

การเตรียมอนุภาคจากเจลาติน-ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งและบด เพื่อประยุกต์ใช้  
ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก



นางสาวอรทัย ศุภวรรณวิบูล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF PARTICLES FROM GELATIN - THAI SILK FIBROIN USING  
FREEZE DRYING AND MILLING FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Miss Orathai Suphawannawiboon



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



อรรถัย ศุภวรรณวิบูล : การเตรียมอนุภาคจากเจลาติน-ไฟโบรอินไหมไทยด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งและบด เพื่อประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (PREPARATION OF PARTICLES FROM GELATIN - THAI SILK FIBROIN USING FREEZE DRYING AND MILLING FOR BONE TISSUE ENGINEERING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. โศรดา กนกพานนท์, 92 หน้า.

กระบวนการขึ้นรูปอนุภาคหลายกระบวนการต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการขึ้นรูป นอกจากนี้ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมแล้ว ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอาจเป็นพิษต่อเซลล์หรือส่งผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ได้ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมอนุภาคที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ผ่านกระบวนการขึ้นรูปแบบใหญ่ไปเล็ก ไฟโบรอิน (S) จากรังไหมไทย *Bombyx mori* (นางน้อยศรีสะเกษ 1) ผสมกับเจลาติน (G) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน คือ S100, S80G20, S50G50, S20G80 และ G100 มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟองน้ำด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งและเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (ร้อยละ 0.10-0.20 โดยปริมาตร) แผ่นฟองน้ำที่ขึ้นรูปได้ถูกบดให้เป็นอนุภาค และคัดขนาด 1,000-2,000 ไมโครเมตรมาใช้ในการศึกษา ผลการทดสอบความเสถียรตัวในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคสูญเสียน้ำหนักไปน้อยกว่าร้อยละ 10 ส่วนในสารละลายเอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV (ค่าความพีเอช 7.4) อนุภาคที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบสูง ย่อยสลายช้ากว่าอนุภาคเจลาตินอย่างเดียวในเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก จึงมีการสะสมผลึกแคลเซียมฟอสเฟตบนพื้นผิวของอนุภาค โดยการแช่อนุภาคในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์สลับกับสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ เมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับมากขึ้นอนุภาคมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น 1.6-4.2 เท่า โดยมีอัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของผลึกบนอนุภาคมีค่าประมาณ 0.86-1.28 (โดยอะตอม) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ในกระดูกมนุษย์ (1.15-1.70) และมีอัตราส่วนองค์ประกอบอินทรีย์ต่ออินทรีย์หลังการแช่สลับ 12 รอบประมาณ 25:75 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในสารละลายเอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV พบว่าที่เวลา 14 วัน อนุภาคที่เคลือบผิวทุกชนิดมีน้ำหนักคงเหลือมากกว่าอนุภาคที่ไม่เคลือบผิว 2.6-7.0 เท่า การเคลือบผิวด้วยแคลเซียมฟอสเฟตช่วยให้การยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระดูกออสทีโอซาร์โคมา (SaOS-2) ได้ดีกว่าอนุภาคที่ไม่เคลือบผิว จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการขึ้นรูปที่ใช้เป็นทางเลือกที่ปลอดภัยสำหรับการผลิตอนุภาคโดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ อนุภาคที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมสำหรับการพัฒนาต่อยอดในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2560

# # 5770482321 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: THAI SILK FIBROIN / GELATIN / SOLVENT-FREE / PARTICLE FABRICATION /  
ALTERNATE SOAKING / HYDROXYAPATITE

ORATHAI SUPHAWANNAWIBOON: PREPARATION OF PARTICLES FROM GELATIN - THAI  
SILK FIBROIN USING FREEZE DRYING AND MILLING FOR BONE TISSUE ENGINEERING.  
ADVISOR: ASST. PROF. DR. SORADA KANOKPANONT, 92 pp.

Several particle fabrication methods require the use of organic solvents. Beside environmental problem, residues solvent may be toxic to cells or affect biological functions. This study aimed to use a solvent-free technique via top-down approach to produce particles for bone tissue engineering. Silk fibroin (S) (*Bombyx mori*, Thai silk cocoons, Nangnoi Srisaket 1) was blended with gelatin (G) at different blending ratios of S100, S80G20, S50G50, S20G80 and G100. The composited sponges were fabricated by freeze-drying and glutaraldehyde crosslinking (0.10- 0.20 %v/v). The resulting sponges were grinded and were sieved to obtain the particles in the range of 1,000-2,000  $\mu\text{m}$ . The particles weight loss was less than 10% in water (at 37 °C for 24 hours). Enzymatic stability test (1 U/mL protease type XIV solution at pH 7.4 for 24 hours) showed that the particles with high silk fibroin contents were more resisted to degradability comparing to the neat gelatin particles. To enhance biological properties of particles for bone tissue engineering, calcium phosphate crystals were deposited onto a surface of particles by alternate soaking in calcium chloride and disodium hydrogen phosphate solutions for 4, 8 and 12 cycles. The more soaking cycles, the more weights increased by 1.6-4.2 times of uncoated particles. The Ca/P ratio (by atomic) of crystals on surface-coated particles were at 0.86-1.28, which were closed to that of the hydroxyapatite in human bone (1.15-1.70). The organic/inorganic ratio of coated particles after 12 cycles of alternate soaking were at 25:75. *In vitro* degradation test in protease type XIV solution, the remained weights of calcium phosphate coated particles after 14 days were more than the uncoated particles by 2.6-7.0 times. The calcium phosphate-coated particles supported attachments and proliferation of human osteogenic sarcoma cell line (SaOS-2) better than the uncoated protein particles. This top-down fabrication was safe choice for producing solvent-free cell carrying particles which has potential use for bone tissue engineering applications.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature .....

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลือและสนับสนุนของหลายท่าน ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยแนะนำแนวทางการวิจัย ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาและการอบรมให้ความรู้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการงานวิจัยนี้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบ ซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ชรินพาณิชย์กุล ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. กษิติศ หนูทอง และดร. ปิยะนุช ฐิติวุฒิกเกียรติ กรรมการการสอบ ที่ท่านได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา สำหรับความอนุเคราะห์รังไหมไทย *Bombyx mori* (นางน้อยศรีสะเกษ1) ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุพรรณษา ยอดเมือง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์เซลล์มะเร็งกระดูกออสทีโอซาร์โคมา (Human osteogenic sarcoma cell line, SaOS-2) สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณรุ่งนภา แยมเดช คุณกัณยาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ คุณชาวี เหล่ามีผล คุณปภาวี ลิขิตเดชาโรจน์ และคุณอวิกา ชุ่มมงคล และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจ และให้สนับสนุน ตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	1
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....	4
บทที่ 2.....	6
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering).....	6
2.2 ชีววัสดุที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคไมโคร .....	7
2.2.1 เจลาติน (Gelatin) .....	7
2.2.2 ไฟโบรอิน (Fibroin) .....	10
2.3 กระบวนการขึ้นรูปอนุภาค.....	12
2.4 การพัฒนาคุณสมบัติของชีววัสดุด้วยวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) .....	18
2.5 กระดูก (Bone).....	22
2.5.1 ชนิด ประเภท และโครงสร้างของกระดูก .....	23
2.5.2 องค์ประกอบของกระดูก.....	24

2.5.3 การสร้างกระดูก (Bone formation).....	25
2.6 การดัดแปลงพื้นผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	26
2.7 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility).....	30
2.8 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์และสิทธิบัตรทางการค้าที่เกี่ยวข้อง.....	32
2.8.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่เกี่ยวข้อง.....	32
2.8.2 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	35
บทที่ 3.....	37
วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย .....	37
3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้.....	37
3.2 อุปกรณ์.....	38
3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย .....	40
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย .....	41
3.4.1 การเตรียมสารละลายตั้งต้น.....	41
3.4.2 การขึ้นรูปอนุภาคไฟโบรอินไหมไทย-เจลาติน.....	42
3.4.3 การดัดแปลงพื้นผิวอนุภาคไฟโบรอินไหมไทย-เจลาตินด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยวิธีแช่กลับ.....	43
3.4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ.....	43
• สารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ .....	43
ก. ค่าศักย์ゼต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาตินชนิดเอ และสารละลายผสมไฟโบรอินไหม ไทยและเจลาตินชนิดเอ .....	43
• อนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ.....	44
ก. โครงสร้างสัณฐานของอนุภาค.....	44
• อนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอหลังการเคลือบผิว .....	45



ก. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการแช่สลับ.....	45
ข. ปริมาณแคลเซียมของอนุภาคหลังการแช่สลับ .....	45
ค. โครงสร้างสัณฐานของอนุภาค.....	45
ง. ปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาค.....	46
จ. การย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ ( <i>In Vitro</i> Biodegradation) .....	46
3.4.5 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ( <i>In vitro</i> biocompatibility) ของอนุภาค.....	46
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	48
บทที่ 4.....	49
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	49
4.1 คุณสมบัติของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน.....	49
4.1.1 ค่าศักย์ゼต้าและค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายผสมไฟโบรอินและเจ ลาติน .....	49
4.2 คุณสมบัติของอนุภาคจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน.....	51
4.2.1 ผลของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง .....	51
4.2.2 ลักษณะของแผ่นฟองน้ำและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคหลังการบด .....	55
4.2.3 โครงสร้างสัณฐานของอนุภาค .....	57
4.3 การเคลือบพื้นผิวอนุภาคโปรตีนด้วยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต.....	59
4.3.1 ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการเคลือบพื้นผิว .....	59
4.3.2 ปริมาณแคลเซียมของอนุภาคหลังการเคลือบพื้นผิว.....	61
4.3.3 โครงสร้างสัณฐานของอนุภาค .....	62
4.3.4 ปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาค.....	67
4.3.5 การย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ.....	70
4.3.6 สมบัติทางความร้อนของอนุภาค .....	73

บทที่ 5.....	75
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	75
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	75
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	76
5.3 ประโยชน์ที่ได้รับ .....	76
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	92



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเจลาติน (หน่วยต่อ 1000 หน่วย) ความชอบน้ำ (Hydrophilic) และความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ของหมู่อะมิโนในเจลาติน .....	9
ตารางที่ 2.2	กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฟโบรอิน ความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ และ ประจุของหมู่อะมิโนในไฟโบรอินจาก <i>Bombyx mori</i> .....	11
ตารางที่ 2.3	การเปรียบเทียบการขึ้นรูปแบบอิมัลชัน และแบบ Top-down.....	17
ตารางที่ 4.2	ชนิดและสัญลักษณ์ของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอที่ใช้ในการ ดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคด้วยแคลเซียมฟอสเฟต โดยวิธีการแช่สลับ.....	59
ตารางที่ 4.3	ปริมาณธาตุ (โดยน้ำหนักและโดยอะตอม) และอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (โดยน้ำหนักและโดยอะตอม) บนพื้นผิวของอนุภาคที่เคลือบผิว 4, 8 และ 12.....	69

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1	โครงสร้างใหม่ II ของไฟโบรอิน .....	12
รูปที่ 2.2	กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์และหมู่เอมีนของกรดอะมิโนไลซีนเกิดเป็นซิมพ์เบส.....	20
รูปที่ 2.3	โครงสร้างภายในของกระดูกแบบเนื้อแน่นและกระดูกพรุนในกระดูกแบบยาว .....	23
รูปที่ 2.4	โครงสร้างสัณฐานของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระดูกออสติโอซาร์โคมา .....	31
รูปที่ 4.1	ค่าศักย์เซต้าและค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายผสมไฟโบรอินใหม่ไทยและ เจลาตินชนิดเอความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ร้อยละ 0.02 โดยปริมาตร.....	50
รูปที่ 4.2	การจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแบบเสียโปรตอนและแบบรับโปรตอนของกรดอะมิโนของโปรตีน ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ กัน .....	51
รูปที่ 4.3	ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังนำอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (GTA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตร แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	53
รูปที่ 4.4	ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังนำอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตร แช่ในเอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....	54
รูปที่ 4.5	ลักษณะภายนอกของแผ่นฟองน้ำไฟโบรอินใหม่ไทยผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร.....	55
รูปที่ 4.6	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคไฟโบรอินใหม่ไทยผสมเจลาตินชนิดเอจากการใช้เครื่องปั่นโถบดขนาดเล็ก (HR2117, Philips) ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เพื่อบดแผ่นฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร.....	56
รูปที่ 4.7	ลักษณะภายนอกของอนุภาคไฟโบรอินใหม่ไทยผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร และมีขนาดอนุภาคในช่วง 1000-2000 ไมโครเมตร.....	57

<b>รูปที่ 4.8</b> โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 100/0, 80/20, 50/50, 20/80 และ 0/100 โดยถ่ายด้วย FE-SEM ที่กำลังขยาย 35, 150 และ 1000 เท่า.....	58
<b>รูปที่ 4.9</b> ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคโปรตีนหลังการเคลือบพื้นผิวด้วยฟลิก แคลเซียมฟอสเฟต โดยทำการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลาย ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ.....	61
<b>รูปที่ 4.10</b> ปริมาณแคลเซียมในอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินเอที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ ที่แช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ.....	62
<b>รูปที่ 4.11</b> ลักษณะภายนอกของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่สลับ 4, 8 และ 12 รอบ.....	63
<b>รูปที่ 4.12</b> โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคที่มีอัตราส่วน SF/GA ต่างๆ กัน และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่สลับ 4 รอบ.....	64
<b>รูปที่ 4.13</b> โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคที่มีอัตราส่วน SF/GA ต่างๆ กัน และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่สลับ 8 รอบ.....	65
<b>รูปที่ 4.14</b> โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคที่มีอัตราส่วน SF/GA ต่างๆ กัน และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่สลับ 12 รอบ.....	66
<b>รูปที่ 4.15</b> อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (โดยอะตอม) บนพื้นผิวของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินอัตราส่วนต่าง ๆ ที่แช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ.....	70
<b>รูปที่ 4.16</b> น้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาค ก.) S100 ข.) S80G20 และ ค.) S50G50 ที่ไม่เคลือบผิวและเคลือบผิว 4, 8 และ 12 รอบ ภายหลังได้สภาวะเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	72
<b>รูปที่ 4.17</b> คุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาค S50H12C และ S100H12 ด้วยเทคนิค TGA ที่อุณหภูมิ 35 ถึง 900 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราให้ความร้อน 20 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิในไนโตรเจน.....	74

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับนำมาใช้เป็นวัสดุทดแทนหรือปลูกถ่ายเพื่อซ่อมแซมและปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับความเสียหาย โดยมีโครงสร้างเลียนเซลล์ (Scaffold) ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) ซึ่งช่วยในการค้ำจุน ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะและกระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโต เพื่อส่งเสริมให้เกิดการซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย โครงสร้างเลียนเซลล์ที่เหมาะสมควรมีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพกับเซลล์ ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ และมีสถานะที่เหมาะสมต่อพฤติกรรมของเซลล์ เช่น การยึดเกาะ (Attachment) การเคลื่อนย้าย (Migration) การเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่จำเพาะมากขึ้น (Differentiation) เพื่อให้เซลล์ที่เจริญเติบโตบนโครงเลียนเซลล์มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสถานะเดิม ทั้งนี้โครงสร้างเลียนเซลล์ในรูปแบบอนุภาคที่เป็นเม็ด เป็นอีกหนึ่งรูปแบบของโครงสร้างเลียนเซลล์ที่นิยมนำมาใช้งานสำหรับรักษาการบาดเจ็บของกระดูกหรือมะเร็งกระดูกที่มีบริเวณไม่กว้างมากนัก หรือนำมาใช้งานทางด้านทันตกรรม

กระบวนการขึ้นรูปอนุภาคมีหลากหลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุหรือพอลิเมอร์ที่ใช้และจุดประสงค์ในการใช้งาน ตัวอย่างกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคที่นิยม เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) อิมัลชัน (Emulsion) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) การระเหยตัวทำละลาย (Solvent evaporation) และการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) เป็นต้น (Nidhi, Rashid et al. 2016) ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาอนุภาคให้ดียิ่งขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามกระบวนการขึ้นรูปบางวิธียังสามารถทำได้แค่ในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น กระบวนการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันเป็นการขึ้นรูปแบบกะ (Batch operation) ยากที่จะพัฒนาขยายขนาดขึ้นมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม และในขั้นตอนการล้างน้ำมันออกจากอนุภาคยังต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน เพื่อล้างน้ำมันออก ซึ่งสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ระบายเคืองผิว ทำลายสมอง ระบบประสาทและอวัยวะภายใน เช่นตับและไต (Sanni Babu, Mutta Reddy et al. 2014) นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างในอนุภาคอาจเป็นพิษต่อเซลล์หรือลดความสามารถทางชีวภาพของเซลล์อีกด้วย (Lees-Haley, Williams et al. 1997) ทำให้ต้องเสียค่าดำเนินการในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ จึงมีต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูง นอกจากนี้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม การควบคุมสถานะต่าง ๆ เช่น

อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้เป็นองค์ประกอบ หรือแรงปั่นกวนสารให้เข้ากัน ให้เหมือนกับสภาวะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนั้นทำได้ยาก ส่งผลให้อนุภาคที่ได้มีขนาดและมีคุณสมบัติไม่เหมือนที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีปัญหาการควบคุมขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคและการทำซ้ำให้ได้ขนาดเท่าเดิม

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 70-80 ของไหม มีการจัดเรียงตัวกันเป็นสายพอลิเพปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่ต่ำกว่า 16 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ ไกลซีน อะลานีน เซรีน และไทโรซีน ไฟโบรอินมีคุณสมบัติเด่น คือ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี และมีอัตราการย่อยสลายช้า จึงเป็นที่นิยมในการนำไปผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นวัสดุทางชีวภาพที่สามารถผลิตได้ในประเทศ ไฟโบรอินถูกนำมาใช้เป็นชีววัสดุในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อหลากหลายรูปแบบ อาทิ เช่น แผ่นฟิล์ม อนุภาค เส้นใย และโครงสร้างความพรุนสูง เป็นต้น

เจลาตินเป็นสารชีววัสดุอีกชนิดที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย เจลาตินเป็นโปรตีนที่สกัดมาจากคอลลาเจนธรรมชาติด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดหรือด่าง ทำให้ได้เจลาติน 2 ชนิดต่างกัน คือ เจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี เจลาตินมีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ เข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ และช่วยในการยึดเกาะกันของเซลล์ แต่เนื่องจากเจลาตินมีอัตราการย่อยสลายในร่างกายที่เร็ว ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงคุณสมบัติให้ดียิ่งขึ้น Chamchongkaset และคณะ (2008) ขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินไหมไทยโดยวิธีการกำจัดเกลือออก (Salt-leaching) จากนั้นคอนจูเกตเจลาตินบนพื้นผิวเพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยการเชื่อมขวางด้วยความร้อน เนื่องจากเจลาตินมีลำดับการจัดเรียงลำดับของกรดอะมิโนแบบ อาร์จินีน-ไกลซีน-แอสพาร์ติก (RGD) ซึ่งช่วยกระตุ้นให้เซลล์ยึดเกาะและเกิดการเคลื่อนย้ายของเซลล์ แล้วทำการตัดแปรเพื่อเพิ่มความเสถียรด้วยการเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) หลังการคอนจูเกตด้วยเจลาตินพบว่า เจลาตินช่วยเพิ่มมอดูลัสแรงกด (Compressive modulus) ของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอิน และช่วยให้เซลล์ยึดเกาะโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ได้ดีขึ้น Jetbumpenkul และคณะ (2012) ขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์จากชีววัสดุ 2 ชนิด ที่มีประจุตรงข้ามกัน คือ เจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย พบว่าชีววัสดุทั้งสองจึงสามารถอยู่ร่วมกันด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic Blending) และสามารถเกิดการรวมตัวกันได้ดีที่สุดเมื่อประจุรวมของชีววัสดุทั้งสองเข้าใกล้ศูนย์ Ratanavaraporn และคณะ (2014) ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเพื่อควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอริน โดยใช้เทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน พบว่าไฟโบรอินสามารถกักเก็บเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้ดี เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาของความไม่ชอบน้ำ และการผสมไฟโบรอินลงไปเป็นการช่วยยืดระยะเวลาในการย่อย

สลายของเจลาตินให้ช้าลง Lerdchai และคณะ (2015) ขึ้นรูปโครงสร้างความพรุนสูงจากไฟโบรอิน และเจลาตินด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง แล้วเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยคอร์คูมินและดีเอชเอสำหรับรักษาโรคมะเร็ง พบว่าการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ช่วยลดการละลายน้ำของเจลาติน และเพิ่มความเสถียรของชิ้นงาน ถึงแม้ว่า SF/G มีร้อยละเชื่อมขวาง 33-88% แต่ก็ยังคงสามารถเกิดการย่อยสลายได้เองทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินโดยมุ่งเน้นกระบวนการขึ้นรูปแบบใหญ่ไปเล็ก (Top-down) ซึ่งเป็นวิธีการขึ้นรูปที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent-free) โดยเริ่มจากการผลิตแผ่นฟองน้ำด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying) และเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) แล้วบดให้เป็นอนุภาค และเพื่อเพิ่มความสามารถทางชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก จึงมีการดัดแปลงพื้นผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite; HAp) ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของกระดูกและฟัน ช่วยทำให้กระดูกและฟันมีความแข็งแรง เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ ชักนำเนื้อเยื่อกระดูก และช่วยในการเจริญเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น วิธีการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการแช่สลับ (Alternate Soaking) โดยแช่สลับอนุภาคในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) วิธีการแช่สลับนี้มีข้อดี คือมีการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวนมาก ในระยะเวลาสั้น ๆ โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง (Taguchi, Kishida et al. 1999) จากนั้นศึกษาและวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและทางชีวภาพของอนุภาคที่ขึ้นรูปได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคสามมิติจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินโดยมุ่งเน้นกระบวนการขึ้นรูปแบบใหญ่ไปเล็กด้วยการทำแห้งเยือกแข็งและบด แล้วนำไปเคลือบพื้นผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยวิธีแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อประยุกต์ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก



### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ (G) ความเข้มข้นของสารละลาย 4% โดยน้ำหนัก และสารละลายไฟโบรอินไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ1 (S) ความเข้มข้นของสารละลาย 4% โดยน้ำหนัก

1.3.2 ขึ้นรูปอนุภาคสามมิติจากสารละลายไฟโบรอินและเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วย กลูตารัลดีไฮด์ และผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำไปบดให้เป็นอนุภาค โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ

- อัตราส่วนผสมของ G/S คือ 100/0, 80/20, 50/50, 20/80 และ 0/100 โดยน้ำหนัก
- ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง คือ 0.10, 0.15 และ 0.20 ร้อยละโดยปริมาตร

1.3.3 ศึกษาวิธีการเคลือบพื้นผิวอนุภาคด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยวิธีแช่สลับ (Alternate Soaking) โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ

- จำนวนรอบในการแช่สลับ คือ 4, 8 และ 12 รอบ

1.3.4 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของอนุภาคสามมิติ

ก. สารละลายผสม

• ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายเจลาตินชนิดเอ สารละลายไฟโบรอินไหมไทย และสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

ข. อนุภาคสามมิติก่อนการแช่สลับ

• โครงสร้างสัณฐานของอนุภาค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูง ชนิดฟิลด์อีมิสชัน (Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM)

• ความคงตัวของอนุภาคในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

• ความคงตัวของอนุภาคภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ในเอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค. อนุภาคสามมิติหลังการแช่สลับ

• น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการแช่สลับ

• ปริมาณแคลเซียมของอนุภาคหลังการแช่สลับ ด้วยเทคนิค Calcium assay

- โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิสชัน (FE-SEM)
- ปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิสชัน ด้วยเทคนิค Energy dispersive X-ray (SEM-EDX)
- การย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* Biodegradation) ในเอนไซม์โปรตีเอสชนิด XIV (Protease type XIV) ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- สมบัติทางความร้อนของอนุภาคด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA)

### 1.3.5 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (*In vitro* biocompatibility) ของอนุภาค



## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์เชิงสหวิชาที่ประยุกต์ใช้ความรู้ทางวิศวกรรมศาสตร์และชีววิทยาศาสตร์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่สำหรับทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับความเสียหาย (Langer and Vacanti 1993) องค์ประกอบสำคัญของวิศวกรรมเนื้อเยื่อมี 3 องค์ประกอบ คือ เซลล์ โกรทแฟคเตอร์ และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) หรือโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Scaffold) เซลล์เป็นหน่วยเล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต เซลล์ชนิดเดียวกันรวมตัวกันเพื่อทำหน้าที่อย่างเดียวกันเป็นเนื้อเยื่อ เมทริกซ์ภายนอกเซลล์เป็นสารที่ถูกเซลล์หลั่งออกมาภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ในการค้ำจุนและช่วยให้เซลล์ยึดเกาะ นอกจากนี้ยังเป็นตัวเชื่อมต่อและส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กับสภาวะภายนอกอีกด้วย สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการนำความรู้ทางชีววัสดุศาสตร์มาประยุกต์ใช้ เพื่อศึกษาและพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ทดแทนเมทริกซ์ภายนอกที่เซลล์หลั่งออกมา โดยใช้วัสดุทางชีวภาพที่เข้าได้ดีกับเซลล์ร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ในปัจจุบันโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นนอกจากใช้เป็นโครงร่างค้ำจุนสำหรับให้เซลล์ยึดเกาะแล้ว ยังมีการพัฒนาส่งเสริมให้มีการซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อพฤติกรรมของเซลล์ เช่น การยึดเกาะ (Attachment) การเคลื่อนย้าย (Migration) การเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่จำเพาะมากขึ้น (Differentiate) เพื่อให้เซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสภาวะเดิม วัสดุที่นิยมนำมาผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ วัสดุสังเคราะห์ เช่น พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic Acid; PLA) พอลิไกลโคลิกแอซิด (Polyglycolic acid; PGA) พอลิแลคติกโคไกลโคลิกแอซิด (Poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) เป็นต้น หรือวัสดุทางชีวภาพซึ่งสามารถย่อยสลายได้ เช่น เจลาติน ไพโบรอิน และคอลลาเจน เป็นต้น การเลือกใช้วัสดุในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ควรพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติเชิงกล คุณสมบัติทางชีวภาพ และความสามารถในการย่อยสลายของวัสดุให้เหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อและตำแหน่งที่ต้องการซ่อมแซม เช่น การเลือกใช้คอลลาเจนสำหรับเซลล์ที่ต้องการความยืดหยุ่น การเลือกใช้พอลิเอธิลีนไกลคอลซึ่งสลายตัวไม่ได้และมีคุณสมบัติชอบน้ำและนุ่มสำหรับการประยุกต์ใช้ในด้านหัวใจและหลอดเลือด หรือการเลือกพอลิเมอร์ที่มีความเป็นระเบียบสูง มีความแข็งแรงและรับแรงได้ดี สำหรับเนื้อเยื่อที่ต้องรับน้ำหนัก เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้ขึ้นรูปอนุภาคสามมิติเพื่อเป็น

โครงสร้างเส้นใยเซลล์สำหรับประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยสมบัติของวัสดุที่ใช้ และกระบวนการขึ้นรูปได้นำเสนอในหัวข้อต่อไป

## 2.2 วัสดุที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคไมโคร

### 2.2.1 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองใส ไร้กลิ่น ไร้รส ไม่สามารถพบได้ในธรรมชาติ แต่ได้มาจากการทำให้คอลลาเจนเกิดการเสียสภาพด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสบางส่วน (Partial hydrolysis) โดยใช้กรดหรือด่าง ส่งผลให้เจลาตินมีความยาวของสายโซ่ที่หลากหลายและมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างกว้างตั้งแต่ 10,000–400,000 ดาลตัน (Lim and Mohammad 2009)

เจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์เป็นสายพอลิเพปไทด์ โดยมีการจัดเรียงลำดับหมู่อะมิโนรูปแบบซ้ำๆ คือ Gly-X-Y เรียงต่อกันอย่างต่อเนื่อง ซึ่งส่วนใหญ่ที่ตำแหน่ง X มักเป็น โพรลีน (Proline) และที่ตำแหน่ง Y มักเป็น ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) (Asghar and Henrickson 1982) นอกจากนี้ยังเกิดพันธะไฮโดรเจนและพันธะโควาเลนต์ระหว่างสายพอลิเพปไทด์และระหว่างกรดอะมิโนหน่วยย่อยภายในสายเดียวกัน ทำให้เกิดโครงสร้าง 3 รูปแบบคล้ายคอลลาเจน คือ  $\alpha$ -chain ที่เป็นสายโซ่เดี่ยว  $\beta$ -chain ซึ่งประกอบขึ้นด้วย  $\alpha$ -chain จำนวน 2 สายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ และ  $\gamma$ -chain ประกอบด้วย  $\alpha$ -chain 3 สายมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Schrieber R. & Gareis H., 2007)

#### คุณสมบัติของเจลาติน

เจลาตินสามารถละลายในสารที่มีขั้วสูงหรือสารประเภทพอลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (สารละลายที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 3 หมู่) ได้ดี แต่เจลาตินไม่ละลายในสารที่มีขั้วน้อยและน้ำเย็น เมื่อแช่เจลาตินในน้ำเย็น เจลาตินจะเกิดการพองตัว โดยเจลาตินสามารถพองตัวในน้ำได้ 5-10 เท่า และเมื่อให้ความร้อนสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เจลาตินที่พองตัวในน้ำจะละลายเกิดเป็นสารละลายคอลลอยด์ (Colloids solution) หรือที่เรียกว่า Sol เนื่องจากโครงสร้างของเจลาตินเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบสุ่ม (Random coil) หากลดอุณหภูมิลงต่ำกว่า Gel point จะเกิดเป็นเจล หรือที่เรียกว่า Gel โครงสร้างของเจลาตินเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบเกลียวสามสาย (Triple-helix) คล้ายโครงสร้างของคอลลาเจน เนื่องจากพันธะบางส่วนเกิดการเชื่อมขวางกันเอง การเกิด Sol-Gel ของเจลาตินมีคุณสมบัติผันกลับได้ด้วยความร้อน (Thermoreversible) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเจลาตินมีพลังงานพันธะน้อย (Meng and Cloutier 2014) การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลมีผลต่อ

คุณสมบัติของเจลาติน เจลาตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมักจะมีความแข็งแรงของเจล และมีอุณหภูมิที่เกิดการเจลสูง

เจลาตินมีคุณสมบัติแอมโฟเทอริก (Amphoteric) หรือกล่าวคือเจลาตินเป็นสารที่มีประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เมื่อ pH มีค่าเท่ากับค่า pI โมเลกุลของเจลาตินจะไม่มีค่าประจุและมีโครงสร้างเป็นแบบสุ่ม (Random coil) แต่เมื่อค่า pH เกิดการเปลี่ยนแปลงจนน้อยกว่าหรือมากกว่าค่า pI โมเลกุลจะมีประจุบวกและลบตามลำดับ เนื่องจากโครงสร้างของเจลาตินเกิดการคลายตัว ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของเจลาตินเกิดการเคลื่อนย้ายตำแหน่ง ส่งผลให้ประจุที่พื้นผิวของเจลาตินเกิดการเปลี่ยนแปลง (Schrieber R. & Gareis H., 2007)

นอกจากนี้เจลาตินยังมีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ (Biodegradability) เข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) กับร่างกายมนุษย์ ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (Non-cytotoxicity) ไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Non-immunogenic) ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (Non-antigenic) และยังช่วยในการยึดเกาะกันของเซลล์ (Cell adhesion) เจลาตินจึงได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางด้านเภสัชกรรมและการแพทย์อย่างกว้างขวาง

โครงสร้าง องค์ประกอบ และคุณสมบัติของเจลาตินแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนและกระบวนการต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัด สามารถแบ่งประเภทของเจลาตินตามกระบวนการผลิตได้เป็น 2 ประเภท คือ

#### **เจลาตินชนิดเอ (Type A gelatin, GA)**

เจลาตินชนิดเอ หรือ Basic gelatin เป็นเจลาตินที่ได้มาจากกระบวนการไฮโดรไลซิส คอลลาเจนด้วยกรด ตัวอย่างกรดที่ใช้ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดซัลฟิวริก (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) เป็นต้น เนื่องจากกระบวนการนี้ได้หมู่อะมิโนปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุบวกในสภาวะ pH เป็นกลาง โดยมีค่า Isoelectric (pI) ประมาณ 7 – 9 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับคอลลาเจน เจลาตินชนิดนี้เหมาะการนำไปประยุกต์ใช้งานร่วมกับสารที่มีสมบัติเป็นกรด

#### **เจลาตินชนิดบี (Type B gelatin, GB)**

เจลาตินชนิดบี หรือ Acidic gelatin เป็นเจลาตินที่ได้มาจากกระบวนการไฮโดรไลซิส คอลลาเจนด้วยเบส สารละลายเบสที่ใช้ ตัวอย่างเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Ca(OH)<sub>2</sub>) จะเปลี่ยน asparagine และ glutamic เป็น aspartic และ glutamic acid ตามลำดับ โดยไฮโดรไลซ์หมู่เอไมด์ของ asparagine และ glutamic เป็นหมู่คาร์บอกซิล ทำให้เจลาตินมีประจุลบในสภาวะ pH เป็นกลาง และมีค่า pI ประมาณ 4.8 -5.2 เจลาตินชนิดบีจึงเหมาะการนำไปประยุกต์ใช้งานร่วมกับสารที่มีสมบัติเป็นเบส

