

# พฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไฟโรฟอสเฟต

นางนิตา จันทรพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2550

***IN VITRO* BEHAVIOUR OF  $\beta$ -CALCIUM  
PYROPHOSPHATE GLASS-CERAMICS**

**Nisa Janphuang**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Degree of Master of Engineering in Ceramic Engineering**

**Suranaree University of Technology**

**Academic Year 2007**

## พฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไฟโรฟอสเฟต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร. วีระยุทธ์ ลอประยูร)

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. จรัสศรี ลอประยูร)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร. สุทิน กุหาเรืองรอง)

กรรมการ

(Asst. Prof. Dr. Shigeki Morimoto)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ รัตนจันทร์)

กรรมการ

(รศ. ดร. เสาวณีย์ รัตนพานิช)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(รศ. น.อ. ดร. วรพจน์ จำพิศ)

คณบดีสำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

นิตา จันทร์พวง : พฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียม  
ไพโรฟอสเฟต (*IN VITRO* BEHAVIOUR OF  $\beta$ -CALCIUM PYROPHOSPHATE  
GLASS-CERAMICS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี ลอประยูร,  
86 หน้า

กลาสเซรามิกเป็นวัสดุทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่ได้พัฒนาขึ้นมาในช่วง 10 ปี เพื่อนำมาใช้ทดแทนกระดูก และมีการผลิตเพื่อการค้า ตัวอย่างเช่น เอ-ดับบลิว กลาสเซรามิก (A-W glass-ceramic), เซราไวทอล (Ceravital) และ ไบโอเวอริท (Bioverit) กลาสเซรามิกเหล่านี้ประกอบด้วยผลึกของอะพาไทต์เป็นหลัก ร่วมกับวัฏภาคที่มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบ แต่กลาสเซรามิกที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ มีผลึกของเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต จึงจำเป็นต้องนำมาศึกษาเกี่ยวกับความเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) โดยศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ (bioactivity) ของวัสดุ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เพื่อให้แน่ใจได้ว่าวัสดุทางชีวภาพชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในร่างกายได้อย่างปลอดภัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำกลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต ซึ่งเตรียมได้จากการหลอมแก้วในระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  (C1) และระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5$  (C2) นำแก้วที่ได้มาผ่านการควบคุมความร้อนเพื่อทำให้เกิดการตกผลึกได้เป็นกลาสเซรามิก GC1 และ GC2 ตามลำดับ นำวัสดุที่ได้ไปวิเคราะห์ชิ้นงานเพื่อศึกษาวัฏภาคโดยเอกซเรย์ดิฟแฟรคชัน (x-ray diffraction, XRD) โครงสร้างจุลภาคโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (scanning electron microscope, SEM) จากนั้นศึกษาพฤติกรรมในหลอดแก้ว (*In vitro* test) คือ ศึกษาปฏิกิริยาของวัสดุภายใต้สภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ในส่วนของการศึกษาปฏิกิริยาของวัสดุภายใต้สภาพแวดล้อมทางชีวภาพ ทำได้โดยนำชิ้นงานใส่ในสภาวะจำลองของเหลวในร่างกาย (conventional simulated body fluid, c-SBF) ที่เตรียมขึ้น แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวชิ้นงานในช่วงระยะเวลา 0-90 วัน ภายใต้สภาวะควบคุม ส่วนการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์นั้น เป็นการศึกษาโดยเลือกใช้วิธีสัมผัสโดยตรง ทำได้โดยนำชิ้นงานที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterilization) แล้วใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งพร้อมต่อการทดสอบ โดยใช้เซลล์จากหนู (L929) แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในช่วงระยะเวลา 1-3 วัน ภายใต้สภาวะควบคุม จากการศึกษาปฏิกิริยาของวัสดุภายใต้สภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แล้วผลปรากฏว่า มีอิทธิพลของแคลเซียมฟอสเฟตวัฏภาคใหม่ปรากฏขึ้นบนผิวของชิ้นงานทั้ง GC1 และ GC2 และสังเกตพบว่าชิ้นงานกลาสเซรามิกชนิดที่ไม่มีซิลิกา (GC2) จะแสดงสมบัติไบโอแอคทีฟเร็วกว่าชิ้นงานกลาสเซรามิกที่มีซิลิกา (GC1) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่ากลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟตทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

และนอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นงานกลาสเซรามิกชนิดที่มีซิลิกา (GC1) นั้นมีผลกระทบต่อเซลล์ช้ากว่า  
ชิ้นงานกลาสเซรามิกชนิดที่ไม่มีซิลิกา (GC2) ซึ่งส่งผลเร็วกว่าอย่างเห็นได้ชัด

สาขาวิชา วิศวกรรมเซรามิก

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

NISA JANPHUANG : *IN VITRO* BEHAVIOUR OF  $\beta$ -CALCIUM  
PYROPHOSPHATE GLASS-CERAMICS. THESIS ADVISOR :  
ASSOC. PROF. CHARUSSRI LORPRAYOON, Ph.D. 86 PP.

*IN VITRO* TEST/CALCIUM PYROPHOSPHATE/BIOCOMPATIBILITY/  
BIOACTIVITY/CYTOTOXICITY

Glass-ceramics are biomaterials that have been developed for a decade for bone replacement. Commercial products such as A-W glass-ceramics, Ceravital and Bioverit are composed of apatite as the major phase with some silica. However, these new developed glass-ceramics contain  $\beta$ -calcium pyrophosphate. The study on their biocompatibility in terms of bioactivity and cytotoxicity is necessary to assure that these new materials are safe when they are used in human body.

The objectives in this study were to make glass-ceramics by melting two glass systems,  $\text{Na}_2\text{O-CaO-B}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$  (C1) and  $\text{Na}_2\text{O-CaO-B}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$  (C2), then heating for crystallization to obtain the final product as glass-ceramics, GC1 and GC2 respectively. Both glass-ceramics have been characterized by x-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscope (SEM). *In vitro* tests have been established for bioactivity and cytotoxicity. For bioactivity test, GC1 and GC2 were soaked in conventional simulated body fluid (c-SBF) under the controlled conditions for 0 to 90 days. Another *In vitro* tests, cytotoxicity test, a direct contact was chosen. Sterile GC1 and GC2 were cultured with cell (mouse cell, L929) for 1 to 3 days under the controlled conditions. After the bioactivity and cytotoxicity test, the existence and growth of calcium phosphate layers were observed on the surface of these two kinds

of specimens. However, GC2 (silica free) had faster bioactivity than GC1 (silica containing). It was found that both glass-ceramics were non-cytotoxic. The effect of GC1 to the cell is slower than GC2.

