แต่ตัวอย่างที่ถูกคงสภาพเรียบร้อยด้วยอัลดีไฮด์ และ OsO_4 หรือยูเรนิลอะซีเตต จะไม่มีปัญหาเหล่านี้

ขั้นตอนการขจัดน้ำ ทำได้โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการคงสภาพ และล้างน้ำยาคงสภาพที่มากเกินพอออกแล้วมาแช่ในสารเคมีที่ใช้ขจัดน้ำความเข้มข้นต่ำไปสูง เช่น 35% , 50% , 70% , 85% , 95% และ 100 % (2 ครั้ง) ขั้นตอนละ 15-20 นาที การที่เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปสูงโดยทำเป็นลำดับขั้น และค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นนี้ เพื่อป้องกันออสโมติคช็อก และเป็นการทำให้เกิดการแทนที่น้ำได้อย่างสมบูรณ์ ในการเปลี่ยนสารเคมีที่ใช้ขจัดน้ำแต่ละขั้น ควรรีบทำด้วยความรวดเร็วไม่ควรทิ้งให้ตัวอย่างแห้ง เพราะจะทำให้ตัวอย่างเหี่ยว โครงสร้างผิดไปจากความจริงได้

การขจัดน้ำออกจากตัวอย่างควรทำอย่างต่อเนื่อง แต่บางครั้งอาจหยุดพักได้ที่ความเข้มข้น 70% โดยปิดฝาให้สนิท และเก็บไว้ในตู้เย็น

หลักการทำให้ตัวอย่างแห้ง(drying) [7]

ขั้นตอนนี้เป็นการขจัดเอาของเหลวที่อยู่ในเนื้อเยื่อออกให้หมด โดยที่โครงสร้างของเซลล์ และเนื้อเยื่อเหล่านั้นไม่เปลี่ยนแปลง หรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด หรือให้มีโครงสร้างและลักษณะผิวใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงให้มากที่สุด การทำตัวอย่างให้แห้งมี 3 วิธี คือ

(1) การให้แห้งในบรรยากาศปกติ(air drying)

เป็นการทำตัวอย่างให้แห้ง โดยใช้หลักการระเหยของน้ำไปเป็นไอน้ำในบรรยากาศปกติ เช่นการปล่อยตัวอย่างทิ้งไว้ให้น้ำระเหยออกไปจากตัวอย่าง โดยวางไว้ในห้องระยะหนึ่ง หรือใส่ไว้ในเดสซิก-เคเตอร์ (desiccator) เพื่อให้ซิลิกาเจล (silica gel) ช่วยดูดความชื้นออกจากตัวอย่าง ตัวอย่างจะแห้งเร็วขึ้นกว่าวางทิ้งไว้เฉยๆ ตัวอย่างที่เหมาะสำหรับการทำให้แห้งโดยวิธีนี้มักเป็นตัวอย่างที่มีโครงสร้างแข็งหรือค่อนข้างแข็ง ซึ่งอาจจะไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการคงสภาพและขจัดน้ำได้ เช่น ขน ผม เล็บ กระดูก เนื้อไม้ ละอองเรณู (pollen) และแมลงต่างๆ เป็นต้น ตัวอย่างนี้มีความชื้นอยู่น้อย และแรงตึงผิวของตัวอย่างมักจะสูง ดังนั้นเมื่อทำให้แห้งโดยวิธีนี้จึงมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะผิวไม่มากนัก

อย่างไรก็ตาม ถ้าตัวอย่างผ่านขั้นตอนขจัดน้ำก่อน จนกระทั่งถึงขั้นตอนสุดท้ายที่ตัวอย่างแช่อยู่ในแอบโซลูทเอทธานอลหรืออะซีโตน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีแรงตึงผิวต่ำ แล้วปล่อยตัวอย่างทิ้งไว้ให้แห้งโดยให้แอลกอฮอล์หรืออะซีโตนนั้นระเหยไปเอง จะทำให้ตัวอย่างทนทานต่อการให้แห้งได้ดีขึ้น การทำให้แห้งในบรรยากาศการปกติ ไม่เหมาะสำหรับตัวอย่างทางชีวภาพที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม หรือมีแรงตึงผิวน้อย เพราะมักจะเกิดลักษณะที่ผิดไปจากลักษณะที่แท้จริงของตัวเอง (artifact) เช่น ผิวตัวอย่างจะเหี่ยวย่น ตัวอย่างแฟบ หรือรูปร่างบิดเบี้ยวไป

(2) **การทำแห้ง ณ จุดเยือกแข็ง** (freeze drying)

เทคนิคนี้เป็นการทำตัวอย่างให้แห้งโดยการเปลี่ยนผลึกเล็กๆของน้ำแข็งหรือของเหลวภายในเซลล์ให้กลายเป็นไอไปภายใต้สุญญากาศ ซึ่งตัวอย่างต้องถูกทำให้เย็นจนเป็นน้ำแข็งก่อน (physical fixation) โดยการจุ่มตัวอย่างลงไปในไนโตรเจนเหลว หรือพ่นด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)หรือแก๊สฟรีออน (freon12) อย่างรวดเร็วของเหลวหรือแก๊สเหล่านี้มีอุณหภูมิต่ำประมาณ –150°C จะทำให้ตัวอย่างแข็งตัวโดยฉับพลัน ดังนั้นของเหลวในเซลล์หรือเนื้อเยื่อจึงไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ ดังที่พบในการทำตัวอย่างให้แข็งตัวอย่างช้าๆ บางครั้งหากตัวอย่างมีขนาดใหญ่ หรือมีของเหลวภายในเซลล์มาก ควรจุ่มตัวอย่างในกลีเซอรีน 2-3 นาทีก่อน จึงทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ในเซลล์หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่แช่แข็งแล้วไปใส่เครื่องฟรีซดรายเออร์ (freeze dryer) ซึ่งสามารถดูดเอาไอของอากาศและความชื้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ที่จุดนี้เองน้ำแข็งจะระเหิดเป็นไอตัวอย่างที่แห้งสามารถนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป เพื่อศึกษาด้วย SEM ได้

การทำตัวอย่างให้แห้งด้วยวิธีนี้ มีข้อเสียคือ อุปกรณ์มีราคาแพง ใช้เวลานานมากในการระเหิดน้ำออกไปและถ้าหากการทำให้ตัวอย่างเย็นจนเป็นน้ำแข็งไม่ถูกต้อง และมีผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดลักษณะที่ผิดไปจากที่แท้จริงได้

(3) **การทำแห้ง ณ จุดวิกฤติ** (critical point drying :CPD)

วิธีนี้ได้รับความนิยมมากเพราะมีความสะดวกรวดเร็วและประหยัด อุปกรณ์ก็มีราคาไม่แพงนัก เทคนิคนี้สำคัญที่จุดวิกฤต(critical point) คือจุดที่อุณหภูมิและความดันระดับหนึ่งที่ของเหลวและแก๊สมีความหนาแน่นสมดุลกันที่จุดนี้ของเหลวและแก๊สมีความตึงผิวเป็นศูนย์ ตัวอย่างที่อยู่ในสภาวะวิกฤตนี้จึงแห้ง โดยรูปร่างและโครงสร้างเหมือนกับธรรมชาติ คือตัวอย่างไม่เหี่ยว ของเหลวทุกชนิดจะมีจุดวิกฤติของตัวมันเอง