ตาราง 2.1 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเจลาติน (หน่วยต่อ 1000 หน่วย) (Kroschwitz J.I.,1987) ความชอบน้ำ (Hydrophilic) ความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ของหมู่อะมิโนในเจลาติน (Schrieber R. & Gareis H., 2007)

กรดอะมิโน	เจลาตินชนิดเอ	เจลาตินชนิดบี	ความชอบน้ำ/ ความไม่ชอบน้ำ	ประจุ
Glycine	330	335	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Proline	132	124	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Alanine	112	117	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Hydroxyproline	91	93	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Glutamic acid	48	72	ชอบน้ำ	ลบ
Arginine	49	48	ชอบน้ำ	บวก
Serine	35	33	ชอบน้ำ	กลาง
Aspartic acid	29	46	ชอบน้ำ	ลบ
Lysine	27	28	ชอบน้ำ	บวก
Valine	26	22	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Glutamine	25	-	ชอบน้ำ	กลาง
Leucine	24	24.3	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Threonine	18	18	ชอบน้ำ	กลาง
Asparagine	16	-	ชอบน้ำ	กลาง
Phenylalanine	14	14	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Isoleucine	10	11	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Hydroxylysine	6.4	4.3	ชอบน้ำ	กลาง
Histidine	4	4.2	ชอบน้ำ	บวก
Methionine	3.6	3.9	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Tyrosine	2.6	1.2	ชอบน้ำ	กลาง

## 2.2.2 ไฟโบรอิน (Fibroin)

ไฟโบรอินเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติชนิดหนึ่งซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก 70-80% ของไหม และมีการจัดเรียงตัวกันเป็นสายพอลิเพปไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่ต่ำกว่า 16 ชนิด

ไฟโบรอินประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ สายพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light Chain, L-Chain) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน สายพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy Chain, H-Chain) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350,000-370,000 ดาลตัน และ ไกลโคโปรตีน P25 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน L-Chain และ H-Chain เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ระหว่าง C-terminus เกิดเป็น H-L Complex นอกจากนี้ H-L Complex ยังเกิดพันธะกับไกลโคโปรตีน P25 ด้วยอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ในอัตราส่วน 6:1

ไฟโบรอินมีคุณสมบัติเด่น คือ มีอัตราการย่อยสลายช้า มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีคุณสมบัติย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงเป็นที่นิยมในการนำไปผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้น โดยพบว่า H-Chain มีผลต่อคุณสมบัติเชิงกลของไฟโบรอินมากกว่า L-Chain เนื่องจาก H-Chain มีขนาดใหญ่กว่า L-Chain มาก (Vepari and Kaplan 2007)

H-Chain ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำเรียงตัวสลับกัน ส่วนที่ชอบน้ำไม่มีการจัดเรียงตัวของอะมิโนเป็นหมู่ซ้ำ และมีการพอร์มตัวแบบไม่เป็นผลึก (Non-crystalline) ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมีการจัดเรียงลำดับอะมิโนเป็น  $-[\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser}]-$  ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของการจัดเรียงอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุล และมีโครงสร้างเป็นผลึก (Crystalline structure) ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดแรงภายในโมเลกุล (Intramolecular force) หรือแรงระหว่างโมเลกุล (Intermolecular forces) เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ หรืออันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ส่งผลให้ไฟโบรอินมีการจัดเรียงตัวแบบแผ่นเบตา ( $\beta$ -sheet) ซึ่งไม่ละลายในน้ำ (Koh, Cheng et al. 2015)

ตาราง 2.2 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฟโบรอิน ความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ และประจุของหมู่อะมิโนในไฟโบรอินจากรังไหม *Bombyx mori* พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ (Kaewprasit, Promboon et al. 2014)

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (%โมล)	ความชอบน้ำ/ ความไม่ชอบน้ำ	ประจุ
Glycine	38.32	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Alanine	34.29	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Serine	13.42	ชอบน้ำ	กลาง
Tyrosine	5.75	ชอบน้ำ	กลาง
Aspartic acid	1.63	ชอบน้ำ	ลบ
Valine	1.15	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Glutamic acid	1.15	ชอบน้ำ	ลบ
Phenylalanine	0.98	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Histidine	0.83	ชอบน้ำ	บวก
Threonine	0.80	ชอบน้ำ	กลาง
Proline	0.42	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Arginine	0.30	ชอบน้ำ	บวก
Leucine	0.27	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Tryptophan	0.21	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Isoleucine	0.20	ไม่ชอบน้ำ	กลาง
Lysine	0.20	ชอบน้ำ	บวก
Methionine	0.08	ไม่ชอบน้ำ	กลาง

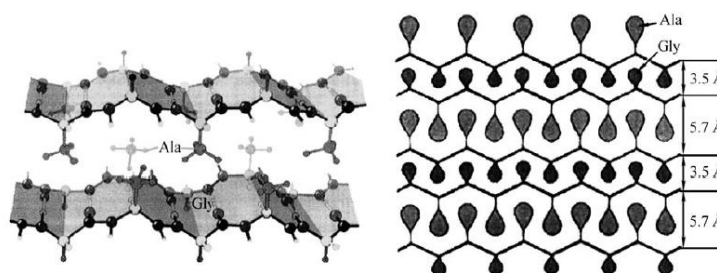
โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ของไฟโบรอินประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนที่เป็นผลึก และส่วนที่ไม่เป็นผลึก โครงสร้างของส่วนที่เป็นผลึก สามารถแบ่งเป็น 3 แบบ คือ โครงสร้างไหม I โครงสร้างไหม II และโครงสร้างไหม III



โครงสร้างใหม่ I เกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล ส่งผลทำให้มีโครงสร้างแบบเกลียว  $\alpha$ -helix หรือ Random coil สามารถละลายน้ำได้ โครงสร้างใหม่ I สามารถเปลี่ยนเป็นโครงสร้างใหม่ II ได้

โครงสร้างใหม่ II โมเลกุลจะเรียงตัวเป็นแผ่นพับเบต้า ( $\beta$ -sheet) แบบขนาน (Parallel) หรือสวนขนาน (Anti-parallel) แผ่นพับเบต้าแบบสวนขนาน แผ่นเบต้าจะจัดเรียงซ้อนกัน โดยหันด้านที่มีกรดอะมิโนชนิดเดียวกันไว้ด้านเดียวกัน ทำให้หมู่อะมิโนเกิดการแทรกตัวระหว่างกันได้ ส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลของพอลิเพปไทด์เข้ามาใกล้กันกว่าแบบขนาน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 สายโซ่พอลิเพปไทด์จะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกัน โครงสร้างใหม่ II จึงไม่ละลายน้ำ

โครงสร้างใหม่ III เป็นส่วนผิวของไฟโบรอินที่เชื่อมต่อระหว่างน้ำและอากาศ (Air-water assembled interfacial silk) มีโครงสร้างเป็นแบบเกลียว



รูป 2.1 โครงสร้างใหม่ II ของไฟโบรอิน (Sashina, Bocek et al. 2006)

## 2.3 กระบวนการขึ้นรูปอนุภาค

กระบวนการขึ้นรูปอนุภาคไม่ใคร่สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติของวัสดุที่ใช้ รวมถึงลักษณะและวิธีการนำอนุภาคไปใช้งาน ตัวอย่างกระบวนการขึ้นรูปอนุภาค ได้แก่

### อิมัลชัน (Emulsion)

อิมัลชันเป็นเทคนิคที่ขึ้นรูปได้โดยนำเอาของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปที่มีคุณสมบัติไม่ผสมกันเป็นเนื้อเดียว มาให้แรงทางกายภาพ เช่น ฮอโมจีไนส์ (Homogenization) หรือโซนิเคชัน (Sonication) เพื่อกระจายของเหลวให้เป็นหยดเล็ก ๆ แทรกเข้าไปในของเหลวอีกชนิด ส่งผลให้พื้นที่สัมผัสระหว่างของเหลวแต่ละชนิดมากขึ้น ของเหลวจึงสามารถเป็นเนื้อเดียวกันเป็นสารละลายคอลลอยด์ได้ การขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในท้องปฏิบัติการ

อิมัลชันแบ่งเป็น 4 ชนิด คือ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil emulsion, W/O), อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsion, O/W) อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำ (Water-in-water emulsion, W/W) และอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำมัน (Oil-in-oil emulsion, O/O) การขึ้นรูปด้วย

เทคนิคอิมัลชันมีข้อจำกัด เนื่องจากการขึ้นรูปแบบกะ (Batch operation) เมื่อขยายขนาดเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมีค่าดำเนินการที่สูง การควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารละลาย แรงกายภาพที่ใช้ปั่นกวน หรือสภาวะต่าง ๆ ให้เหมือนกับในห้องปฏิบัติการนั้นทำได้ยาก ส่งผลให้อนุภาคไมโครที่ได้มีขนาดและคุณสมบัติไม่เหมือนที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ และยังมีปัญหาการควบคุมขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค และการทำซ้ำให้ได้ขนาดเท่าเดิมนอกจากนี้ยังต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน ในการล้างน้ำมันออก ซึ่งสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้ต้องเสียค่าดำเนินการในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ จึงมีต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้นและส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูงขึ้น (Varde and Pack 2004)

### การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying)

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นเทคนิคการขึ้นรูปโดยใช้อากาศร้อนเพื่อระเหยน้ำออกจากของเหลว เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและยา เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว อนุภาคที่ได้มีประสิทธิภาพการกักเก็บสูง สามารถขยายขนาดได้ง่าย ไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายของยาและพอลิเมอร์ ข้อเสียของการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ ใช้อุณหภูมิสูง ทำให้พอลิเมอร์หรือสารออกฤทธิ์บางชนิดที่ไม่สามารถทนความร้อนเกิดการเสถียรภาพได้

การทำแห้งแบบพ่นฝอยสามารถขึ้นรูปได้ทั้งสารละลาย สารอิมัลชัน หรือสารแขวนลอย โดยป้อนเข้าไปในเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย แล้วฉีดด้วยหัวฉีดออกมาเป็นละอองขนาดเล็ก ๆ เข้าไปในห้องอบแห้ง (Drying chamber) ซึ่งมีอากาศร้อนไหลผ่าน ทำให้น้ำที่อยู่ในละอองระเหยไปหมดอย่างรวดเร็ว แล้วแยกอนุภาคที่แห้งออกมา

ส่วนประกอบหลักของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย มี 3 ส่วน คือ

- ตัวทำละออง (Atomizer) เป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของการทำแห้งแบบพ่นฝอย มีหน้าที่ทำให้ของเหลวที่ป้อนเข้าไปแตกตัวเป็นละอองขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวต่อปริมาตรให้มากขึ้น ส่งผลให้สามารถเกิดการถ่ายเทมวลและความร้อนได้ดีขึ้น การระเหยจึงเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ตัวทำละอองเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของการทำแห้งแบบพ่นฝอย ควบคุมอัตราการไหลไปยังห้องอบแห้ง และกำหนดขนาดของอนุภาค

- ห้องทำแห้ง (Drying chamber) เป็นบริเวณที่ละอองเกิดการสัมผัสอากาศร้อน เพื่อทำให้เกิดการระเหยน้ำออกไป ทิศทางของการเคลื่อนที่ของอากาศร้อนให้เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ แบ่งได้ 3 แบบคือ

การไหลไปในทิศทางเดียวกัน (Co-current flow) ละอองถูกพ่นออกไปในทิศทางเดียวกันกับอากาศร้อนที่ไหลเข้ามาในห้องทำแห้ง อุณหภูมิของอากาศร้อนจะลดลงระหว่างการทำแห้ง เหมาะสำหรับสารที่ไม่ทนความร้อน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความหนาแน่นต่ำ

การไหลสวนทางกัน (Counter-current flow) อากาศร้อนไหลในทิศทางตรงกันข้ามกับละอองที่ถูกพ่น ละอองที่มีอุณหภูมิต่ำจะได้รับความร้อนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิของอากาศร้อน เหมาะสำหรับสารที่ทนต่อความร้อนสูงได้ และต้องการความร้อนมาก

การไหลแบบผสม (Mixed flow) ละอองถูกพ่นและอากาศร้อนจะไหลไปในทางเดียวกันและสวนทางกันพร้อม ๆ กัน โดยอากาศร้อนจะไหลเข้าห้องทำแห้งทั้งด้านบนและด้านล่าง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการทำแห้ง

- อุปกรณ์แยกอนุภาคออกจากอากาศ เช่น ไซโคลน (Cyclone) ถุงกรอง (Bag filter) (Patel R. P. et al. 2009)

### การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying)

การทำแห้งแบบเยือกแข็งหรือที่เรียกกันว่าไลโอฟิลิเซชัน (Lyophilization) เป็นกระบวนการที่แช่แข็งเพื่อเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง แล้วทำการระเหิดของแข็งให้กลายเป็นไอโดยการลดความดันให้ต่ำกว่าจุดทริบเปิล (Triple point) ซึ่งเป็นจุดที่สารมีสถานะของแข็ง ของเหลว และแก๊สสมดุลกัน ทำให้ได้ชิ้นงานที่แห้งและมีความคงรูป

การทำแห้งแบบเยือกแข็งมีกระบวนการหลัก 2 ขั้นตอน คือ

1. การแช่เยือกแข็ง (Freezing) เป็นขั้นตอนเปลี่ยนสถานะน้ำจากของเหลวให้เป็นของแข็ง โดยการลดอุณหภูมิลงให้เท่ากับหรือต่ำกว่าอุณหภูมิจุดเยือกแข็ง ในขั้นตอนนี้ความเร็วในการแช่แข็งมีผลต่อโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากการแช่แข็งแบบเร็ว เช่น การแช่แข็งแบบลมเป่า การแช่แข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด เป็นต้น จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก ส่วนการแช่แข็งแบบช้า ใช้เวลาการเกิดผลึกนาน ผลึกน้ำแข็งที่ได้จึงมีขนาดใหญ่

2. การทำแห้ง เป็นขั้นตอนการลดความดันลง เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งเกิดการระเหิดเป็นไอ การทำแห้งสามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

การทำแห้งระยะที่ 1 (Primary drying) เป็นขั้นตอนลดความดันลง เพื่อระเหิดผลึกน้ำแข็งซึ่งเป็นน้ำอิสระ (Free Water) ออกจากผิวหน้าและภายในผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาที่ใช้ในการระเหิดขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

การทำแห้งระยะที่ 2 (Secondary Drying) หรือที่เรียกกันว่า Desorption เป็นขั้นตอนกำจัดน้ำที่อยู่ร่วมกับสารประกอบด้วยพันธะทางเคมี (Bound Water) ซึ่งไม่แข็งตัวเป็นผลึกเหมือนน้ำอิสระ ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นเมื่อน้ำอิสระระเหิดไปหมดในขั้นตอนการทำแห้งระยะที่ 1 โดยอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มสูงขึ้น 20-40 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่มีการใช้ความร้อนแฝงเพื่อระเหิดผลึกน้ำแข็งแล้ว ความร้อนจึงถ่ายเทสู่ผลิตภัณฑ์โดยตรง

ข้อดีของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรูปทรง และมีโครงสร้างใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น เมื่อละลายน้ำสามารถคืนตัว (Rehydration) ได้ และยังสามารถใช้กับสารที่ละลายตัวด้วยความร้อนได้ง่าย แต่มีข้อเสียและข้อจำกัด คือ เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งมีราคาแพงและใช้พลังงานสูงกว่าการทำแห้งแบบทั่วไป การทำแห้งแบบเยือกแข็งในแต่ละรอบต้องใช้เวลา 24-72 ชั่วโมง นอกจากนี้การเกิดผลึกน้ำแข็งในชิ้นงานอาจทำให้ชิ้นงานเกิดการฉีกขาดได้

ตัวอย่างงานวิจัยที่ขึ้นรูปไฟโบรอินและเจลาตินสำหรับประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อและระบบนำส่งยา

Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์จากชีววัสดุ 2 ที่มีประจุตรงข้ามกัน คือ ไฟโบรอินไหมไทย (SF) และเจลาตินชนิดเอ (GA) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ โดยไม่ใช้การเชื่อมขวางทางเคมี และเปรียบเทียบกับโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ SF/GA ที่เชื่อมขวางโดยใช้ EDC/NHS พบว่าที่สภาวะร่างกาย pH 7.4 ไฟโบรอินซึ่งมีค่า pi น้อยกว่า 7 จะแสดงประจุลบ และเจลาตินเอซึ่งมีค่า pi มากกว่า 7 จะแสดงประจุบวก ชีววัสดุทั้งสองจึงสามารถอยู่ร่วมกันด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic Blending) และสามารถเกิดการรวมตัวกันได้ดีที่สุดเมื่อประจุรวมของชีววัสดุทั้งสองเข้าใกล้ศูนย์หรือกล่าวคือมีประจุชนิดตรงข้ามสมดุลกัน ที่สภาวะนี้จะมีแรงทางไฟฟ้าสถิตมากที่สุด โดยพบว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่อัตราส่วน SF/GA เท่ากับ 50/50 มีค่าศักย์เซต้าเข้าใกล้ศูนย์มากที่สุด มีเสถียรภาพในน้ำ และมีความสามารถในการทนแรงกดได้ดีใกล้เคียงกับโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวาง นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางจะมีอัตราการย่อยสลายที่มากขึ้นเมื่อมีสัดส่วนเจลาตินเป็นองค์ประกอบสูงขึ้น

Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเพื่อควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอริน โดยใช้เทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน พบว่าได้อนุภาคไมโครขนาด 197-217 ไมโครเมตร เมื่อทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ พบว่าหลังผ่านไป 14 วัน อนุภาค G ที่เชื่อมขวางแล้วเกิดการย่อยสลายทั้งหมด อนุภาคไมโคร G/SF ที่เชื่อมขวางแล้ว อัตราส่วน 70/30 เหลือ 80% อัตราส่วน 50/50 และ 30/70 ยังไม่เกิดการย่อยสลาย สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยพบว่า SF สามารถกักเก็บเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้ดีเนื่องจากเกิดอันตรกิริยาของความไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในกักเก็บเคอร์คูมินและไฟเพอรินแบบ dual มีประสิทธิภาพน้อยกว่าการกักเก็บเคอร์คูมินหรือไฟเพอรินแบบ single เนื่องจากเกิดการแข่งขันกันดูดซับบนอนุภาคไมโคร

Aramwit P. และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และพฤติกรรมการปลดปล่อยยาของอนุภาคนาโนจากเจลาตินชนิดเอ (GA) และ

อนุภาคนาโนจากเจลาตินชนิดบี (GB) โดยทำการขึ้นรูปอนุภาคนาโนด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าได้อนุภาคเจลาตินขนาดนาโนที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 576-970 นาโนเมตร เมื่อทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์พบว่า GB มีปริมาณร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่า GA เนื่องจาก GB มีหมู่อะมิโนอิสระมากกว่า ส่งผลทำให้ GB มีอัตราการย่อยสลายช้ากว่า GA สำหรับการศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยยาของอนุภาคนาโน โดยใช้เมทิลีนบลู (Methylene blue) อีโอซิน (Eosin) และเซรีซิน (Sericin) เป็นโมเดลยาแทนยาที่มีประจุบวก ยาที่มีประจุลบ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตามลำดับ พบว่าประสิทธิภาพในการดูดซับสารออกฤทธิ์และร้อยละการบรรจุสารออกฤทธิ์ของเมทิลีนบลูและอีโอซินขึ้นอยู่กับชนิดของเจลาตินที่ใช้ในการขึ้นรูปเป็นอนุภาค GB ซึ่งมีประจุลบมีความสามารถในการกักเก็บเมทิลีนบลูที่มีประจุบวกได้ดีกว่า GA (ประสิทธิภาพในการดูดซับและร้อยละการบรรจุ 92% และ 46% ตามลำดับ) ส่วนอีโอซินซึ่งมีประจุลบถูกกักเก็บใน GB ที่มีประจุลบได้น้อย (ประสิทธิภาพในการดูดซับและร้อยละการบรรจุ 25% และ 12% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่าเซรีซินที่มีประจุลบเหมือนกันกับอีโอซิน แต่กลับมีถูกกักเก็บใน GB ที่มีประจุลบเหมือนกันได้ดีกว่า GA ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากขนาดของโมเลกุลเซรีซิน (25-150 กิโลดาลตัน) มีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลของเมทิลีนบลูและอีโอซิน (319 และ 691 ดาลตัน ตามลำดับ) ทำให้แรงทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interaction) ไม่ใช่กลไกหลักในการกักเก็บเซรีซินในอนุภาคนาโน

Lerdchai K. และคณะ (2015) ขึ้นรูปโครงสร้างความพรุนสูง (Sponges) จากไฟโบรอินและเจลาตินด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอสำหรับรักษาโรคมะเร็ง พบว่าปริมาณของ SF ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโครงสร้างความพรุนสูงมีผลต่ออัตราการย่อยสลาย การกักเก็บและปลดปล่อยของยาที่ไม่ละลายน้ำ โครงสร้างความพรุนสูง SF/G ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์แล้วสามารถกักเก็บเคอร์คูมิน ดีเอชเอ เคอร์คูมินและดีเอชเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ โครงสร้างความพรุนสูง SF/G อัตราส่วน 50/50 เกิดการเชื่อมขวางได้ดี มีอัตราการย่อยสลายช้า ส่งผลให้มีอัตราการปลดปล่อยช้าที่สุด

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการขึ้นรูปอนุภาค ผ่านกระบวนการขึ้นรูปแบบใหญ่ไปเล็ก โดยการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วบดให้เป็นอนุภาค เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการขึ้นรูปแบบเก่าซึ่งขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชัน

ตาราง 2.3 การเปรียบเทียบการขึ้นรูปแบบอิมัลชัน (Ratanavaraporn, Kanokpanont et al. 2014) และแบบจาก Top-down

หัวข้อ	วิธีการขึ้นรูปแบบอิมัลชัน	วิธีการขึ้นรูปแบบ Top-down
เทคนิคที่ใช้ในการขึ้นรูป	อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน	กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งแล้วบดให้เป็นอนุภาค
การเชื่อมขวาง	เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์	เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์
เครื่องมือที่ใช้	เครื่องโฮโมจีไนซ์, เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง, เครื่องปั่นเหวี่ยง, ตู้เย็น -40 °C	เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง, ตู้เย็น -40 °C
รูปร่างของอนุภาค	ค่อนข้างกลม	รูปร่างไม่แน่นอน
ขั้นตอนการขึ้นรูป	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เตรียมสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาติน (1 ซม.)</li> <li>- ทำให้เกิดเป็นอิมัลชัน ลอดอุณหภูมิเป็น 4°C เพื่อให้เจลาตินเกิดการเจล</li> <li>- ล้างน้ำมันออกโดยการปั่นเหวี่ยงในอะซิโตนที่ 4°C</li> <li>- แยกขนาดอนุภาคด้วยตะแกรงคัดแยก แล้วทิ้งให้แห้งที่ 4°C</li> <li>- เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ 4°C ในที่มืด (เวลา 20 ชม.)</li> <li>- แซในไกลซีน แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (4 ชม.)</li> <li>- แซในตู้เย็น -40 °C (1 คืน)</li> <li>- ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (72 ชม.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เตรียมสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาติน</li> <li>- เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์</li> <li>- ขึ้นรูปไฮโดรเจลแล้วนำไปแช่ในตู้เย็น -40 °C (1 คืน)</li> <li>- ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (72 ชม.)</li> <li>- บดอนุภาคด้วยเครื่องปั่น</li> <li>- แยกขนาดอนุภาคโดยใช้ตะแกรงคัดแยก</li> <li>- แซในไกลซีน แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (4 ชม.)</li> <li>- แซในตู้เย็น -40 °C (1 คืน)</li> <li>- ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (72 ชม.)</li> </ul>
ระยะเวลาในการขึ้นรูปโดยประมาณ	109 ชม.	175 ชม.

หัวข้อ	วิธีการขึ้นรูปแบบอิมัลชัน	วิธีการขึ้นรูปแบบจากใหญ่ไปเล็ก
ข้อดี	<ul style="list-style-type: none"> <li>- อนุภาคมีรูปร่างค่อนข้างกลม</li> <li>- มีวิธีการขึ้นรูปง่าย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่ใช่สารละลายอินทรีย์ในการผลิต</li> <li>- มีวิธีการขึ้นรูปง่าย</li> <li>- ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรูพรุน และมีโครงสร้างใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น</li> </ul>
ข้อเสีย	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องขึ้นรูปที่อุณหภูมิ 4 °C</li> <li>- ใช้อะซิโตนในการล้างน้ำมันจำนวนมาก</li> <li>- กลูตารัลดีไฮด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ หากล้างกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่ไม่หมดอาจเกิดการระคายเคืองได้</li> <li>- ยากต่อการพัฒนาเพื่อผลิตในอุตสาหกรรม มีปัญหาการควบคุมขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค และการทำซ้ำให้ได้ขนาดเท่าเดิม</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ได้อนุภาคมีรูปร่างไม่แน่นอน</li> <li>- ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 2 ครั้ง</li> <li>- กลูตารัลดีไฮด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ หากล้างกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่ไม่หมดอาจเกิดการระคายเคืองได้</li> <li>- ใช้เวลาในการผลิตนาน</li> </ul>

#### 2.4 การพัฒนาคุณสมบัติของชีววัสดุด้วยวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking)

การเชื่อมขวาง คือ การสร้างพันธะระหว่างหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ที่อยู่ภายในสายโซ่หรือระหว่างสายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์ ทำให้พอลิเมอร์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีและมีเสถียรภาพมากขึ้น ส่งผลให้พอลิเมอร์มีอัตราการย่อยสลายช้าลง และยังช่วยลดคุณสมบัติละลายน้ำของพอลิเมอร์ การเชื่อมขวางเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพ และทางชีวภาพของพอลิเมอร์ให้ดีขึ้น เพื่อให้พอลิเมอร์มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งานต่าง ๆ วิธีการเชื่อมขวางมีหลากหลายวิธี โดยสามารถแบ่งประเภทของการเชื่อมขวางเป็น 2 ประเภทหลัก ๆ ได้ดังนี้

##### • การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking)

การเชื่อมขวางทางกายภาพ เช่น การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal crosslinking, DHT) การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet crosslinking, UV) และการเชื่อมขวางด้วยการฉายรังสีแกมมา (Gamma radiation crosslinking) เป็นต้น ทำให้เกิดแรง

แวนเดอวาลส์ พันธะไฮโดรเจน แรงระหว่างประจุ หรือแรงไฮโดรโฟบิก ระหว่างสายพอลิเมอร์เกิดเป็นโครงร่างแหสามมิติ (Yuichi Ohya, Akihiro Takahashi et al. 2012)

### **การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal crosslinking, DHT)**

การเชื่อมขวางด้วยความร้อนทำได้โดยลดความดันของระบบให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส เพื่อให้กำจัดโมเลกุลน้ำ (Dehydration) ออกจากชิ้นงาน โดยผ่านปฏิกิริยาการควบแน่น (Condensation reaction) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) อีสระเกิดเป็นหมู่เอไมด์ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) เกิดเป็นหมู่เอสเตอร์ การกำจัดน้ำออกจากโมเลกุลทำให้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์ ซึ่งส่งผลให้พอลิเมอร์มีสมบัติทางกลและมีเสถียรภาพมากขึ้น ย่อยสลายได้ช้าลง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเชื่อมขวางด้วยความร้อนสามารถเกิดได้เฉพาะหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกันเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณและความหนาแน่นในการเชื่อมขวางของพอลิเมอร์ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ (Ozeki and Tabata 2005)

การเชื่อมขวางทางวิธีนี้ได้รับความสนใจและเป็นที่ยอมรับใช้ในงานทางชีวการแพทย์ เนื่องจากสะดวก ทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีในการเชื่อมขวาง ทำให้ไม่เกิดผลข้างเคียงและความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารเคมีที่ใช้ และยังเป็นกรช่วยลดต้นทุนเนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการกำจัดสารเคมีก่อนนำไปใช้งาน แต่มีข้อเสีย คือ ยากต่อการควบคุมกระบวนการในการเชื่อมขวาง ปริมาณและความหนาแน่นที่เกิดการเชื่อมขวางค่อนข้างน้อย และอาจทำให้พอลิเมอร์บางส่วนเกิดการเสียสภาพได้

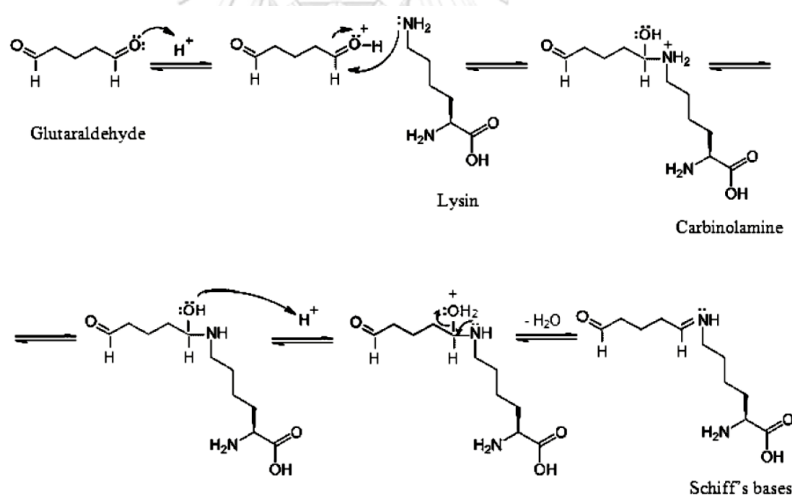
### **• การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)**

การเชื่อมขวางทางเคมีเป็นการเชื่อมขวางโดยใช้สารเคมีเพื่อเป็นสารเชื่อมขวาง (Crosslinking agent) ตัวอย่างเช่น กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde) คาร์โบไดอิมิด (Carbodiimides) หรือสารประกอบอีพอกซี (Epoxy compound) เป็นต้น สารเคมีที่เติมลงไปจะเป็นตัวกลางในการเชื่อมขวางโดยทำปฏิกิริยาเคมีเชื่อมหมู่ฟังก์ชันของสายโซ่พอลิเมอร์เข้าด้วยกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง ทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย ข้อดีของการเชื่อมขวางทางเคมี คือ สามารถควบคุมปริมาณและความหนาแน่นของการเชื่อมขวางได้ดีกว่าการเชื่อมขวางทางกายภาพ ส่งผลให้สามารถออกแบบพอลิเมอร์ให้มีสมบัติตรงตามความต้องการในการนำไปใช้งาน แต่มีข้อเสีย คือ สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมขวางมักเป็นพิษต่อเซลล์ และก่อนนำพอลิเมอร์ไปใช้งานต้องมีกระบวนการกำจัดสร้างเคมีออกจากพอลิเมอร์



### การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde crosslinking)

การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็นที่นิยมใช้ในการเชื่อมขวาง เนื่องจากกลูตารัลดีไฮด์มีราคาไม่แพง สามารถทำการเชื่อมขวางได้ง่ายและรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางสูง กลูตารัลดีไฮด์ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอมต่อกันเป็นสายโซ่ตรง และมีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่อยู่ที่ปลายทั้งสองข้าง ในการเกิดการเชื่อมขวางหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde;  $-CHO$ ) ของ กลูตารัลดีไฮด์ สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกันได้หลายหมู่ อาทิเช่น หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl;  $-COOH$ ) หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl;  $-OH$ ) หมู่เอมีน (Amine;  $-NH_2$ ) และหมู่เอไมด์ (Amide;  $-COONH_2$ ) สำหรับการเชื่อมขวางระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ของกลูตารัลดีไฮด์กับหมู่เอมีนเกิดจากปฏิกิริยาการเพิ่มนิวคลีโอไฟล์ (Nucleophilic addition) ของหมู่เอปซิลอน-อะมิโน ( $\epsilon$ -amino) ของไลซีน (Lysine; Lys) และไฮดรอกซีไลซีน (Hydroxyllysine; Hyl) หรือหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนปลายเอ็น (N-terminal amino acid) ที่ไม่ยังไม่เกิดการรับโปรตอน ไปยังคาร์บอนิล (Carbonyl;  $C=O$ ) ของหมู่แอลดีไฮด์เกิดเป็นคาร์บินอลามีน (Carbinolamine) ซึ่งมีโครงสร้างไม่เสถียร หมู่ไฮดรอกซิลจะถูกโปรโตเนต โดยรับโปรตอนและปลดปล่อยน้ำออกมาเกิด Schiff-bases (Schrieber and Gareis 2007) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูป 2.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์และหมู่เอมีนของกรดอะมิโนไลซีนเกิดเป็น Schiff-bases (Farris, Song et al. 2010)

ข้อเสียของการทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ คือ กลูตารัลดีไฮด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงจำเป็นต้องกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินออกโดยใช้ไกลซีน กลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่จะไปจับกับหมู่อะมิโนของไกลซีนแทน หากล้างกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่ไม่หมดอาจเกิดการระคายเคืองได้ หลังจากเชื่อมขวางแผ่นไฮโดรเจลจะถูกล้างด้วยสารละลายไกลซีน (Glycine) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้าง ไกลซีนเป็นสวิตเทอร์ไอออน