School of Ceramic Engineering

Academic Year 2007

Student's Signature \_\_\_\_\_

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ดำเนินการสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย กล่าวคือ

- รศ. ดร.จรัสศรี ลอประยูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, ผศ. ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ และ Asst. Prof. Dr. Shigeki Morimoto อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้โอกาสทางการศึกษา ให้ความรู้อันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างมาก และแนะนำการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

- อ. ดร.วีระยุทธ ลอประยูร, รศ. ดร.สุทิน กุหาเรืองรอง, ผศ. ดร.ศิริรัตน์ รัตนจันทร์, ผศ. ดร.สุขเกษม กังวานตระกูล และ ผศ. ดร.สุธรรม ศรีหล่มสัก คณาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนในการทำวิจัย

- ดร.ชวลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล นักวิชาการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และคณะ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ชี้แนะแนวทางในการดำเนินงานวิจัย

- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการดำเนินงานวิจัยในส่วนของทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

- เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณอนุชิต เรืองวิทยานนท์ และ คุณจรรจรู รุจิวรรณ

- คุณศิวดล เสถียรพัฒนากุล ที่ช่วยดูแลจัดรูปแบบการพิมพ์ให้ออกมาสวยงาม

- คุณพัฒนพงศ์ จันทร์พวง ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา สตามเจตนารมณ์

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้การเลี้ยงดูอบรมและให้กำลังใจด้วยความรัก ความอบอุ่น และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีมาโดยตลอด ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

นิตา จันทร์พวง



# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
<b>บทที่</b>	
<b>1. บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	6
1.2 ขอบเขตงานวิจัย.....	6
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
<b>2. ทัศนวิสัยวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>7</b>
2.1 ไบโอแอคทีฟกลาสและกลาสเซรามิก (Bioactive glass and glass-ceramics).....	7
2.2 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility).....	10
2.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity).....	13
2.4 การศึกษาไบโอแอคทีวิตีของวัสดุ.....	15
2.5 สารละลายจำลองพลาสมาของเลือด (Simulated body fluid).....	15
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
<b>3. วัสดุและวิธีการทดลอง.....</b>	<b>25</b>
3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....	25
3.2 วัสดุและสารเคมี.....	26
3.3 วิธีการทดลอง.....	28
3.3.1 การออกแบบการทดลอง.....	28
3.3.2 รายละเอียดวิธีการทดลอง.....	31

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2.1	การเตรียมกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต .....	31
3.3.2.2	การตัดและขัดชิ้นงาน.....	32
3.3.2.3	การศึกษาลักษณะเฉพาะของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต .....	34
3.3.2.4	การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ .....	36
3.3.2.5	การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ .....	39
<b>4.</b>	<b>ผลการทดลองและอภิปรายผล.....</b>	<b>44</b>
4.1	ผลการศึกษาลักษณะเฉพาะของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต .....	44
4.1.1	ผลการศึกษารูปประกอบทางเคมี .....	44
4.1.2	ผลการศึกษารูปร่าง.....	44
4.1.3	ผลการศึกษาโครงสร้างจุลภาค .....	45
4.2	ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ .....	46
4.2.1	ผลการศึกษารูปประกอบทางเคมี .....	46
4.2.2	ผลการศึกษารูปร่าง.....	48
4.2.3	ผลการศึกษาโครงสร้างจุลภาค .....	51
4.3	ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ .....	55
<b>5.</b>	<b>สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>62</b>
	รายการอ้างอิง .....	64
	ภาคผนวก	
	ภาคผนวก ก. ISO 10993-5 .....	67
	ภาคผนวก ข. วิธีการคำนวณวัตถุคิบ .....	80
	ภาคผนวก ค. วิธีนับจำนวนเซลล์.....	82
	ภาคผนวก ง. บทความที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ .....	84
	ประวัติผู้เขียน .....	86

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	ข้อดี ข้อเสียของวัสดุประเภทต่าง ๆ.....1
1.2	ลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างวัสดุกับเนื้อเยื่อ.....2
1.3	วัสดุเคลือบเซรามิก.....4
2.1	ส่วนประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟพอลิเมอร์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก).....7
2.2	ส่วนประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟพอลิเมอร์เซรามิก (ร้อยละโดยน้ำหนัก).....9
2.3	คำแนะนำในการพิจารณาวัสดุหรือผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ.....12
2.4	หัวข้อการพิจารณาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ.....13
2.5	เกณฑ์การให้คะแนนสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....14
2.6	การจัดกลุ่มของปฏิกิริยาที่มีต่อเซลล์.....14
2.7	สรุปความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย SBF ชนิดต่าง ๆ เทียบกับพลาสมาของเลือดมนุษย์.....16
2.8	งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเคลือบเซรามิกพอลิเมอร์.....17
2.9	งานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ.....19
2.10	งานวิจัยที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธีสัมผัสโดยตรง.....21
2.11	สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับไบโอแอคทีฟพอลิเมอร์และความเป็นพิษ.....23
3.1	แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....25
3.2	ส่วนผสมของแก้วที่ใช้ศึกษา (ร้อยละโดยน้ำหนัก).....26
3.3	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย SBF ที่มีปริมาณไอออนใกล้เคียงกับเลือด ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร.....26
3.4	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ.....27
3.5	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....27
4.1	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเคลือบเซรามิกไอออนและฟอสฟอรัสไอออน ของชิ้นงาน GC1 และ GC2.....44
4.2	รูปภาพที่ปรากฏใน GC1 และ GC2.....45

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.3 ปริมาณแคลเซียม ไอออนและฟอสฟอรัสไอออนใน GC1 และ GC2 ที่แช่ใน SBF ในช่วงเวลาต่าง ๆ.....	47
4.4 ภูมิภาคต่าง ๆ ที่ปรากฏใน GC1 เมื่อแช่ใน SBF ที่เวลาต่าง ๆ.....	48
4.5 ภูมิภาคต่าง ๆ ที่ปรากฏใน GC2 เมื่อแช่ใน SBF ที่เวลาต่าง ๆ.....	50
4.6 แสดงผลการเจริญเติบโตเซลล์ และลักษณะทั่ว ๆ ไปของเซลล์ ที่เวลาต่าง ๆ ของชิ้นงาน GC1 และ GC2 ที่มีขนาดแตกต่างกัน.....	59
4.7 เภณท์การให้คะแนนสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	60
4.8 การจัดกลุ่มของปฏิกิริยาที่มีต่อเซลล์.....	60
4.9 สรุปการให้คะแนน Cytotoxicity index ของ GC1 และ GC2.....	60
ข.1 แสดงส่วนประกอบร้อยละโดยโมลของแก้ว.....	81
ข.2 แสดงส่วนประกอบร้อยละโดยน้ำหนักของแก้วทั้ง 2 ชนิด.....	81
ข.3 แสดงปริมาณวัตถุดิบที่ต้องใช้ในการหลอมแก้ว.....	81