เมื่อตัวอย่างผ่านการคงสภาพและขจัดน้ำ สุดท้ายตัวอย่างจะแช่อยู่ใน 100% เอทธานอล หรืออะซีโตน ซึ่งเป็นของเหลวตัวกลาง (intermediate fluid) นำตัวอย่างมาใส่ตลับใส่ตัวอย่างสำหรับเครื่อง CPD (sample holder) โดยต้องให้มีของเหลวตัวกลางชุ่มตัวอย่างอยู่ตลอดเวลา แล้วจึงนำตัวอย่างใส่ในช่องใส่ตัวอย่างของเครื่อง CPD (CPD chamber) แล้วเติมของเหลวตัวกลางให้ท่วมตัวอย่าง ปิดฝาช่องใส่ตัวอย่างให้สนิทแล้วค่อยๆเปลี่ยนจากของเหลวตัวกลาง ให้ทรานซิชันนอลฟลูอิด (transitional fluid) เข้าไปแทนที่ในตัวอย่างจนสมบูรณ์ ทรานซิชันนอลฟลูอิดต้องเป็นของเหลวที่มีจุดวิกฤตที่เหมาะสม คือ ที่จุดนี้อุณหภูมิและความดันต้องไม่สูงเกินไปจนเป็นอันตรายต่อตัวอย่าง ตัวอย่างของทรานซิชันนอลฟลูอิดได้แก่ คาร์บอนได้ออกไซด์เหลว,แก๊สฟรีออน 12, ไนตรัสออกไซด์ (N_2O) เป็นต้น

หลังจากเปลี่ยนของเหลวตัวกลางไปเป็นทรานซิชันนอลฟลูอิดแล้ว จึงปรับความดันและอุณหภูมิให้ถึงจุดวิกฤติ ตัวอย่างจะแห้งจะมีโครงสร้างที่เหมือนเดิม หรือใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด ในบางครั้ง

ก่อนที่จะนำตัวอย่างมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง CPD อาจนำตัวอย่างไปแช่ในเอมิลอะซีเทต (amyl acetate) ซึ่งมีกลิ่นฉุนเฉพาะตัวทั้งนี้เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าของเหลวตัวกลาง ถูกแทนที่ด้วยทรานซิชันนอลฟลูอิดอย่างสมบูรณ์แล้ว ทราบได้โดยเมื่อของเหลวที่ถูกปล่อยออกจากช่องใส่ตัวอย่างไม่มีกลิ่นของเอมิลอะซีเทต

ก่อนที่จะนำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วไปศึกษาด้วย SEM จะต้องติด (mounting) ตัวอย่างบนแท่นติดตัวอย่าง (stub) แล้วจึงนำตัวอย่างนี้ไปฉาบผิว (coating) ด้วยโลหะหนักก่อนเสมอ

การติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่งยึดตัวอย่าง (mounting) [7]

วัสดุที่ใช้ทำเป็นแท่นติดตัวอย่าง ควรเป็นโลหะ เช่น ทองเหลือง ทองแดง อลูมิเนียม หรือแท่งเหล็ก เป็นต้น โดยทั่วไปแท่นติดตัวอย่าง จะมีรูปร่างเป็นแท่งที่มีหน้าตัดเป็นรูปวงกลม และเรียบ เพื่อให้ตัวอย่างสามารถวางบนหน้าตัดนี้ได้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงของแท่นติดตัวอย่างที่ใช้ ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวอย่าง แต่ก็ต้องมีความเหมาะสมกับช่องใส่แท่นติดตัวอย่างที่อยู่ภายในฐานของคอลัมน์ (Column) ของ SEM ด้วย

ตัวอย่างจะติดอยู่บนแท่นติดตัวอย่างได้ ต้องมีตัวกลางสำหรับยึด (adhesive) ให้ตัวอย่างติดอยู่บนแท่นได้แน่น โดยให้ด้านที่ไม่ต้องการศึกษาเป็นส่วนที่ถูกยึดติดกับแท่นติดตัวอย่าง ตัวกลางสำหรับยึดที่นิยมใช้ ได้แก่ เทปกาว 2 หน้า (double-sticky tape) , กาวเหนียวเงิน (silver paint) , กาวที่มีผงถ่าน (carbon paint) , พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) และยาทาเล็บ เป็นต้น การเลือกใช้ตัวกลางสำหรับยึดแต่ละชนิดขึ้นกับลักษณะและขนาดตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่เป็นผง เช่นละอองเรณู (pollen) หรือสปอร์ (spore) หรือตัวอย่างที่เป็นเส้นใย ควรเลือกใช้เทปกาว 2 หน้า ในบางครั้งตัวอย่างที่เป็นผงอาจใช้ยาทาเล็บก็ได้ โดยทายาทาเล็บลงบนด้านหน้าตัดของแท่นติดตัวอย่าง พอยาทาเล็บเริ่มแห้งหมาดๆจึงโรยผงตัวอย่างลงบนแท่นติดตัวอย่าง

ตัวอย่างแห้งที่มีขนาดใหญ่สามารถนำไปติดบนฐานตัวอย่างได้โดยใช้กาวประเภท กาวเหนียวเงิน หรือกาว ที่มีผงถ่าน (colloidal) เอจะช่วยการนำไฟฟ้า (conductivity) ระหว่างตัวอย่างและฐานยึดติดตัวอย่างให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เพราะโดยปกติแล้วตัวอย่างแห้งขนาดใหญ่ มักจะมีคุณสมบัติคล้ายฉนวน ซึ่งจะทำให้ประจุไฟฟ้าสถิตบนผิวของตัวอย่างเพิ่มขึ้น จนไปรบกวนทำให้เกิดประจุอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (secondary electron) น้อยลง หรือหักเหออกนอกทิศทางอันเป็นผลทำให้สัญญาณหรือเลวลง ทำให้ภาพพร่า

ตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก เบา และบอบบางมากอาจใช้อุปกรณ์ที่ช่วยในการหยิบจับ คือเข็มเขี่ยแบบสุญญากาศ (vacuum needle) โดยที่ปลายเล็กขนาดเล็กจะมีแรงดูดสุญญากาศ ใช้แตะตัวอย่างที่บอบบางมาติดบนแท่นติดตัวอย่าง วิธีการติดตัวอย่างโดยใช้กาวเหนียวที่มีลักษณะคล้ายครีมเหลวนี้ ทำได้โดย

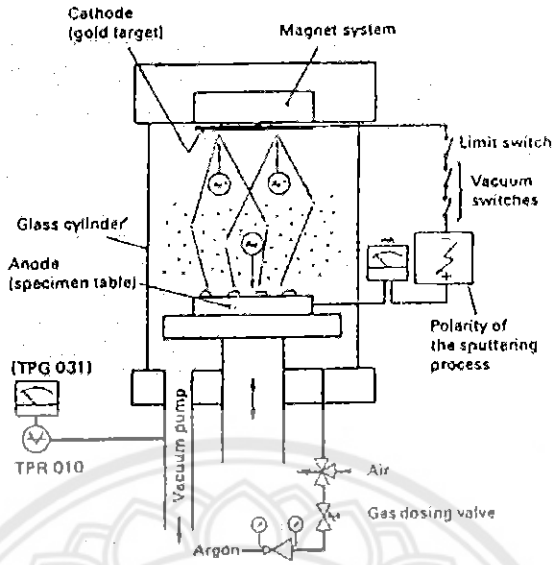
ป้ายกาวบนแผ่นหน้าของแท่นติดตัวอย่างที่ล้างให้สะอาดด้วยอะซีโตนมาอย่างดีแล้ว วางตัวตัวอย่างด้านตรงข้ามกับพื้นผิวที่ต้องการจะตรวจสอบบนกาวทันที หลังจากนั้นปล่อยตัวอย่างซึ่งติดและจัดไว้บนแท่นติดตัวอย่างให้แห้งสักระยะหนึ่ง ก่อนที่นำไปผ่านขั้นตอนการฉาบผิวโดยโมเลกุลของโลหะหนัก เพื่อการตรวจและศึกษาด้วย SEM