(Zwitterion) และเมื่อไกลซีนเกิดปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ระเหย (Johnson 1993)

ในการศึกษาการเชื่อมขวางของคอลลาเจนด้วยสารที่มีหมู่แอลดีไฮด์ 1 หมู่ คือ พอร์มาลดีไฮด์ และสารที่มีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่ที่มีคาร์บอน 2-6 อะตอม คือ ไกลออกซอล (Glyoxal) มาลอนไดแอลดีไฮด์ (Malondialdehyde) ซัคซินแอลดีไฮด์ (Succinaldehyde) กลูตารัลดีไฮด์ และ Adipaldehyde พบว่ากลูตารัลดีไฮด์มีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางมากที่สุด (Bowes and Cater 1968)

Esposito E. และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาผลของการเชื่อมขวางด้วยความร้อนต่อสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยขึ้นรูปอนุภาคจากเจลาตินด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Water in oil emulsion) และใช้ Tween 85 และ Span 85 เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) เมื่อทำการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน พบว่าอนุภาคทรงกลมที่ได้มีสีน้ำตาล ความสามารถในการละลายและการบวมตัวของอนุภาคลดลง และมีพื้นที่ผิวจำเพาะ (Specific surface) ซึ่งเป็นพื้นที่ผิวต่อหน่วยมวลมากขึ้นเนื่องจากอนุภาคมีรูพรุนมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อศึกษาการปลดปล่อยยาของอนุภาคทรงกลมพบว่า อนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนสามารถปลดปล่อยยาได้ดีกว่าอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเชื่อมขวางด้วยความร้อนทำให้อนุภาคมีความหนาแน่นของเจลาตินเมทริกซ์ลดลง

Vandelli M.A. และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (0.5, 1 และ 2 %w/v) และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง (1 และ 24 ชั่วโมง) ต่อรูปร่าง ขนาด และการพองตัว (Swelling) ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินเพื่อเป็นตัวนำส่งโคลนิติน ไฮโดรคลอไรด์ (Clinidine hydrochloride) พบว่าหลังจากการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์แล้ว อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีหมู่อะมิโนอิสระน้อยลง โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์และเวลาในการเชื่อมขวางเพิ่มมากขึ้นจะมีร้อยละการเชื่อมขวางมากยิ่งขึ้น ความสามารถในการพองตัวและการปลดปล่อยยาจะลดลง แต่ไม่มีผลต่อขนาดของอนุภาค นอกจากนี้ยังพบว่าการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการปลดปล่อยยาแบบออกฤทธิ์นาน (Sustained release) โดยอนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.5 %w/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดความดันโลหิตได้นาน 52-72 ชั่วโมง

Ratanavaraporn J. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบวิธีการเชื่อมขวางทางกายภาพและการเชื่อมขวางทางเคมีของเส้นใยจากเจลาตินชนิดเอ (GA) และชนิดบี (GB) ที่ขึ้นรูปด้วยเทคนิคการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต พบว่าการเชื่อมขวางแต่ละวิธีมีผลต่อโครงสร้างของเส้นใยและมีร้อยละ

การเชื่อมขวางที่แตกต่างกัน การเชื่อมขวางทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน (DHT) และการใช้พลาสมา (PLAS) มีร้อยละการเชื่อมขวางน้อยกว่าการเชื่อมขวางทางเคมี เนื่องจากเกิดได้เฉพาะพื้นที่ผิวของเส้นใย ในงานวิจัยนี้พบว่าการเชื่อมขวางด้วย PLAS ทำให้เกิดแรติคัลที่วงอะโรมาติกของกรดอะมิโน เช่น ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน ของเจลาติน ทำให้เกิดการเชื่อมขวางขึ้น และเมื่อใช้เทคนิค DHT ร่วมกับ PLAS พบว่า GA มีร้อยละการเชื่อมขวางมากขึ้น ในขณะที่ GB ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การใช้เทคนิคการเชื่อมขวางทางกายภาพร่วมกับทางเคมี เช่น ใช้ DHT ร่วมกับการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี เช่น 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) / N-Hydroxysuccinimide (NHS) หรือกลูตารัลดีไฮด์ จะทำให้เกิดการเชื่อมขวางทั้งที่พื้นผิวและเนื้อในของเส้นใยเจลาติน นอกจากนี้เส้นใย GB ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า GA เมื่อทำการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS ซึ่งทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนกับหมู่คาร์บอกซิลมา จะมีร้อยละการเชื่อมขวางสูง เมื่อทำการศึกษารูปสัณฐานของเส้นใย พบว่าหลังผ่านการเชื่อมขวางด้วย DHT PLAS หรือ DHT/PLAS พื้นผิวของเส้นใยจะเกิดการหลอมละลาย ขณะที่ด้านในของเส้นใยไม่มีการเปลี่ยนแปลง การเชื่อมขวางทางกายภาพโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มการพองตัวของเส้นใย และลดการละลายในขณะทำการเชื่อมขวางทางเคมี และเมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย พบว่าเส้นใยที่เชื่อมขวางด้วย DHT มีอัตราการย่อยสลายเร็วที่สุด การใช้เทคนิค DHT ร่วมกับการใช้สารเคมีช่วยลดอัตราการย่อยสลาย และยังพบว่า GB มีอัตราการย่อยสลายช้ากว่า GA หลังผ่านไป 210 นาที GA มีร้อยละน้ำหนักลดลง 80-90% ในขณะที่ GB มีประมาณ 70-80%

Lerdchai K. และคณะ (2015) ขึ้นรูปโครงสร้างความพรุนสูง (Sponges) จากไฟโบรอินและเจลาตินด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอสำหรับรักษาโรคมะเร็ง พบว่าการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ช่วยลดการละลายน้ำของเจลาติน และเพิ่มความเสถียรของโครงสร้างความพรุนสูง ถึงแม้ว่า SF/G มีร้อยละการเชื่อมขวาง 33-88% แต่ก็ยังคงสามารถเกิดการย่อยสลายได้เองทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อเซลล์

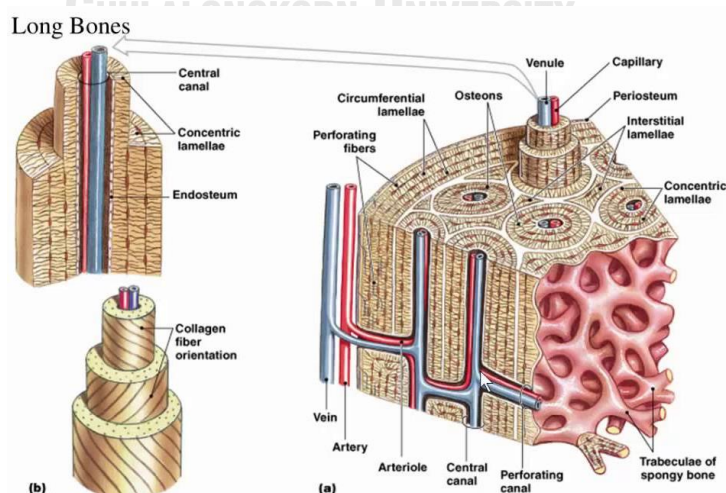
## 2.5 กระดูก (Bone)

กระดูกเป็นอวัยวะที่มีโครงสร้างแข็งภายในร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ในมนุษย์ที่โตเต็มวัยมีกระดูก 213 ชิ้น (ไม่รวมกระดูกในกล้ามเนื้อ) หน้าที่ของกระดูก คือ เป็นโครงสร้างค้ำจุนร่างกาย ป้องกันอวัยวะภายในที่สำคัญจากอันตรายและการกระทบกระเทือน เป็นจุดยึดเกาะของกล้ามเนื้อและเอ็นทำให้ร่างกายสามารถเคลื่อนไหวในรูปแบบต่าง ๆ ได้ สะสมแร่ธาตุและ

โกรทแฟคเตอร์ (Growth Factor) รักษาสมดุลของแร่ธาตุและสภาวะกรดเบสในร่างกาย นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งสร้างเซลล์เม็ดเลือดอีกด้วย (Taichman 2005)

### 2.5.1 ชนิด ประเภท และโครงสร้างของกระดูก

กระดูกแบ่งตามลักษณะและรูปร่างของกระดูกได้ 4 ชนิด คือ กระดูกทรงกระบอก (Tubular bone) หรือกระดูกยาว (Long bone) เป็นกระดูกแข็งที่มีรูปร่างยาว เช่น กระดูกต้นแขน กระดูกต้นขา และกระดูกเชิง กระดูกสั้น (Short bone) เป็นกระดูกแข็งที่มีรูปร่างสั้น เช่น กระดูกข้อมือ และกระดูกข้อเท้า กระดูกแบน (Flat bone) เป็นกระดูกแข็งที่มีรูปร่างแบน เช่น กะโหลกศีรษะ และกระดูกสะบัก และกระดูกที่มีรูปร่างอื่น ๆ (Irregular bone) เป็นกระดูกแข็งที่มีลักษณะและรูปร่างไม่แน่นอน เช่น กระดูกสันหลัง และกระดูกใบหน้า เป็นต้น และหากแบ่งกระดูกตามลักษณะของเนื้อกระดูก สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ กระดูกเนื้อแน่น (Compact bone) เป็นกระดูกที่มีลักษณะแน่นและแข็ง มีช่องว่างของเนื้อกระดูกน้อยมาก ลักษณะภายนอกมีสีขาวหรือเหลืองอ่อน ภายในประกอบด้วยวงเรียงเป็นชั้นๆ (Lamellae) ล้อมรอบช่องฮาเวอร์เซียน (Haversian หรือ Central canal) ซึ่งเป็นท่อยาวขนานตามความยาวของกระดูกแข็ง และเป็นที่อยู่ของหลอดเลือด เส้นประสาทและท่อน้ำเหลืองที่มาเลี้ยงกระดูก เนื้อกระดูกอีกชนิด คือ กระดูกพรุน (Spongy bone) เป็นกระดูกที่มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ เนื่องจากมีชิ้นกระดูกเล็ก ๆ ที่มีลักษณะเป็นแท่งที่เรียกว่า Trabeculae ประสานต่อกันเป็นร่างแหโดยมีช่องว่างแทรกอยู่ เนื้อกระดูกในแต่ละ Trabeculae จะมีการเรียงเป็นวงเรียงเป็นชั้น ๆ เช่นเดียวกับกระดูกเนื้อแน่น แต่ไม่เป็นระเบียบนัก เนื่องจาก Trabeculae มีขนาดเล็ก การจัดเรียงตัวของ Trabeculae ไม่เป็นระเบียบ แต่มีการจัดเรียงตัวในแนวที่สามารถช่วยรับแรงหรือน้ำหนักได้ (Soames 1995)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างภายในของกระดูกแบบเนื้อแน่นและกระดูกพรุนในกระดูกแบบยาว

(Soames 1995)

## 2.5.2 องค์ประกอบของกระดูก

กระดูกมีส่วนที่เป็นเนื้อกระดูก (Bone matrix) คิดเป็นร้อยละ 90 ของปริมาตรกระดูกทั้งหมด เนื้อกระดูกมีองค์ประกอบสำคัญ 2 ส่วน คือ เซลล์กระดูกและเนื้อเยื่อกระดูก

### 2.5.2.1 เซลล์กระดูก (Bone cell)

เซลล์กระดูกเป็นองค์ประกอบร้อยละ 10 ของปริมาตรกระดูกทั้งหมด โดยเซลล์กระดูกประกอบด้วยเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ เซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์ (Osteoprogenitors) เซลล์ออสติโอเบลาสต์ (Osteoblast) เซลล์ออสติโอไซต์ (Osteocytes) และเซลล์สลายกระดูก ได้แก่ เซลล์ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) (Clarke 2008)

- เซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์เป็นเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกซึ่งเจริญมาจาก Embryonic mesenchymal cells เซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์พบได้ทั่วไปภายในกระดูก เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยโกรทแฟคเตอร์ เช่น Bone morphogenetic proteins; BMPs จะเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง (Differentiate) ไปเป็นเซลล์ออสติโอเบลาสต์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ และซ่อมแซมเนื้อกระดูกส่วนที่ถูกทำลายหรือแตกหัก

- เซลล์ออสติโอเบลาสต์เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์ เซลล์ชนิดนี้มักพบตามบริเวณขอบของเนื้อกระดูก โดยมีลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคล้ายลูกบาศก์เรียงตัวชิดกันเป็นแถว เซลล์ออสติโอเบลาสต์มีหน้าที่สร้าง ลำเลียง และจัดเรียงโปรตีนของเนื้อกระดูก เนื่องจากเซลล์มีตัวรับ (Receptor) ของโปรตีนหลายชนิดอยู่บนผิวเซลล์ และสามารถสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติอยด์ (Osteoid) ซึ่งสามารถเกิดการสะสมสารอนินทรีย์จนกลายเป็นเนื้อกระดูกได้ นอกจากนี้เซลล์ยังสามารถสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อกระดูก

- เซลล์ออสติโอไซต์เป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว มีออร์แกเนลล์ในไซโตพลาซึมน้อย แต่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เซลล์ออสติโอไซต์เป็นเซลล์กระดูกที่มีมากที่สุดทำหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียม และสารอื่น ๆ นอกเซลล์อื่น โดยเซลล์ชนิดนี้เจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์เหลือเป็นช่องที่เซลล์อาศัยอยู่เรียกว่า ลากูนา (Lacuna) และแต่ละลากูนามีช่องทางเล็ก ๆ ที่เรียกว่า คานาลิคูล (Canaliculi) เพื่อให้แขนงเซลล์แทรกเข้าไปเพื่อนำส่งสารอาหาร ออกซิเจน ติดต่อกับสารและแลกเปลี่ยนระหว่างเซลล์

- เซลล์ออสติโอคลาสต์เป็นเซลล์สลายกระดูกที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (Monocyte stem cells) เซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมีหลายนิวเคลียส โดยมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการก่อรูปกระดูก (Bone remodeling) เซลล์ออสติโอคลาสต์สามารถสังเคราะห์ Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการกร่อนเนื้อกระดูก ทำให้

กระดูกมีรูปร่างและลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้กระบวนการนี้ยังทำให้เกิดการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย (Buckwalter, Glimcher et al. 1995)

### 2.5.2.2 เนื้อเยื่อกระดูก (Osseous tissue)

เนื้อเยื่อพื้นฐานของกระดูกเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพิเศษ เรียกว่า เนื้อเยื่อกระดูก (Osseous tissue) มีองค์ประกอบสำคัญ 4 ชนิด คือ สารอนินทรีย์หรือแร่ธาตุต่าง ๆ ร้อยละ 50-70 สารอินทรีย์ ร้อยละ 20-40 น้ำร้อยละ 5-10 และไขมันน้อยกว่าร้อยละ 3 (Clarke 2008) สำหรับในส่วนของสารอนินทรีย์และแร่ธาตุมีองค์ประกอบหลัก คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite; HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) และมีคาร์บอนेट แมกนีเซียม โซเดียม และกรดฟอสเฟตในปริมาณเล็กน้อย และในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์มี คอลลาเจน ชนิด I (Collagen type I) เป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 90 ที่เหลือเป็นโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจน เช่น โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) และโกรทแฟกเตอร์ (Buckwalter, Glimcher et al. 1995)

### 2.5.3 การสร้างกระดูก (Bone formation)

กระบวนการสร้างกระดูกสามารถแบ่งเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ การสร้างกระดูกแบบเอนโดคอนดรอล (Endochondral ossification) และการสร้างกระดูกแบบอินทราเมมเบรนัส (Intramembranous ossification)

- การสร้างกระดูกแบบเอนโดคอนดรอลเป็นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีกระดูกอ่อน (Cartilage) เป็นต้นแบบ แล้วเปลี่ยนแปลงกระดูกอ่อนให้เป็นกระดูก โดยเริ่มจากเซลล์คอนโดโรคลาสต์ (Chondroclasts) ซึ่งเป็นเซลล์สลายกระดูกอ่อน มีการเจริญเพิ่มจำนวนและมีขนาดใหญ่ขึ้น คอนโดโรคลาสต์จะสลายกระดูกอ่อนเกิดช่องว่าง กลุ่มเซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์เข้าไปแทนที่ในช่องว่าง และเกิดการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ออสติโอบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์สร้างกระดูก ถือว่าเป็นกระดูกปฐมภูมิ (Primary bone) ขณะที่ศูนย์กลางของการสร้างกระดูกปฐมภูมิขยายมายังปลายสองข้างของกระดูกยาว ที่ปลายทั้งสองของกระดูกจะถูกสลายโดยเซลล์ออสติโอคลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์สลายกระดูก กระดูกทุติยภูมิ (Secondary bone) จะถูกสร้างมาแทนที่ การสร้างกระดูกทั้งปฐมภูมิและทุติยภูมิจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งสร้างกระดูกมาบรรจบกันที่แนวแผ่นอีพิไฟเซียล (Epiphysial plate) (Shapiro 2008)

- การสร้างกระดูกแบบอินทราเมมเบรนัสเป็นการกระบวนการสร้างกระดูกที่ไม่ต้องอาศัยกระดูกอ่อนต้นแบบที่เจอแคลเซียม (Calcified cartilage template) มักเกิดกับกระดูกแบน และกระดูกที่เจริญแนวกว้าง การสร้างกระดูกด้วยกระบวนการนี้เกิดจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์มีเซนไคม์ทำให้เกิดจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (Primary ossification center) เซลล์มีเซนไคม์เกิด

การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ออสติโอโพรจีนิตอร์ จากนั้นเจริญเติบโตและพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ออสติโอบลาสต์ซึ่งช่วยให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูกด้วยการสะสมแคลเซียมในบริเวณดังกล่าว (Yang 2009)

## 2.6 การตัดแปลงพื้นผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite; HAp) เป็นสารประกอบอนินทรีย์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของกระดูกและฟัน ที่ทำให้กระดูกและฟันมีความแข็งแรง มีสูตรทางเคมี คือ  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ไฮดรอกซีอะพาไทต์บริสุทธิ์มีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca/P ratio) เท่ากับ 1.67 โดยโมล หรือ 2.151 โดยน้ำหนัก สามารถสลายตัวที่อุณหภูมิประมาณ 800-1200 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับปริมาณสารสัมพันธ์ (Stoichiometry) โดยข้อเสียของไฮดรอกซีอะพาไทต์ คือ มีความทนทานการแตกหัก (fracture toughness) น้อย

ไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) มีคุณสมบัติช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ (Cellular adhesion) ชักนำเนื้อเยื่อกระดูก (Osteoconductive) และช่วยในการเจริญเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น (Cell differentiation) (Dorozhkin 2009) ขนาดและรูปร่างของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์มีผลต่อคุณสมบัติและส่งผลต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขนาดนาโนช่วยเพิ่มกิจกรรมทางชีวภาพ (Bioactivity) เนื่องจากคุณสมบัติเหล่านี้ไฮดรอกซีอะพาไทต์จึงนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในเป็นวัสดุทางการแพทย์ เช่น ฟิลเลอร์กระดูก (Bone fillers), โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds), การเคลือบผิว (Coating) หรือ นำส่งยา (Drug delivery) เป็นต้น

การเคลือบพื้นผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ทำได้หลายวิธี เช่น กระบวนการเลียนแบบร่างกาย (Biomimetic process) โดยใช้ SBF, การแช่สลับ (Alternate Soaking), การพ่นเคลือบด้วยพลาสมา (Plasma spraying), การตกตะกอนร่วม (Co-precipitation), อิเล็กโตรสปินนิง (Electrospinning), การเผาไล่ไอน้ำ (Calcination) หรือ การเผาซินเตอร์ (Sintering) เป็นต้น ในงานวิจัยนี้เลือกวิธีการตัดแปลงพื้นผิวอนุภาคด้วยการแช่สลับ

การแช่สลับเป็นวิธีการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิว โดยแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) แล้วแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) นับเป็น 1 รอบของการแช่สลับ ปฏิกิริยาของการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ในกระบวนการแช่สลับเป็นไปตามสมการ



วิธีนี้มีข้อดี คือ เกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวนมากในระยะเวลาสั้นๆ โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ปริมาณผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับจำนวนรอบที่ใช้ในการแช่สลับ สำหรับ

การแช่สลับในชิ้นงานที่เป็นสารชีวโมเลกุล ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการนี้มีการความแข็งแรง เนื่องจากเกิดพันธะเคมีระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะมิโนของชิ้นงานกับหมู่ P-O และ O-H ในผลึก

Taguchi T. และคณะ (1999) ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการแช่สลับเพื่อสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวและภายในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol; PVA) เพื่อศึกษาผลของการบวมตัวของเจลต่อการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยเตรียมเจลพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีความหนาแน่นในการเชื่อมขวางต่างกัน ทำให้ได้เจลที่มีอัตราการบวม (Swelling ratio) ต่างกัน 4.1-30 เท่า ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ จากนั้นนำไปแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ในทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วกำจัดน้ำส่วนที่เกินบนผิวด้วยการซับกับกระดาษกรอง จากนั้นแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนพอสเฟตความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับเป็นการแช่สลับ 1 รอบ จากการศึกษาพบว่าการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้นทั้งบนพื้นผิวและภายในของเจลพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยเจลพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีอัตราการบวมมากขึ้นจะมีการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากอัตราการบวมน้ำส่งผลต่อการแพร่กระจายของสารละลายแคลเซียม และสารละลายฟอสเฟตเข้าไปในเนื้อของเจล และเมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับพบว่าเจลทุกชนิดมีการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์มากขึ้นตามไปด้วย โดยเจลพอลิไวนิลแอลกอฮอล์มีไฮดรอกซีอะพาไทต์สะสมมากกว่าร้อยละ 70 ได้เมื่อใช้เจลที่มีอัตราการบวมน้ำสูง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการแช่สลับ โดยการใช้อุณหภูมิในการแช่สลับ 4, 37, 60 และ 80 องศาเซลเซียส จากผล XRD พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้นความเป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์จะมากขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะลดข้อบกพร่องในผลึกโครงข่าย แต่ปริมาณของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณลดลง เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงลดความสามารถในการแพร่กระจายของไอออนแคลเซียมและไอออนฟอสเฟต และลดการจับตัวกันของไอออนกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และไดโซเดียมไฮโดรเจนพอสเฟตที่ใช้ในการแช่สลับ 20/12, 100/60, 200/120, 400/240, 800/480 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อใช้สารละลายความเข้มข้นสูงจะเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มขึ้น แต่จะพบการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ภายในเจลพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เฉพาะเจลที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายต่ำ ผลการศึกษาการเขย่า (Shaking) ต่อการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์พบว่า การเขย่าขณะการแช่สลับส่งผลให้การเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มมากกว่าการแช่สลับในสภาวะอยู่นิ่งเฉพาะการแช่สลับรอบที่ 1-3 แต่เมื่อเพิ่มรอบการแช่สลับรอบที่ 4-6 พบว่าปริมาณไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแช่สลับแบบเขย่าและแบบอยู่นิ่ง ผลการศึกษาของปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการแช่สลับพบว่า ปริมาตรของสารละลายที่ใช้น้อยจะส่งผลต่อการแช่สลับรอบแรก



เท่านั้น ในการแช่สลับรอบถัดไปพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อศึกษาลำดับในการแช่สลับ คือ แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ก่อนเป็นลำดับแรก และแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตก่อนเป็นลำดับแรก พบว่าลำดับในการแช่สลับไม่มีผลต่อการแช่สลับ

Furuzono T. และคณะ (2000) ได้ทำการเตรียมคอมโพสิตระหว่างผ้าไหม (Silk fabric) กับอะพาไทต์ด้วยวิธีการแช่สลับ โดยการผ้าไหม 1.5 เซนติเมตรไปแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ในทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกำจัดน้ำส่วนที่เกินบนผิวด้วยการซับกับกระดาษกรอง จากนั้นแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับเป็นการแช่สลับ 1 รอบ โดยทำทั้งหมด 30 รอบ จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำผ้าไหมและผ้าไนลอนมาแช่สลับที่สภาวะเดียวกัน พบว่าผ้าไหมมีปริมาณอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นเยอะกว่าผ้าไนลอน และเมื่อศึกษา XRD ของอะพาไทต์ที่สะสมอยู่บนผ้าไหมพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นจากการแช่สลับมีความเป็นผลึกน้อยกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์มาตรฐานที่ได้จากการเผา (Sintering) เมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นมีความเป็นผลึกมากขึ้น การเกิดผลึกอะพาไทต์ที่สะสมบนผ้าไหมเกิดขึ้นยึดออกไปตามแกน c (c axis) FTIR และ XPS แสดงให้เห็นว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นจากการแช่สลับมีคาร์บอน, ไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน และโซเดียมไอออนเป็นส่วนประกอบเหมือนในกระดูกธรรมชาติ ซึ่งอาจทำให้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับ ปริมาณของไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออนและโซเดียมไอออนในผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์จะลดลงส่งผลให้ความเป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มขึ้น

Goes J.C. และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเคลือบอะพาไทต์บนแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่มีความหนาแน่นของหมู่คาร์บอกซิลแตกต่างกัน คอลลาเจนประจุลบ (Anionic Collagen) เตรียมได้โดยการไฮโดรไลซิสหมู่คาร์บอกซีไมด์ (Carboxyamides) ของแอสพาราจีนและกลูตามีน นำแผ่นฟิล์มคอลลาเจนและคอลลาเจนประจุลบขนาด 5x5 เซนติเมตร มาแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที แผ่นฟิล์มถูกล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์หลังจากแช่ในสารละลายแต่ละชนิดทำการแช่สลับ 100 รอบ ผลการศึกษาพบว่า XRD ของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนประจุลบและคอลลาเจนที่แช่สลับมีพีคที่  $26^\circ$  และ  $32^\circ$  ตามลำดับ ซึ่งเป็นพีคหลักของไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยพีคของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนมีความกว้างซึ่งแสดงถึงความเป็นผลึกต่ำมากกว่าแผ่นฟิล์มคอลลาเจนประจุลบ จากผล TGA พบว่าแผ่นฟิล์มคอลลาเจนประจุลบมีอะพาไทต์เกิดขึ้นที่พื้นผิวมากกว่าแผ่นฟิล์มคอลลาเจน 1.24 เท่า และผลจาก SEM พบว่าพื้นผิวของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนประจุลบและแผ่นฟิล์มคอลลาเจน

มีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนเคลือบอยู่ จากผลการทดลองสนับสนุนว่าปริมาณหมู่คาร์บอกซิลที่เพิ่มขึ้นในแผ่นฟิล์มคอลลาเจนประจุลบส่งผลต่อการเกิดเกลือผลึกของอะพาไทต์ในสภาวะของร่างกาย

Kim H.J. และคณะ (2008) ได้ศึกษาโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปจากไหมไฟโบรอินและกรดพอลิแอสพาร์ติก (Polyaspartic acid) ที่อัตราส่วน 100/0, 95/5, 90/10 และ 80/20 ด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก (Salt-leaching) แล้วนำมาแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4) เป็นเวลา 20 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่สลับจำนวน 3, 5 และ 7 รอบ ทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าปริมาณอะพาไทต์ในโครงสร้างเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อมีพอลิแอสพาร์ติกเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลิกจากพอลิแอสพาร์ติกช่วยเพิ่มปริมาณการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ เมื่อนำโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ทำการแช่สลับแล้วไปเลี้ยงสเต็มเซลล์ชนิด Human bone marrow (hMSC) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะชักนำ osteogenic ที่มี BMP-2 และไม่มี BMP-2 เป็นส่วนประกอบ พบว่า ที่เวลา 6 สัปดาห์ โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณพอลิแอสพาร์ติกมากที่สุด BMP-2 ไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ จากผล ALP พบว่า โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณพอลิแอสพาร์ติกร้อยละ 20 และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี BMP-2 มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่มอื่น และจากผลของการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม (Calcium assay) พบว่า โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี BMP-2 มีปริมาณแคลเซียมสะสมในโครงสร้างเลี้ยงเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มี BMP-2

Tritanipakul S. และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างสัณฐานและความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยโดยวิธีการกำจัดเกลือออก (Salt-leaching) แล้วนำไปคอนจูเกตเจลาตินและเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS จากนั้นตัดแปรพื้นผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.12 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการแช่สลับ 4 รอบ พบว่า โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอินล้วนมีปริมาณการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์มากกว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่คอนจูเกตเจลาติน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของโครงสร้างสัณฐาน โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่คอนจูเกตเจลาตินมีขนาดรูพรุนเล็กกว่าส่งผลต่อการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครงสร้างเซลล์ การคอนจูเกตเจลาตินลงบนโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ช่วยเพิ่มมอดุลัสแรงกด (Compressive modulus) ของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอิน จากการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ชนิด rat bone-marrow derived mesenchymal (MSCs) พบว่า เซลล์ MSCs มีการเจริญเพิ่มจำนวนบนโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่คอนจูเกตเจลาตินได้

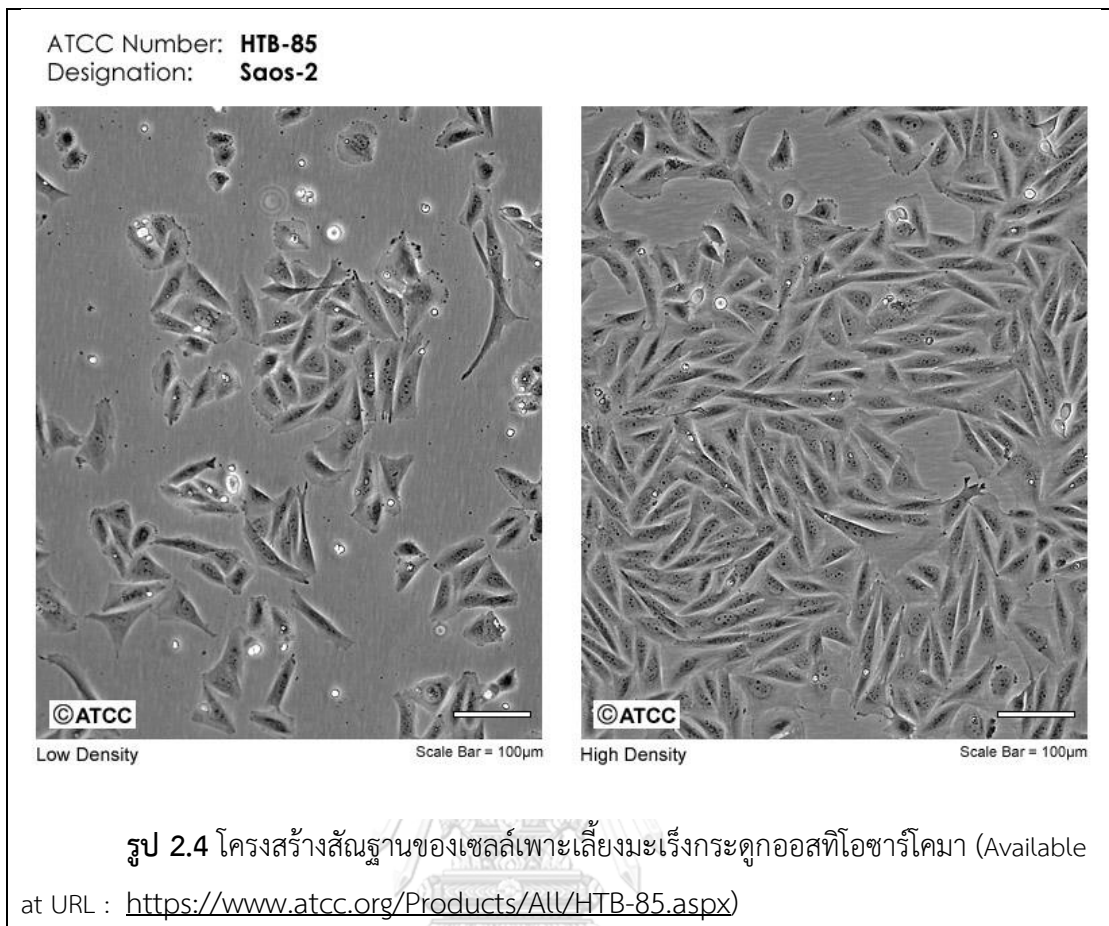
ดีกว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินล้วน และยังพบว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮดรอกซีอะพาไทต์มีการเจริญของเซลล์ MSCs ได้ดีกว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ก่อนการตัดแปรผิว

## 2.7 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพบ่งบอกถึงความสามารถของวัสดุในการแสดงพฤติกรรมการตอบสนองในฐานะโฮสที่เหมาะสมในสถานการณ์จำเพาะ (Williams 2008) ความเข้ากันได้ทางชีวภาพเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้กับร่างกาย โดยเฉพาะในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ การตอบสนองของร่างกายต่อชีววัสดุเป็นปัจจัยแรกที่ต้องคำนึงถึง การทดสอบการเข้ากันได้ทางชีวภาพทำได้โดยทดสอบการตอบสนองต่อเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เช่น การยึดเกาะของเซลล์ (cell adhesion) การเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell proliferation) และการอยู่รอดของเซลล์ (Cell viability)

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระดูกออสทีโอซาร์โคมา (Human osteogenic sarcoma cell line; SaOS-2) เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคที่ผลิตขึ้น