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	แผนภูมิแสดงลักษณะของความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ.....11
3.1	แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการเตรียมวัสดุกลาสเซรามิก.....29
3.2	แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการการศึกษาปฏิกิริยา ต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ.....30
3.3	แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....31
3.4	เครื่องขัดชิ้นงานแบบจานหมุน.....32
3.5	เครื่องทำระเหยในสุญญากาศ (Vacuum Evaporator).....34
3.6	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM).....36
3.7	แสดงการวางชิ้นงานในภาชนะ.....38
3.8	ผู้ควบคุมอุณหภูมิ.....38
3.9	แสดงการวางชิ้นงานลงในถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม.....42
3.10	แสดงถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุมเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์.....42
4.1	กราฟ XRD ของ GC1 และ GC2.....45
4.2	ไมโครกราฟจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ GC1 และ GC2.....46
4.3	กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมไอออนหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ.....47
4.4	กราฟแสดงปริมาณฟอสฟอรัสไอออนหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ.....48
4.5	กราฟ XRD แพทเทิร์น ของ GC1 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน.....49
4.6	กราฟ XRD แพทเทิร์น ของ GC2 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน.....51
4.7	จุดโครงสร้างของ GC1 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน.....53
4.8	จุดโครงสร้างของ GC2 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน.....54
4.9	เซลล์ L-929 (blank) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน.....56
4.10	เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงานควบคุมเชิงบวก (เป็นพิษ) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน.....57

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงานควบคุมเชิงลบ (ไม่เป็นพิษ) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน.....	57
4.12 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงาน GC1 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน.....	58
4.13 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงาน GC2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน.....	58
ค.1 แสดงตารางที่ปรากฏในฮีโมไซโตมิเตอร์ และตัวอย่างการนับจำนวนเซลล์ในตาราง.....	83

# บทที่ 1

## บทนำ

โลกในยุคปัจจุบันมีการนำวัสดุหลากหลายมาใช้งานต่าง ๆ มากมาย จนมนุษย์อาจละเลยถึงที่มาของวัสดุ เพราะเรามักให้ความสนใจในประโยชน์ของการใช้งานของผลิตภัณฑ์จากวัสดุ โดยไม่คำนึงถึงเบื้องหลังของผลิตภัณฑ์นั้น ว่ามีความเกี่ยวข้องกับวัสดุศาสตร์อย่างไร

วัสดุศาสตร์ คือ การนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมในการศึกษาเพื่ออธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบพื้นฐานของวัสดุ และการจัดเรียงตัวในระดับอะตอมและสมบัติของวัสดุ ซึ่งความเข้าใจดังกล่าวนี้จะนำไปตอบคำถามที่ว่าเมื่อนำไปผ่านกระบวนการผลิตแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสมรรถนะในการใช้งานอย่างไร ความรู้ที่นำมาใช้นั้นก็จะมีลักษณะเป็นสหวิทยาการ คือการใช้ความรู้ในหลาย ๆ แขนงมารวมกันในการทำงาน และยิ่งในปัจจุบันที่วัสดุศาสตร์ได้เข้าไปมีบทบาทอย่างมากในเกือบทุกผลิตภัณฑ์ ดังนั้น วัสดุศาสตร์ในปัจจุบันจึงต้องอาศัยความรู้ในหลายแขนงวิชา ไม่ว่าจะเป็นความรู้ทางฟิสิกส์ เคมี วิศวกรรม ชีววิทยา ไฟฟ้า คณิตศาสตร์ หรือ การแพทย์ เข้ามารวมกันเพื่อแก้ปัญหาหรืออธิบายสิ่งต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวัสดุ และคุณสมบัติที่สนใจ (จินตมัย สุวรรณประทีป, 2546)

วัสดุศาสตร์จะนำเอาวัสดุประเภทต่าง ๆ มาศึกษา ทดสอบ ปรับปรุง เปลี่ยนแปลง ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีทั้งพอลิเมอร์ โลหะ เซรามิกส์ และวัสดุเชิงประกอบ ซึ่งวัสดุแต่ละชนิดจะมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไปดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ข้อดี ข้อเสีย ของวัสดุประเภทต่าง ๆ

วัสดุที่ใช้	ข้อดี	ข้อเสีย
พอลิเมอร์ (polymer)	ยืดหยุ่น ขึ้นรูปได้ง่าย	ไม่แข็งแรง เสื่อมสภาพตามกาลเวลา
โลหะ (metal)	แข็งแรง เหนียว	มีความหนาแน่นมาก ผุกร่อน มีกระบวนการผลิตที่ยุ่งยาก

ตารางที่ 1.1 ข้อดี ข้อเสีย ของวัสดุประเภทต่าง ๆ (ต่อ)

วัสดุที่ใช้	ข้อดี	ข้อเสีย
เซรามิกส์ (ceramic)	สามารถเข้ากับร่างกายได้ดี แข็งแรงต่อแรงกด อัด	เปราะ ไม่ยืดหยุ่น มีกระบวนการผลิตที่ยุ่งยาก
วัสดุเชิงประกอบ (composites)	แข็งแรง	มีกระบวนการผลิตที่ยุ่งยาก

หมายเหตุ : จากหนังสือ Biomaterials Principles and Applications โดย Joon B. Park และ Joseph D. Bronzino, 2003, United States of America: CRC Press LLC.

วัสดุศาสตร์มีบทบาทสำคัญต่อการรักษาโรคและบำรุงสุขภาพของมนุษย์ วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ประเภทต่าง ๆ ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษา ทดแทน แก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการรักษาโรค ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่ คอนแทกเลนส์ กระจกเทียม ข้อต่อเทียม ระบบควบคุมการจ่ายยา แขนเทียม ขาเทียม ลิ้นหัวใจเทียม หลอดเลือดเทียม เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้เรียกว่า วัสดุทางชีวภาพ (biomaterials)

เราสามารถแบ่งวัสดุทางชีวภาพตามลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของชิ้นวัสดุซึ่งนำไปใช้ในร่างกาย (implant) กับเนื้อเยื่อได้ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างวัสดุกับเนื้อเยื่อ

ปฏิกิริยาระหว่างวัสดุกับเนื้อเยื่อ	ลักษณะการเกิด
เป็นพิษ (toxic)	เนื้อเยื่อตาย
ค่อนข้างเฉื่อย (nearly inert)	จะเกิดช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อกับวัสดุ
ไบโอแอคทีฟ (bioactive)	วัสดุจะมีพันธะขั้นที่ผิวสัมผัส (interfacial) ของเนื้อเยื่อ
ละลายเมื่ออยู่ในร่างกาย (resorbable)	เนื้อเยื่อจะแทนที่วัสดุ

หมายเหตุ : จากหนังสือ An Introduction to Bioceramics โดย Larry L. Hench และ June Wilson, 1993, Singapore: World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd.