การเลือกใช้กาว หรือวัสดุสำหรับยึดตัวอย่างกับแท่นติดตัวอย่าง จะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติการเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดีไว้เป็นหลัก มิฉะนั้นแล้วการใช้กาวผิดประเภท หรือประเภทที่มีคุณสมบัติเป็นฉนวนอาจก่อให้เกิดอุปสรรคในขณะที่ตรวจสอบตัวอย่างด้วย SEM ได้หลายรูปแบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณภาพของภาพที่ปรากฏบนจอหรือบนแผ่นฟิล์มจะไม่ชัดเจน หรือผิดจากความเป็นจริงอันเนื่องจากการรบกวนของไฟฟ้าสถิตย์ที่ไม่สามารถผ่านตัวอย่างไปสู่ส่วนที่เป็นโลหะให้ครบวงจรไฟฟ้าได้

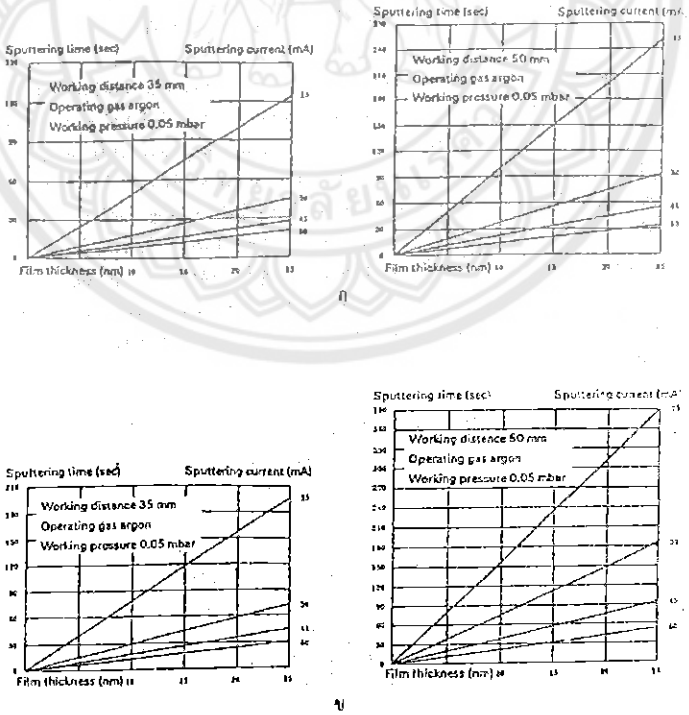
การวางตัวอย่างและการจัดตัวอย่างให้ยึดติดกับแท่นติดตัวอย่าง ควรทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ เพื่อจะได้เลือกผิวของตัวอย่างได้ถูกด้าน และสถานที่ดำเนินการนี้จะต้องไม่มีความชื้นสูง รวมทั้งจะต้องปราศจากละอองในบริเวณนั้นด้วย ตัวอย่างและแท่นติดตัวอย่าง ที่ยึดติดไว้ด้วยกันดีแล้ว ควรเป่าปัดฝุ่นโดยใช้ลูกยางเป่าลมบนผิวตัวอย่างเพื่อไล่ฝุ่นให้ออกไปจากผิวบนที่ต้องการจะตรวจสอบและศึกษา

การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก (metal coating) [8]

การฉาบผิวตัวอย่างเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำให้พื้นผิวมีคุณสมบัตินำไฟฟ้ายกเว้นกรณีที่ตัวอย่างนำไฟฟ้าได้ดีอยู่แล้ว หรือนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย SEM ชนิดสุญญากาศต่ำ ก็ไม่จำเป็นต้องฉาบผิวตัวอย่างที่จะศึกษาด้วย SEM นิยมฉาบผิวด้วยทอง (Au) หรือโลหะผสมระหว่างทองกับ พลาเดียม (Au-Pd) ซึ่งโลหะผสม Au-Pd จะให้ grain ที่ละเอียดกว่าทอง เหมาะสำหรับศึกษาตัวอย่างที่ต้องการรายละเอียดสูง (High resolution) เครื่องมือที่ใช้ในการฉาบผิวเรียกว่า Sputter coater หรือ Ion sputter (รูปที่ 5) โดยตัวอย่างจะวางไว้ที่ขั้ว anode และโลหะที่ใช้ฉาบ (Targer) อยู่ที่ขั้ว cathode ในการฉาบจะดูดอากาศออกให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศระดับ 0.1 Torr แล้วให้กระแสไฟฟ้าและปล่อยก๊าซอาร์กอน (Ar) เข้าไปใน chamer โดย Ar จะเคลื่อนไปที่ขั้ว cathode และชนแผ่นทองทำให้แตกตัวเป็นโมเลกุล กระจายไปทั่ว chamber แล้วค่อยๆเคลือบลงบนตัวอย่าง ความหนาของผิวฉาบควรอยู่ระหว่าง 10 -20 nm. การฉาบบางเกินไป จะทำให้เกิดการ Charge up ซึ่งภาพที่ได้จะเห็นเป็นแสงสว่างจ้าเป็นจุดๆ แต่ถ้าฉาบหนาเกินไปจะทำให้สูญเสียรายละเอียด ความหนาของผิวฉาบขึ้นอยู่กับ ระยะห่างระหว่างตัวอย่างกับโลหะที่ใช้ (Working distance) กระแสไฟฟ้า และเวลาที่ฉาบ (รูปที่ 6)



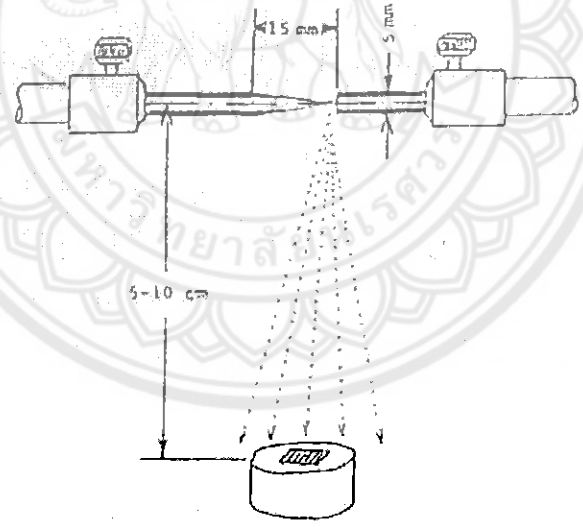
รูปที่ 9 แผนภาพแสดงการฉาบทองด้วยเครื่อง sputter coater [8]



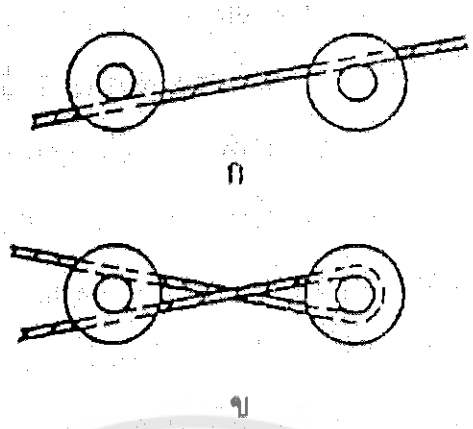
รูปที่ 10 กราฟแสดงความหนาของผิวฉาบ[8]