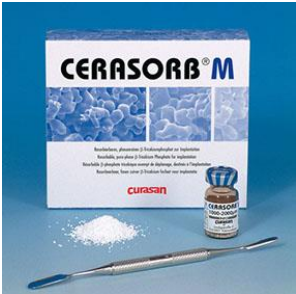

ข้อมูลของเซลล์ SaOS-2
ชื่อเซลล์ : เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระดูกออสทีโอซาร์โคมา (Human osteogenic sarcoma cell line)
ประเภทเซลล์ : เซลล์ออสติโอ بلاสต์ (Osteoblast)
สิ่งมีชีวิต : มนุษย์สปีชีส์ <i>Homo sapiens</i>
เนื้อเยื่อ : กระดูก
สัณฐานวิทยา : เนื้อเยื่อบุผิว (Epithelial)
ลักษณะการเพาะเลี้ยง : ยึดเกาะ (Adherent)
ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ : 1
โรค : มะเร็งกระดูกออสทีโอซาร์โคมา (Osteosarcoma)
อายุ : 11 ปี
เพศ : หญิง
เชื้อชาติ : คอเคเซียน (Caucasian)
ATCC : HTB-85™



## 2.8 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์และสิทธิบัตรทางการค้าที่เกี่ยวข้อง

### 2.8.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่เกี่ยวข้อง

ชื่อผลิตภัณฑ์	องค์ประกอบ	ขนาดของอนุภาค	ที่มา
<p><b>Bio-Oss<sup>®</sup></b></p>  <p>Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland</p>	<p>Bovine hydroxyapatite, high temperature HA ceramics, deproteinated</p>	<p>0.25–1 มม. และ 1–2 มม.</p>	<p>Available at URL: <a href="https://www.geistlich-na.com">https://www.geistlich-na.com</a></p>
<p><b>TutoBONE<sup>®</sup>Microchips</b></p>  <p>Tutogen Medical, Neunkirchen, Germany</p>	<p>Bovine hydroxyapatite solvent dehydrated natural bone</p>	<p>0.25–1 มม. และ 1–2 มม.</p>	<p>Available at URL: <a href="https://www.novomedics.ch">https://www.novomedics.ch</a></p>
<p><b>PEPGEN P-15<sup>®</sup></b></p>  <p>Dentsply Friadent, Mannheim, Germany</p>	<p>Bovine hydroxyapatite, high temperature sintered, deproteinated, enhanced with p-15 peptide</p>	<p>250-420 ไมครอน</p>	<p>Available at URL: <a href="http://res-5.cloudinary.com">http://res-5.cloudinary.com</a></p>
<p><b>BioBase<sup>®</sup></b></p>  <p>Zimmer Dental Freiburg, Germany</p>	<p><math>\alpha</math>-tricalciumphosphate</p>	<p>0.3–0.5 มม. 0.5– 1.0 มม. และ 1.0– 2.0 มม.</p>	<p>Available at URL: <a href="http://www.biovision.de">http://www.biovision.de</a></p>

ชื่อผลิตภัณฑ์	องค์ประกอบ	ขนาดของอนุภาค	ที่มา
<p>Osbone®</p>  <p>Curasan, Kleinostheim, Germany</p>	<p>Synthetic hydroxyapatite ceramic</p>	<p>250-1000 ไมครอน และ 1000-2000 ไมครอน</p>	<p>Available at URL: <a href="http://curasaninc.com">http://curasaninc.com</a></p>
<p>CERASORB® M</p>  <p>Curasan, Kleinostheim, Germany</p>	<p><math>\beta</math>-tricalciumphosphate</p>	<p>150-500 ไมครอน และ 500-1000 ไมครอน และ 1000-2000 ไมครอน</p>	<p>Available at URL: <a href="http://curasaninc.com">http://curasaninc.com</a></p>
<p>FRIOS® Algipore®</p>  <p>Dentsply Friadent, Mannheim, Germany</p>	<p>Purely plant-derived bone regeneration material harvested from red algae with close analogy to the hydroxyapatite of human bone.</p>	<p>0.3–0.5 มม. 0.5–1.0 มม. และ 1.0–2.0 มม.</p>	<p>Available at URL: <a href="http://res-5.cloudinary.com">http://res-5.cloudinary.com</a></p>

Mayr-Wohlfart U. และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของวัสดุทดแทนกระดูกต่อพฤติกรรมการเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระดูกออสติโอซาร์โคมา (SaOS-2) ในงานวิจัยนี้ศึกษาวัสดุทดแทนกระดูก 4 ชนิด คือ BIOBASE® (อัลฟา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ( $\alpha$ -tricalcium phosphate;  $\alpha$ -TCP)), แก้วที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive glasses หรือ bioglass), แก้วเซรามิกที่เป็นกลาง (GB9N) และกระดูกที่กำจัดสารละลายออก (Solvent dehydrated bone) เพื่อศึกษาการ

เจริญเติบโตของเซลล์ (Cell proliferation) และกระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น (Cell differentiation) โดยใช้โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ทรงลูกบาศก์ ขนาด 0.7x0.7x1.0 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงเซลล์ 200000 เซลล์ต่อลูกบาศก์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, penicillin-streptomycin 100 U/ml, 1.0% amphotericin B และ 0.08% Certomycin หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันศึกษาโครงสร้างลักษณะของเซลล์บนวัสดุทดแทนกระดูกด้วย SEM พบว่าเมื่อหักโครงสร้างเลี้ยงเซลล์เพื่อดูโครงสร้างข้างใน พบว่าเซลล์สามารถแทรกซึมเข้ามาได้ตามรูพรุนของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ แต่รูปร่างของเซลล์แตกต่างกัน เซลล์ SaOS-2 บน BIOBASE<sup>®</sup>, แก้วเซรามิกที่เป็นกลาง และกระดูกที่กำลังสลายละลายออกไม่ได้เป็นชั้นเดียวสม่ำเสมอ เซลล์มีรูปร่างกลม เซลล์กระจายแยกตัวเดี่ยวๆ หรือเซลล์รวมตัวกัน ขึ้นอยู่กับวัสดุทดแทนกระดูกแต่ละชนิด ในขณะที่กระดูกที่กำลังสลายละลายออกซึ่งมีพื้นผิวเรียบพบว่า เซลล์ SaOS-2 มีลักษณะแบนและกระจายไปทั่วเหมือนเซลล์เพาะเลี้ยงในเพลต จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่าเซลล์เจริญเติบโตได้ดีบนแก้วเซรามิกที่เป็นกลาง มากกว่า BIOBASE<sup>®</sup> และแก้วที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดบนกระดูกที่กำลังสลายละลายออก และจากการศึกษากระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น พบว่า BIOBASE<sup>®</sup> มีค่าแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ค่าแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสหารด้วยปริมาณเซลล์จากวิธีวิเคราะห์ DNA) มากกว่า 9 เท่าของแก้วเซรามิกที่เป็นกลางซึ่งมีค่าแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่ำสุด ส่วนแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสของกระดูกที่กำลังสลายละลายออกมีค่าใกล้เคียงกับการเลี้ยงเซลล์แบบเพลต ในขณะที่แก้วที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีค่าแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพียงครึ่งเดียวของ BIOBASE<sup>®</sup> จากผล RT-PCR พบ Col1 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นถึงการเริ่มต้นการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ใกล้เคียงกันทุกตัวอย่าง ในตัวอย่าง BIOBASE<sup>®</sup> พบ BSP ซึ่งบ่งชี้ถึงการสร้างกระดูกในและพบ OC ซึ่งบ่งชี้ถึงการเริ่มต้นของกระบวนการเกิดผลึก แสดงถึงเซลล์ใน BIOBASE<sup>®</sup> อยู่ในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บนกระดูกที่กำลังสลายละลายออกและแก้วที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพปล่อยแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส, OC และ BSP ในปริมาณใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่มีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเท่าใน BIOBASE<sup>®</sup> แต่มีการเกิดผลึก (สะสมแร่ธาตุ) และการสร้างกระดูกขึ้น ในขณะที่แก้วเซรามิกที่เป็นกลางพบว่าเซลล์อยู่ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะระยะเริ่มแรก และมีแนวโน้มที่จะไม่เจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะ

Bernhardt A และคณะ (2011) ได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของ Osbone<sup>®</sup> เปรียบเทียบกับ Cerasorb M<sup>®</sup> และ Bio-Oss<sup>®</sup> โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 ความเข้มข้น  $1.6 \times 10^5$  เซลล์ต่อตัวอย่าง 0.12 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ McCoy's 5 A ซึ่งมี 15% FCS, penicillin 10 U/ml, streptomycin 100 µg/ml และ glutamine 2 mM และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า Cerasorb M<sup>®</sup> และ Osbone<sup>®</sup> มีปริมาณเซลล์สูงกว่า Bio-Oss<sup>®</sup> อย่างมี

นัยสำคัญทุกช่วงเวลา ในขณะที่ Cerasorb M<sup>®</sup> มีปริมาณเซลล์สูงกว่า Osbone<sup>®</sup> อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างสัณฐานหลังจากเพาะเลี้ยง 28 วัน โดยนำไปส่อง SEM พบว่าเซลล์มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอใน Osbone<sup>®</sup> และ Cerasorb M<sup>®</sup> แต่ไม่พบเซลล์ใน Bio-Oss<sup>®</sup> เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงของเซลล์พบว่า Cerasorb M<sup>®</sup> มีค่าจำเพาะแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากกว่า Osbone<sup>®</sup> อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 21 และ 28 วัน นอกจากนี้ยังพบตัวบ่งชี้ ALP, ON, OP และ BSP II ทั้งใน Cerasorb M<sup>®</sup> และ Osbone<sup>®</sup> แสดงถึงศักยภาพทางชีวภาพของ Osbone<sup>®</sup> ระดับห้องปฏิบัติการ

Ayobian-Markazi N. และคณะ (2012) ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ SaOS-2 และวัสดุทดแทนกระดูกชนิดต่างๆ คือ Bio-Oss<sup>®</sup>, Tutodent<sup>®</sup>, Osteon<sup>®</sup> และ Cerasorb<sup>®</sup> โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 ความเข้มข้น  $2 \times 10^4$  เซลล์ลงบนวัสดุทดแทนกระดูกที่เป็นเม็ด (Granule) ขนาด 0.25 ถึง 0.5 มิลลิเมตรปริมาณ 30 มิลลิกรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS เป็นเวลา 15 และ 21 วัน จากการศึกษาโครงสร้างสัณฐานของเซลล์โดย SEM พบว่า เซลล์บนพื้นผิวของ Tutodent<sup>®</sup> และ Osteon<sup>®</sup> มีลักษณะยึดออกคล้ายกระสวยยาวรี (Spindle-like) มีการยึดเกาะที่พื้นผิวได้ดี ในขณะที่ Cerasorb<sup>®</sup> และ Bio-Oss<sup>®</sup> เซลล์มีลักษณะกลม และเมื่อศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 15 วันแสดงให้เห็นว่า Tutodent<sup>®</sup> มีปริมาณเซลล์มากที่สุด ตามด้วย Osteon<sup>®</sup> และ Cerasorb<sup>®</sup> ตามลำดับ โดย Bio-Oss<sup>®</sup> มีปริมาณเซลล์น้อยที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง Osteon<sup>®</sup>, Cerasorb<sup>®</sup> และ Bio-Oss<sup>®</sup> และเมื่อวัดค่าแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสพบว่า Tutodent<sup>®</sup> มีค่าแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่สุด ตามด้วย Cerasorb<sup>®</sup>, Osteon<sup>®</sup> และ Bio-Oss<sup>®</sup> จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าวัสดุทดแทนกระดูกทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการชักนำให้เกิดการเจริญเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะ แต่มีอัตราการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่ำ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.8.2 ลิขสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

### 2.8.2.1 ลิขสิทธิ์ต่างประเทศ

#### 1. ลิขสิทธิ์ CN103446617A ประเทศจีน ปี 2013

เจ้าของผลงาน 郭瑞, 张渊明, 薛巍 และ 蓝咏

ชื่อลิขสิทธิ์ Gentamicin sulfate/gelatin microsphere complex-loaded silk fibroin scaffold and preparation method

ได้ขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจนต้าไมซินซัลเฟต (Gentamicin sulphate) ผสมเจลาตินอยู่ภายใน เพื่อช่วยให้เจนต้าไมซินซัลเฟตสามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้นานยิ่งขึ้น โดยมีการปลดปล่อยอย่างช้า ๆ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการ



รักษาบาดแผลที่ผิวหนังได้ การขึ้นรูปแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน และการขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนอยู่ภายใน

การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยนำสารละลายเจลาติน 10 %โดยน้ำหนัก แล้วปั่นกวนเป็นเวลา 180 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วปั่นกวนอีก 30 นาที เติมสารละลายกลูต้ารัลดีไฮด์ 25 %โดยน้ำหนัก 0.1 มิลลิลิตร ปั่นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส เติมอะซิโตน 30 มิลลิลิตร แล้วปั่นกวน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกอนุภาคออกมา และนำมาล้างด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล ล้างด้วยน้ำ DI แล้วนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งจะได้อนุภาคเจลาติน จากนั้นหยดเจลาตินตำไมซินซัลเฟตความเข้มข้น 10-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าไปในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน วางทิ้งไว้หนึ่งคืนที่ 4-25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะได้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินตำไมซินซัลเฟตผสมเจลาติน ส่วนการขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนอยู่ภายใน ทำได้โดยใส่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินตำไมซินซัลเฟตผสมเจลาติน 2-10 %โดยน้ำหนัก ลงไปในสารละลายไฟโบรอิน ปั่นกวนแล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

## 2. สิทธิบัตร US 008715740B2 ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี 2014

เจ้าของผลงาน Xiaoqin Wang และ David L. Kaplan

ชื่อสิทธิบัตร Silk nanospheres and microspheres and methods of making same

ได้พัฒนากระบวนการเตรียมอนุภาคนาโนและอนุภาคไมโครจากไหมไฟโบรอิน โดยไม่ใช้สารละลายอินทรีย์ในการผลิต Yamaura และคณะ (1990) พบว่าจะเกิดการแยกเฟส (Phase separation) ขึ้น เมื่อนำไหมไฟโบรอิน (SF) และโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) มาผสมกัน แล้วขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม เนื่องจากการผสม SF กับ PVA ทำให้โครงสร้างทุติยภูมิของไหมเปลี่ยนไป การขึ้นรูปอนุภาคด้วยเทคนิคนี้ทำได้โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) นำสารละลายไปขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม แล้วนำแผ่นฟิล์มไปละลายในน้ำ จากนั้นกำจัด PVA ออกไป จะได้อนุภาคไหมไฟโบรอิน โดยขนาดและรูปร่างของอนุภาคขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของ PVA และสัดส่วน PVA/SF ที่ใช้ เทคนิคนี้ทำได้ง่าย ปลอดภัย รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน ไม่ใช้สารละลายอินทรีย์ การปั่นกวน และความร้อนในการผลิต จึงเหมาะสำหรับนำส่งยา สารเคมีหรือสารออกฤทธิ์ที่มีความว่องไวและเสถียรภาพได้ง่าย เช่น โปรตีน เอนไซม์ เป็นต้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยา การปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์นาน หรือนำส่งยาสู่เป้าหมายได้

### 2.8.2.2 สิทธิบัตรในประเทศไทย

ไม่พบสิทธิบัตรในประเทศไทย

### บทที่ 3 วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้

- 3.1.1 เจลาตินชนิดเอ (pl = 9, Nitta Gelatin Inc., ญี่ปุ่น, Lot#160328)
- 3.1.2 รังไหม (พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1, สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ)
- 3.1.3 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, pH 5.8)
- 3.1.4 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Ajax Finechem, ออสเตรเลีย, Lot# J731401R0x)
- 3.1.5 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน, Lot# STBF0310V)
- 3.1.6 กลูตารัลดีไฮด์ (25%, Fluka, เยอรมัน, Lot#LM06291311)
- 3.1.7 ไกลซีน (Sigma-Aldrich, เยอรมัน, CAS 56-40-6)
- 3.1.8 แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Ajax-Finechem, ออสเตรเลีย, CAS 10035-04-8)
- 3.1.9 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Ajax-Finechem, ออสเตรเลีย, CAS 7558-79-4)
- 3.1.10 กรดไฮโดรคลอริก (HCl 36.5-38%, QReC, นิวซีแลนด์, CAS 7647-01-0)
- 3.1.11 สารละลายบัฟเฟอร์เอทานอลามีน (Ethanalamine;  $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ , Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, Lot#MKBM0407V)
- 3.1.12 ออร์โธ-ครีซอล์ฟทาลีน (o-Cresolphthalein complexion; oCPC, Fluka, เยอรมัน, Lot#BCBC4450V)
- 3.1.13 เอนไซม์โปรตีเอส XIV (Protease type XIV = 3.5 units/mg, Sigma-Aldrich, เยอรมัน, Lot#SLB58732)
- 3.1.14 โซเดียมเอไซด์ ( $\text{NaN}_3$ , Labchem, ออสเตรเลีย, Cat# 822335)
- 3.1.15 สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic cancda Inc., แคนาดา, Lot#K720R0G)
- 3.1.16 Dulbecco's modified eagle powder medium (DMEM, 10% medium + L glutamine, Hyclone, สหรัฐอเมริกา, Lot#AC102406860)

3.1.17 Fetal Bovine Serum (FBS, HyClone, สหรัฐอเมริกา, Cat#SV30160.03)

3.1.18 Penicillin-Streptomycin antibiotic (10,000 units/ml, Hyclon, สหรัฐอเมริกา, Lot#J180005)

3.1.19 Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin in EDTA, Hyclone, สหรัฐอเมริกา, Lot#J170043)

3.1.20 Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS, Bio basic cancda Inc., แคนาดา, Lot#B102581R0G)

3.1.21 Bisbenzimidazole H33258 (Hoechst 33258) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, CAS 23491-45-4)

3.1.22 ไดมethylซัลไฟด์ (DMSO,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  = 78.13 g/mol, Riedel-de Haen®, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, Lot#1411057)

3.1.23 เอทานอล (99.9%, QReC, นิวซีแลนด์, CAS 64-17-5)

## 3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิทัล (AL204, Mettler TOLEDO, สหรัฐอเมริกา)

3.2.2 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Cimarac 3, Thermolyne, สหรัฐอเมริกา)

3.2.3 ตู้อบ (VD23, Binder, เยอรมัน)

3.2.4 ฝูงไดอะไลซิส (MWCO 12000-16000, Viskase Companies, Inc., ญี่ปุ่น)

3.2.5 เครื่อง Centrifuge (Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)

3.2.6 Autopipette (Eppendorf, เยอรมัน)

3.2.7 ถาดพลาสติกเคลือบเทฟลอน (ญี่ปุ่น)

3.2.8 เครื่อง Freeze dry (CHRIST®, เยอรมัน)

3.2.9 เครื่องปั่นโกลบขนาดเล็ก (HR2117, Philips)

3.2.10 ตะแกรงแยกขนาด (Sieve, Humboldt, สหรัฐอเมริกา)

3.2.11 อ่างน้ำร้อน (1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)

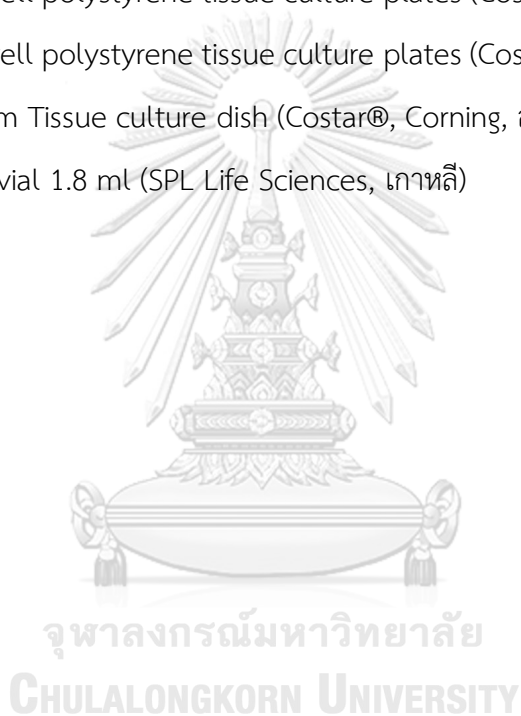
3.2.12 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (NR-BU343, Panasonic, ไทย)

3.2.13 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Sandenintercool, ไทย)

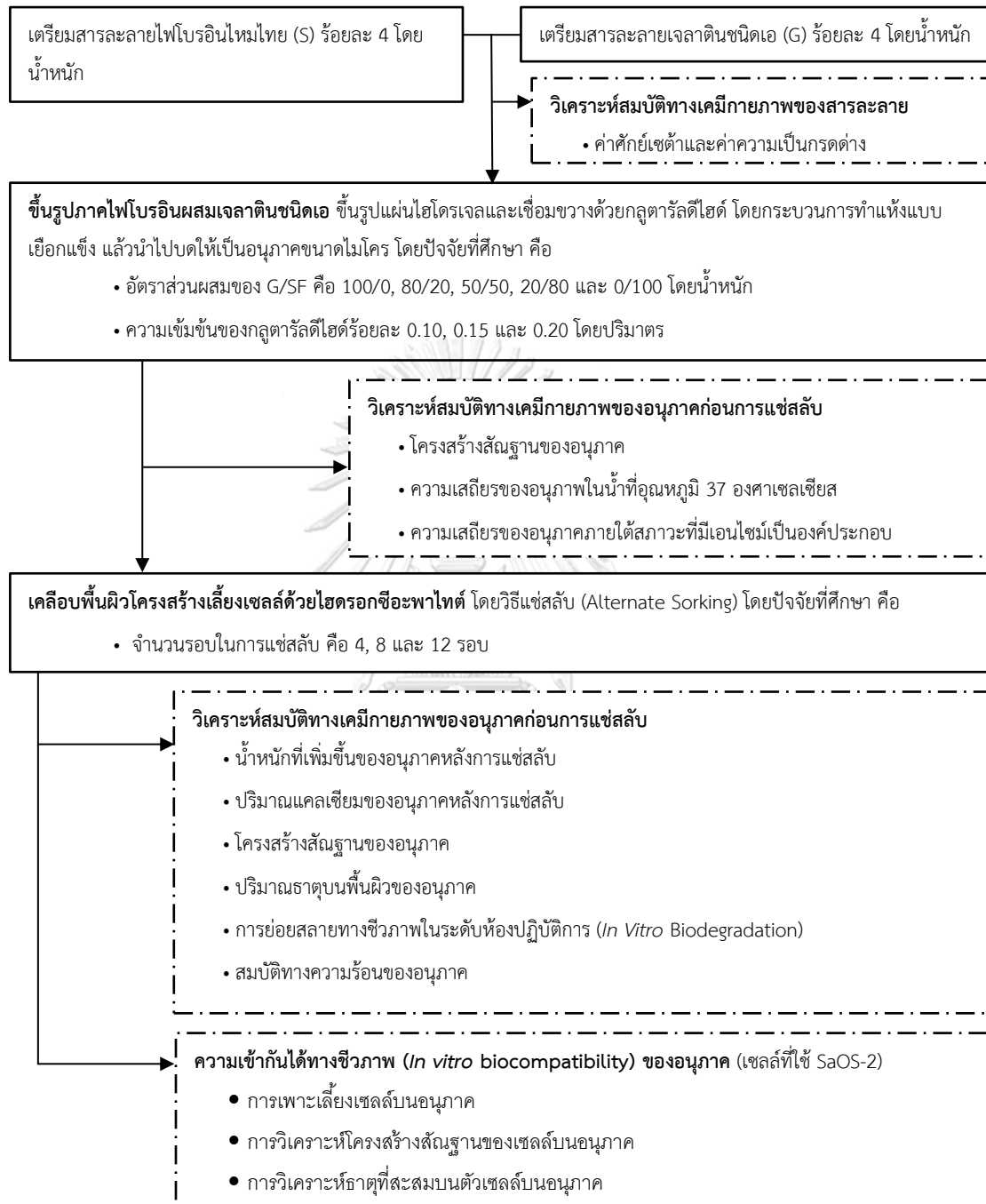
3.2.14 ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส (Haier, จีน)

3.2.15 ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (New Brunswick scientific, สหรัฐอเมริกา)

- 3.2.16 เครื่อง Microplate Reader (FLUOstar, Omega, BGM LABTECH, เยอรมัน)
- 3.2.17 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิชัน (Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM, JSM-7610F, ญี่ปุ่น)
- 3.2.18 เครื่อง Zetasizer NanoZS nanoseries (Malvaern Instrument Ltd., อังกฤษ)
- 3.2.19 ตู้ปมเชื้อในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> Incubator, Galaxy 170R, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.20 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar Flow, Cabinet, ScanLaf, Mars 1800, เดนมาร์ก)
- 3.2.21 24-well polystyrene tissue culture plates (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.22 96-well polystyrene tissue culture plates (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.23 10 cm Tissue culture dish (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.24 Cryovial 1.8 ml (SPL Life Sciences, เกาหลี)



### 3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การเตรียมสารละลายตั้งต้น

##### 3.4.1.1 การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ

การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอควรเตรียมแล้วใช้งานทันทีหรืออุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสก่อนการใช้งาน เนื่องจากเจลาตินมีคุณสมบัติสามารถผันกลับได้ด้วยความร้อน ดังนั้น หากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สารละลายจะกลายเป็นเจลได้ การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำได้โดยนำเจลาตินน้ำหนัก 4 กรัม แช่ในน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water; DI) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินเกิดการพองตัวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปั่นกวนให้เจลาตินละลายน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

##### 3.4.1.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ1 ควรเตรียมแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นและใช้งานภายใน 1 เดือน วิธีการเตรียมไฟโบรอินไหมไทยดัดแปลงมาจากวิธีของ Kim U.J. และคณะ (2005) และ Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) สามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

##### การกำจัดกาวไหม

ไหมประกอบด้วยไฟโบรอินร้อยละ 72-81 โดยน้ำหนัก และกาวไหมซึ่งประกอบด้วยเซรีซินร้อยละ 19-28 โดยน้ำหนัก ไชมันและแวกซ์ร้อยละ 0.8-1.0 โดยน้ำหนัก สารสีและปริมาณเถ้าร้อยละ 1.0-1.4 โดยน้ำหนัก (Yong-woo Lee, 1996) ดังนั้นการเตรียมสารละลายไฟโบรอินจึงต้องกำจัดกาวไหมซึ่งทำหน้าที่เคลือบเส้นใยไฟโบรอินและยึดเส้นใยให้ติดกัน วิธีการกำจัดกาวไหมออกทำได้โดยทำความสะอาดรังไหมเบื้องต้นด้วยการดึงปุ๋ยไหมส่วนเกิน ตัวดักแด่ และสิ่งสกปรกต่างๆ ที่ปะปนมาที่รังไหมออก แล้วนำรังไหมที่สะอาด 40 กรัม ไปต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างรังไหมที่ต้มแล้วด้วยน้ำปราศจากไอออน 4-5 ครั้ง จนกระทั่งน้ำที่ล้างออกมาใสไม่มีสี จากนั้นต้มรังไหมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตซ้ำอีก 1 ครั้ง และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 4-5 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่ากำจัดเซรีซินและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ตกค้างอยู่ออกจนหมด ผึ่งรังไหมให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน คำนวณหาปริมาณเซรีซินที่ถูกกำจัดออกไปโดยชั่งน้ำหนักเส้นใยไหมที่ได้เปรียบเทียบกับน้ำหนักรังไหมเริ่มต้น

### การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินสามารถเตรียมได้โดยฉีกเส้นใยไหมที่กำลังเจียรขึ้นให้ฟู เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเส้นใยไหมกับสารละลายให้มากขึ้น จากนั้นชั่งน้ำหนักเส้นใยไหม 4 กรัม แล้วค่อย ๆ หยดสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ปริมาตร 16 มิลลิลิตร (อัตราส่วนไหมต่อสารละลายลิเทียมโบรไมด์ คือ 1 ต่อ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปบนพื้นผิวของเส้นใยไหมให้ทั่วทุกบริเวณ จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งไหมทั้งหมดละลายเป็นสารละลายสีเหลืองใส นำสารละลายไหมที่ได้มาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออนเพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออกไป โดยใช้ถุงไดอะไลซ์ (Viskase Companies, Inc., ญี่ปุ่น) ที่มี Molecular weight cut-off (MWCO) เท่ากับ 12,000-16,000 ดาลตัน ในชั่วโมงแรกเปลี่ยนน้ำทุก 15 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง (เช้า กลางวัน และเย็น) เป็นเวลา 3-4 วัน จนแน่ใจว่าไม่มีลิเทียมโบรไมด์เหลืออยู่ในสารละลายไหม (ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำที่ใช้ไดอะไลซ์เท่ากับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำปราศจากไอออน) แล้วนำสารละลายที่ได้มาไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ออกจากสารละลาย คำนวณความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน โดยนำไปอบให้แห้งเพื่อหาน้ำหนักของไฟโบรอิน แล้วปรับความเข้มข้นของสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บสารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2 การขึ้นรูปอนุภาคไฟโบรอินไหมไทย-เจลาติน

วิธีการขึ้นรูปอนุภาคสามมิติในงานวิจัยนี้เริ่มต้นจากการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลผ่านการเชื่อมขวาง ซึ่งดัดแปลงมาจาก Lerdchai, K. และคณะ (2016) โดยนำสารละลายเจลาตินร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายไฟโบรอินร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมเข้าด้วยกัน ด้วยอัตราส่วนไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาติน (S/G) 100/0, 80/20, 50/50, 20/80 และ 0/100 โดยน้ำหนัก ปั่นกวนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที จนกระทั่งได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นการเชื่อมขวางด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์ โดยเติมสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตรลงไปในสารละลายผสม และปั่นกวนตลอดเวลาในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที หมู่แอลดีไฮด์ของกลูตาร์ลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนปฐมภูมิ (primary amine) ในสายพอลิเพปไทด์ของโปรตีน หลังจากนั้นเทสารละลายผสมลงในภาตพลาสติกเคลือบเพฟลอนรูปสี่เหลี่ยม แล้วนำแผ่นไฮโดรเจลที่ได้ไปแช่ในตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วกำจัดกลูตาร์ลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่ออกโดยแช่ใน

สารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง 30 นาที และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำแผ่นไฮโดรเจลไปแช่ในตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วอบแผ่นฟองน้ำด้วยเครื่องปั่นโอบขนาดเล็ก (HR2117, Philips) แยกขนาดอนุภาคโดยใช้ตะแกรงคัดแยกขนาดเมช (Mesh) 35, 18 และ 10 ซึ่งมีขนาดช่อง 500, 1000 และ 2000 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยนำเฉพาะอนุภาคที่มีขนาด 1000-2000 ไมโครเมตรไปทำการทดลองขั้นต่อไป

### 3.4.3 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคไฟโบรอินไหมไทย-เจลาตินด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยวิธีแช่สลับ

วิธีการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคไฟโบรอินไหมไทย-เจลาตินด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยวิธีแช่สลับซึ่งดัดแปลงมาจาก Tachaboonyakiat W. และคณะ (2001) และ Tungtasana H. และคณะ (2010) โดยนำอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) ความเข้มข้น 0.20 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 15 วินาที ก่อนนำไปแช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ความเข้มข้น 0.12 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำแช่ในน้ำปราศจากไอออนอีกครั้งเป็นเวลา 15 วินาที การแช่สลับทั้งหมดนี้นับเป็น 1 รอบ ทำการแช่สลับซ้ำ 4, 8 และ 12 รอบ จากนั้นทิ้งอนุภาคไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำอนุภาคที่ทำกรแช่สลับแล้วไปทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบแก๊สเอธิลีนออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับทำการทดลองขั้นต่อไป

### 3.4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ

#### • สารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ

ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาตินชนิดเอ และสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ

ค่าศักย์เซต้า คือ ค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวของอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าของสารละลาย โดยสามารถวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zetasizer NanoZS nanoseries (Malvern Instrument Ltd., อังกฤษ) เพื่อหาค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาตินชนิดเอ สารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.02 โดยปริมาตร (Lerdchai, Kitsongsermthon et al. 2016)



## • อนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ

### ก. โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาค

การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ได้จากการบดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิชชัน (Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM, JSM-7610F, ญี่ปุ่น) ทำได้โดยนำตัวอย่างไปติดบนแท่นเตรียมตัวอย่าง (Stub) แล้วนำไปเคลือบแพลทินัมเพื่อให้อนุภาคเกิดการนำไฟฟ้า ส่องกล้องที่กำลังขยายต่าง 35, 150 และ 1000 เท่า เพื่อดูรูปร่าง ลักษณะภายนอกและพื้นผิวของอนุภาค

### ข. ร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์

ความคงตัวของอนุภาคในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสามารถบ่งชี้ถึงความสำเร็จของการเชื่อมขวางของอนุภาคได้โดยทำการวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางเปรียบเทียบกับอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตร โดยนำอนุภาค 5 มิลลิกรัม แช่ในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดน้ำออกและทำให้แห้งด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักอนุภาคที่เหลือเพื่อคำนวณหาร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคดังสมการ

$$\text{ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือในน้ำ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

โดยที่  $W_i$  คือ น้ำหนักแห้งของอนุภาคก่อนการแช่น้ำ (กรัม)

$W_f$  คือ น้ำหนักแห้งของอนุภาคหลังการแช่น้ำ (กรัม)