มนุษย์เริ่มใช้เซรามิกส์ในรูปของเครื่องปั้นดินเผามานานนับพันปี และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย จนกระทั่งถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม มนุษย์เริ่มตระหนักถึงการนำเซรามิกส์ในการเสริม



ปรับปรุง แก้ว หรือทดแทนส่วนต่าง ๆ ในร่างกายได้ โดยเฉพาะส่วนที่เป็นกระดูก ซึ่งเซรามิกส์ที่นำมาใช้ในวัตถุประสงค์นี้ เรียกว่า เซรามิกส์ชีวภาพ (bioceramics)

Hench (1993) ได้จำแนกเซรามิกส์ชีวภาพตามลักษณะการเกิดพันธะกับเนื้อเยื่อได้เป็น 4 ชนิด ดังต่อไปนี้

1) วัสดุที่มีสมบัติค่อนข้างเฉื่อย คือวัสดุจะไม่เกิดพันธะใด ๆ กับกระดูก เช่น อะลูมินา (alumina) เซอร์โคเนีย (zirconia) ดังนั้นเมื่อนำวัสดุนี้ใส่เข้าไปในร่างกายแล้วมีการเคลื่อนไหวในบริเวณนั้นบ่อยครั้งจะส่งผลทำให้วัสดุหลวมแล้วเกิดการโยกคลอน ทั้งนี้เนื่องมาจากมีช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อกับวัสดุ

2) วัสดุมีรูพรุน (porous) เนื้อเยื่อจะเจริญเติบโตแทรกเข้าไปในรู เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบบนโลหะที่มีรูพรุน วัสดุชนิดนี้พัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันการหลวมของวัสดุ เนื่องจากเนื้อเยื่อกระดูกสามารถเจริญเติบโตแทรกเข้าไปตามรูพรุนที่บริเวณผิวหน้าวัสดุ แต่วัสดุชนิดนี้มีข้อจำกัดคือ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนจะต้องไม่น้อยกว่า 100 ไมโครเมตร เพื่อให้มีที่ว่างเพียงพอที่เส้นเลือดสามารถเข้าไปหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกได้

3) วัสดุที่ไวต่อปฏิกิริยาชีวภาพ ที่บริเวณผิวหน้าของวัสดุจะเกิดพันธะกับเนื้อเยื่อ เช่น ไบโอแอคทีฟกลาส (bioactive glass) ไบโอแอคทีฟกลาสเซรามิก (bioactive glass-ceramics) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ จุดมุ่งหมายของการพัฒนาวัสดุชนิดนี้ขึ้นมาคือ ต้องการให้วัสดุมีคุณสมบัติอยู่ระหว่างวัสดุที่ค่อนข้างเฉื่อย และวัสดุที่สามารถละลายได้ วัสดุชนิดนี้จึงมีปฏิกิริยาทางเคมีกับร่างกาย แต่เกิดเฉพาะที่ผิวของวัสดุเท่านั้น

4) วัสดุที่สามารถละลายได้ (resorbable) วัสดุจะถูกแทนที่โดยกระดูก เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) ไบโอแอคทีฟกลาส วัสดุชนิดนี้ถูกออกแบบให้วัสดุสามารถละลายในร่างกายได้เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง และถูกแทนที่โดยเนื้อเยื่อที่บริเวณนั้น ๆ ซึ่งอัตราการละลายของวัสดุควรจะสัมพันธ์กับอัตราการเติบโตของเนื้อเยื่อ แต่วัสดุชนิดนี้บางชนิดมีอัตราการละลายเร็ว บางชนิดมีอัตราการละลายช้า

ประมาณ 20 กว่าปีที่ผ่านมา การพัฒนาวัสดุชนิดใหม่สำหรับการปลูกถ่าย ทดแทนกระดูก ในมนุษย์ ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก กลาสเซรามิกเป็นหนึ่งในวัสดุที่ถูกนำมาพัฒนา

กลาสเซรามิกเป็นเซรามิกส์ทำจากแก้ว โดยการควบคุมกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของแก้ว ทำให้เกิดการตกผลึกในเนื้อแก้วได้เป็นกลาสเซรามิก โดยกลาสเซรามิกที่นำมาใช้ในการทดแทนกระดูกที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไปคือ เซราไวทอล (Ceravital) และไบโอเวริท (Bioverit)

ในทศวรรษที่ผ่านมา ได้เริ่มมีการนำวัสดุประเภทแคลเซียมฟอสเฟตต่าง ๆ จำหน่ายในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และญี่ปุ่น ดังตารางที่ 1.3 วัสดุเหล่านี้ถูกนำมาใช้งานทั้งทางด้านทันตกรรม

และการแพทย์ ซึ่งวัสดุแคลเซียมฟอสเฟตจัดเป็นวัสดุที่ไวต่อปฏิกิริยาชีวภาพ เนื่องจากที่บริเวณผิวหน้าของวัสดุชนิดนี้มีความสามารถในการเกิดพันธะกับกระดูก