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้และความหนาที่ต้องการ

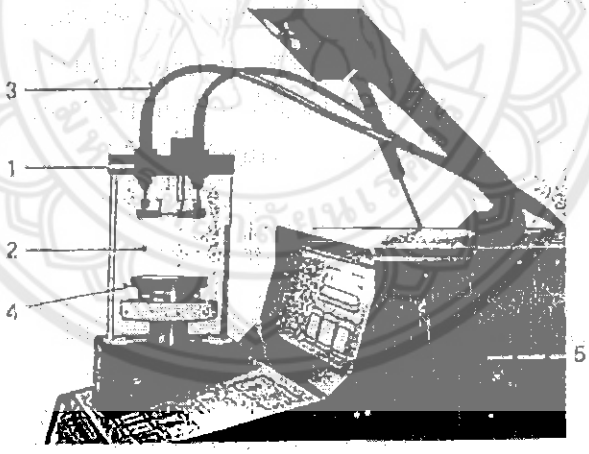
ตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ธาตุด้วย X-ray microanalysis จะฉาบผิวด้วยคาร์บอน เนื่องจากคาร์บอนเป็นธาตุเบามีคุณสมบัติดูดกลืนรังสีเอกซ์ได้น้อย จึงมีผลกระทบต่อการวัดความเข้มของรังสีเอกซ์ที่ออกจากตัวอย่างน้อยมาก คาร์บอนที่ใช้มี 2 แบบ คือ แบบแท่งกับแบบเส้น แบบแรก จะประด้วย แท่งคาร์บอน 2 แท่ง แท่งหนึ่งจะฝนให้เป็นปลายตัดเรียบ อีกแท่งหนึ่งจะเหลาให้เรียบ แล้วนำไปติดตั้งในเครื่องมือที่เรียกว่า Vacuum evaporator โดยให้ปลายทั้งสองชนกัน และอยู่เหนือตัวอย่างขึ้นมาประมาณ 5-10 cm (รูปที่ 3) การฉาบจะทำภายใต้สภาวะสุญญากาศสูง (10^{-6} Torr) โดยปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปที่แท่งคาร์บอน ซึ่งถูกยึดติดกับขั้วไฟฟ้า คาร์บอนจะถูกเผาจนร้อนแดง ทำให้ตรงปลายแหลมกลายเป็นไอ และเคลือบลงบนผิวตัวอย่าง ส่วนคาร์บอนแบบเส้นทำได้โดยพันเส้นคาร์บอนที่ขั้วไฟฟ้า จะใช้คาร์บอนเส้นเดียวหรือสองเส้นขึ้นอยู่กับความหนาของฟิล์มที่ต้องการ (รูปที่ 4) แล้วนำไปประกอบเข้ากับเครื่อง Carbon coater (รูปที่ 5) หลักการทำงานจะคล้ายกับ Vacuum evaporator แต่ทำงานภายใต้สภาวะสุญญากาศต่ำ (10^{-1}Torr) จึงเป็นข้อดี คือ ฉาบได้เร็วไม่ต้องรอสภาพสุญญากาศนาน ไม่ต้องฝนแท่งคาร์บอนและเครื่องมือมีราคาถูกกว่า แต่ก็มีข้อเสียคือ คาร์บอนแบบเส้นจะให้ grain คาร์บอนที่หยาบกว่า



รูปที่ 11 ลักษณะการจัดแท่งคาร์บอนสำหรับฉาบผิวด้วยเครื่อง Vacuum evaporator[8]



รูปที่ 12 ลักษณะการพันเส้นคาร์บอน (ก) เส้นเดียว (ข) สองเส้น[8]



รูปที่ 13 Carbon coater สำหรับฉาบผิวด้วยคาร์บอนแบบเส้น [8]

(1) Evaporator flange comp.(2)Glass cylinder (3)High current cable

(4)Specimen table accessory (5) High current supply

การเก็บรักษาตัวอย่างที่ฉาบผิวตัวอย่างแล้ว[7]

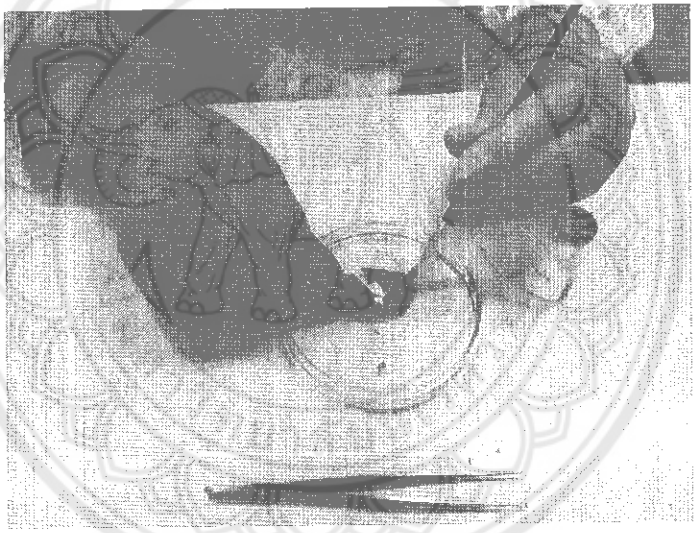
ตัวอย่างที่ฉาบผิวตัวอย่างแล้วควรที่จะนำไปตรวจและศึกษาด้วย SEM โดยเร็วที่สุดเท่าที่เวลาและโอกาสอำนวย โดยเหตุผลที่ว่าหากเก็บไว้นานๆคุณภาพหรือปริมาณของชั้นผิวโมเลกุลของโลหะหนักจะลดลงซึ่งจะทำให้ผลที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร

ในกรณีที่ต้องการจะเก็บตัวอย่างที่ฉาบผิวแล้วเพื่อศึกษาเพิ่มเติม ก็ควรจัดเก็บรักษาไว้เช่นเดียวกับตัวอย่างแห้ง คือเก็บไว้ในตู้หรือภาชนะที่ปราศจากความชื้นและปราศจากฝุ่นละออง

บทที่ 4
การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับงาน SEM และวิธีการปฏิบัติงาน

วิธีการเตรียมSpecimen(ชิ้นงานตัวอย่าง)

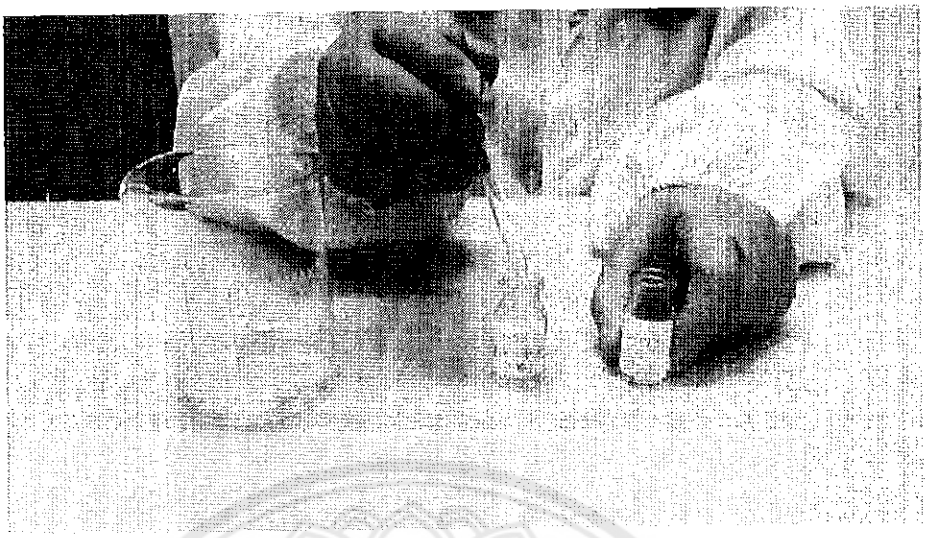
การตัดชิ้นงานตัวอย่างที่ต้องการศึกษาให้มีขนาดพอเหมาะ โดยขนาดที่เหมาะสมในการ fixative ได้ดีควรมีขนาดเล็ก โดยขนาดที่เหมาะสมไม่ควรเกิน 1x1x1 ลบ.มม. เพื่อให้น้ำยาที่ใช้ในการ fixative ตัวอย่างเข้าแทรกซึมได้ดีและทั่วถึงทั้งชิ้นงาน และนำชิ้นงานใส่ขวด vial หรือขวดขนาดเล็กอื่นๆ ที่มีสารละลาย PBS Buffer (Phosphate Buffer) pH=7 เพื่อเป็นการรักษาสภาพชิ้นงานให้คงสภาพให้มากที่สุด