### ค. ร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางของอนุภาค เพื่อหาสภาวะในการเชื่อมขวางที่เหมาะสมที่สุดเพียงสภาวะเดียวสำหรับนำอนุภาคไปทดสอบขั้นต่อไป โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ได้แก่ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตรต่อความเสถียรของอนุภาคในสภาวะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ โดยนำอนุภาค 5 มิลลิกรัม แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate-buffer saline; PBS) pH 7.4 ที่มีเอนไซม์โปรตีเอสชนิด XIV (Protease type XIV) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมเอไซด์ ( $\text{NaN}_3$ ) 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง จากนั้นทำให้แห้งด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาค

## • อนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอหลังการเคลือบผิว

### ก. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการแช่สลับ

ภายหลังแช่สลับอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 4, 8 และ 12 รอบ สามารถวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการแช่สลับ และปริมาณของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นได้ (Taguchi, Kishida et al. 1999) ดังแสดงในสมการ

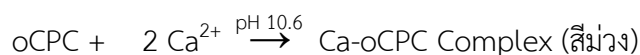
$$\text{ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการแช่สลับ} = \frac{W_2 - W_1}{W_2} \times 100$$

โดยที่  $W_1$  คือ น้ำหนักแห้งของอนุภาคก่อนการแช่สลับ (กรัม)

$W_2$  คือ น้ำหนักแห้งของอนุภาคหลังการแช่สลับ (กรัม)

### ข. ปริมาณแคลเซียมของอนุภาคหลังการแช่สลับ

ปริมาณแคลเซียมของอนุภาคหลังการแช่สลับสามารถวัดได้โดย นำอนุภาค 5 มิลลิกรัม แช่ลงในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 18.5% โดยปริมาตรลงไป แล้วให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินเอละลายจนหมดอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดปริมาณแคลเซียมด้วยวิธี Calcium assay (Paull, Macka et al. 1997) โดยนำสารละลายที่ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์เอทานอลามีน (Ethanalamine) ความเข้มข้น 0.88 โมลาร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 11 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายออร์โธ-ครีซอลฟทาเลอิน (O-cresolphthalein complexon; oCPC) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตูตสารละลายผสม 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม เพื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่สภาวะเป็นเบสสารออร์โธ-ครีซอลฟทาเลอินจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออนเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีม่วงดังแสดงในสมการ



### ค. โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาค

การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ดัดแปรพื้นที่ผิวด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ ทำได้โดยนำตัวอย่างไปติดบนแท่นเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบแพลทินัมเพื่อให้อนุภาคเกิดการนำไฟฟ้า จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิสชัน (FE-SEM, JSM-7610F, ญี่ปุ่น) ที่กำลังขยายต่าง 35, 150 และ 1000 เท่า เพื่อดูรูปร่าง ลักษณะภายนอกและพื้นผิวของอนุภาค สำหรับอนุภาคหลังการแช่สลับบันทึกภาพที่กำลังขยายประมาณ 30000 เท่า เพื่อดูลักษณะของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวของอนุภาค

### ง. ปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาค

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาติน ทำได้โดยนำตัวอย่างไปติดบนแท่นเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบทองเพื่อให้อนุภาคเกิดการนำไฟฟ้า จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิชชัน (Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM, JSM-7610F, ญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า และใช้เทคนิค Energy dispersive X-ray (EDX) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุเชิงปริมาณบนพื้นผิวของอนุภาค โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 จุด

### จ. การย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* Biodegradation)

การย่อยสลายเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของชีววัสดุที่ย่อยสลายได้เองทางธรรมชาติ การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของอนุภาคไมโครที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ทำได้โดยซังอนุภาคไมโครหกลดละ 5 มิลลิกรัม (จำนวน 4 หลอด สำหรับการทดลอง 1 ซ้ำ) แชนในเอนไซม์โปรตีเอสชนิด XIV (Protease type XIV) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่มี pH 7.4 และสารละลายโซเดียมเอไซด์ ( $\text{NaN}_3$ ) 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน เก็บผลน้ำหนักรวมของอนุภาคไมโครที่เหลืออยู่เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน โดยล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง แล้วอบให้แห้ง จากนั้นคำนวณร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาค (Kim, Park et al. 2005)

### ฉ. สมบัติทางความร้อนของอนุภาค

เทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) เป็นเทคนิคที่ใช้การวัดน้ำหนักของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับความร้อนในแต่ละช่วงอุณหภูมิ โดยใช้เครื่องชั่งที่มีความไวสูง ในงานวิจัยนี้ศึกษาสมบัติทางความร้อนของอนุภาค เพื่อศึกษาอุณหภูมิในการย่อยสลายของอนุภาค และนำมาวิเคราะห์อัตราส่วนของสารอินทรีย์ต่อสารอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในอนุภาค โดยใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมเพื่อทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 35 ถึง 900 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราให้ความร้อน 20 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้สภาวะไนโตรเจน

### 3.4.5 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (*In vitro* biocompatibility) ของอนุภาค

ในงานวิจัยนี้ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคไฟโบรอินและเจลาตินไหมไทย ก่อนและหลังการแช่สลับ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระดูกออสติโอซาร์โคมา

(Human osteogenic sarcoma cell line, Saos-2) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก อ. ดร. สุพรรณษา ยอดเมือง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.4.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาค

เซลล์ SaOS-2 ถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนอนุภาคโฟโบรินและเจลาตินก่อนและหลังการแช่สลับที่ฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ โดยเตรียมสารละลายเซลล์เข้มข้น (Concentrated cell suspension) ความเข้มข้น 3000 เซลล์/ 100 ไมโครลิตร/ 5 มิลลิกรัมอนุภาคสำหรับทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ (Kübler, Neugebauer et al. 2004) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนอนุภาคใช้วิธี agitation seeding ซึ่งทำได้โดยปิเปตสารละลายเซลล์เข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอนุภาค จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine และ 1% penicillin-streptomycin ลงไปอีก 200 ไมโครลิตร เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์ท่วมอนุภาคเล็กน้อย แล้วเขย่าที่ความเร็ว 60 รอบต่อนาที ในตู้เพาะเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีการรักษาระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เซลล์ยึดเกาะบนอนุภาค จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มอีก 0.7 มิลลิตร แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน

### 3.4.5.2 การเตรียมสารละลายเซลล์มาตรฐาน

ในงานวิจัยนี้วัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA Assay สำหรับการเตรียมเซลล์มาตรฐานทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 ใน 24 well plate (พื้นที่ 1.9 เซนติเมตร<sup>2</sup>/หลุม) โดยทำการเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้นระหว่าง  $2.0 \times 10^5$  ถึง 3125 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine และ 1% penicillin-streptomycin ปริมาตร 1 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

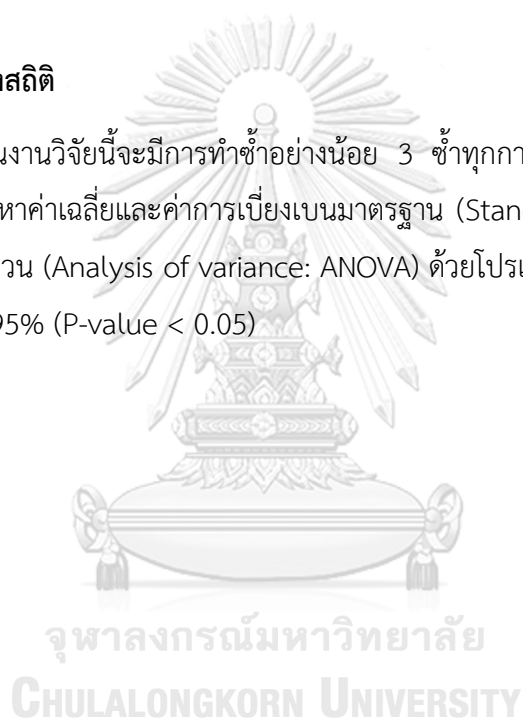
### 3.4.5.3 การวิเคราะห์จำนวนเซลล์

เมื่อครบเวลาเพาะเลี้ยงตามที่กำหนด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิตร เพื่อกำจัดเซลล์ที่ตายออก เตรียมสารละลาย Cell lysate ของเซลล์บนอนุภาค และเซลล์มาตรฐาน โดยเติมสารละลาย SDS (sodium dodecyl sulfate) lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิตร (ซึ่งเตรียมได้จาก SDS น้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ในสารละลาย SSC 20X ปริมาตร 1 มิลลิตร และน้ำปราศจากไอออน 19 มิลลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผนังเซลล์แตก จากนั้นใช้วิธีแช่แข็ง-ละลาย (Freeze-thaw) ตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้ผนังเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์เนื่องจากเซลล์บวมและแตกจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในและภายนอกเซลล์

สำหรับการวัดปริมาณ DNA ปิเปตสารละลาย Cell lysate ของเซลล์บนอนุภาค และเซลล์มาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในถาดดำ (Black plate) 96 หลุม เติมสารละลาย Hoechst 33258 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ซึ่งเตรียมได้จากผสม Hoechst 33258 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 19 มิลลิลิตร และสารละลาย SSC 20X ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) โดยใช้ปิเปตแบบหลายช่อง (Multichannel pipette) ในที่มืด เพื่อควบคุมเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา แล้ววัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent Intensity) ทันทีด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร (Excitation) และ 460 นาโนเมตร (Emission)

### 3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองในงานวิจัยนี้จะมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำทุกการทดลอง ( $n=3$ ) แล้วนำข้อมูลเชิงปริมาณทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P\text{-value} < 0.05$ )



## บทที่ 4

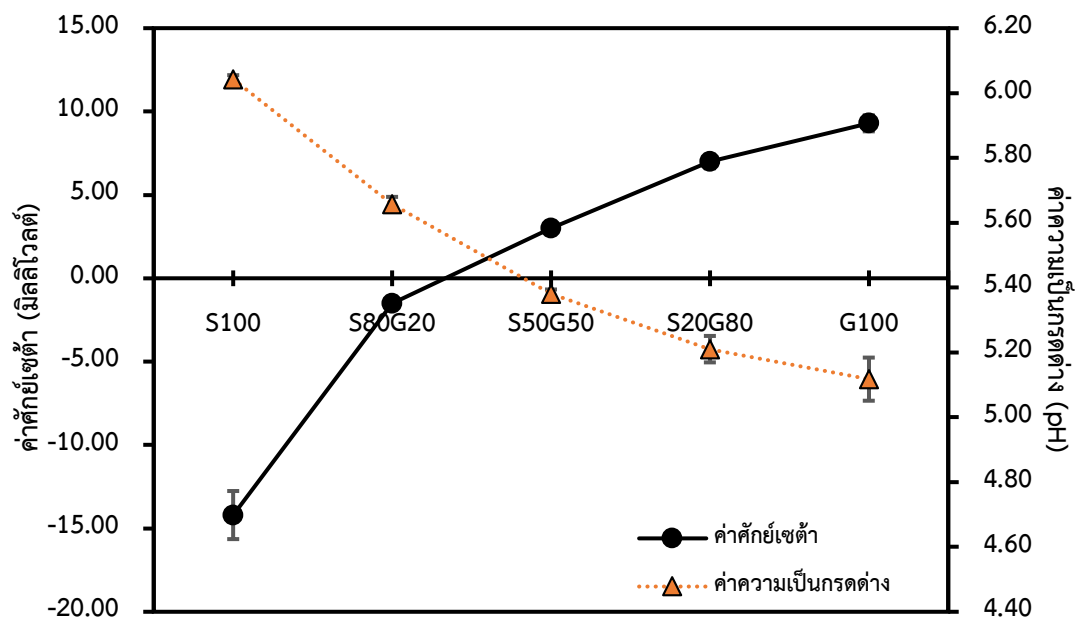
### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการขึ้นรูปอนุภาคสามมิติจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ โดยมุ่งเน้นกระบวนการขึ้นรูปแบบ Top-down ซึ่งเริ่มจากการขึ้นรูปแผ่นฟองน้ำจากสารละลายผสมไฟโบรอินและเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นบดแผ่นฟองน้ำให้เป็นอนุภาค แล้วนำไปเคลือบพื้นผิวด้วยแคลเซียมฟอสเฟตด้วยการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยศึกษารายละเอียดดังหัวข้อต่อไปนี้

#### 4.1 คุณสมบัติของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

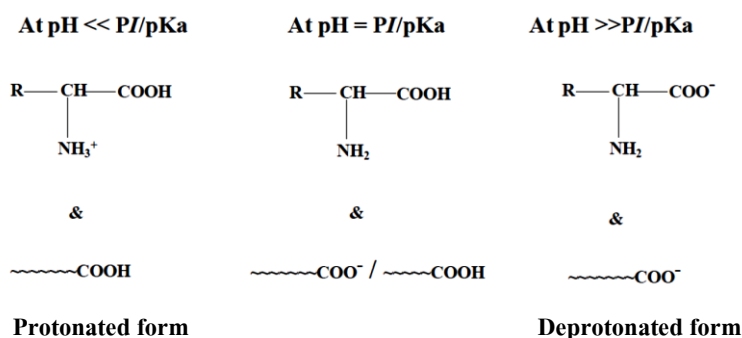
##### 4.1.1 ค่าศักย์ゼต้าและค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายผสมไฟโบรอินและเจลาติน

ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายเป็นค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวของอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าของสารละลาย การศึกษาศักย์ゼต้าทำให้ทราบถึงคุณสมบัติทางประจุไฟฟ้าของสารละลาย ผลการศึกษาค่าศักย์ゼต้าพบว่าสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (S100) และสารละลายเจลาติน (G100) มีค่าศักย์ゼต้าเท่ากับ  $-14.20 \pm 1.44$  และ  $+9.29 \pm 0.48$  มิลลิโวลต์ตามลำดับ ส่วนสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินที่อัตราส่วน 80/20 (S80G20), 50/50 (S50G50) และ 20/80 (S20G80) พบว่าเมื่อมีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมากขึ้น สารละลายผสมจะมีค่าความเป็นกรดต่างลดลงและมีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกมากขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย S80G20, S50G50 และ S20G80 มีค่าเท่ากับ 5.66, 5.38 และ 5.21 ตามลำดับ และค่าศักย์ゼต้าของสารละลายผสมมีค่าเท่ากับ  $-1.52 \pm 0.16$ ,  $+3.01 \pm 0.23$  และ  $+7.00 \pm 0.23$  มิลลิโวลต์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) และ Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) ซึ่งรายงานผลว่าสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่มีสัดส่วนต่างกันจะแสดงค่าศักย์ゼต้าที่เป็นบวกลดลง เมื่อมีสารละลายผสมมีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบมากขึ้น



รูปที่ 4.1 ค่าศักย์เซต้าและค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเคความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ร้อยละ 0.02 โดยปริมาตร

ไฟโบรอินและเจลาตินเป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนมากต่อกันเป็นสายพอลิเพปไทด์ การเปลี่ยนแปลงค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมไฟโบรอินและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมต่าง ๆ จึงขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสายพอลิเพปไทด์ อิทธิพลของประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิล ( $-\text{COOH}$ ) และหมู่ไฮดรอกซิล ( $-\text{OH}$ ) และอิทธิพลของประจุบวกจากหมู่อะมิโน ( $-\text{NH}_2$ ) ของกรดอะมิโนส่งผลต่อความสมดุลประจุ (Charge balance) ของสารละลาย หมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์จัดเป็นกรดอ่อนซึ่งมีความสามารถในการแตกตัวให้โปรตอนได้ ในขณะที่หมู่อะมิโนเป็นเบสอ่อนซึ่งมีความสามารถในการรับโปรตอน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งนอกจากจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนแล้ว ค่าศักย์เซต้าจะมีค่าเป็นบวกหรือลบยังขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย สารละลายไฟโบรอิน (S100) มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.04 ซึ่งมากกว่าค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point;  $p_i$ ) ของไฟโบรอินซึ่งมีค่าประมาณ 4-5 (Shen, Hu et al. 2015) สารละลายไฟโบรอินแสดงประจุเป็นลบ ในขณะที่สารละลายเจลาติน (G100) มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.12 น้อยกว่าค่าไอโซอิเล็กทริกของเจลาตินซึ่งมีค่าประมาณ 9 ทำให้สารละลายเจลาตินแสดงประจุบวก (K and Bandyopadhyay 2012)



**รูปที่ 4.2** การจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแบบเสียโปรตอนและแบบรับโปรตอนของกรดอะมิโนของโปรตีน ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดต่าง ๆ กัน (K and Bandyopadhyay 2012)

#### 4.2 คุณสมบัติของอนุภาคจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

ในงานวิจัยนี้ขึ้นรูปอนุภาคมาจากการบดแผ่นไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ดังนั้นในหัวข้อนี้จึงทำการศึกษาคงสมบัติของอนุภาคโปรตีนที่ขึ้นรูปได้ โดยเริ่มจากการศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจล ในหัวข้อ 4.2.1 จากนั้นศึกษาการกระจายตัวของอนุภาคที่ได้จากการบด และศึกษาโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคในหัวข้อที่ 4.2.2 และ 4.2.3 ตามลำดับ

##### 4.2.1 ผลของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง

ไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ดังนั้นเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงมีการดัดแปลงคุณสมบัติด้วยการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้เชื่อมขวางในการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจล 3 ความเข้มข้น คือ 0.10, 0.15 และ 0.20 % โดยปริมาตร และทำการศึกษาผลของการเชื่อมขวาง โดยการวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคหลังแช่ในสารละลายที่ไม่มีเอนไซม์และมีเอนไซม์

##### 4.2.1.1 ร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์

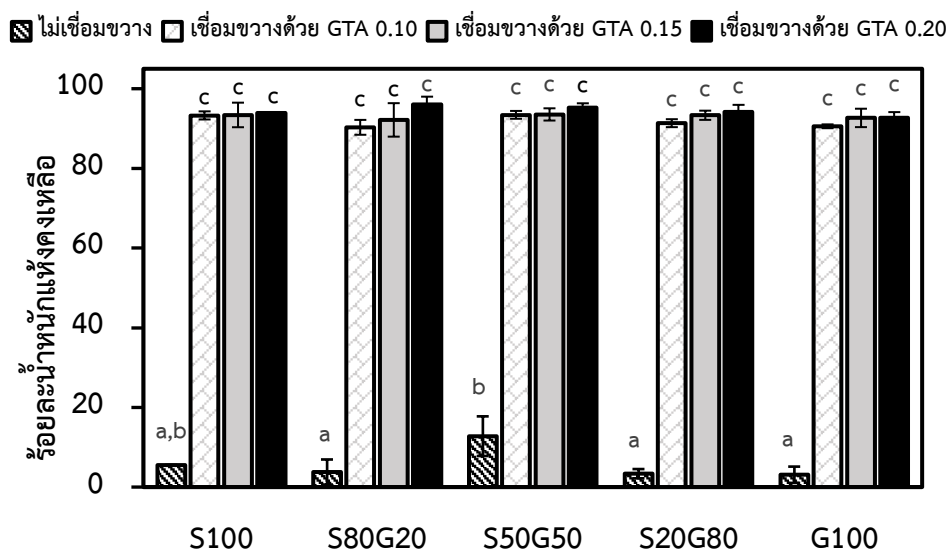
ในหัวข้อนี้ศึกษาความสำเร็จในการเชื่อมขวาง โดยการทดสอบความต้านทานการละลายน้ำของอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางเปรียบเทียบกับอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางของอนุภาคชนิด S100, S80GA20, S50GA50, S20GA80 และ G100 มีค่าเท่ากับร้อยละ  $5.51 \pm 0.05$ ,  $3.78 \pm 3.14$ ,  $12.77 \pm 4.98$ ,  $3.36 \pm 1.16$  และ  $3.09 \pm 2.05$  ตามลำดับ อนุภาคที่ยังไม่ผ่านการเชื่อมขวางมีความสามารถในการคงรูปในน้ำค่อนข้างต่ำ เนื่องจากไฟโบรอินและเจลาตินที่เป็นองค์ประกอบในอนุภาคสามารถละลาย



น้ำได้ โดยพบว่าอนุภาคที่ไม่เชื่อมขวางจะมีความสามารถในการคงตัวในน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อมีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบมากขึ้น ยกเว้น S50G50 ซึ่งมีน้ำหนักคงเหลือมากที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ S80G20, S20G80 และ G100 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ S100 สอดคล้องกับรายงานของ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ซึ่งพบว่าสารละลายไฟโบรอินและเจลาตินอัตราส่วน 50/50 มีค่าศักย์เซต้าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงถึงการเกิดสมดุลระหว่างประจุบวกและลบในสารละลาย ซึ่งที่สภาวะนี้เป็นสภาวะที่เกิดอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิตย์ (Electrostatic interaction) ระหว่างประจุที่ตรงข้ามกันมากที่สุด ส่งผลให้แผ่นไฮโดรเจลมีความสามารถในการคงตัวในน้ำได้มากขึ้น

เมื่อพิจารณาน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน แต่มีอัตราส่วน S/G ต่างกัน (S100, S80G20, S50G50, S20G80 และ G100) พบว่าอนุภาคทุกชนิดมีน้ำหนักคงเหลืออยู่ในช่วงร้อยละ 90-96 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคที่มีอัตราส่วนผสมไฟโบรอินต่อเจลาตินเท่ากัน แต่ใช้ความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวางต่างกัน (0.10, 0.15 และ 0.20% โดยปริมาตร) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นในการเชื่อมขวางเพิ่มมากขึ้น น้ำหนักคงเหลือของอนุภาคจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางและอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางมีน้ำหนักคงเหลืออยู่ในช่วงร้อยละ 3-12 ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางซึ่งมีน้ำหนักคงเหลือมากกว่าร้อยละ 90 ทุกความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยกลูตารัลดีไฮด์ประสบความสำเร็จ การเชื่อมขวางสามารถช่วยดัดแปลงคุณสมบัติในการต้านทานน้ำของอนุภาคไฟโบรอินและเจลาตินให้เพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น 7-30 เท่าเมื่อเทียบกับอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ทั้งนี้ความสามารถในการคงตัวในน้ำของอนุภาคที่เพิ่มขึ้นเป็นการยืนยันความสำเร็จในการเชื่อมขวางเพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ต่อประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมดังแสดงในหัวข้อที่ 4.2.1.2



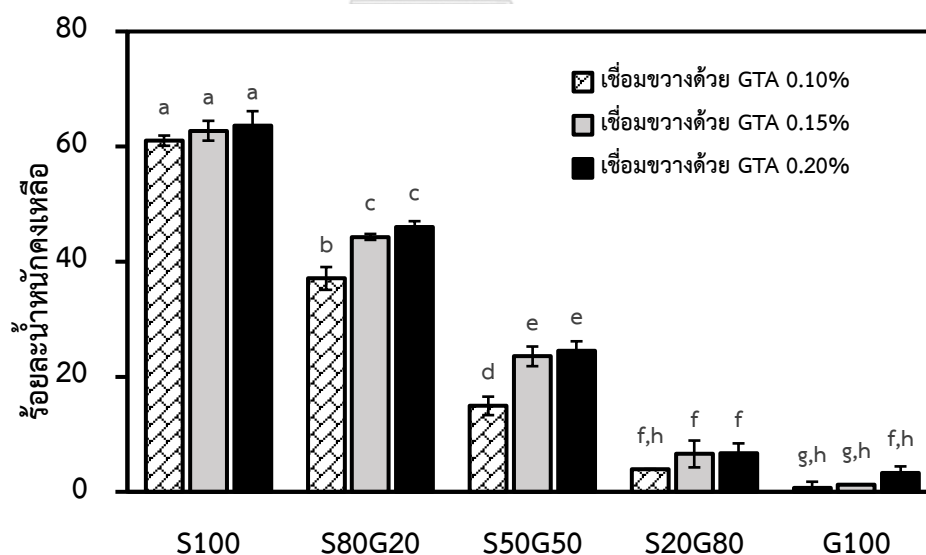
รูปที่ 4.3 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังก่อนนำอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (GTA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตร แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a-c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

#### 4.2.1.2 ร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคภายใต้สถานะที่มีเอนไซม์

ในหัวข้อนี้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อประสิทธิภาพในการเชื่อมขวาง โดยนำอนุภาคมาแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูความคงตัวของอนุภาคในสถานะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบดังแสดงในรูปที่ 4.4 เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์พบว่าอนุภาคที่มีอัตราส่วนไฟโบรอินใหม่ไทยต่อเจลาตินเท่ากัน น้ำหนักคงเหลือของอนุภาคจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นในการเชื่อมขวางมากขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในอนุภาค S100 และ G100 ในขณะที่อนุภาค S80G20, S50G50 และ S20G80 มีร้อยละน้ำหนักคงเหลือเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์จากร้อยละ 0.1 และ 0.15 โดยปริมาตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์เป็น 0.2 โดยปริมาตร พบว่าร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Sheu M.T. และคณะ (2001) ซึ่งทำการศึกษาสารละลายและโครงสร้างเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.01-0.20 ต่อคุณสมบัติเชิงกลและความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน พบว่าความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.12 มีร้อยละการเชื่อมขวาง  $96.13 \pm 1.74$  เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ

กลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 0.15 และ 0.20 พบว่ามีร้อยละการเชื่อมขวาง  $102.42 \pm 3.00$  และ  $105.61 \pm 2.02$  ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.12 จึงเพียงพอและเหมาะสมในการเชื่อมขวางโครงสร้างเส้นใยเซลล์คอลลาเจนและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และ ถนอม วงศ์พุทธรักษา (2554) ซึ่งศึกษาการผลิตโครงสร้างเส้นใยเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรต์ และเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตร พบว่าปริมาณกรดอะมิโนในเจลาตินที่สามารถเกิดการเชื่อมขวางได้มีประมาณร้อยละ 12 ดังนั้นความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.15 โดยปริมาตรเพียงพอต่อการเชื่อมขวางเจลาตินแล้ว เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์จึงไม่สามารถเชื่อมขวางเจลาตินได้มากขึ้น

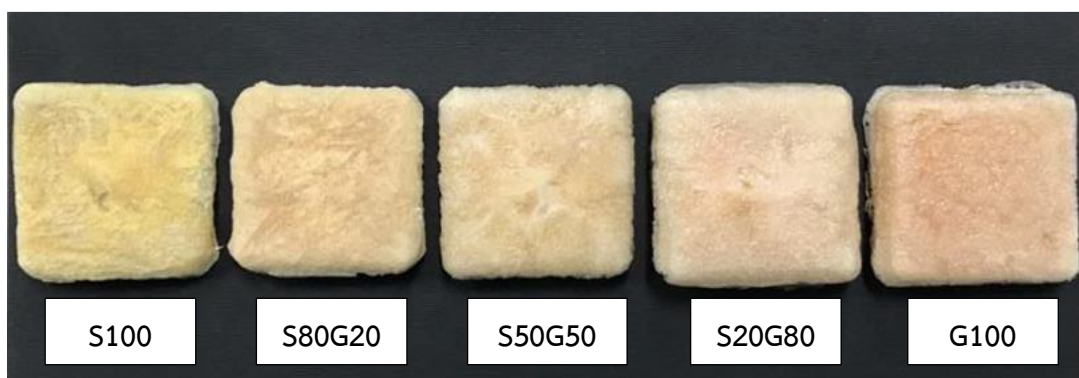
หลังการแช่อนุภาคในสภาวะเอนไซม์เป็นเวลา 1 วัน พบว่าอนุภาค S100, S80G20, S50G50, S20G80 และ G100 มีน้ำหนักคงเหลือร้อยละ 61-63, 37-46, 14-24, 3-6 และ 0.6-3 โดยน้ำหนักตามลำดับ ดังนั้นเพื่อลดความเป็นพิษของกลูตารัลดีไฮด์ให้น้อยที่สุด โดยที่อนุภาคยังคงมีคุณสมบัติที่เหมาะสม ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร ซึ่งมีความคงตัวในสภาวะที่มีเอนไซม์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.20 โดยปริมาตร และเลือกใช้เฉพาะอนุภาค S100, S80G20 และ S50G50 ซึ่งมีความสามารถในการคงตัวในสภาวะที่มีเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก สำหรับการขึ้นรูปอนุภาคไฟโบรอินผสมไหมไทยสำหรับศึกษาในหัวข้อ 4.3 และ 4.4



**รูปที่ 4.4** ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังจากอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยปริมาตร แช่ในเอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a-h แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

#### 4.2.2 ลักษณะของแผ่นฟองน้ำและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคหลังการบด

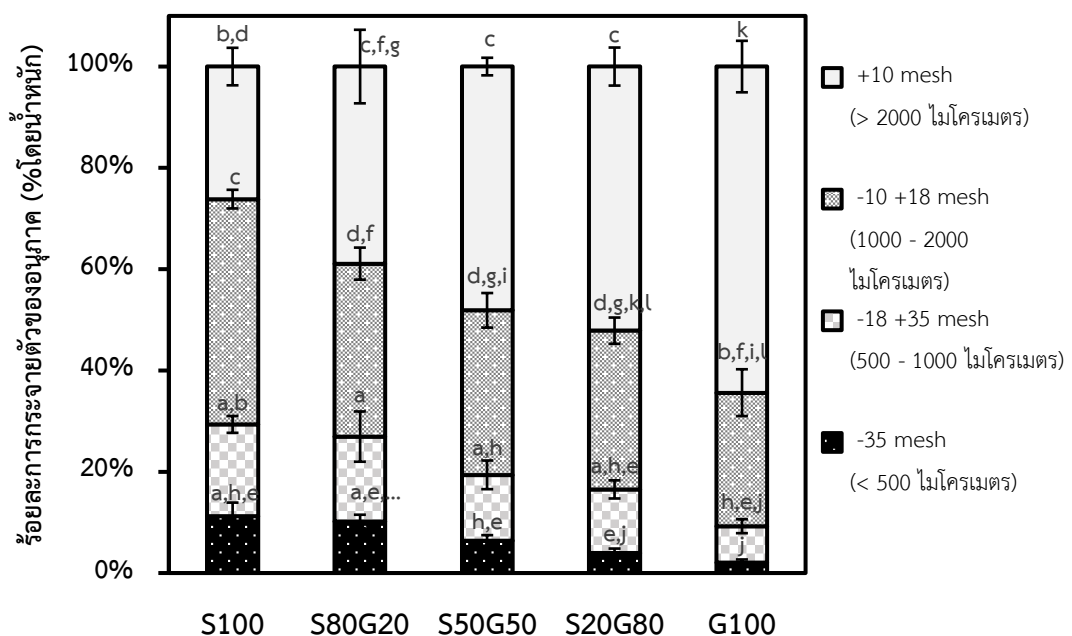
หลังจากที่ขึ้นรูปแผ่นฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์แล้ว กลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินจะถูกกำจัดออกโดยใช้ไกลซีน แล้วนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งอีกครั้ง แผ่นฟองน้ำไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินที่ขึ้นรูปได้มีลักษณะเป็นรูพรุน สีของแผ่นจะมีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล เนื่องจากสีเหลืองของไฟโบรอินและสีน้ำตาลของกลูตารัลดีไฮด์ โดยแผ่นฟองน้ำ S100 จะมีสีเหลืองมากที่สุด และแผ่นฟองน้ำ G100 จะมีสีออกโทนน้ำตาลมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.5



**รูปที่ 4.5** ลักษณะภายนอกของแผ่นฟองน้ำไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร

แผ่นฟองน้ำถูกบดด้วยเครื่องปั่นโถบดขนาดเล็ก (HR2117, Philips) ด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาทีจนกลายเป็นอนุภาค การขึ้นรูปโดยการบดด้วยเครื่องปั่นทำให้ได้อนุภาคมีขนาดและรูปร่างแบบสุ่ม อนุภาคที่ได้มีรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อนำอนุภาคไปแยกขนาดโดยใช้ตะแกรงคัดแยกขนาดเมช (Mesh) 35, 18 และ 10 ซึ่งมีขนาดช่อง 500, 1000 และ 2000 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่าอนุภาคมีการกระจายตัวของขนาดดังแสดงในรูปที่ 4.6 อนุภาค S80G20, S50G50, S20G80 และ G100 มีการกระจายตัวของอนุภาคส่วนใหญ่อยู่ในช่วงมากกว่า 2000 ไมโครเมตร ในขณะที่การกระจายตัวส่วนใหญ่ของ S100 อยู่ในช่วง 1000-2000 ไมโครเมตร โดยพบว่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 1000-2000 ไมโครเมตรซึ่งเป็นช่วงที่เลือกนำไปศึกษาต่อในหัวข้อต่อ ๆ ไปไม่มีร้อยละการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเพียง 25-45 โดยน้ำหนักซึ่งค่อนข้างจะน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้เครื่องปั่นอาหารในการบด ทำให้สภาวะที่ใช้ เช่น ความเร็วรอบและเวลาที่ใช้ในการปั่นไม่เพียงพอ จึงควรทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการบดในการทดลองครั้งถัดไป นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อบดแผ่นฟองน้ำที่มีปริมาณเจลาตินเป็นองค์ประกอบมากจะได้อนุภาคขนาดใหญ่ ส่งผลให้การกระจายตัวของอนุภาคที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมากเบี่ยงเบนไปทางอนุภาคขนาด 2000 ไมโครเมตร ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของไฟโบรอินและเจลาติน แผ่นฟองน้ำที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมากจะมีความเหนียว ส่วนแผ่นฟองน้ำที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไหมไฟโบรอินจะมีความเปราะ ทำให้