ตารางที่ 1.3 วัสดุแคลเซียมฟอสเฟต

วัสดุ	ชื่อทางการค้า
แคลเซียมฟอสเฟตเซรามิกส์	<ol style="list-style-type: none"> <li>แคลเซียม ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (<math>HA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2</math>) <ul style="list-style-type: none"> <li>- แคลซีไทต์ (Calcitite™)</li> <li>- ดูราพาไทต์ (Durapatite™)</li> <li>- อัลวีโอกราฟ (Alveograf™)</li> <li>- ออสทีโอกราฟ (Osteograf™)</li> <li>- ไฮเมท เฮชเอ (Himed™ - HA)</li> <li>- ไบโออะพาไทต์ (Bioapatite™)</li> <li>- ไบโอรีโอก (Bioroc™)</li> <li>- อัลโลโทรแพท (Allotropat™)</li> <li>- มิตซูบิชิ เฮชเอ (Mitsubishi HA)</li> </ul> </li> <li>เบตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต (<math>\beta</math>-TCP, <math>Ca_3(PO_4)_2</math>) <ul style="list-style-type: none"> <li>- ซินโทกราฟ (Synthograf™)</li> <li>- อ็อกเมน (Augmen™)</li> <li>- ไฮเมท ทีซีพี (Himed™ - TCP)</li> </ul> </li> </ol>
ไบเฟลิก แคลเซียมฟอสเฟต (BCP)	<ol style="list-style-type: none"> <li>ไทรโอซิท (Triosit™)</li> <li>ไฮเมท ทีซีพี (Himed™ - TCP)</li> </ol>
วัสดุแคลเซียมฟอสเฟตที่สามารถละลายได้	<ol style="list-style-type: none"> <li>ออสทีโอเจน (Osteogen™)</li> <li>ไฮเมท เอพี (Himed™ - AP)</li> </ol>
วัสดุแคลเซียมฟอสเฟตที่ได้จากธรรมชาติ	<ol style="list-style-type: none"> <li>ไบโอออส (BioOss™)</li> <li>ออสทีโอกราฟ เอ็น (Osteograf-N™)</li> </ol>

หมายเหตุ : จากหนังสือ Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A :  
Materials Vol.2 โดย LeGeros R.Z. LeGeros J.P. Daculsi G. และ Kijikowska R.,  
1995, United States of America: Marcel Dekker, Inc.

วัสดุที่นำไปใช้ในร่างกายควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย, ไม่ก่อโรคมะเร็ง, ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้และการอักเสบ, สามารถเข้าด้วยกันได้ (compatibility) และทำงานภายในร่างกายได้ตลอดช่วงอายุการใช้งาน (Billotte, 2000)

การเข้าด้วยกันได้กับร่างกาย หมายถึง วัสดุที่ใส่ในร่างกาย ได้รับการยอมรับจากเนื้อเยื่อ ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ โดยไม่เกิดความเสียหาย หรืออันตรายใด ๆ ต่อเนื้อเยื่อ และต่อร่างกาย (Hill, 1998) ดังนั้นการนำวัสดุทางชีวภาพชนิดหนึ่งมาใช้งาน จำเป็นจะต้องผ่านกระบวนการศึกษาเกี่ยวกับการเข้าด้วยกันได้กับร่างกาย (biocompatibility) ก่อน ซึ่งได้แก่ การศึกษาเกี่ยวกับการมีปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ (bioactivity) ของวัสดุนั้น ๆ รวมถึงการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ซึ่งสามารถศึกษาได้ทั้งในหลอดแก้ว (*In vitro*) และในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (*In vivo*) เพื่อให้มีความแน่ใจว่า วัสดุทางชีวภาพชนิดนั้น สามารถนำมาใช้ในร่างกายได้อย่างปลอดภัย

การมีปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ คือ ความสามารถในการเกิดพันธะทางเคมีกับกระดูกเพื่อช่วยการยึดเกาะ (Hench, 1991) ส่วนการเป็นพิษต่อเซลล์ อาจทำให้เซลล์มีรูปร่างลักษณะ (morphology) เปลี่ยนแปลง หรือทำให้เซลล์ตาย (Northup, 1996)

ถ้าวัสดุไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีข้อมูลทางพฤติกรรมของวัสดุต่อสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพแล้ว แพทย์ก็จะนำวัสดุนั้นไปทดลองใช้งานจริงกับผู้ป่วยที่เป็นอาสาสมัคร เพื่อศึกษาผลจากการใช้งาน ก่อนที่จะนำไปผลิตเพื่อจำหน่ายต่อไป (Hanson, 1996)

วัสดุชีวภาพที่เป็นเซรามิกส์ได้มีการพัฒนาขึ้นมาหลายชนิดเช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูก อะลูมินา (alumina) เป็นส่วนประกอบของสะโปกเทียมไพโรไลติกคาร์บอน (pyrolytic carbon) ใช้เป็นลิ้นหัวใจ

ประเทศไทยเริ่มมีการพัฒนาวัสดุทางชีวภาพได้ไม่นาน จึงยังไม่สามารถผลิตวัสดุเหล่านั้นใช้เองภายในประเทศ จำเป็นต้องอาศัยการนำเข้า ที่มีราคาสูง อีกทั้งในปัจจุบันมีผู้ที่ประสบอุบัติเหตุ จนกระดูกหักมีมากขึ้น รวมถึงผู้สูงอายุ โดยเฉพาะสตรีที่เผชิญกับโรคกระดูกพรุน ทำให้มีความต้องการใช้วัสดุทดแทนกระดูกในปริมาณมาก จำเป็นต้องพัฒนาวัสดุเหล่านี้ เพื่อทดแทนการนำเข้า และเพื่อเป็นการพัฒนาที่ยั่งยืน

งานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมกลาสเซรามิก ที่มีส่วนประกอบของเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต ซึ่งเป็นวัสดุทางชีวภาพชนิดใหม่ ที่พัฒนาโดย รศ. ดร.จรัสศรี ลอประยูร และ Asst. Prof. Dr. Shigeki Morimoto (2004) อาจารย์สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และนำมาศึกษาเกี่ยวกับการมีปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกในอนาคต

## 1.1 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.1.1 เตรียมกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต
- 1.1.2 ศึกษาลักษณะเฉพาะของกลาสเซรามิก ที่เตรียมขึ้นในด้าน องค์ประกอบทางเคมี (แคลเซียมและฟอสฟอรัส) วัฏภาค และโครงสร้างจุลภาค
- 1.1.3 ศึกษาพฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิก ที่เตรียมขึ้นในด้านการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์

## 1.2 ขอบเขตการวิจัย

- 1.2.1 การเตรียมกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต ใช้การหลอมแก้วในระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  และระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5$  แล้วนำแก้วมาควบคุมความร้อนเพื่อทำให้เกิดการตกผลึกต่าง ๆ เพื่อให้ได้กลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต เป็นวัฏภาคหนึ่ง
- 1.2.2 การศึกษาลักษณะเฉพาะของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟตที่เตรียมขึ้น จำกัดที่องค์ประกอบทางเคมี วัฏภาค และโครงสร้างจุลภาคเท่านั้น
- 1.2.3 การเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ของกลาสเซรามิกที่เตรียมขึ้น จำกัดการศึกษาเฉพาะพฤติกรรมในหลอดแก้ว