รูปที่14 การตัดชิ้นงานตัวอย่าง อาทิเช่น ใบพืช

วิธีการคงสภาพปฐมภูมิ (Primary Fixation)

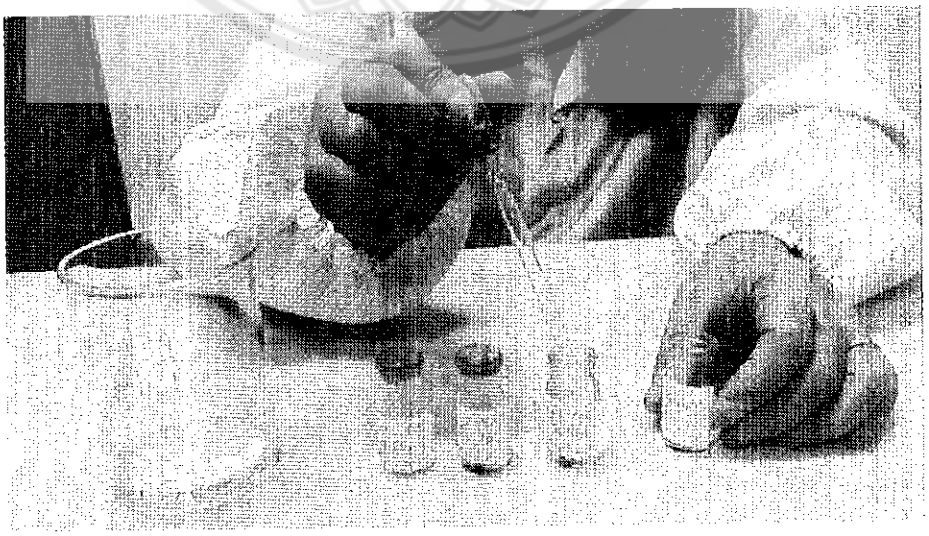
เมื่อผ่านขั้นตอนการตัดชิ้นงานและชิ้นงานอยู่ขวด vial ที่มีสารละลาย 0.1 M PBS Buffer (Phosphate Buffer) อยู่ ทำการดูดสารละลาย0.1 M PBS Buffer (Phosphate Buffer) ออกไปให้เหลือพอท่วมชิ้นงานตัวอย่าง (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) หลังจากนั้น ดูดสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใส่เข้าไปแทนที่ เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพให้คงเดิมมากที่สุด ซึ่งมีผลต่อการคงตัวของโปรตีนได้ดีมาก ใช้เวลา 1ชั่วโมง



รูปที่15 การเปลี่ยนน้ำยาปฐมภูมิ (Primary fixation)

วิธีการล้างสารละลายตัวอย่าง (Buffer wash)

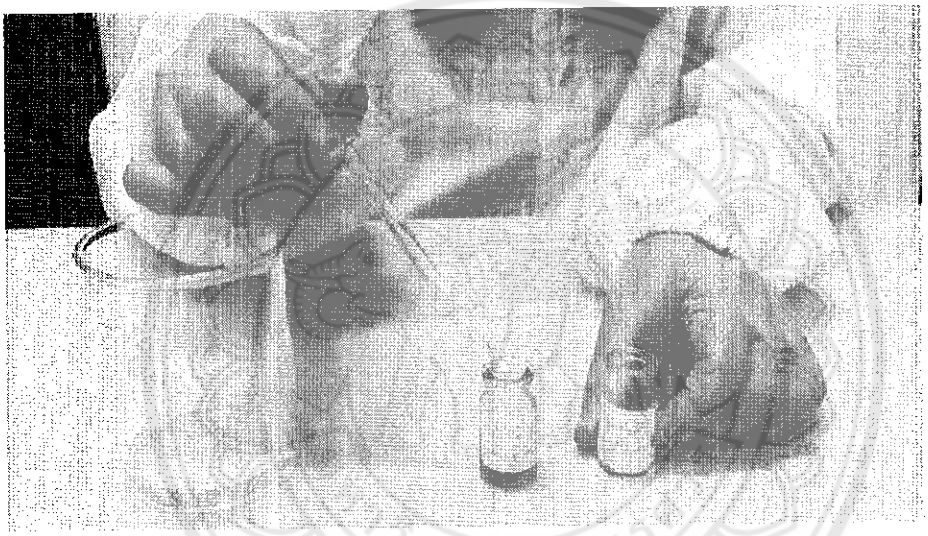
เมื่อคงสภาพชิ้นงานด้วย 2.5% glutaraldehyde นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการดูดสารละลาย2.5% glutaraldehyde ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) และ ใส่สารละลาย 0.1 M PBS Buffer (Phosphate Buffer) แทนที่ เป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้น ดูดสารละลาย 0.1 M PBS Buffer(Phosphate Buffer) เก่าออก และใส่สารละลาย0.1 M PBS Buffer (Phosphate Buffer) ใหม่ไปแทนที่ ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที (นิยมใช้ 0.1 M phosphate buffer เพราะมีความคล้ายคลึงกับของเหลวภายในเซลล์)



รูปที่16 การล้างสารละลายตัวอย่าง (Buffer wash)

วิธีการคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation)

เมื่อล้างสารละลายตัวอย่างด้วย 0.1 M PBS Buffer (Phosphate Buffer) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที หลังจากนั้น ทำการดูดสารละลาย 0.1 M PBS Buffer (Phosphate Buffer) ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) และใส่ Osmium Tetroxide (OsO_4) แทนที่ เพื่อเป็นการคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation) ซึ่งสามารถรวมกับองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์เนื้อเยื่อได้ดี ทำให้มีความทนทานและมีสภาพคงที่ ใช้ fix membrane และโครงสร้างที่ประกอบด้วยไขมัน โดยใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง (ชิ้นงานจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีดำ)



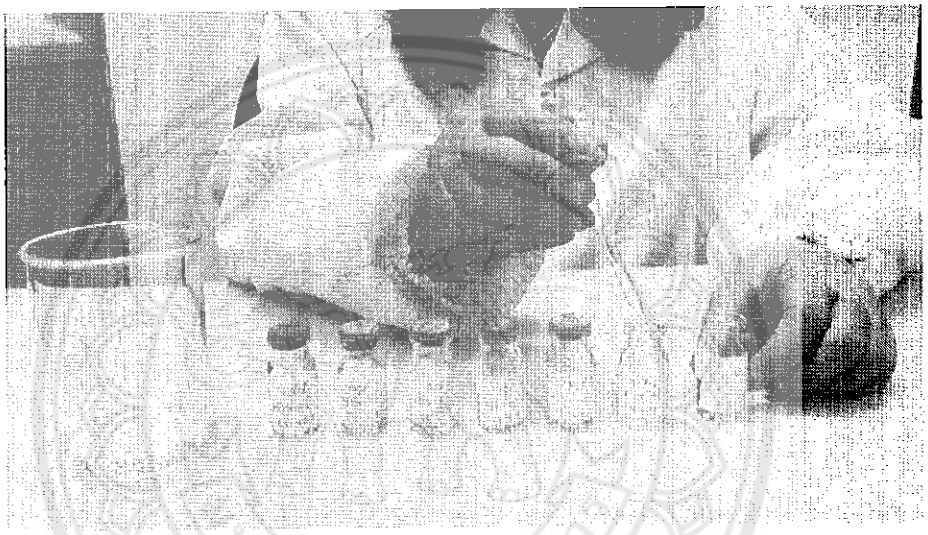
รูปที่17 การคงสภาพทุติยภูมิ (Post Fixation)

วิธีการขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง(Dehydration)