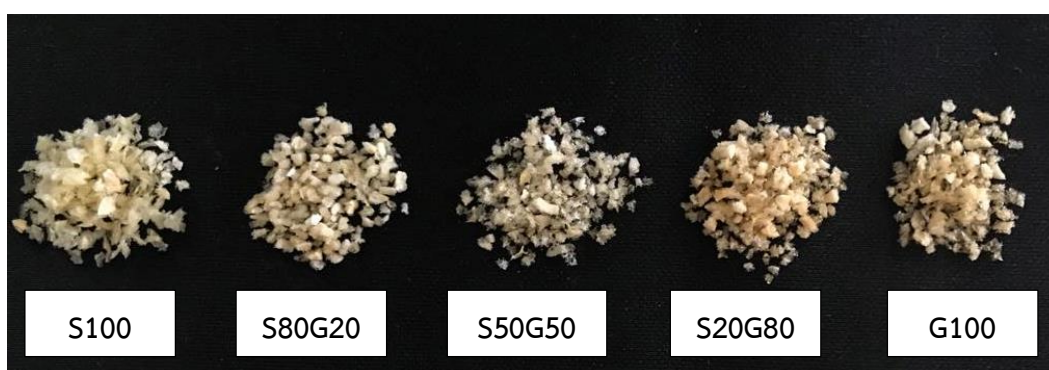
ประสิทธิภาพการบดแผ่นฟองน้ำชนิดต่างๆ ไม่เท่ากัน และส่งผลต่อการกระจายตัวของขนาดอนุภาคจากรายงานของ Xia L. และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการบวมน้ำและคุณสมบัติทางกลของแผ่นเจลเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยใช้เจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 10-40 โดยน้ำหนักและกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5-50 โดยน้ำหนัก พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์จะส่งผลให้ความเหนียว (Toughness) และความยืดหยุ่น (Elasticity) ของเจลาตินลดลง ในขณะที่ความสามารถคงรูป (Stiffness) เพิ่มขึ้น โดยมีค่าพลังงานสำหรับจุดขาด (Energy to break) การยืดตัว ณ จุดขาด (Elongation at Break) ความต้านทานแรงดึง ณ จุดสูงสุด (Peak stress) และมอดูลัส (Modulus) อยู่ในช่วง 2-15 mJ, 11-30%, 140-365 MPax10<sup>2</sup> และ 5-15 MPa ตามลำดับ และจากรายงานของ Yin J. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มความเหนียวของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินซึ่งโดยธรรมชาติมีความอ่อนและเปราะ โดยการ Uniaxial extension ภายใต้สภาวะการบวมน้ำ เพื่อให้เกิดการจัดเรียงตัวของโมเลกุลในสายโซ่ของไฟโบรอินใหม่ ส่งผลให้ความเครียด ณ จุดขาด (Strain at Break) ความต้านทานแรงดึงสูงสุด (Ultimate stress) มอดูลัสของยัง (Young's modulus) และพลังงานสำหรับจุดขาด (Energy to break) ของแผ่นฟิล์มเพิ่มขึ้นจาก 5%, 90 MPa, 2.7 GPa และ 2.1 kJ/kg เป็น 35%, 169 MPa, 3.5 GPa, และ 38.9 kJ/kg ตามลำดับ



**รูปที่ 4.6** การกระจายตัวของขนาดอนุภาคไฟโบรอินใหม่ไทยผสมเจลาตินชนิดเอจากการใช้เครื่องปั่นโอบดขนาดเล็ก (HR2117, Philips) ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เพื่อบดแผ่นฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร (a-k แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

### 4.2.3 โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาค

หลังจากการขึ้นรูปแผ่นฟองน้ำและบดด้วยเครื่องปั่นโอบขนาดเล็กจนกลายเป็นอนุภาค จากนั้นนำไปแยกขนาดโดยใช้ตะแกรงคัดแยก เพื่อนำเฉพาะอนุภาคที่มีขนาด 1000-2000 ไมโครเมตรมาใช้ในการทดลองในหัวข้อนี้และหัวข้อต่อไป พบว่าอนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ด (Granular) ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่สมมาตรหรือเป็นรูปทรงทางเรขาคณิต สีของอนุภาคมีสีเหลือง จนถึงสีน้ำตาลเหมือนสีของแผ่นฟองน้ำแต่มีสีอ่อนกว่าเล็กน้อย อนุภาค S100 จะมีสีเหลืองมากที่สุด และอนุภาค G100 จะมีสีออกโทนน้ำตาลมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ลักษณะภายนอกของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร และมีขนาดอนุภาคในช่วง 1000-2000 ไมโครเมตร

โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไฟโบรอินผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร และมีขนาดอนุภาคในช่วง 1000-2000 ไมโครเมตร ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิสชันที่กำลังขยาย 35, 150 และ 1000 เท่า เพื่อดูรูปร่างลักษณะภายนอกและพื้นผิวของอนุภาค พบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นเม็ดพรุนที่ได้มีรูพรุนต่อกันหมด (Interconnected pores) และผนังของอนุภาคมีลักษณะเรียบ ดังแสดงในรูปที่ 4.8

ชนิดของ

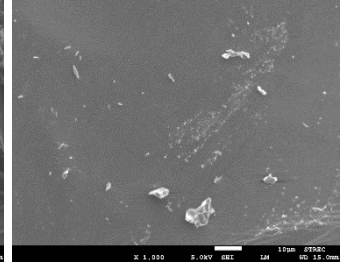
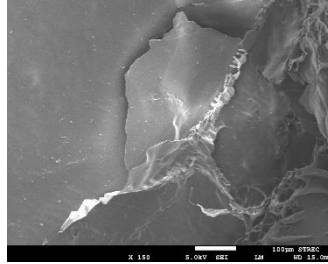
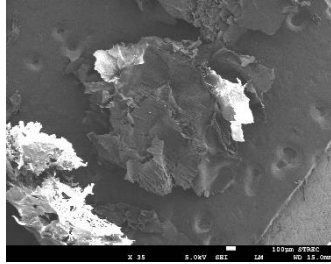
อนุภาค

กำลังขยาย 35 เท่า

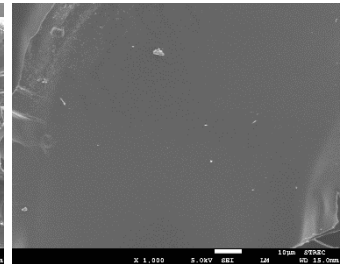
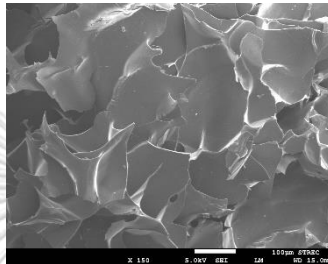
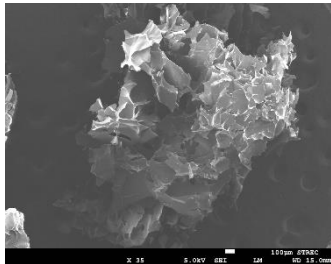
150 เท่า

1000 เท่า

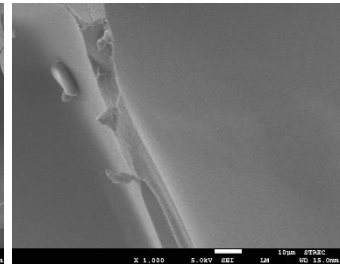
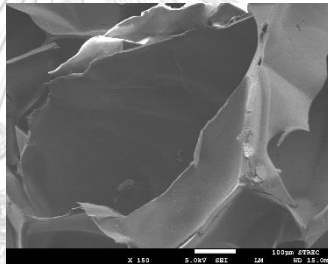
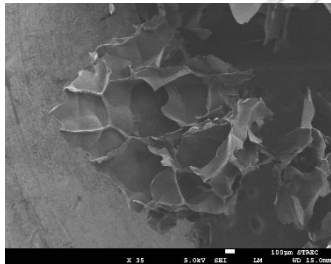
S100



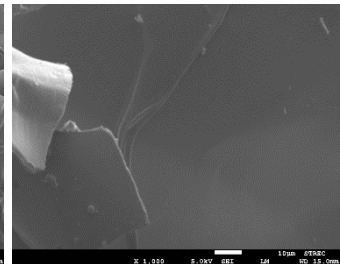
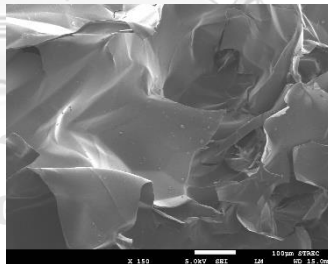
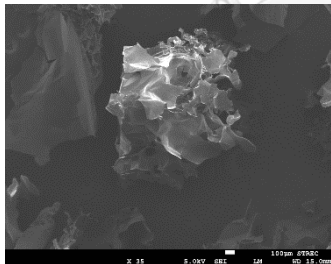
S80G20



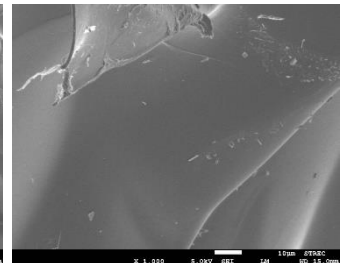
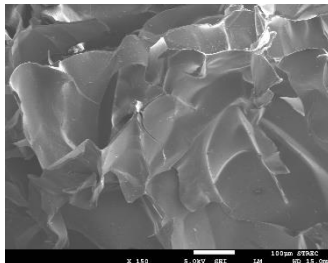
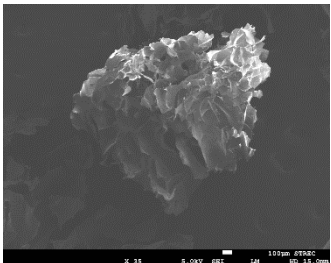
S50G50



S20G80



G100



รูปที่ 4.8 โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 100/0, 80/20, 50/50, 20/80 และ 0/100 โดยถ่ายด้วย FE-SEM ที่กำลังขยาย 35, 150 และ 1000 เท่า ซึ่งมีสเกลบาร์เท่ากับ 100, 100 และ 10 ไมโครเมตรตามลำดับ

#### 4.3 การเคลือบพื้นผิวอนุภาคโปรตีนด้วยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต

กระดูกของมนุษย์มีส่วนประกอบสำคัญเป็นสารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 30 และสารอนินทรีย์ร้อยละ 60 ดังนั้นเพื่อเลียนแบบองค์ประกอบของกระดูกในร่างกาย หลังจากขึ้นรูปอนุภาคโปรตีนซึ่งเป็นสารอินทรีย์ได้แล้ว ในส่วนของการทดลองถัดไปจะทำการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคด้วยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอินทรีย์ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยการแช่สลับอนุภาคที่มีอัตราส่วนไฟโบรอินต่อเจลาตินต่าง ๆ กัน 3 อัตราส่วน คือ 100/0, 80/20 และ 50/50 โดยน้ำหนัก ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.20 โมลต่อลิตร และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.12 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาทีสำหรับแต่ละสารละลาย โดยเมื่อแช่ครบทั้งสองสารละลายนับเป็น 1 รอบ ทำการแช่สลับซ้ำ 4, 8 และ 12 รอบ สามารถสรุปชนิดของอนุภาคและสัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลองหัวข้อนี้ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2

**ตารางที่ 4.2** ชนิดและสัญลักษณ์ของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ใช้ในการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคด้วยแคลเซียมฟอสเฟตโดยวิธีการแช่สลับ

สูตร	สัดส่วนโดยน้ำหนัก		จำนวนรอบในการแช่สลับ
	ไฟโบรอินไหมไทย	เจลาติน	
S100H4C	100	0	4
S80H4C	80	20	4
S50H4C	50	50	4
S100H8C	100	0	8
S80H8C	80	20	8
S50H8C	50	50	8
S100H12C	100	0	12
S80H12C	80	20	12
S50H12C	50	50	12

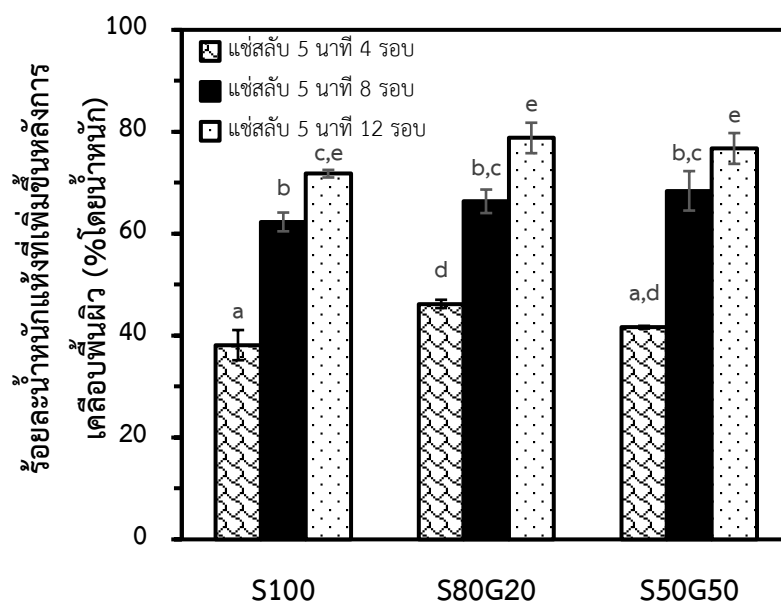
##### 4.3.1 ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังการเคลือบพื้นผิว

ภายหลังจากเคลือบพื้นผิวอนุภาคโปรตีนโดยแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 4, 8 และ 12 รอบ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคหลังกระบวนการแช่สลับเกิดจากการสะสมของผลึกแคลเซียมฟอสเฟตที่พื้นผิวของอนุภาคแสดงในรูปที่ 4.9 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มรอบการเคลือบพื้นผิวอนุภาคจาก 4 รอบ เป็น 8 และ 12 รอบ อนุภาคมีน้ำหนัก



เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากร้อยละ 38-46 โดยน้ำหนัก เป็นร้อยละ 62-68 และ 71-80 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจำนวนรอบในการแช่สลับบีผลต่อการเกิดการสะสมผลึกแคลเซียมฟอสเฟต นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคที่แช่สลั 8 รอบมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น 1.6 เมื่อเทียบกับอนุภาคที่แช่สลั 4 รอบ ในขณะที่อนุภาคที่แช่สลั 12 รอบ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเพียง 1.2 เมื่อเทียบกับอนุภาคที่แช่สลั 8 รอบ

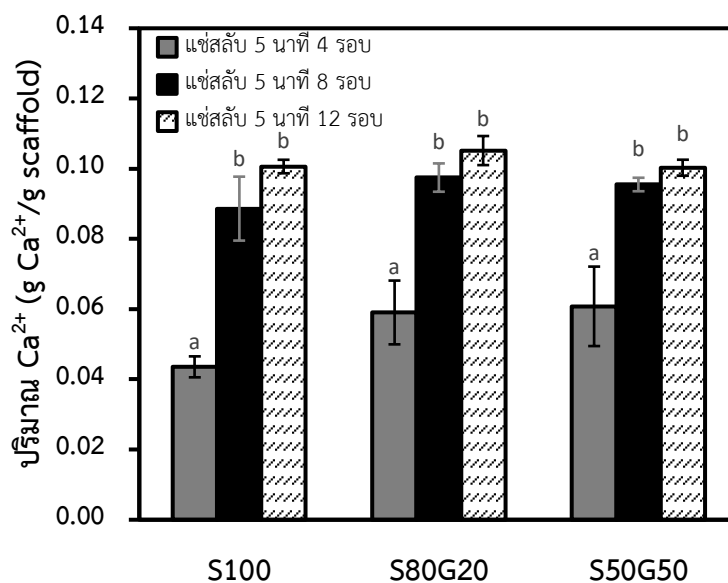
เมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วน S/G ต่อการเกิดผลึกแคลเซียมฟอสเฟตพบว่าอัตราส่วนของโปรตีนมีผลต่อการเคลือบผิวเฉพาะการแช่สลั 4 รอบเท่านั้น สำหรับการแช่สลัมากกว่า 4 รอบพบว่าอนุภาคที่มีจำนวนรอบการแช่สลัเท่ากันแต่มีอัตราส่วน S/G ต่างกันมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกระบวนการเกิดผลึกแคลเซียมฟอสเฟตของวิธีการแช่สลัเกี่ยวข้องกับแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interaction) ระหว่างหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคกับไอออนแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) และไอออนฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ในสารละลาย โดยในขั้นแรกของกระบวนการแช่สลั อนุภาคจะถูกแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แคลเซียมไอออนซึ่งมีประจุบวกจะเกิดอันตรกิริยากับพื้นผิวที่มีประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาค จากนั้นไอออนส่วนเกินออกด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วอนุภาคในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ฟอสเฟตไอออนจะจับตัวกับแคลเซียมไอออนและพื้นผิวที่เป็นบวกของอนุภาค ทำให้เกิดนิวเคลียสผลึกและการโตของผลึกอะพาไทต์ขึ้นบนพื้นผิวของอนุภาค (Taguchi, Kishida et al. 1999) และเมื่อเพิ่มจำนวนการแช่สลัจนผลึกแคลเซียมฟอสเฟตปกคลุมผิวของอนุภาคจนเต็มแล้ว หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของอนุภาคจะถูกบดบังทำให้เกิดอันตรกิริยากับไอออนได้น้อยลง การเกิดผลึกแคลเซียมฟอสเฟตหลังนั้นจึงเป็นการเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนบนผลึกอะพาไทต์เท่านั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Goes J. C. และคณะ (2007) ซึ่งทำการศึกษาการเคลือบอะพาไทต์บนแผ่นฟิล์มคอลลาเจนชนิดประจุลบซึ่งมีความหนาแน่นของหมู่คาร์บอกซิลมากเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มคอลลาเจนธรรมชาติที่ไม่ได้ดัดแปลง พบว่าปริมาณไฮดรอกซีอะพาไทต์บนแผ่นฟิล์มทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นแม้จะทำการแช่สลัจำนวนมากกว่า 100 รอบ แต่พบว่าเมื่อแช่สลัมากกว่า 50 รอบ อัตราเร็วในการเกิดผลึกอะพาไทต์บนแผ่นฟิล์มทั้งสองชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งมีสาเหตุมาจากเมื่อทำการแช่สลัจำนวนรอบมากๆ จะเกิดผลึกบดบังพื้นผิวของอนุภาค ทำให้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างไอออนบนผลึกอะพาไทต์เท่านั้น ส่งผลให้อัตราการเกิดผลึกอะพาไทต์ช้าลง ผลึกอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นจึงมีการจัดเรียงตัวกันอย่างไม่ระเบียบและมีความสามารถในการละลายน้ำสูงขึ้น



รูปที่ 4.9 ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของอนุภาคโปรตีนหลังการเคลือบฟันผิวด้วยฟลักแคลเซียมฟอสเฟต โดยทำการแปรงฟันในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ (a-e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

#### 4.3.2 ปริมาณแคลเซียมของอนุภาคหลังการเคลือบฟันผิว

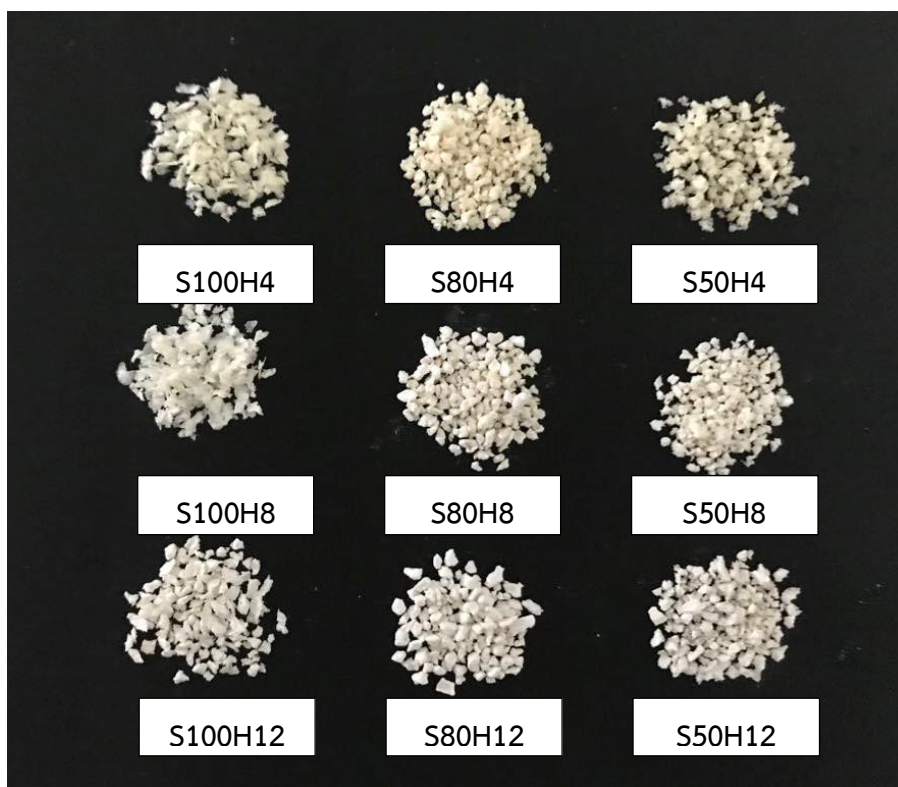
ปริมาณแคลเซียมในอนุภาคหลังการเคลือบฟันผิวในหัวข้อนี้วิเคราะห์ด้วย Calcium assay เพื่อยืนยันผลของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังการแปรงฟันในหัวข้อที่ 4.3.1 พบว่าปริมาณแคลเซียมในอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มการแปรงฟันจาก 4 เป็น 8 รอบ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มการแปรงฟันจาก 8 เป็น 12 รอบ ซึ่งสอดคล้องกับผลของร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังการเคลือบฟันผิวในหัวข้อที่ 4.3.1 และเมื่อเปรียบเทียบอนุภาคที่มีจำนวนรอบในการแปรงฟันเท่ากัน แต่มีอัตราส่วนโปรตีนต่างกัน พบว่าอนุภาคแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.10 ปริมาณแคลเซียมในอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินเอที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ ที่แช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไดโซเดียมไฮดรอกซิเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

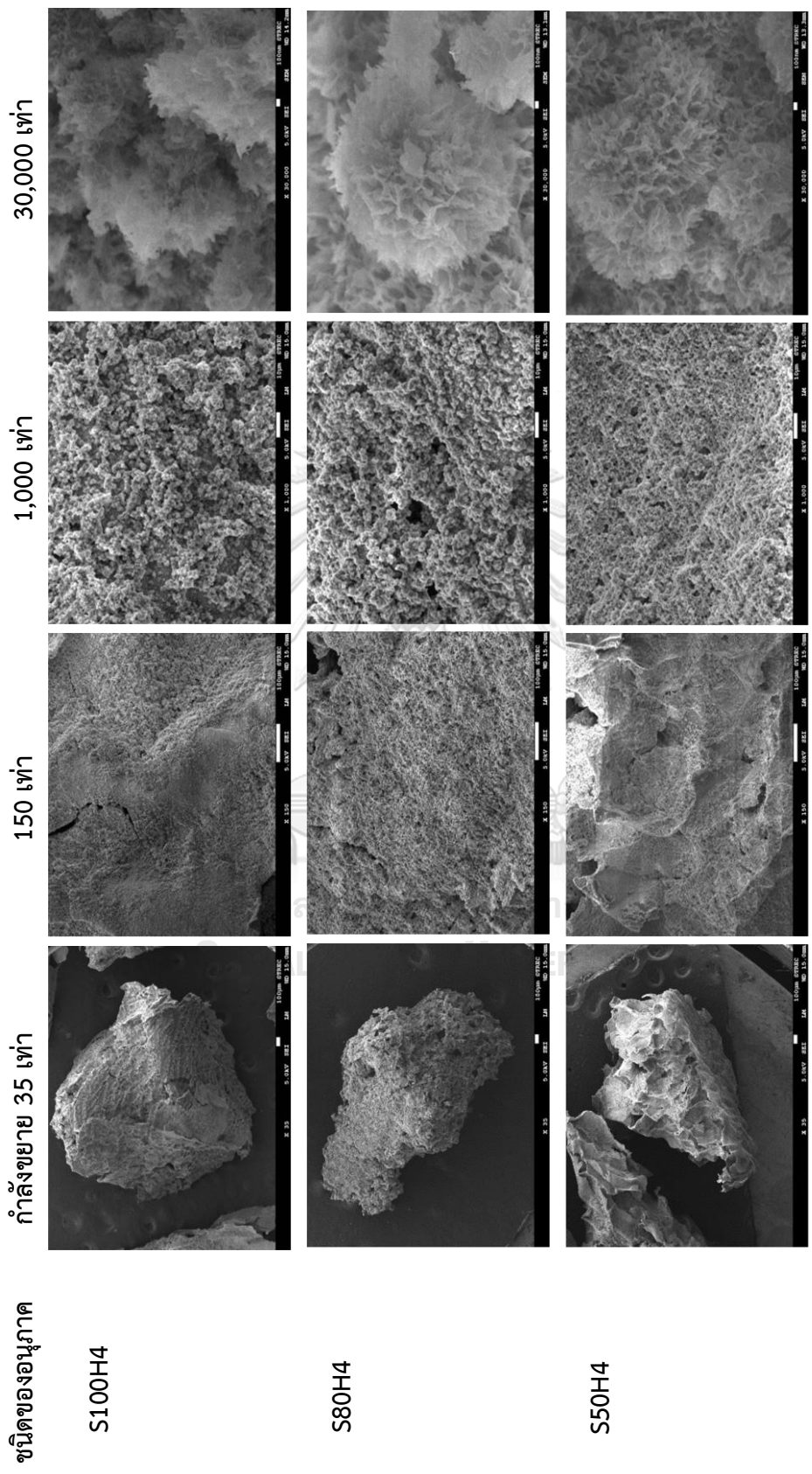
#### 4.3.3 โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาค

อนุภาคโปรตีนถูกนำไปเคลือบพื้นผิวด้วยผลึกแคลเซียมฟอสเฟตโดยการแช่สลับจำนวน 4, 8 และ 12 รอบ พบว่าก่อนการเคลือบผิวอนุภาคมีสีเหลือง-สีเหลืองออกโทนน้ำตาล แต่เมื่อแช่สลับพบว่าสีของอนุภาคเปลี่ยนจากสีเหลืองน้ำตาลเป็นสีเหลืองนวลสว่างขึ้นเมื่อแช่สลับ 4 รอบ สีขาวออกเหลืองเมื่อแช่สลับ 8 รอบ จนเป็นสีขาวเมื่อแช่ 12 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.11

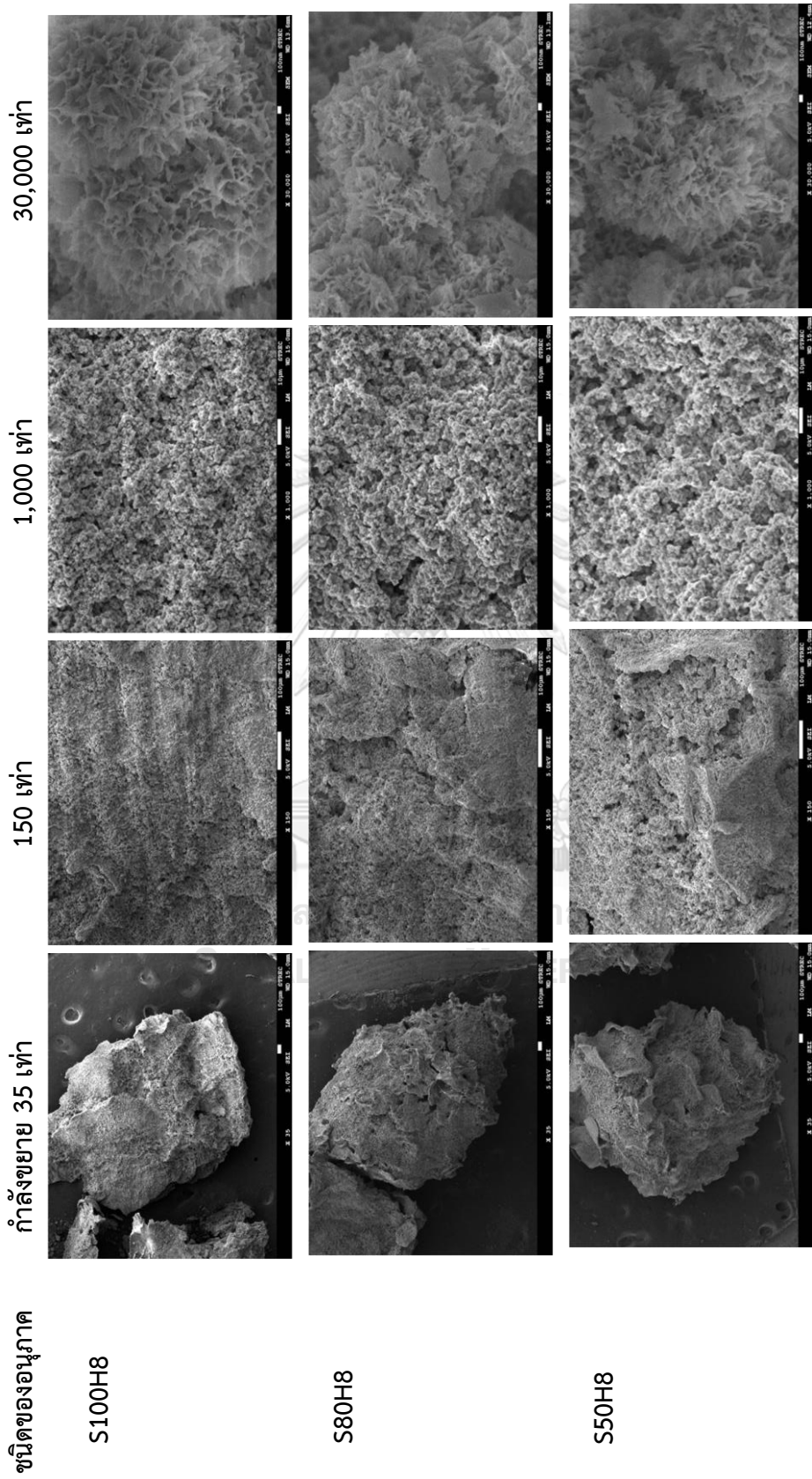


รูปที่ 4.11 ลักษณะภายนอกของอนุภาคไฟโบรอินใหม่ไทยผสมเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่สลับ 4, 8 และ 12 รอบ

จากนั้นศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคที่ตัดแปลงพื้นที่ผิวด้วยแคลเซียมฟอสเฟต ดังแสดงในรูปที่ 4.12-4.14 พบว่าอนุภาคที่เคลือบผิว 4 รอบ สามารถมองเห็นลักษณะรูปร่างและรูพรุนของอนุภาคได้อย่างชัดเจน และยังสามารถมองเห็นพื้นผิวของอนุภาคได้ในบางบริเวณที่มีผลึกแคลเซียมฟอสเฟตสะสมอยู่น้อย ส่วนอนุภาคที่ทำการเคลือบผิว 8 รอบพบว่าพื้นผิวของอนุภาคถูกปกคลุมด้วยผลึกแคลเซียมฟอสเฟตจนเต็ม และยังคงเห็นรูปร่างและรูพรุนของอนุภาคแต่ไม่ชัดเจนสำหรับอนุภาคที่แช่สลับ 12 รอบพบว่าเกิดแคลเซียมฟอสเฟตจำนวนมากจนเต็มรูพรุนของอนุภาค สอดคล้องกับหัวข้อ 4.3.1 ซึ่งพบว่าแคลเซียมฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มรอบในการแช่สลับ นอกจากนี้เมื่อบันทึกภาพที่กำลังขยาย 30000 เท่า เพื่อดูลักษณะของผลึกแคลเซียมฟอสเฟตบนพื้นผิวของอนุภาคที่แช่สลับ 4, 8 และ 12 รอบ พบว่าผลึกแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้นบนอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมคล้ายฟุ่มไม้ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ซ้อนกันเป็นฟุ่ม ๆ ส่งผลให้เกิดการเคลือบผิวของแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวของอนุภาคเป็นการเคลือบผิวแบบมีรูพรุน (Porous Coating) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคโปรตีนที่ทำการแช่สลับ 8 และ 12 รอบมีการเกิดผลึกที่มีลักษณะเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมลักษณะแบนยาวขึ้น



**รูปที่ 4.12** โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคที่มีอัตราส่วน S/G ต่าง ๆ กัน และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแซ่กลับ 4 รอบ โดยถ่ายด้วย FE-SEM ที่กำลังขยาย 35, 150, 1000 และ 30000 เท่า ซึ่งมีสเกลบาร์เท่ากับ 100, 100, 10 ไมโครเมตร และ 100 นาโนเมตร ตามลำดับ



**รูปที่ 4.13** โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคที่มีอัตราส่วน S/G ต่าง ๆ กัน และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่สลับ 8 รอบ โดยถ่ายด้วย FE-SEM ที่กำลังขยาย 35, 150, 1000 และ 30000 เท่า ซึ่งมีสเกลบาร์เท่ากับ 100, 100, 10 ไมโครเมตร และ 100 ไมโครเมตร ตามลำดับ