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ได้กลาสเซรามิก ที่มีส่วนประกอบของเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟตที่เป็นวัสดุชีวภาพ ชนิดใหม่
- 1.3.2 ทราบลักษณะการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต
- 1.3.3 ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต
- 1.3.4 ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกชนิดใหม่ ๆ เพิ่มเติม
- 1.3.5 เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการสร้างวัสดุทดแทนกระดูกขึ้นภายในประเทศ ซึ่งสามารถทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ
- 1.3.6 ทำให้มีทางเลือกสำหรับการใช้วัสดุทดแทนกระดูกได้หลากหลาย ตามจุดประสงค์ของการใช้งาน
- 1.3.7 เป็นการเพิ่มศักยภาพในด้านการพัฒนาวัสดุของประเทศ

## บทที่ 2

### ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ไบโอแอคทีฟกลาส และ กลาสเซรามิก (Bioactive glass and glass-ceramics)

ไบโอแอคทีฟกลาส และ กลาสเซรามิกมีคุณลักษณะพิเศษคือสามารถเกิดพันธะกับเนื้อเยื่ออ่อนได้ดีทัดเทียมกับการเกิดพันธะกับกระดูก (Wilson, 1981) ในด้านการใช้งานถ้าวัสดุสามารถเกิดพันธะกับเนื้อเยื่ออ่อนหรือกระดูก จะเกิดการยึดเกาะกันแน่น ช่วยให้มีความเสถียร คุณสมบัติโดยทั่วไปของวัสดุที่เป็นไบโอแอคทีฟขึ้นกับชนิดของวัสดุ ภูมิภาค ขนาด และเวลา การเปลี่ยนแปลงของพื้นผิววัสดุจะเกิดขึ้นเมื่อฝังภายในร่างกาย ที่พื้นผิวจะเกิดชั้นของแอคทีฟลาร์บอนด์ที่มีไฮดรอกซีอะพาไทต์ ก่อให้เกิดพันธะที่เชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อ (Hench, 2004)

การเกิดพันธะกับกระดูกที่พบครั้งแรกในไบโอแอคทีฟกลาส ซึ่งมีส่วนประกอบของ  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  และ  $\text{P}_2\text{O}_5$  ที่มีสัดส่วนเฉพาะ (Hench, 1972) ซึ่งสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟกลาส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

	45S5 Bioglass	45S5F Bioglass	45S5.4F Bioglass	40S5B5 Bioglass	52S4.6 Bioglass	55S4.3 Bioglass
ส่วนประกอบทางเคมี (%)						
$\text{SiO}_2$	45.0	45.0	45.0	40.0	52.0	55.0
$\text{P}_2\text{O}_5$	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
$\text{CaO}$	24.5	12.25	14.7	24.5	21.0	19.5
$\text{CaF}_2$	-	12.25	9.8	-	-	-
$\text{Na}_2\text{O}$	24.5	24.5	24.5	24.5	21.0	19.5
$\text{B}_2\text{O}_3$	-	-	-	5.0	-	-
แหล่งอ้างอิง	Hench et al. (1972)	Hench et al. (1972)	Hench et al. (1972)	Hench et al. (1972)	Hench et al. (1972)	Hench et al. (1972)

หมายเหตุ : จากหนังสือ Biomaterials Science (An Introduction to Materials in Medicine 2<sup>nd</sup> edition)

โดย Buddy D. Ratner และคณะ, 2004, United States of America: Elsevier Academic Press.

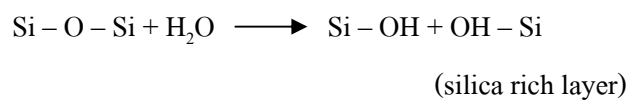
จากรายงานของ Hench และคณะ (1972) องค์ประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟกลาสนั้นแตกต่างจากของแก้วธรรมดา ซึ่งเป็นโซดาแลมกลาส ไบโอแอคทีฟกลาส มี SiO<sub>2</sub> ร้อยละ 45-55, CaO ร้อยละ 12.25-24.5, Na<sub>2</sub>O ร้อยละ 19.5-24.5, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ร้อยละ 6.0 ในบางครั้งเติม CaF<sub>2</sub> ร้อยละ 9.8-12.25 และ B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ร้อยละ 0-5.0 โดยสรุปข้อแตกต่างมี 3 ประการดังนี้

- 1) มีปริมาณ SiO<sub>2</sub> น้อยกว่า ร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก
- 2) มีปริมาณ Na<sub>2</sub>O และ CaO มากกว่าในแก้วธรรมดา
- 3) มีอัตราส่วนระหว่าง CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> สูง

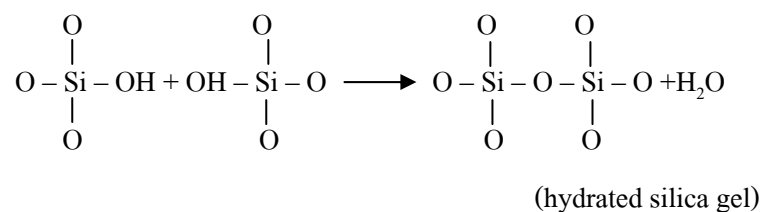
การที่มีปริมาณ Na<sub>2</sub>O และ CaO สูง จึงทำให้พื้นที่ผิวเกิดปฏิกิริยากับสารละลายได้ง่ายขึ้น สำหรับพันธะที่เกิดขึ้นนั้นเกิดโดยปฏิกิริยาเคมีระหว่างแก้วกับของเหลวในร่างกาย มีผลทำให้เกิดชั้นของไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ซึ่งกระดูกสามารถสร้างพันธะด้วยได้ Hench (1993) กล่าวว่า สำหรับการแช่ไบโอแอคทีฟกลาสในสารละลายจะเกิดปฏิกิริยาขึ้น 3 แบบ คือ

1) การชะล้าง (leaching) เป็นการเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอออน H<sup>+</sup> หรือ H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> กับ โลหะอัลคาไล หรืออัลคาไลน์เอิร์ธ ทำให้ค่าความเป็นเบสเพิ่มมากกว่า 7.4 ซึ่งเป็นค่าที่ควบคุมไว้

2) การละลายของแก้ว (network dissolution) โดยการแตกตัวของพันธะ -O-Si-O- และ ปล่อย Si ลงในสารละลาย ในรูปของ Si(OH)<sub>4</sub> โดยกล่าวว่าอัตราการละลายเร็วยิ่งขึ้น หากในแก้วมี SiO<sub>2</sub> น้อยกว่าร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก ต่อมาคือสมการการเกิด SiOH (silanols) ที่รอยต่อระหว่างแก้ว และสารละลายเกิดเป็นบริเวณที่มีซิลิกาสูง