เมื่อคงสภาพทุติยภูมิด้วย Osmium Tetroxide (OsO_4) นาน 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการการขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง โดยการแทนที่ด้วยสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลายที่ระเหยง่าย นิยมใช้ ethanol หรือ acetone ไล่ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง จากประสบการณ์นิยมใช้ ethanol ดังนี้

- ทำการดูดสารละลาย Osmium Tetroxide (OsO_4) ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด)และใส่ 30% ethanol เข้าไปแทนที่ นาน 15 นาที
- ทำการดูดสารละลาย 30% ethanol ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) และใส่ 50% ethanol เข้าไปแทนที่ นาน 15 นาที
- ทำการดูดสารละลาย 50% ethanol ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด)และใส่ 70% ethanol เข้าไปแทนที่ นาน 15 นาที

- ทำการดูดสารละลาย 70% ethanol ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) และใส่ 90% ethanol เข้าไปแทนที่ นาน 15 นาที
- ทำการดูดสารละลาย 90% ethanol ออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) และใส่ 100% ethanol เข้าไปแทนที่ นาน 15 นาที
- ทำการดูดสารละลาย 100% ethanol เก่าออกให้เหลือพอท่วมชิ้นงาน (ห้ามแห้งโดยเด็ดขาด) และใส่ 100% ethanol ใหม่เข้าไปแทนที่ นาน 15 นาที



รูปที่18 การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration)

วิธีการทำแห้ง ณ จุดวิกฤติ (critical point drying :CPD)

เมื่อทำการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยการแทนที่น้ำด้วยสารระเหยง่าย ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง 30% - 100% ethanol นั้น สุดท้ายตัวอย่างจะแช่อยู่ใน 100% ethanol หรือ acetone หลังจากนั้น ทำแห้ง ณ จุดวิกฤติ โดยใช้เครื่อง CPD (critical point drying) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

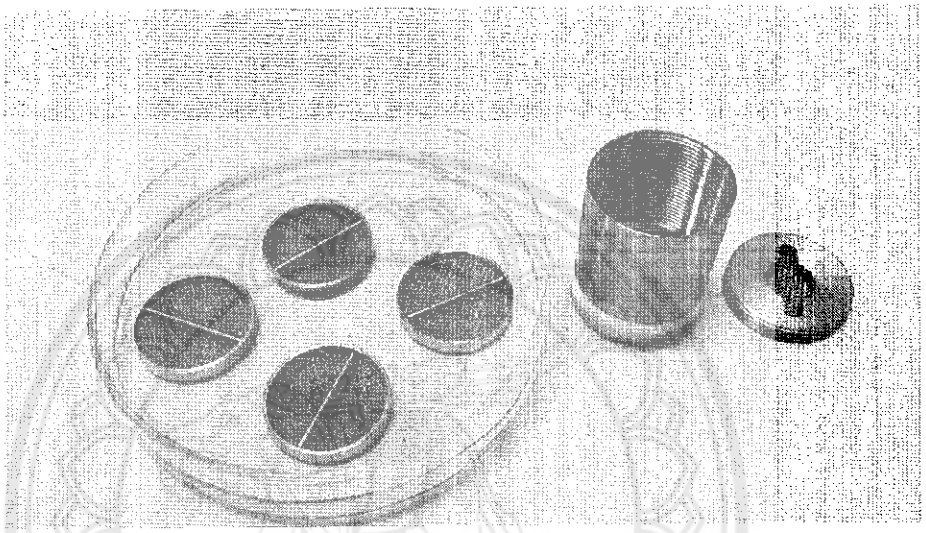
- ทำการลดอุณหภูมิ Chamber ของเครื่อง CPD ประมาณ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า

- นำตัวอย่างมาใส่ตลับ (sample holder) เป็นที่ใส่ตัวอย่างสำหรับใช้งานเครื่อง CPD (critical point drying) โดยต้องให้สารละลาย ethanol หรือ acetone ท่วมชิ้นงานตัวอย่างอยู่ตลอดเวลา

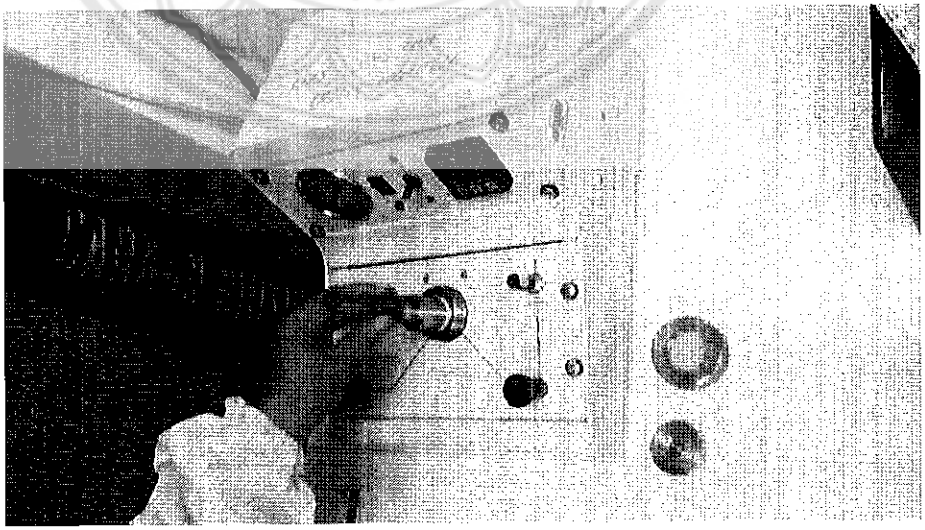
- เทสารละลาย ethanol หรือ acetone ลงไปครึ่งช่องใส่ชิ้นงานของเครื่อง CPD (CPD chamber)

-นำตัวอย่างที่อยู่ในตลับ (sample holder) ใส่ในช่องใส่ตัวอย่างของเครื่อง CPD (CPD chamber) แล้วเติมของเหลวตัวกลางให้ท่วมตัวอย่าง

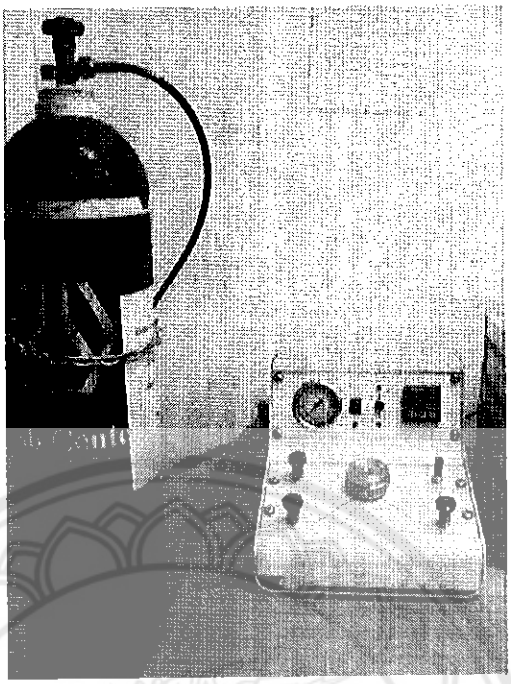
- ปิดฝาช่องใส่ตัวอย่างให้สนิทแล้วค่อยๆไล่สารระเหยง่าย ethanol หรือ acetone ออกโดยแทนที่ด้วยทรานซิชันนอลฟลูอิด (transitional fluid) นิยมใช้ $LqCO_2$ (คาร์บอนไดออกไซด์เหลว) เป็นของเหลวที่มีจุดวิกฤตที่เหมาะสม คือ ที่จุดนี้อุณหภูมิและความดันต้องไม่สูงเกินไปจนเป็นอันตรายต่อตัวอย่าง ตัวอย่างจะแห้งและคงสภาพโครงสร้างเดิมได้มากที่สุด