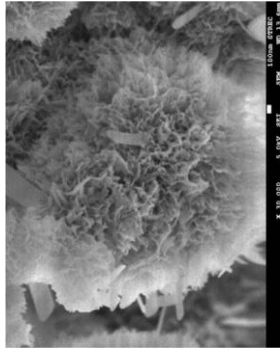
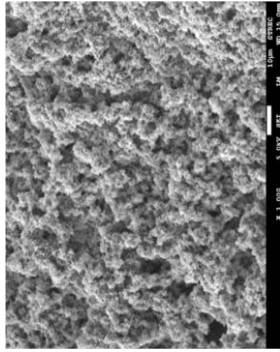
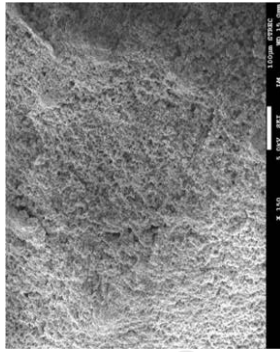
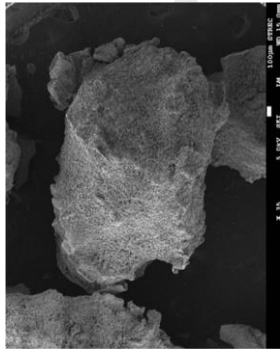
ชนิดของอนุภาค

กำลังขยาย 35 เท่า

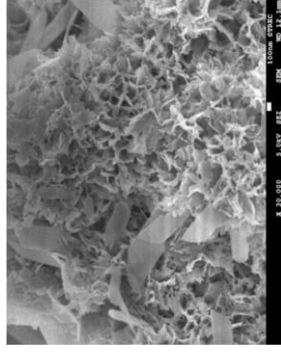
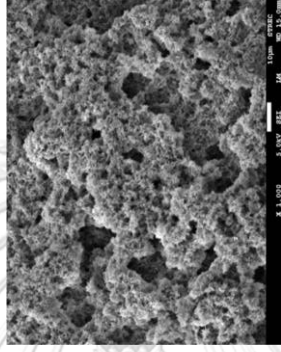
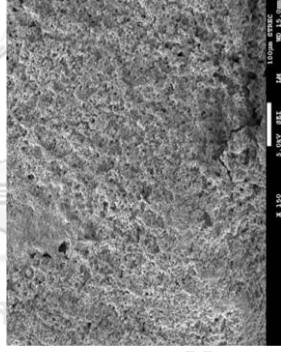
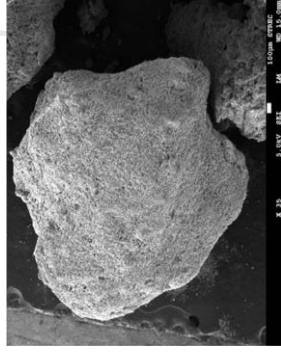
150 เท่า

1,000 เท่า

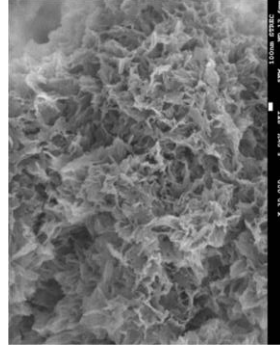
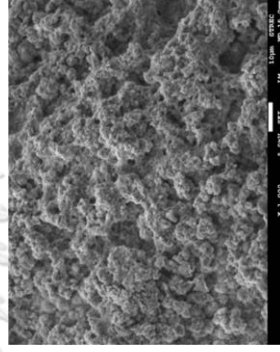
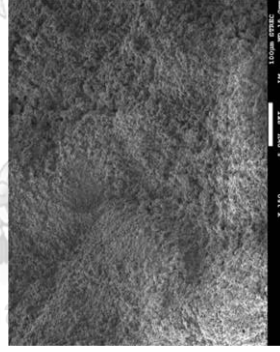
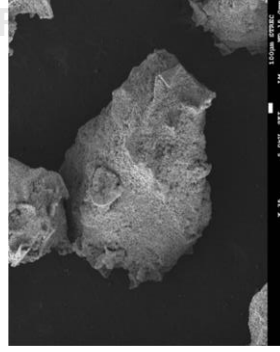
30,000 เท่า



S100H12



S80H12



S50H12

รูปที่ 4.14 โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคที่มีอัตราส่วน S/G ต่าง ๆ กัน และตัดแปลงพื้นผิวโดยการแช่กลับ 12 รอบ โดยถ่ายด้วย FE-SEM ที่

กำลังขยาย 35, 150, 1000 และ 30000 เท่า ซึ่งมีสเกลบาร์เท่ากับ 100, 100, 10 ไมโครเมตร และ 100 ไมโครเมตร ตามลำดับ

#### 4.3.4 ปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาค

ในหัวข้อนี้วัดปริมาณธาตุบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยเทคนิค Energy dispersive X-ray (EDX) ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3 จากนั้นทำการวิเคราะห์อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสเฟต (Ca/P ratio) เพื่อใช้ในการอธิบายประเภทของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต พบว่าอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของอนุภาคที่เคลือบพื้นผิวมีค่าอยู่ในช่วง 0.86-1.28 โดยอะตอม

เมื่อพิจารณาผลของจำนวนรอบในการแช่สลับพบว่าอนุภาคที่ดัดแปลงโดยการเพิ่มรอบการแช่สลับจาก 4 รอบเป็น 8 รอบ มีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสมิแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยเพิ่มขึ้นจาก 0.86-1.08 โดยอะตอม (1.11-1.39 โดยน้ำหนัก) เป็น 1.22-1.27 โดยอะตอม (1.58-1.65 โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพิ่มรอบการแช่สลับเป็น 12 รอบมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสค่าใกล้เคียงกับการแช่สลับ 8 รอบ โดยมีค่าเท่ากับ 1.14-1.28 โดยอะตอม (1.47-1.65 โดยน้ำหนัก) การที่อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสมิแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มรอบการแช่สลับจาก 4 รอบเป็น 8 รอบอาจมีผลมาจากการแช่สลับจำนวนรอบน้อย ๆ มีการเกิดอันตรกิริยาของโซเดียมไอออนเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ดังแสดงในภาคผนวก ข ทำให้ปริมาณสัมพันธ (Stoichiometry) เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลให้ความเป็นผลึกต่ำลง และเมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับโซเดียมไอออนจะถูกแทนที่โดยแคลเซียมไอออน ทำให้ความเป็นผลึกมากขึ้นและส่งผลให้อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสเพิ่มสูงขึ้น (Kim, Himeno et al. 2004) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu J.Y. และคณะ (2004) ซึ่งทำการศึกษาการเกิดผลึกแร่ธาตุทางชีวภาพของโครงสร้างเลียนเซลล์ *N*-Methylene Phosphochitosan โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่สลับและการแช่ใน SBF พบว่าอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของผลึกอะพาไทต์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับ และจากผล XRD พบว่าความเป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อแช่สลับจำนวนครั้งมากขึ้น

เมื่อพิจารณาอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสเฟต ไฮดรอกซีอะพาไทต์บริสุทธิ์มีสูตรทางเคมี คือ  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  และมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส 1.67 โดยอะตอม หรือ 2.15 โดยน้ำหนัก ในขณะที่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ในกระดูกมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสอยู่ที่ 1.15-1.70 โดยอะตอม (Bohner 2000) โดยในงานวิจัยนี้พบว่าอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของอนุภาคที่เคลือบพื้นผิวด้วยผลึกแคลเซียมมีค่าอยู่ในช่วง 0.86-1.28 โดยอะตอม ผลึกแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจากการเคลือบพื้นผิว คือ ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่มีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสเฟตต่ำเนื่องจากเกิดแผ่นสี่เหลี่ยมลักษณะแบนยาวบนผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ ดังแสดงในโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคในหัวข้อ 4.3.3 ซึ่งมีลักษณะผลึกแบบเดียวกันกับที่พบในรายงานการวิจัยของ Strange G.T. และคณะ (2011) ที่ศึกษาการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์-เจลาตินบนกระจกสไลด์ด้วย

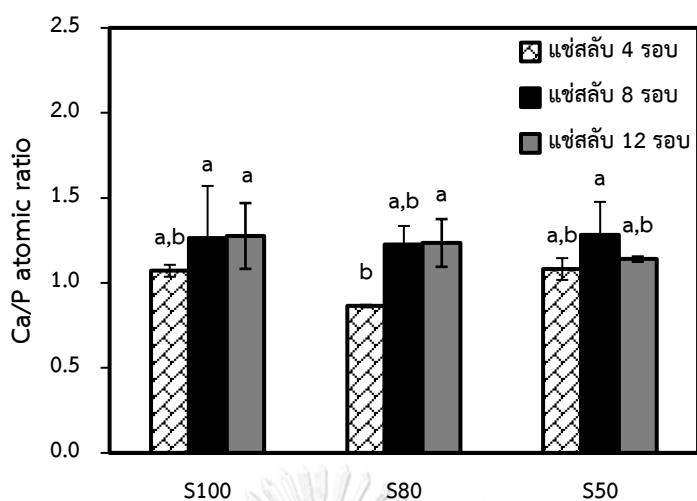


วิธีการแช่สลับบางอัตโนมัติโดยใช้ Robotic cane โดยการแช่สลับบรรจุสไลด์ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีเจลาตินละลายอยู่ แล้วทำการแช่สลับบ้างทั้งหมด 170 รอบ (เปลี่ยนสารละลายที่ใช้เป็นชุดใหม่ทุก 30 รอบ) พบว่าตัวอย่างที่ได้หลังแช่สลับบ้าง 170 รอบมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสประมาณ 1.15 โดยอะตอม และเมื่อทำการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบผลึกที่มีลักษณะเป็นแผ่นอยู่บนผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยผลึกที่พบมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส  $0.97 \pm 0.05$  โดยอะตอม ซึ่งใกล้เคียงกับไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (Dicalcium phosphate dihydrate; DCPD) ซึ่งมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 1 โดยอะตอม จึงเป็นสาเหตุให้อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของตัวอย่างต่ำกว่าปกติ การเกิดผลึกไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตมีสาเหตุจากการแช่สลับบ้างในสารละลายชุดเดิมทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายจากเดิมมีค่า 7.4 ลดลงต่ำกว่า 7 ส่งผลให้เกิดการก่อตัวเป็นผลึกไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตดังแสดงในสมการ



ตารางที่ 4.3 ปริมาณธาตุ (โดยน้ำหนักและโดยอะตอม) และอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (โดยน้ำหนักและโดยอะตอม) บนพื้นผิวของอนุภาคที่เคลือบผิว 4, 8 และ 12 รอบ

ธาตุ	S100H4C		S80H4C		S50H4C	
	%Weight	%Atomic	%Weight	%Atomic	%Weight	%Atomic
O	56.85±0.71	74.60±0.52	61.25±0.57	77.66±0.42	58.24±4.94	75.60±3.66
P	18.11±0.10	12.28±0.12	18.33±0.32	12.00±0.25	17.42±1.80	11.73±1.61
Ca	25.05±0.67	13.12±0.42	20.43±0.26	10.34±0.17	24.33±3.19	12.67±2.07
รวม	100	100	100	100	100	100
Ca/P ratio	1.38±0.04	1.07±0.03	1.11±0.01	0.86±0.01	1.39±0.06	1.08±0.05
ธาตุ	S100H8C		S80H8C		S50H8C	
	%Weight	%Atomic	%Weight	%Atomic	%Weight	%Atomic
O	47.54±15.01	66.01±14.13	49.47±3.32	68.72±2.74	49.64±5.44	68.84±4.62
P	19.71±3.19	14.74±4.44	19.58±0.69	14.07±0.83	18.95±0.65	13.63±1.09
Ca	32.75±11.82	19.25±9.69	30.95±2.78	17.21±1.98	31.40±4.80	17.52±3.52
รวม	100	100	100	100	100	100
Ca/P ratio	1.63±0.31	1.26±0.24	1.58±0.11	1.22±0.09	1.65±0.19	1.28±0.15
ธาตุ	S100H12C		S80H12C		S50H12C	
	%Weight	%Atomic	%Weight	%Atomic	%Weight	%Atomic
O	47.15±12.48	66.02±11.69	50.73±3.02	69.81±2.45	56.78±0.54	74.62±0.42
P	19.82±3.13	14.77±4.02	18.99±0.27	13.52±0.47	17.50±0.23	11.18±0.20
Ca	33.04±9.35	19.20±7.67	30.28±2.87	16.68±2.00	25.72±0.36	13.50±0.24
รวม	100	100	100	100	100	100
Ca/P ratio	1.65±0.19	1.27±0.15	1.59±0.14	1.23±0.11	1.47±0.02	1.14±0.01



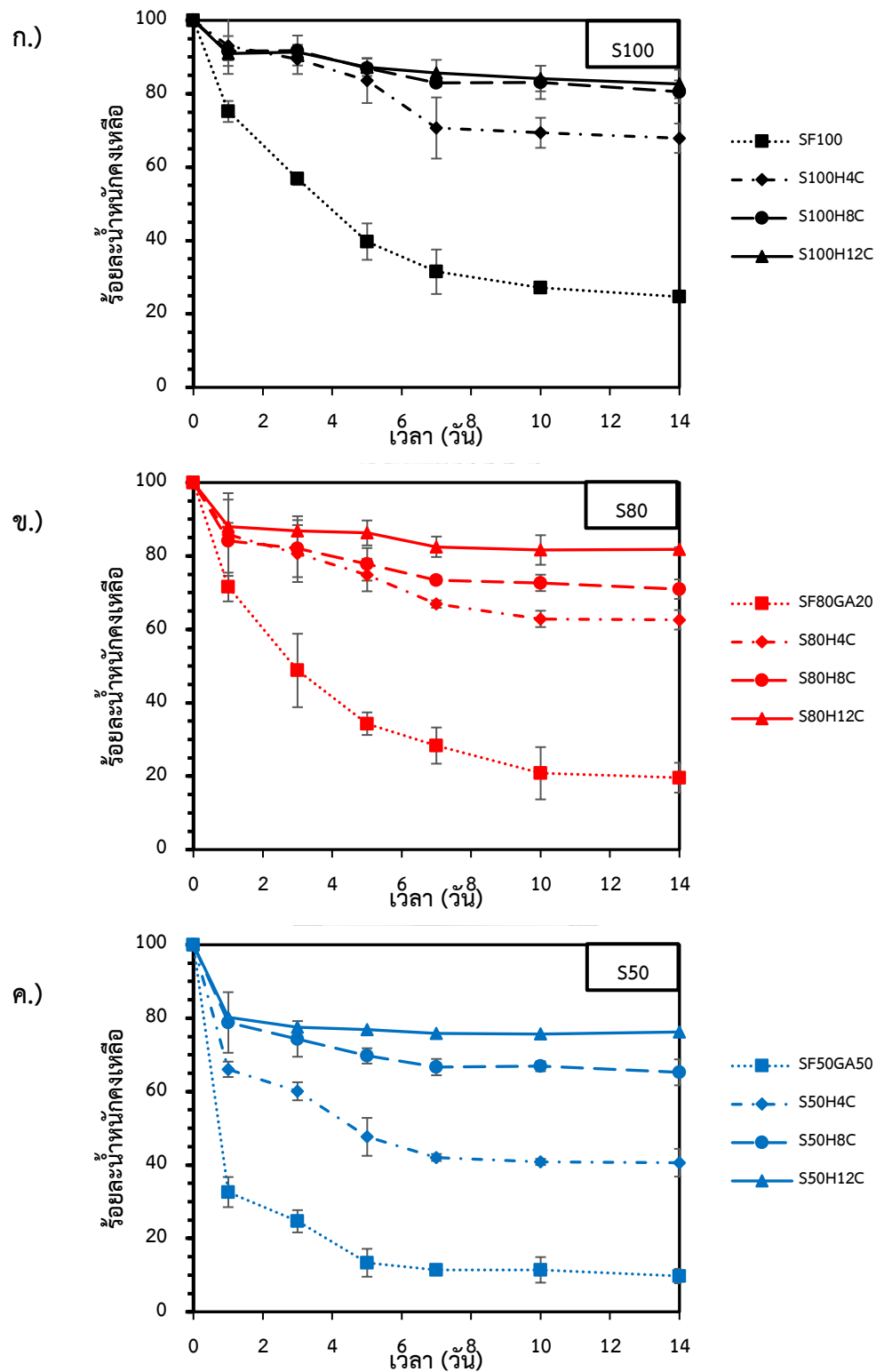
**รูปที่ 4.15** อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (โดยอะตอม) บนพื้นผิวของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินอัตราส่วนต่าง ๆ ที่แช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4, 8 และ 12 รอบ (a-b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

#### 4.3.5 การย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ

การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของชีววัสดุสำหรับพัฒนาประยุกต์ใช้ในทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในหัวข้อนี้ทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเลือกใช้เอนไซม์โปรตีเอสชนิด XIV ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์  $\alpha$ -Chymotrypsin, คอลลาจีเนส IA, สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ไม่มีเอนไซม์ (Li, Ogiso et al. 2003) และเอนไซม์โปรตีเอส XXIII (Wongnarat and Srihanam 2013) โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายของอนุภาคที่เคลือบผิวด้วยการแช่สลับ 4, 8 และ 12 รอบกับอนุภาคที่ไม่ผ่านการเคลือบผิว พบว่าเมื่อแช่อนุภาคที่ไม่เคลือบผิวในเอนไซม์ 14 วัน อนุภาค S100, S80G20 และ S50G50 มีร้อยละน้ำหนักคงเหลือ  $24.69 \pm 1.39$ ,  $19.58 \pm 4.06$  และ  $9.74 \pm 1.96$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และมีค่าช่วงชีวิตเท่ากับ 3.44, 2.68 และ 0.15 วันตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่ออนุภาคมีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบมากขึ้น จะมีอัตราการย่อยสลายช้าลง สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Lerdchai K. และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นไฮโดรเจลจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอที่อัตราส่วนต่าง ๆ ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อคอลลาเจนและอนุพันธ์ของคอลลาเจน (เจลาติน) มากกว่าไฟโบรอิน โดยพบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินมีการย่อยสลายช้ากว่าเจลาติน

นอกจากความจำเพาะของเอนไซม์แล้ว เจลาตินเป็นโปรตีนที่มีสมบัติชอบน้ำ ส่งผลให้ไฮโดรเจลเจลาตินถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วกว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลไฟโบรอินผสมเจลาติน และยังพบอีกว่าการมีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนเพียงร้อยละ 5 ช่วยชะลอการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินล้วนได้อย่างชัดเจน โดยมีน้ำหนักแห้งคงเหลือเพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 67 เป็นร้อยละ 80

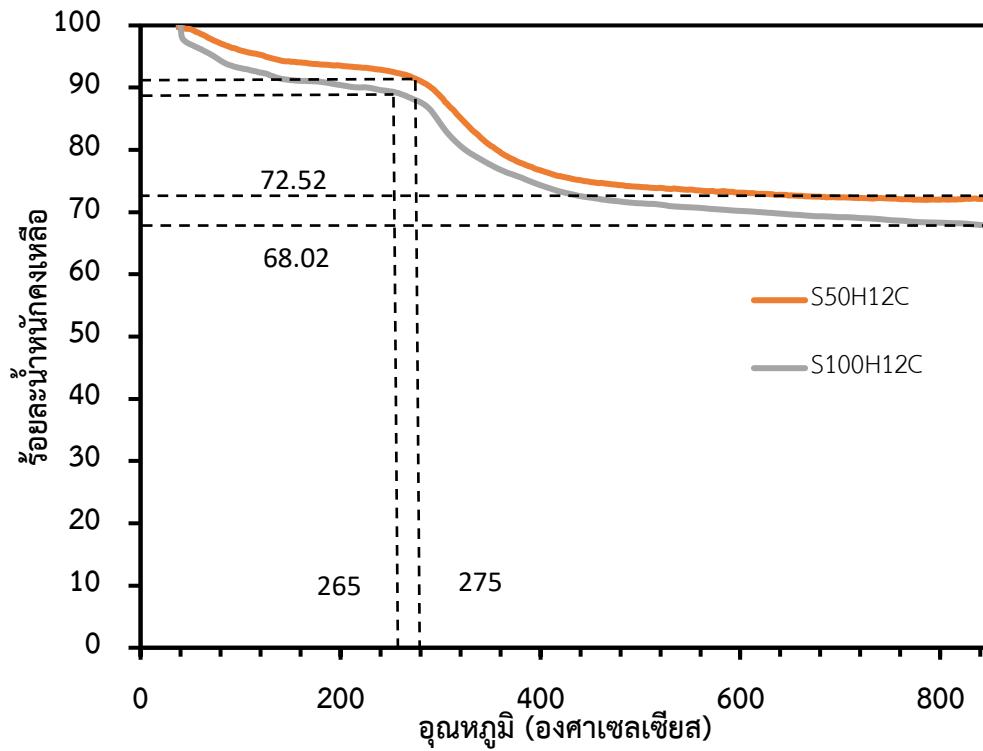
หลังจากแช่อนุภาคเคลือบผิวในเอนไซม์ 14 วัน อนุภาคเคลือบผิวเกือบทุกชนิดมีน้ำหนักคงเหลือมากกว่าร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก (ยกเว้น S50H4C ที่มีน้ำหนักคงเหลือประมาณ 40 โดยน้ำหนัก) โดยอนุภาค S100H12C มีน้ำหนักคงเหลือมากที่สุด สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ คือ S100H12C, S80H12C, S100H8C, S50H12C, S80H8C, S100H4C, S50H8C, S80H4C และ S50H4C น้ำหนักคงเหลือของอนุภาคที่เวลา 14 วัน มีความสอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมฟอสเฟตที่มีอยู่ในอนุภาคในหัวข้อ 4.3.1 เอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ไม่สามารถย่อยสลายผลึกแคลเซียมฟอสเฟตได้ ดังนั้นน้ำหนักที่เหลืออยู่ส่วนหนึ่งจึงเป็นน้ำหนักของแคลเซียมฟอสเฟตที่มีอยู่ในอนุภาคที่ไม่ถูกเอนไซม์ย่อยสลาย และเนื่องจากการเคลือบผิวของอนุภาคเป็นการเคลือบผิวแบบมีรูพรุน การเคลือบผิวด้วยผลึกแคลเซียมฟอสเฟตจึงขัดขวางการย่อยสลายของอนุภาค ส่งผลให้อนุภาคมีความต้านทานการย่อยสลายที่ดีขึ้น ยกเว้นอนุภาค S50H4C ที่มีอัตราการย่อยสลายรวดเร็วโดยมีค่าช่วงชีวิตเท่ากับ 4.21 วัน แสดงให้เห็นว่าการแช่สลับ 4 รอบสำหรับอนุภาค S50G50 ยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันการย่อยสลาย



รูปที่ 4.16 น้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาค ก.) S100 ข.) S80G20 และ ค.) S50G50 ที่ไม่เคลือบผิวและเคลือบผิว 4, 8 และ 12 รอบ ภายหลังจากได้สภาวะเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสชนิด XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

#### 4.3.6 สมบัติทางความร้อนของอนุภาค

ในการหวัข้อการนี้ศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาคที่เคลือบผิวด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) เพื่อศึกษาอัตราส่วนของสารอินทรีย์ต่ออนินทรีย์ของอนุภาค S50H12C และ S100H12C (ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดีที่สุดจากการศึกษาในภาคผนวก จ) พบว่า S50H12C มีอุณหภูมิการย่อยสลายของอนุภาคที่น้ำหนักหายไปร้อยละ 5 โดยน้ำหนักมีค่าเท่ากับ 275 องศาเซลเซียส และมีอัตราส่วนของน้ำเป็นองค์ประกอบในอนุภาคประมาณร้อยละ 3.73 โดยน้ำหนัก สารอินทรีย์ร้อยละ 23.75 โดยน้ำหนัก และสารอนินทรีย์ร้อยละ 72.52 โดยน้ำหนัก เมื่อคิดอัตราส่วนของสารอินทรีย์ต่ออนินทรีย์ในอนุภาคมีค่าประมาณ 25:75 ในขณะที่ S100H12C มีอุณหภูมิการย่อยสลายของอนุภาคที่น้ำหนักหายไปร้อยละ 5 โดยน้ำหนักมีค่าเท่ากับ 265 องศาเซลเซียส และมีอัตราส่วนของน้ำเป็นองค์ประกอบในอนุภาคประมาณร้อยละ 6.64 โดยน้ำหนัก มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ร้อยละ 25.34 และ 68.02 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อคิดอัตราส่วนของสารอินทรีย์ต่ออนินทรีย์ในอนุภาคมีค่าประมาณ 27:73 ปริมาณสารอินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้ในหัวข้อนี้มีความสอดคล้องกับร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังการแช่สลับ ในหัวข้อที่ 4.3.1 ซึ่งพบว่า S50H12C และ S100H12C มีร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังการแช่สลับเท่ากับ  $76.73 \pm 3.02$  และ  $71.77 \pm 0.75$  โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของสารอินทรีย์ต่ออนินทรีย์ของอนุภาคทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกับในกระดุกซึ่งองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์ร้อยละ 60 (ไฮดรอกซีอะพาไทต์) น้ำร้อยละ 10 และสารอินทรีย์ร้อยละ 30 เมื่อคิดอัตราส่วนของสารอินทรีย์ต่ออนินทรีย์ในมีค่าประมาณ 30:70 (Morgan, Barnes et al. 2013)



รูปที่ 4.17 คุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาค S50H12C และ S100H12 ด้วยเทคนิค TGA ที่อุณหภูมิ 35 ถึง 900 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราให้ความร้อน 20 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้สภาวะไนโตรเจน

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการขึ้นรูปอนุภาคสามมิติจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และมุ่งเน้นกระบวนการขึ้นรูปแบบ Top down ซึ่งเริ่มจากการขึ้นรูปแผ่นฟองน้ำจากสารละลายผสมไฟโบรอินและเจลาตินชนิดเอด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แล้วจึงบดให้เป็นอนุภาค ตามด้วยการดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตโดยใช้วิธีแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

ในกระบวนการผลิตอนุภาคโปรตีน ผลของอัตราส่วนไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินมีผลทำให้อนุภาคมีการย่อยสลายในสภาวะที่มีเอนไซม์ได้น้อยลง เมื่อมีอัตราส่วนไฟโบรอินเพิ่มขึ้น โดยอนุภาค S100, S80G20 และ S50G50 มีค่าช่วงชีวิตเท่ากับ 3.44, 2.68 และ 0.15 วันตามลำดับ จากผลความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ทำให้อนุภาคที่เชื่อมขวางมีน้ำหนักคงเหลือมากกว่าร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก ซึ่งมากกว่าอนุภาคที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง 7-30 เท่า นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.15 โดยปริมาตรเหมาะสมกับการนำไปขึ้นรูปอนุภาคโปรตีน เนื่องจากมีน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไม่แตกต่างจากอนุภาคที่เชื่อมขวางกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.20 โดยปริมาตร นอกจากนี้ยังเลือกใช้เฉพาะอนุภาค S100, S80G20 และ S50G50 ซึ่งมีความสามารถในการคงตัวในสภาวะที่มีเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก สำหรับการนำไปดัดแปลงเคลือบพื้นผิวด้วยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต

หลังจากการขึ้นรูปอนุภาค โดยการบดแผ่นฟองน้ำด้วยเครื่องบดโถบดเล็ก พบว่าอนุภาคจะมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ขึ้น เมื่ออนุภาคมีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมากขึ้น หลังการบดพบว่ามีอนุภาคขนาด 32-500, 500-1000, 1000-2000 และใหญ่กว่า 2000 ไมโครเมตร อยู่ร้อยละ 2-11, 7-18, 25-45 และ 25-65 โดยน้ำหนักตามลำดับ อนุภาคที่ได้จากการบดมีลักษณะเป็นเม็ดมีรูพรุนต่อกันหมด และผนังของอนุภาคมีลักษณะเรียบ

การดัดแปลงเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพด้วยการเคลือบพื้นผิว พบว่าปริมาณผลึกแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้น สูงขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยอนุภาคที่เคลือบผิวหลังการแช่สลับ 4, 8 และ 12 รอบ



มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นร้อยละ 38-46, 62-68 และ 71-80 โดยน้ำหนักตามลำดับ ผลของอัตราส่วนโปรตีนต่อการเคลือบผิวพบว่า S80G20 มีการเกิดผลึกได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ SF100 และ SF50GA50

ผลึกแคลเซียมฟอสเฟตที่สะสมบนอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมคล้ายฟูมไม้ ส่งผลให้พื้นผิวของอนุภาคมีความขรุขระเพิ่มขึ้น อนุภาคโปรตีนที่ทำการเคลือบผิว 8 และ 12 รอบมีการเกิดผลึกที่มีลักษณะเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมลักษณะเป็นแผ่นแบนยาวเกิดขึ้น โดยพบว่าอัตราส่วน Ca:P ของตัวอย่างที่เคลือบผิว 4, 8 และ 12 รอบ มีค่ากับ 0.86-1.08, 1.22-1.28 และ 1.14-1.28 โดยอะตอมตามลำดับ พบว่าอนุภาคที่เคลือบผิว 8 และ 12 รอบมีอัตราส่วน Ca:P มีค่าใกล้เคียงกับผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พบในกระดูกมนุษย์ อนุภาค S50H12C และ S100H12C มีสัดส่วนเหมาะต่อการเป็นโครงสร้างเลี้ยงเซลล์กระดูกโดยมีอัตราส่วนอินทรีย์ต่ออินทรีย์ประมาณ 25:75

ทั้งนี้สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปอนุภาคสำหรับการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก คือ อัตราส่วนไฟโบรอินต่อเจลาตินร้อยละ 50/50 ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.15 โดยปริมาตร และเคลือบผิวด้วยแคลเซียมฟอสเฟตด้วยการแช่สลับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 12 รอบ จะได้อนุภาค S50H12C ที่มีอัตราส่วนอินทรีย์ต่ออินทรีย์ประมาณ 25:75 โดยมีอัตราส่วน Ca:P เท่ากับ 1.14 ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับกระดูกในร่างกายของมนุษย์

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดสอบหาพื้นผิว และขนาดรูพรุนของอนุภาค
2. ควรทำการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (Differentiation) เนื่องจากไฮดรอกซีอะพาไทต์มีคุณสมบัติช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ (Cellular adhesion) ชักนำเนื้อเยื่อกระดูก (Osteoconductive) และช่วยในการเจริญเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น (Cell differentiation) (Dorozhkin 2009)

## 5.3 ประโยชน์ที่ได้รับ

- ก. ได้วิธีการผลิตอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาติน ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและบด โดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์
- ข. ได้ทราบคุณสมบัติของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินที่ผลิตได้
- ค. ได้ทราบศักยภาพในการใช้งานอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินสามมิติ สำหรับการประยุกต์ใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

## รายการอ้างอิง

Aramwit, P., et al. (2015). "A comparative study of type A and type B gelatin nanoparticles as the controlled release carriers for different model compounds." Materials Express **5**(3): 241-248.

Asghar, A. and R. L. Henrickson (1982). "Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems." Adv Food Res **28**: 231-372.

Ayobian-Markazi, N., et al. (2012). "Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) seeded on various bone substitute materials: An in vitro study." Dent Res J (Isfahan) **9**(1): 86-92.

Bernhardt, A., et al. (2011). "Novel ceramic bone replacement material Osbone(R) in a comparative in vitro study with osteoblasts." Clin Oral Implants Res **22**(6): 651-657.

Bohner, M. (2000). "Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements." Injury **31 Suppl 4**: 37-47.

Bowes, J. H. and C. W. Cater (1968). "The interaction of aldehydes with collagen." Biochim Biophys Acta **168**(2): 341-352.

Buckwalter, J. A., et al. (1995). "Bone Biology .1. Structure, Blood-Supply, Cells, Matrix, and Mineralization." Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume **77a**(8): 1256-1275.

Chamchongkaset, J., et al. (2008). "Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering." Advanced Materials Research **55-57**: 685-688.

Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." Clin J Am Soc Nephrol **3 Suppl 3**: S131-139.

Dorozhkin, S. V. (2009). "Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine." Materials **2**(4): 1975-2045.

Esposito, E., et al. (1996). "Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties." Biomaterials **17**(20): 2009-2020.

Farris, S., et al. (2010). "Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde." J Agric Food Chem **58**(2): 998-1003.

Furuzono, T., et al. (2000). "Preparation and characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process." Journal of Biomedical Materials Research **50**(3): 344-352.

Goes, J. C., et al. (2007). "Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process." Acta Biomater **3**(5): 773-778.

Jetbumpenkul, P., et al. (2012). "Balanced electrostatic blending approach--an alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold." Int J Biol Macromol **50**(1): 7-13.

Johnson, T. J. A. (1993). "Glutaraldehyde Cross-Linking." **516**: 283-295.

K, A. and P. Bandyopadhyay (2012). "Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids."

Kaewprasit, K., et al. (2014). "Physico-chemical properties and in vitro response of silk fibroin from various domestic races." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **102**(8): 1639-1647.

Kim, H. J., et al. (2008). "Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds." Bone **42**(6): 1226-1234.

Kim, H. M., et al. (2004). "The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment." J R Soc Interface **1**(1): 17-22.

Kim, U. J., et al. (2005). "Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin." Biomaterials **26**(15): 2775-2785.

Koh, L.-D., et al. (2015). "Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials." Progress in Polymer Science **46**: 86-110.