และเกิดการจับตัวกันเป็นเจล ดังสมการ



3) การตกตะกอน (precipitation) โดย  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{PO}_4^{3-}$  ที่มีอยู่ในเนื้อแก้ว และจากสารละลาย (body fluid) จะเกาะกันบนบริเวณที่มีซิลิกาสูงและมีสถานะเป็นเจล ทำปฏิกิริยากันได้อัญรูปของแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งภายหลังกลายเป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่มี  $\text{CO}_3^{2-}$  จากสารละลายร่วมอยู่ด้วย

นอกจากการใช้ไบโอแอคทีฟกลาสแล้ว ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับกลาสเซรามิก ในเวลาต่อมา Gross และ Strunz (1985) และ Gross และคณะ (1988) ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อการเติมโลหะอัลคาไลในปริมาณน้อย ๆ (ร้อยละ 0-5 โดยน้ำหนัก) ลงในไบโอแอคทีฟซิลิกากลาสเซรามิก (Ceravital) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 ก็สามารถเกิดพันธะกับกระดูกได้เช่นเดียวกัน กลุ่มนักวิจัยยังพบว่า การเติม  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  หรือ  $\text{ZrO}_2$  ลงไปในส่วนประกอบจะสามารถทำให้เกิดพันธะกับกระดูกได้เช่นกัน นอกจากนี้ Kokubo และคณะ (1982) ได้ทำกลาสเซรามิกชนิดซิลิกาฟอสเฟตที่ประกอบไปด้วย อะพาไทต์  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F})_2]$  ผลึกวอลลาสโตไนต์ (wollastonite crystal) ( $\text{CaO}$ ,  $\text{SiO}_2$ ) และส่วนที่เป็นซิลิกากลาสเมทริกซ์ หรือที่เรียกกลาสเซรามิกนี้ว่า เอ ดับบลิว กลาสเซรามิก (A-W glass-ceramic) (Nakamura et al.,1985; Yamamura et al.,1990; Kokubo, 1993) ก็สามารถเกิดพันธะกับกระดูกได้

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟกลาสเซรามิก (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

	KGC Ceravital	KGS Ceravital	KGy213 Ceravital	A-W GC
ส่วนประกอบทางเคมี (%)				
$\text{SiO}_2$	46.2	46	38	34.2
$\text{P}_2\text{O}_5$	-	-	-	16.3
$\text{CaO}$	20.2	33	31	44.9
$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	25.5	16	13.5	-
$\text{CaF}_2$	-	-	-	0.5
$\text{MgO}$	2.9	-	-	4.6
$\text{Na}_2\text{O}$	4.8	5	4	-
$\text{K}_2\text{O}$	0.4	-	-	-
$\text{Al}_2\text{O}_3$	-	-	7	-
$\text{Ta}_2\text{O}_5/\text{TiO}_2$	-	-	6.5	-

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ส่วนประกอบทางเคมีของไบโอเอกซิมพลาสเซรามิก (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

	KGC Ceravital	KGS Ceravital	KGy213 Ceravital	A-W GC
แหล่งอ้างอิง	Gross et al. (1998)	Gross et al. (1998)	Gross et al. (1998)	Nakamura et al. (1993)

หมายเหตุ : จากหนังสือ Biomaterials Science (An Introduction to Materials in Medicine 2<sup>nd</sup> edition)

โดย Buddy D. Ratner Allan S. Hoffman Frederick J. Schoen และ Jack E. Lemons, 2004,

United States of America: Elsevier Academic Press.

## 2.2 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ เป็นความสามารถของวัสดุที่มนุษย์พัฒนาขึ้น ที่คงอยู่ได้ภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตในช่วงเวลาหนึ่ง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ วัสดุทุกชนิดที่นำมาใช้เป็นวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์นั้นล้วนแล้วแต่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ แต่จะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับประเภทการใช้งาน คำว่าความเข้ากันได้ทางชีวภาพจะครอบคลุมคุณสมบัติค่อนข้างกว้าง ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

1) วัสดุสามารถมีพันธะยึดเกาะกัน โดยวัสดุจะต้องสามารถมีพันธะยึดเกาะกับส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

2) วัสดุมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตผิดปกติ

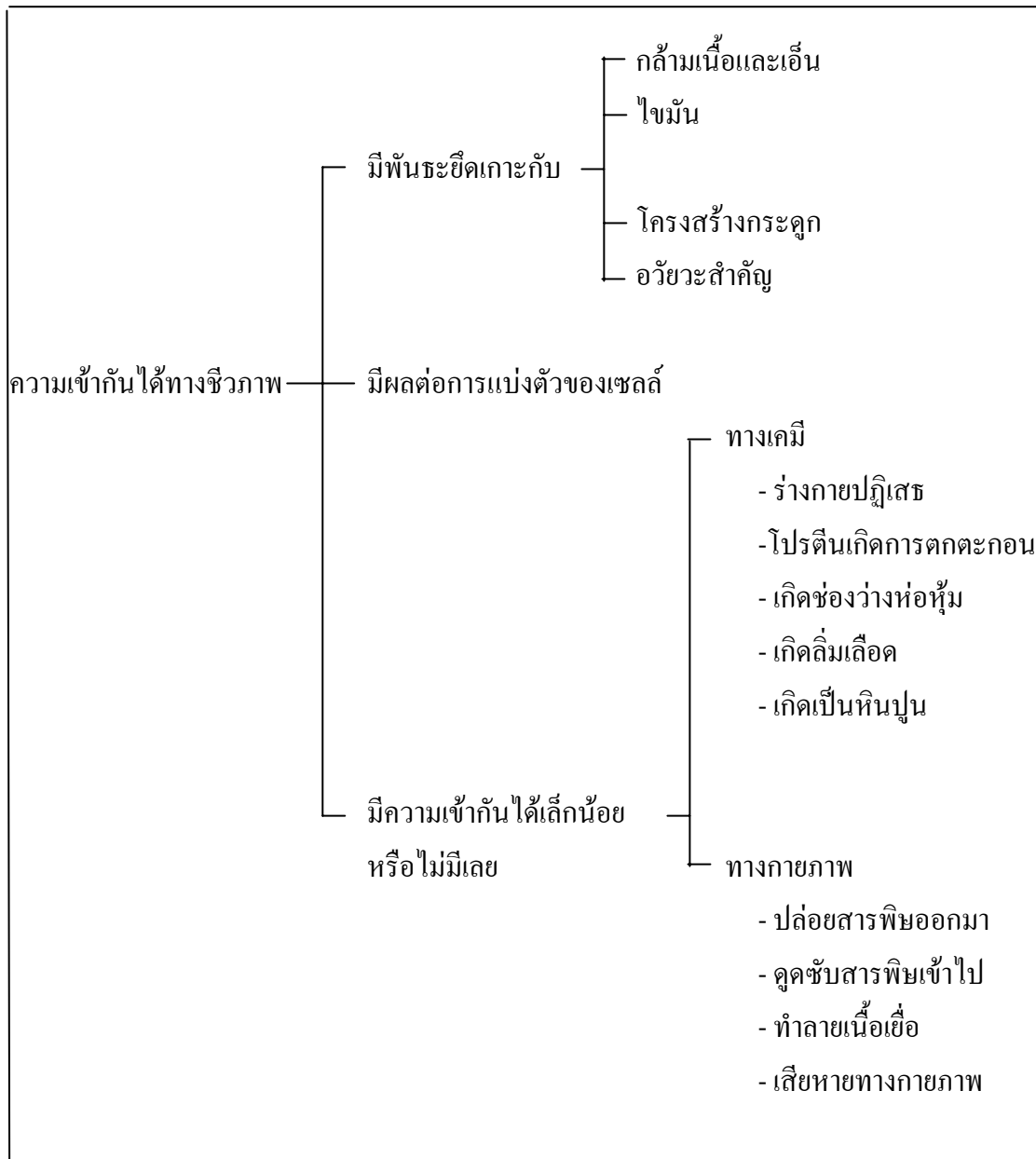
3) วัสดุมีความเข้ากันได้เล็กน้อยหรือไม่มีเลย ซึ่งวัสดุจะส่งผล 2 วิธีคือ