รูปที่19 การนำตัวอย่างมาใส่ตลับ sample holder



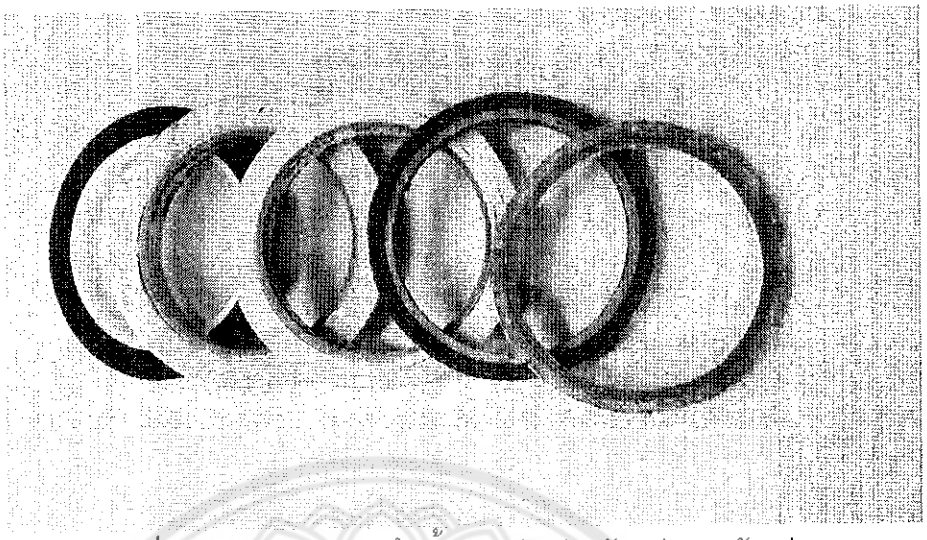
รูปที่ 20 การนำตลับตัวอย่าง sample holder ใส่เครื่อง CPD



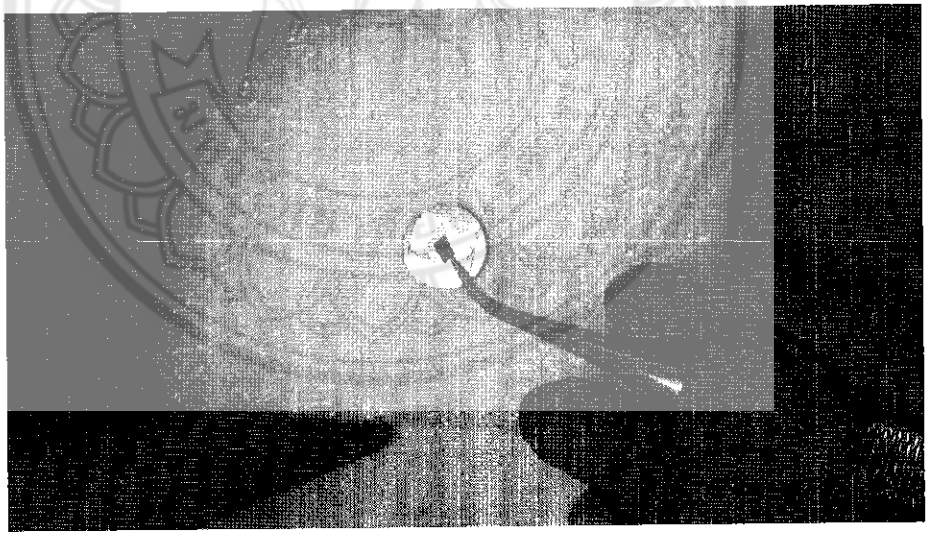
รูปที่ 21 การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration) ที่อยู่ภายในเครื่อง CPD รุ่น 7501

วิธีการติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่งยึดตัวอย่าง (mounting)

เมื่อนำชิ้นงานตัวอย่างออกจากเครื่อง CPD (critical point drying) ทำการติดยึดตัวอย่างบน stub (แท่นยึดตัวอย่าง) ด้วยเทปกาวหรือน้ำยาป้ายนำไฟฟ้า ชนิดต่างๆ อาทิเช่น เทปกาวคาร์บอน เทปกาวทองแดง เทปกาวเงิน และน้ำยาป้ายเงิน (silver paint) ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง และการวิเคราะห์ระดับจุลธาตุ (EDS) ควรเลือกเทปกาวที่ไม่มีอยู่ในสารประกอบของตัวอย่าง เพื่อแยกผลในการวิเคราะห์ได้ถูกต้อง ในกรณีตัวอย่างทางชีวภาพที่นิยมคือ carbon tape (เทปกาวคาร์บอน) ใช้ในการยึดชิ้นงานตัวอย่างกับ stub (แท่นยึดตัวอย่าง) เพื่อเป็นการตรึงชิ้นงานให้คงสภาพเดิมไม่ม้วนงอ



รูปที่ 22 เทปกาวสำหรับยึดชิ้นงานตัวอย่างกับแท่นวางตัวอย่าง

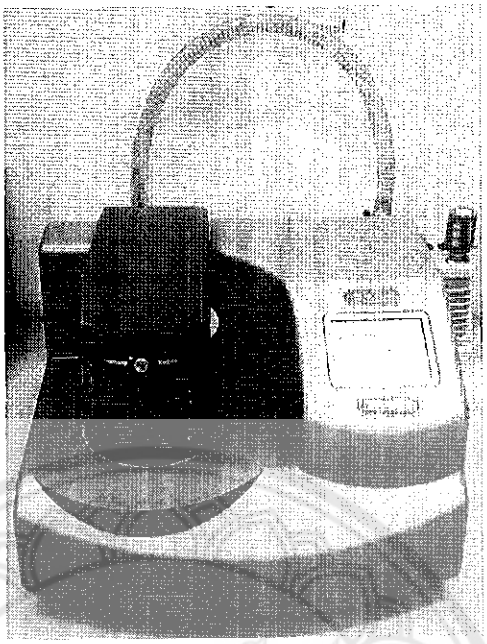


รูปที่ 23 การติดตัวอย่างบนฐานหรือแท่นวางตัวอย่าง (stub)

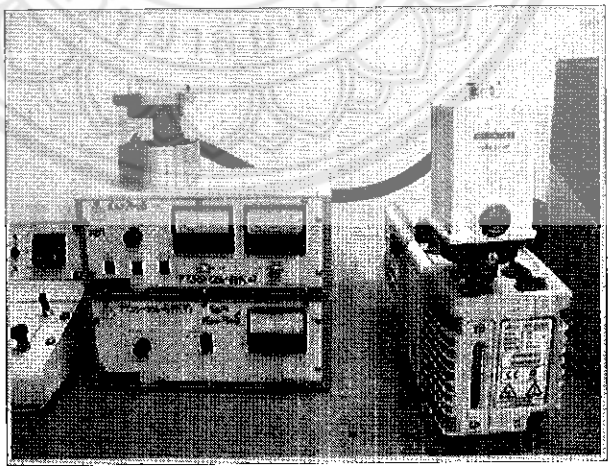
วิธีการฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก (metal coating)

เมื่อทำการยึดชิ้นงานตัวอย่างกับ stub (แท่นยึดตัวอย่าง) หลังจากนั้น นำstub (แท่นยึดตัวอย่าง) ชิ้นงานตัวอย่างมาเข้าเครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (Sputter Coater) (ดังรูปที่ 24) เพื่อให้ชิ้นงานตัวอย่างมีคุณสมบัตินำไฟฟ้า ซึ่งเครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (Sputter Coater) มีหลายแบบ ทั้งนี้แสดงตัวอย่างที่ทางงานห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอนใช้งานอยู่คือ ยี่ห้อ Quorum รุ่น Q150RS (ดังรูปที่ 25) และยี่ห้อ Polaron รุ่น SC 7620 (ดังรูปที่ 26)

รูปที่ 24 การนำ stub ตัวอย่าง เข้าเครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater)