Kübler, A., et al. (2004). "Growth and Proliferation of Human Osteoblasts on Different Bone Graft Substitutes An In Vitro Study." Implant Dentistry **13**(2): 171-179.

Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue Engineering." Science **260**(5110): 920-926.

Lerdchai, K., et al. (2016). "Thai Silk Fibroin/Gelatin Sponges for the Dual Controlled Release of Curcumin and Docosahexaenoic Acid for Anticancer Treatment." J Pharm Sci **105**(1): 221-230.

Li, M. Z., et al. (2003). "Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets." Biomaterials **24**(2): 357-365.

Lim, Y. P. and A. W. Mohammad (2009). "Physicochemical Properties of Mammalian Gelatin in Relation to Membrane Process Requirement." Food and Bioprocess Technology **4**(2): 304-311.

Mayr-Wohlfart, U., et al. (2001). "Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials." Journal of Biomedical Materials Research **57**(1): 132-139.

Meng, Y. and S. Cloutier (2014). "Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation." 227-239.

Morgan, E. F., et al. (2013). The Bone Organ System. Osteoporosis: 3-20.

Nidhi, et al. (2016). "Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review." Saudi Pharm J **24**(4): 458-472.

Ozeki, M. and Y. Tabata (2005). "In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various cross-linking methods." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **16**(5): 549-561.

Paull, B., et al. (1997). "Determination of calcium and magnesium in water samples by high-performance liquid chromatography on a graphitic stationary phase with a mobile phase containing o-cresolphthalein complexone." Journal of Chromatography A **789**(1-2): 329-337.

Ratanavaraporn, J., et al. (2014). "The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine." J Mater Sci Mater Med **25**(2): 401-410.

Sashina, E. S., et al. (2006). "Structure and solubility of natural silk fibroin." Russian Journal of Applied Chemistry **79**(6): 869-876.

Schrieber, R. and H. Gareis (2007). Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.

Shapiro, F. (2008). "Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts." European Cells and Materials **15**: 53-76.

Shen, G., et al. (2015). "Surface Modification and Characterisation of Silk Fibroin Fabric Produced by the Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Alginate/Regenerated Silk Fibroin." PLoS One **10**(4): e0124811.

Sheu, M. T., et al. (2001). "Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture." Biomaterials **22**(13): 1713-1719.

Soames, R. (1995). Skeletal system. Gray's Anatomy. New York, Churchill Livingstone.

Strange, D. G. and M. L. Oyen (2011). "Biomimetic bone-like composites fabricated through an automated alternate soaking process." Acta Biomater **7**(10): 3586-3594.

Tachaboonyakiat, W., et al. (2001). "Hydroxyapatite formation on/in biodegradable chitosan hydrogels by an alternate soaking process." Polymer Journal **33**(2): 177-181.

Taguchi, T., et al. (1999). "Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process (III) : Effect of physico-chemical factors on apatite formation on/in poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **10**(8): 795-804.

Taguchi, T., et al. (1999). "Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process: II. Effect of swelling ratios of poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices on apatite formation." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **10**(3): 331-339.

Taichman, R. S. (2005). "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." Blood **105**(7): 2631-2639.

Tungtasana, H., et al. (2010). "Tissue response and biodegradation of composite scaffolds prepared from Thai silk fibroin, gelatin and hydroxyapatite." J Mater Sci Mater Med **21**(12): 3151-3162.

Varde, N. K. and D. W. Pack (2004). "Microspheres for controlled release drug delivery." Expert Opin Biol Ther **4**(1): 35-51.

Vepari, C. and D. L. Kaplan (2007). "Silk as a Biomaterial." Prog Polym Sci **32**(8-9): 991-1007.

Williams, D. F. (2008). "On the mechanisms of biocompatibility." Biomaterials **29**(20): 2941-2953.

Wongnarat, C. and P. Srihanam (2013). "Degradation Behaviors of Thai <i>Bombyx mori</i> Silk Fibroins Exposure to Protease Enzymes." Engineering **05**(01): 61-66.

Yang, Y. Z. (2009). "Skeletal Morphogenesis during Embryonic Development." Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression **19**(3): 197-218.

Yin, Y. J., et al. (2004). "A study on biomineralization behavior of N-methylene phosphochitosan scaffolds." Macromol Biosci **4**(10): 971-977.

Yuichi Ohya, et al. (2012). "Biodegradable Polymeric Assemblies for Biomedical Materials." Adv Polym Sci **247**: 65-114.



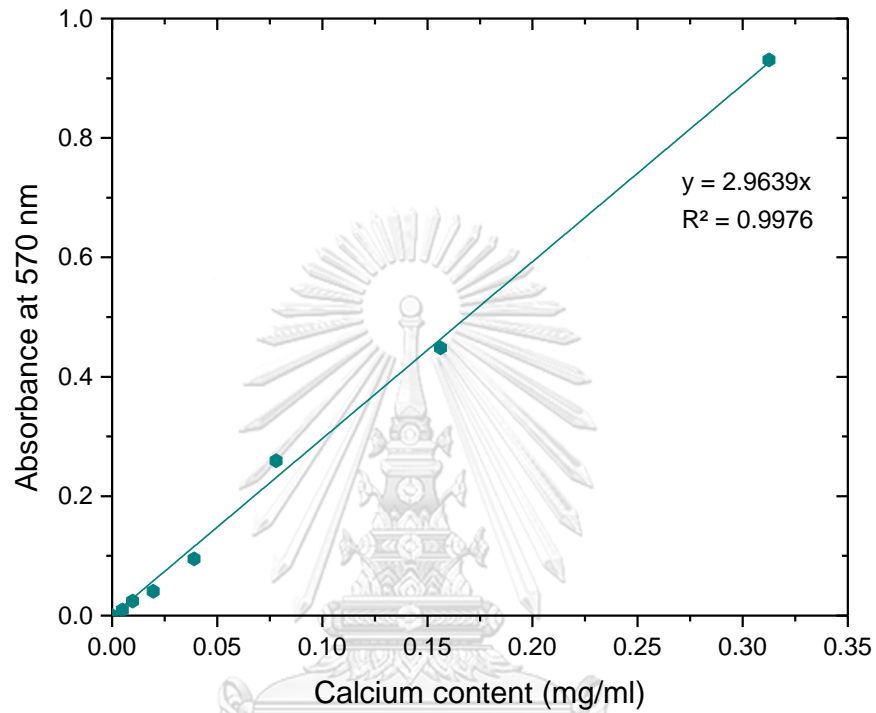
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานของ  $\text{Ca}^{2+}$ 

ที่ใช้ในการวัดปริมาณแคลเซียมในอนุภาคหลังการเคลือบผิวด้วย Calcium assay



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

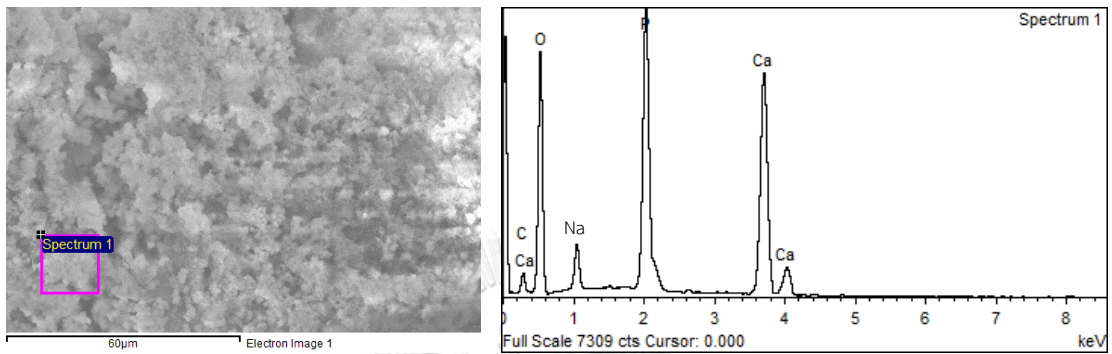
CHULALONGKORN UNIVERSITY



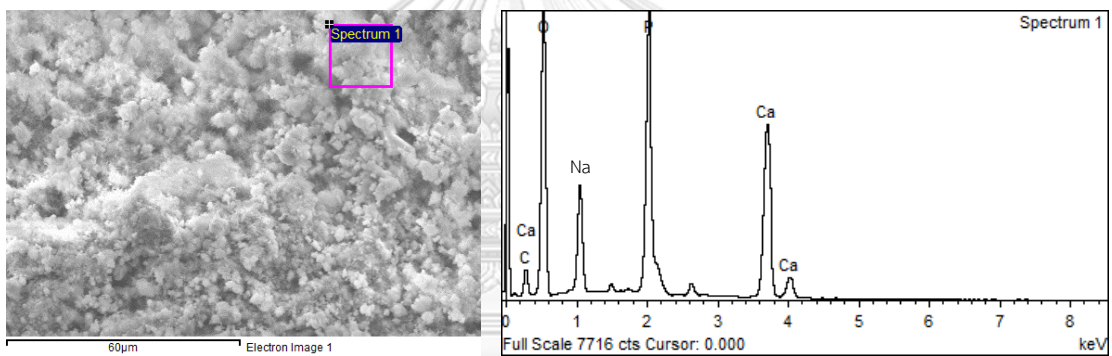
## ภาคผนวก ข

## ปริมาณธาตุของอนุภาคเคลือบผิวด้วยเทคนิค EDX

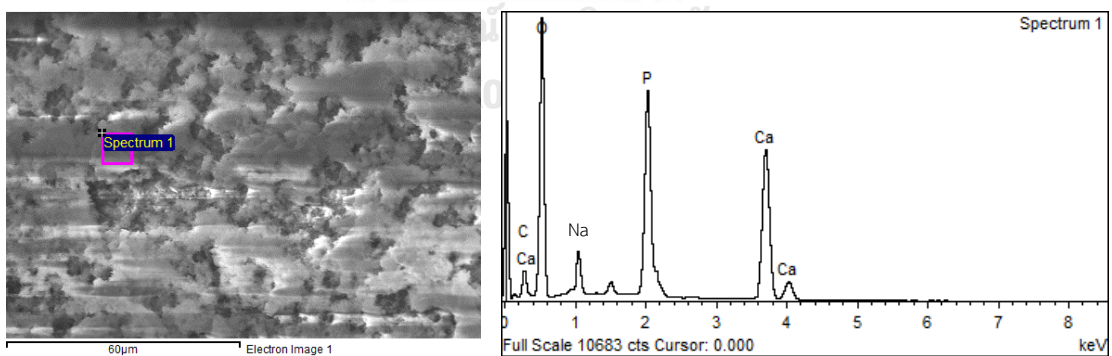
ตัวอย่าง S100H4C



ตัวอย่าง S80H4C

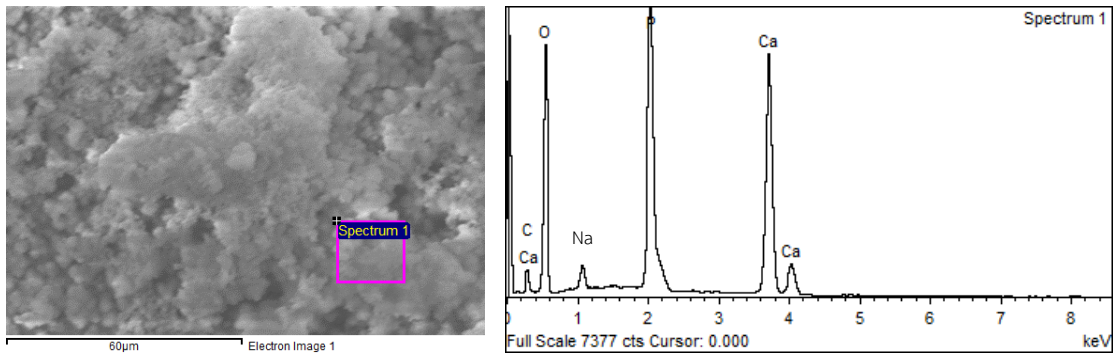


ตัวอย่าง S50H4C

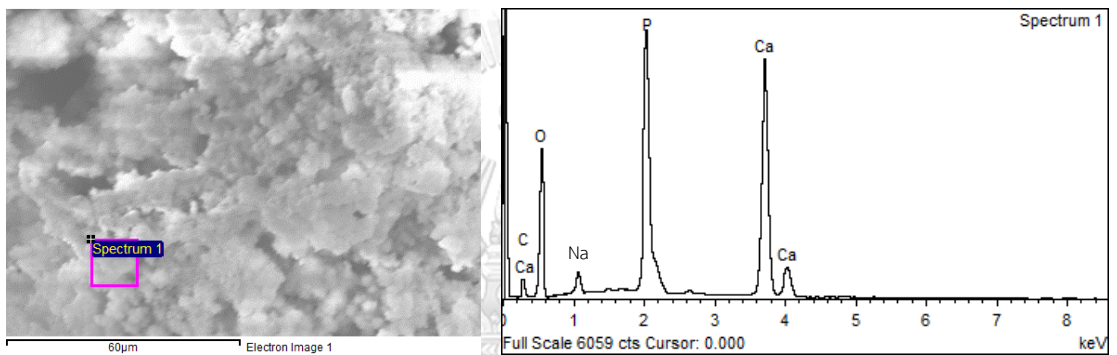


รูปที่ ข.1 กราฟเส้นแสดงธาตุที่อยู่บนอนุภาคที่เคลือบผิว S100H4C, S80H4C และ S50H4C

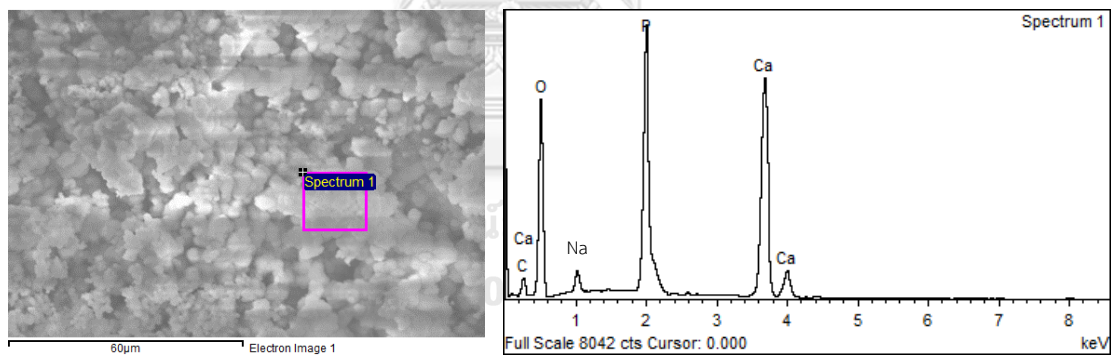
ตัวอย่าง S100H8C



ตัวอย่าง S80H8C

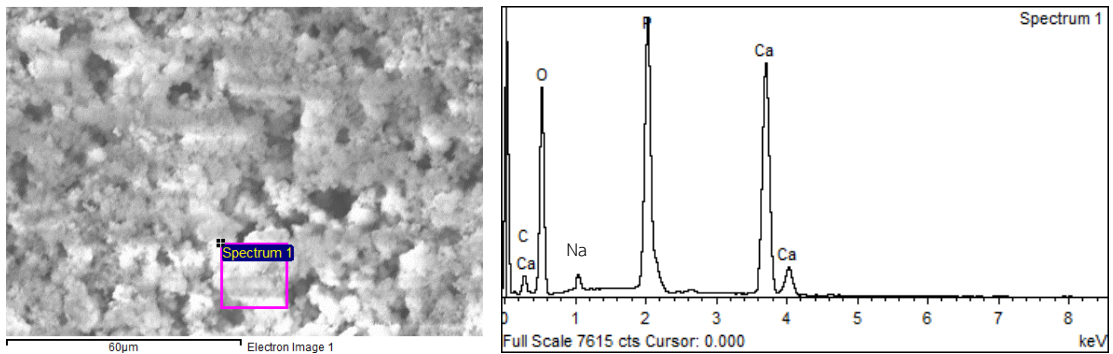


ตัวอย่าง S50H8C

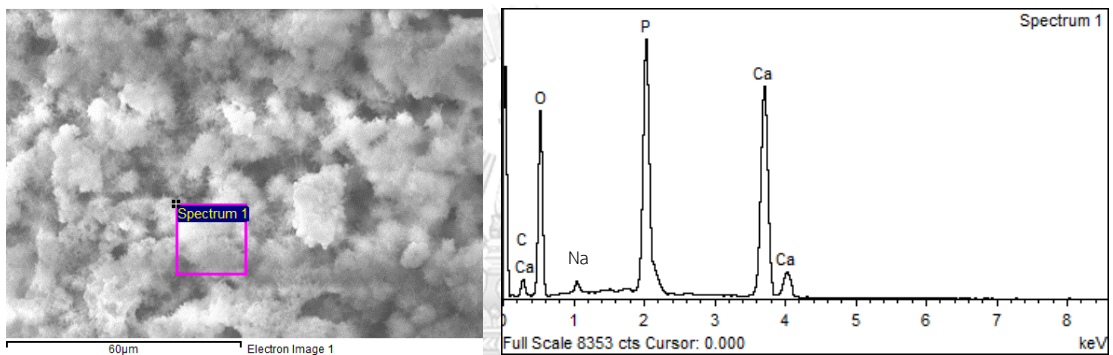


รูปที่ ข.2 กราฟเส้นแสดงธาตุที่อยู่บนอนุภาคที่เคลือบผิว S100H8C, S80H8C และ S50H8C

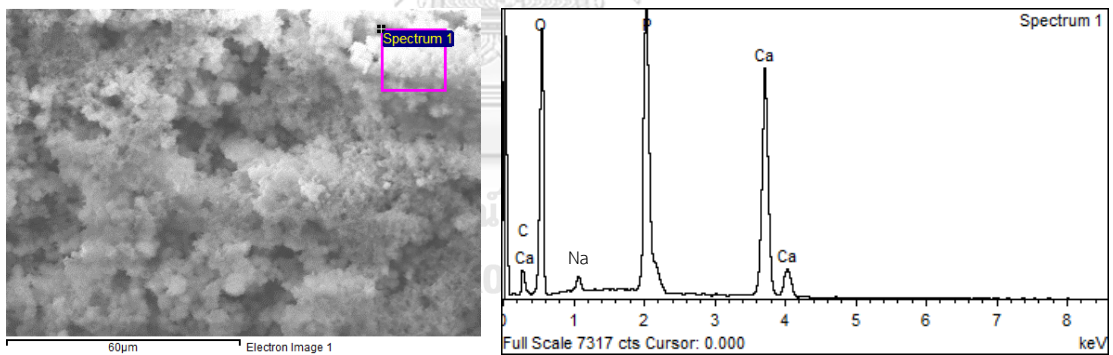
ตัวอย่าง S100H12C



ตัวอย่าง S80H12C



ตัวอย่าง S50H12C

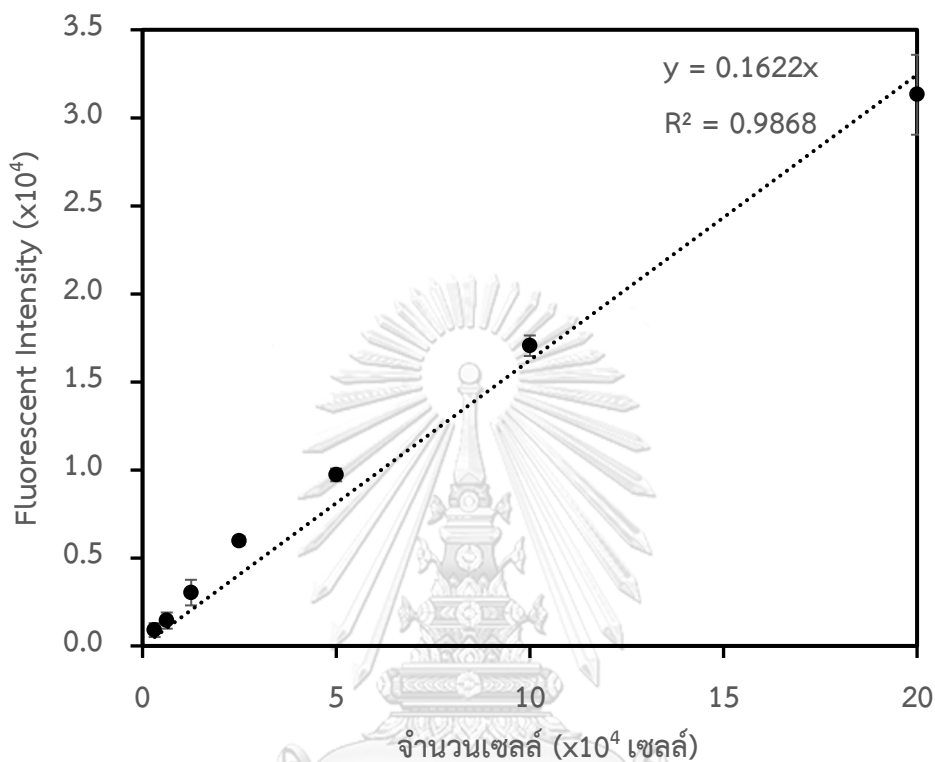


รูปที่ ข.3 กราฟเส้นแสดงธาตุที่อยู่บนอนุภาคที่เคลือบผิว S100H12C, S80H12C และ S50H12C

## ภาคผนวก ค

## กราฟมาตรฐานของเซลล์ SaOS-2

ที่ใช้ในการวัดจำนวนเซลล์ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคด้วย DNA assay

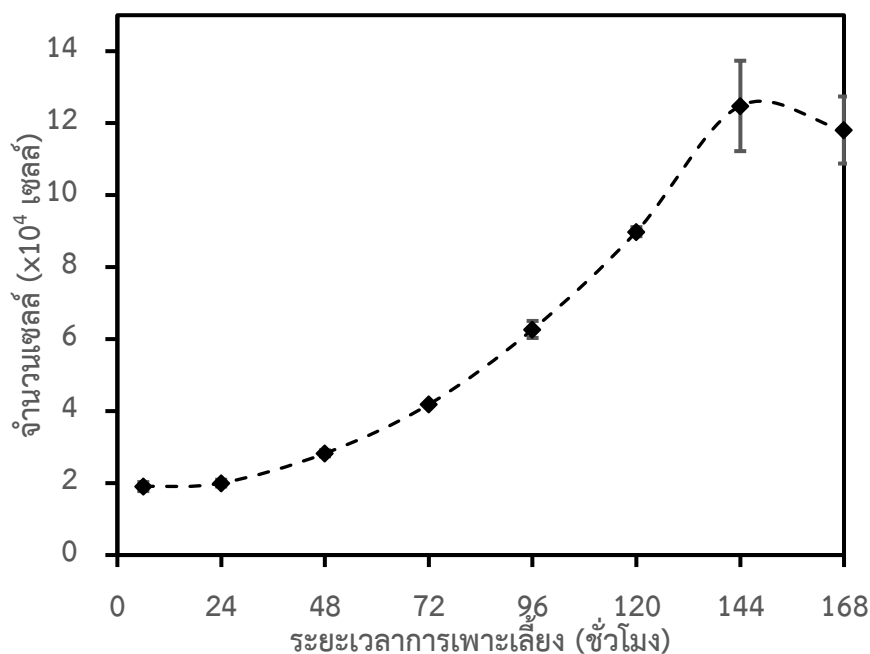


รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของเซลล์ SaOS-2 ที่วัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีด้วย DNA assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 ใน 24 well plate (พื้นที่  $1.9 \text{ cm}^2$ /หลุม) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin เก็บผลที่ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ด้วย DNA assay

## ภาคผนวก ง

กราฟแสดงการเจริญเติบโต (Growth curve) ของเซลล์ SaOS-2 ใน 24 well plate



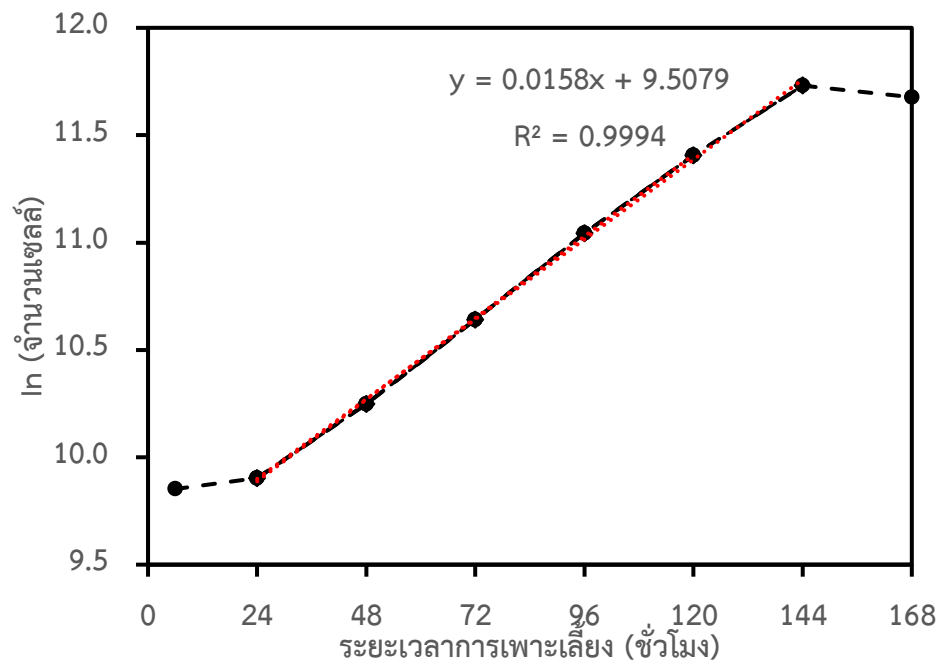
รูปที่ ง.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโต (Growth curve) ของเซลล์ SaOS-2 ใน 24 well plate และวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีด้วย DNA assay

เพาะเลี้ยง SaOS-2 บน ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์/ซม<sup>2</sup> บน 24 well plate (พื้นที่ 1.9 ซม<sup>2</sup>/หลุม) (จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ 19,000 เซลล์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin เป็นเวลา 6 ชม., 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก ๆ 3 วัน และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วย DNA assay

$$\% \text{ cell attachment} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}} \times 100$$

$$= \frac{19025}{19000} \times 100$$

$$= 100.15\%$$



รูปที่ ๓.2 กราฟ ln (จำนวนเซลล์) และเวลาที่เพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 ใน 24 well plate และวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีด้วย DNA assay

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate,  $\mu$ ,  $\text{hr}^{-1}$ )

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dX$$

$$\mu (t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

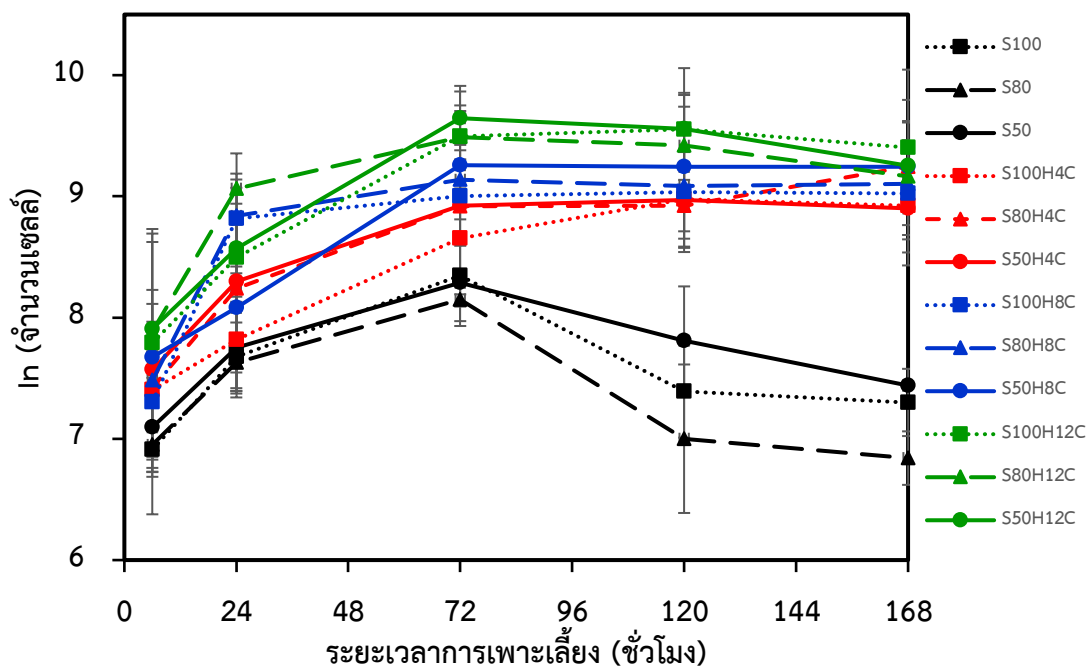
$$\mu = 0.0158 \text{ hr}^{-1}$$

$$\text{PDT} = \frac{\ln 2}{\mu} = 43.87 \text{ hr}$$

## ภาคผนวก จ

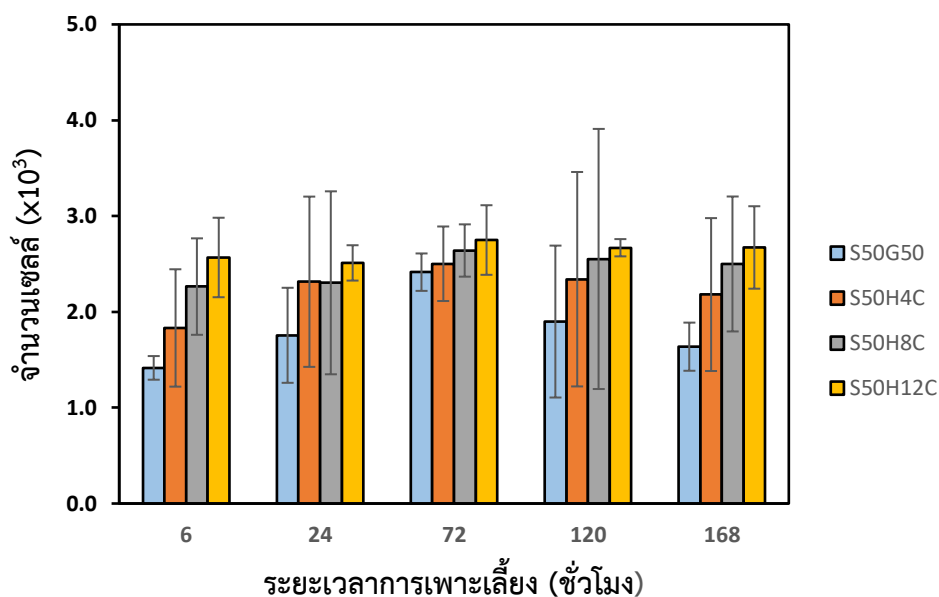
## ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (In vitro biocompatibility) ของอนุภาค

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคก่อนและหลังการเคลือบผิว โดยใช้เซลล์มะเร็งกระดูกออสติโอซาร์โคมา (Saos-2) ความเข้มข้น 3000 เซลล์/ 100 ไมโครลิตร/ 5 มิลลิกรัมอนุภาค เพื่อทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย DNA assay ในการทดลองศึกษาเริ่มต้นดังแสดงในรูปที่ จ.1 พบว่าอนุภาคที่เคลือบผิวและไม่เคลือบผิวมีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่ออนุภาคมีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมากขึ้น



รูปที่ จ.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln (จำนวนเซลล์) SaOS-2 ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคที่ไม่ใช่สลับและอนุภาคที่ใส่สลับจำนวน 4, 8 และ 12 รอบ) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์

ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะอนุภาค S50G50, S50H4C, S50H8C และ S50H12C มาทำการทดลองซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ จ.2 พบว่าอนุภาคมีร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ SaOs-2 ดังแสดงในตารางที่ จ.1



รูปที่ จ.2 จำนวนเซลล์ SaOS-2 บนอนุภาคที่เคลือบผิวและไม่เคลือบผิว S50G50, S50H4C, S50H8C และ S50H12C ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน

ตารางที่ จ.1 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ SaOs-2 บนอนุภาคที่ไม่แช่สลับและอนุภาคที่แช่สลับจำนวน 4, 8 และ 12 รอบ

ตัวอย่าง	ร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ , ชม. <sup>-1</sup> )	ระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT, ชม.)
S50G50	47.19±4.11 <sup>a</sup>	0.008±0.003 <sup>b</sup>	87.74±11.44 <sup>d</sup>
S50H4C	61.07±7.98 <sup>a</sup>	0.005±0.001 <sup>b, c</sup>	148.53±21.41 <sup>d, e</sup>
S50H8C	75.46±16.78 <sup>a</sup>	0.003±0.001 <sup>c</sup>	273.61±52.66 <sup>e</sup>
S50H12C	85.59±13.83 <sup>a</sup>	0.002±0.001 <sup>c</sup>	310.36±37.36 <sup>e</sup>

(a แสดงความแตกต่างกันมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการยึดเกาะของเซลล์, b-c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และ d-e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์)



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอรทัย ศุภวรรณวิบูล เกิดวันที่ 23 เมษายน พ.ศ. 2534 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนปิยะมหาราชาลัย ในปีการศึกษา 2551 และสำเร็จการศึกษาปริญญาตรีในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557

#### ผลงานทางวิชาการ

Suphawannawiboon, O., Jamkratoke, J., Kanokpanont S. A top-down fabrication of Thai silk fibroin/gelatin composited microparticles. Poster Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON2018), The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center (ICC Hat Yai), Hat Yai, Songkhla, Thailand, 7–9 February 2018.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY