

การเตรียมตัวอย่างใบพืชสำหรับการทำแห้งด้วยวิธี Freeze drying

นุสบา ครบุรี

นักวิจัย ปฏิบัติการ

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ธันวาคม 2566)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) นั้นจำเป็นจะต้องให้ตัวอย่างแห้งปราศจากน้ำ ความชื้น และน้ำมัน โดยการทำให้แห้ง (Dehydration) ตัวอย่างมีหลากหลายวิธี เช่น การอบแห้ง (Drying), การทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ (Critical point drying : CPD) หรือ การทำให้แห้ง ณ จุดเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างใบพืชถือเป็นตัวอย่างทางชีวภาพที่มีของเหลวอยู่ในโครงสร้างสูง จึงจำเป็นจะต้องนำของเหลวที่อยู่ในโครงสร้างออกโดยที่ไม่ทำให้โครงสร้างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

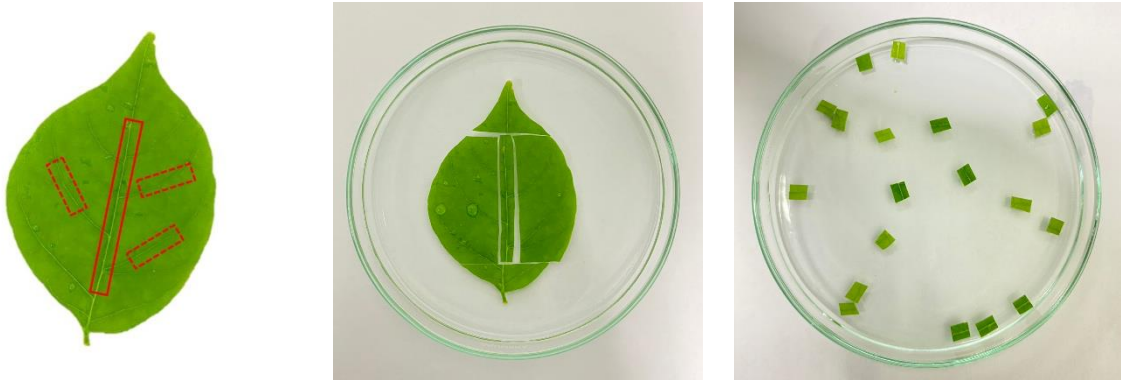
การเตรียมตัวอย่างให้แห้งด้วยวิธีทำแห้ง ณ จุดเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นวิธีการที่ไม่ต้องใช้สารเคมีในการเตรียมตัวอย่าง เหมาะสำหรับตัวอย่างที่ไม่ทนความร้อนและสารเคมี วิธีการนี้จะทำให้ตัวอย่างแห้งโดยการเปลี่ยนของเหลวภายในเซลล์ให้ระเหิดกลายเป็นไอในสภาวะสุญญากาศอย่างช้าๆ โดยตัวอย่างจะต้องถูกลดอุณหภูมิให้เป็นสภาวะน้ำแข็งอย่างรวดเร็วก่อนโดยการเทไนโตรเจนเหลวลงในตัวอย่าง ซึ่งการทำให้ตัวอย่างเกิดการแข็งตัวอย่างรวดเร็วจะทำให้ของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก(หากใช้เวลานานภายในโครงสร้างจะเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ทำให้เซลล์ตัวอย่างเกิดการเสียหายได้) จากนั้นนำตัวอย่างที่แข็งตัวแล้วใส่ลงเครื่อง Freeze dryer เพื่อระเหิดน้ำแข็งให้เป็นไอ(นำความชื้นออกจากตัวอย่าง) ณ อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เมื่อครบกระบวนการสามารถนำตัวอย่างที่ทำแห้งแล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไปได้

การเตรียมตัวอย่าง “ใบพืช” ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze drying สามารถดำเนินการได้ ดังนี้

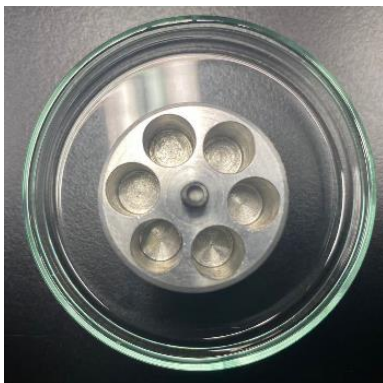
- 1) เมื่อตัดใบพืชมาแล้ว นำมาทำความสะอาดด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น ใช้ฟู่กันในการเช็ดสิ่งสกปรกที่ติดมากับตัวอย่างออกอย่างเบามือ เมื่อทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วให้นำตัวอย่างวางลงบน petri dish ที่มีน้ำกลั่นใส่ไว้เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ตัวอย่างเหี่ยว



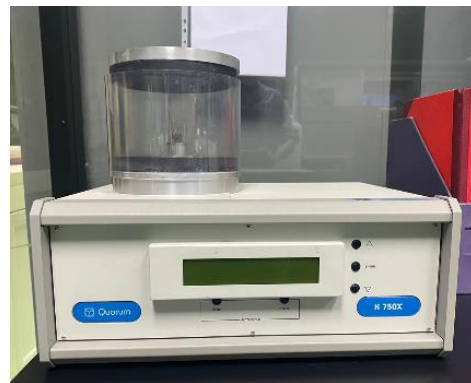
- 2) การตัดตัวอย่างจะต้องให้มีขนาดไม่เกิน 5 มิลลิเมตรโดยตัวอย่างต้องอยู่ในน้ำกลั่นตลอด และจุดสังเกตในบริเวณที่ควรตัดของใบพืชคือส่วนของเส้นกลางใบ (Midrib) และเส้นใบ (Vein) เนื่องจากเมื่อตัวอย่างถูกทำแห้งแล้วนั้นจะสามารถใช้แยกได้ว่าด้านใดคือผิวใบด้านบน (Upper epidermis) หรือผิวใบด้านล่าง (Lower epidermis)



- 3) เมื่อเครื่อง Freeze dryer เริ่มกระบวนการ “Start Cooling Now” แล้วนั้นให้นำตัวอย่างที่ตัดมาซับเอาน้ำส่วนเกินออกโดยการใช้ฟู่กันค่อยๆ เชียตัวอย่างลงบนกระดาษ แล้วนำตัวอย่างมาลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วโดยการเทไนโตรเจนเหลว (ซับน้ำส่วนเกินออกเพื่อป้องกันไม่ให้กลายเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่)
- 4) เมื่อตัวอย่างแข็งตัวแล้วให้นำฟู่กันเชียตัวอย่างลงใน Specimen holder โดยใส่ 1 ชิ้นต่อ 1 ช่อง จากนั้นนำใส่ในเครื่อง Freeze dryer และดำเนินการต่อตามกระบวนการของเครื่อง



Specimen holder



Freeze Dryer (Quorum : K750X)

เอกสารอ้างอิง

- [1] Pathan, A. K., J. Bond, and R. E. Gaskin. "Sample preparation for SEM of plant surfaces." *Materials Today* 12 (2010): 32-43.
- [2] Yuan, Jinhong, et al. "Comparison of sample preparation techniques for inspection of leaf epidermises using light microscopy and scanning electronic microscopy." *Frontiers in Plant Science* 11 (2020): 133.