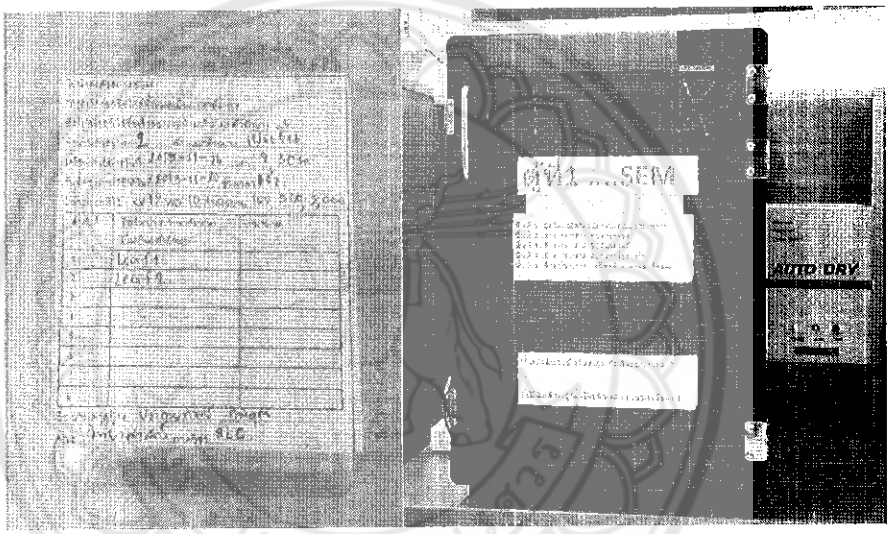
รูปที่ 25 เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater) ยี่ห้อ Quorum รุ่น Q150RS



รูปที่26 เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (sputter Coater) ยี่ห้อ Polaron รุ่น SC7620

วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างที่ฉาบผิวตัวอย่างแล้ว

หลังจากทำการฉาบผิวตัวอย่างด้วยทองโดยเครื่อง Sputter Coater ควรนำมาวิเคราะห์โดยเร็ว หากเก็บไว้นานๆคุณภาพหรือปริมาณของชั้นผิวโมเลกุลของโลหะหนักจะลดลงซึ่งจะทำให้ผลที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ถ้าในกรณีต้องเก็บตัวอย่าง ควรเขียนข้อมูลของตัวอย่างให้ชัดเจน ถูกต้อง (ดังรูปที่ 20) และนำเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อป้องกันฝุ่นละอองและความชื้น (ดังรูปที่ 21)



รูปที่ 27 การเขียนของข้อมูลชิ้นงานตัวอย่างและเก็บในตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

บทที่ 5
ปัญหา อุปสรรคและข้อเสนอแนะ

ปัญหาและอุปสรรคจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างควรระมัดระวังไม่ให้ชิ้นงานตัวอย่างแห้ง ซึ่งชิ้นงานตัวอย่างควรอยู่ในสารละลายตลอดเวลา เพื่อช่วยรักษาสภาพชิ้นงานไม่ให้เสียโครงสร้าง หรือรูปร่างได้ จากประสบการณ์การการเตรียมตัวอย่างแต่ละครั้ง จะต้องมีการเตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีให้พร้อมก่อนเริ่มทำการเตรียมอย่าง เพื่อลดปัญหาการเสียเวลาในแต่ละครั้งได้ และจากการจัดทำคู่มือการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM) ยี่ห้อ LEO รุ่น 1455VP นั้น ตัวอย่างทางชีวภาพมีหลายชนิดและมีความหลากหลายอย่างมาก ผู้จัดทำซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ต้องใช้เวลาในการจัดทำคู่มือเป็นเวลานาน ในการอ่านข้อมูล รวบรวมข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงและจากประสบการณ์ทำงาน มาสรุปและถ่ายทอดให้ผู้ที่ไม่เคยเตรียมตัวอย่างมาก่อนเข้าใจและสามารถปฏิบัติตามจากคู่มือนี้ได้ ซึ่งมีปัจจัยทางด้านเวลาที่จำกัดการรวบรวมเอกสารได้ไม่ครอบคลุมทุกชนิดตัวอย่าง ข้อเสนอแนะควรมีการจัดทำคู่มือเพิ่มเติมในโดยแยกชนิดตัวอย่าง อาทิเช่น ตัวอย่างทางด้านเภสัชวิทยา ตัวอย่างทางการแพทย์ ตัวอย่างพืช และตัวอย่างสัตว์ เป็นต้น ดังนั้น ต้องมีการจัดทำคู่มือในโอกาสต่อไปและจะมีการศึกษาให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. หัสวิภา หมายมั่น. (2555). Scanning Electron Microscope :SEM. สืบค้นเมื่อ 22 มีนาคม 2557. จากhttp://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/micro-analysis-instrument-menu/item/96-scaning-electron-microscrope.html.
2. ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. (2557). **กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด**(SEM) LEO **รุ่น**1455VP. สืบค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2557. จากhttp://www.sci.nu.ac.th/slc/tools.php?tool_ID=1
3. ร้อยตำรวจเอก วิวัฒน์ ชินวร. (2547). **การวิเคราะห์เขม่าดินปืนด้วยเทคนิค** SEM/EDX. วิทยานิพนธ์. วทม. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
4. ศูนย์วิจัยทางฟิสิกส์ของฟิล์มบาง. (2557). Field Emission Scanning Electron Microscope JSM-7001F. สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2557. จาก http://thep-center.org/src2/files/eq/fesem.pdf.
5. สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2557). Electron Microscope: **กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน**. สืบค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2557. จาก http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/nano/Page/Unit4-5.html.
6. ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง .**กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด** Scanning Electron Microscope : SEM. สืบค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2557. จาก http://www.kmitl.ac.th/sisc/SEM/SEMmodel.htm.
7. รองศาสตราจารย์ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. (2545). **เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์**. 1(186-234) สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
8. การเตรียมตัวอย่างสำหรับ SEM. (2557). **การฉาบผิว**(Coating). สืบค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2557. จาก http://www.elecnet.chandra.ac.th/courses/ELEC2101/termwork/sem/w5.3/5.3.html.
9. วิทยาศาสตร์น่ารู้กับครูแจง. **หลักการทำงานของเครื่อง**SEM. สืบค้นเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2558. จากhttps://kanokwan09.wordpress.com/nano/sem/

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล นางประกายทิพย์ กิติคุณ

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์

ที่ทำงานปัจจุบัน ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2553 วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยนเรศวร

พ.ศ. 2547 ประกาศนียบัตรวิชาชีพครู มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

พ.ศ. 2544 วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลงานวิจัย

1. Effect of *Butea superba* on sperm quality and Morphology in Diabetic Rats ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ ประจำปี 2551 ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (หัวหน้าโครงการ)
2. Microstructural Study of Carbides in High Chromium Cast Irons ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ ประจำปี 2550 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย นเรศวร (หัวหน้าโครงการ)
3. The Study of bead morphology using Scanning Electron Microscope งบประมาณรายได้ปี 2549 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (หัวหน้าโครงการ)
4. นำเสนอผลงานด้านโปสเตอร์เรื่อง Phase and Microstructure of Bismuth Titanate Powers Synthesized by Chemical Coprecipitation Route ในการประชุมวิชาการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ครั้งที่ 20 ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์กรุงเทพฯ (ผู้ร่วมวิจัย)
5. นำเสนอผลงานด้านโปสเตอร์เรื่อง Influences of Cooking and Bleaching Conditions on Microstructures of Broussonetia Papyrifera L. Vent and Edgeworthia Papyritera Mitsumata ในการประชุมวิชาการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ครั้งที่ 20 ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์กรุงเทพฯ (ผู้ร่วมวิจัย)