- ทางเคมี

- ทางกายภาพ

โดยสามารถแสดงลักษณะของความเข้ากันได้ทางชีวภาพรูปที่ 2.1





หมายเหตุ : จากหนังสือ Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices โดย David Hill, 1998, England, John Wiley & Sons Ltd.

รูปที่ 2.1 แผนภูมิแสดงลักษณะของความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ

สมบัติของวัสดุที่เกี่ยวข้องกับความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้น ยังรวมไปถึงความเฉื่อยทางเคมี ความเป็นพิษ การเกิดลิ่มเลือด และต่อต้านการยึดเกาะ เพื่อช่วยในการพิจารณาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุหรือผลิตภัณฑ์นั้นหน่วยงานที่เกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ทางการแพทย์

(Medical Device Agency, MDA) ได้กำหนดคำแนะนำในการพิจารณาไว้ว่าต้องระบุข้อมูลที่เกี่ยวข้องดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คำแนะนำในการพิจารณาวัสดุหรือผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

ข้อมูลที่ต้องการ	รายละเอียดที่ต้องระบุ
ลักษณะของวัสดุ	โครงสร้าง องค์ประกอบทางเคมี มลทิน องค์ประกอบที่เป็นพิษ ขนาด รูปร่าง และระยะเวลาในการใช้งาน
รายละเอียดเกี่ยวกับการใช้งานวัสดุย้อนหลัง	รายงานผลการใช้งานย้อนหลัง รายละเอียดของผลที่เกิดขึ้นจากการใช้งาน และเอกสารพิสูจน์ถึงความเหมาะสมต่อการใช้งาน
ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษ	การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ โดยใช้วิธีสัมผัสโดยตรงกับเนื้อเยื่อในร่างกาย และการทดสอบความเป็นพิษ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐาน ISO 10993-1:1992 (Guidance on Selection of Test for Biological Evaluation)

หมายเหตุ : จากหนังสือ Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices โดย David Hill, 1998, England, John Wiley & Sons Ltd.

หลังจากนั้นจึงทำการประเมินผลขั้นสุดท้าย โดยนำข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้รวบรวมตามตารางข้างต้นมาทำการสรุปผล

ในการที่จะยืนยันว่าวัสดุนั้น ๆ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จะต้องมีการทดสอบต่าง ๆ หลายประการ ซึ่งจะต้องเป็นไปตามมาตรฐาน ISO 10993-1 โดยรายละเอียดที่ต้องทดสอบมีดังนี้

- 1) การกลายพันธุ์ของยีน (mutagenicity)
- 2) ความเป็นพิษที่ส่งผลกระทบต่อร่างกายทั้งระบบ (acute systemic toxicity)
- 3) ความเป็นพิษในกรณีที่ได้รับประทานเข้าไป (oral toxicity)
- 4) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)
- 5) ความไวต่อปฏิกิริยา (sensitization)
- 6) การแพ้ที่ก่อให้เกิดอาการคัน (irritation)
- 7) การปลูกถ่ายในร่างกาย (implantation) เป็นต้น

แต่เมื่อไม่กี่ปีมานี้ทิศทางการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพได้เปลี่ยนแปลงออกโดยจะพิจารณา 2 ประการคือ ความปลอดภัย และการทำงานของผลิตภัณฑ์ในร่างกาย (Hill,1998) ซึ่งมีหัวข้อการพิจารณาดังนี้

ตารางที่ 2.4 หัวข้อการพิจารณาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ

หัวข้อในการพิจารณา	รายละเอียดที่ต้องพิจารณา	รายละเอียดย่อย
ความปลอดภัย	1) ความเป็นพิษต่อเซลล์  2) Carcinogenesis 3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ	- ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ที่ถูกทำลาย - ขนาดและจำนวนเซลล์ขณะเจริญเติบโต - ปริมาณเซลล์ที่ถูกทำลายในช่วงเวลาหนึ่ง - อัตราเมแทบอลิซึมของเซลล์
การทำงาน	1) การยึดเกาะของเซลล์ คุณลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กับวัสดุ 2) การเจริญเติบโตของเซลล์ 3) การปกคลุมของเซลล์ ว่าจะมีเซลล์ขึ้นปกคลุมวัสดุหรือไม่	

หมายเหตุ : จากหนังสือ Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices โดย David Hill, 1998, England, John Wiley & Sons Ltd.

## 2.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเป็นการทดสอบในเบื้องต้นของความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐาน ISO 10993-5 (Test for Cytotoxicity : In Vitro methods) ซึ่งสามารถดูรายละเอียดได้ในภาคผนวก ก โดยเมื่อทดสอบตามกระบวนการที่กำหนดแล้ว ผลที่ได้

จะถูกนำมาให้คะแนนตามตารางที่ 2.5 เพื่อพิจารณาผลของการใช้วัสดุนั้นว่าเป็นพิษหรือไม่ หรือเป็นพิษเพียงใด

ตารางที่ 2.5 เกณฑ์การให้คะแนนสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

คะแนน	ความหนาแน่นของเซลล์	จำนวนเซลล์ที่ลอย	เซลล์ที่ไม่มี การเจริญเติบโต	การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์
0	100%	0%	0-10%	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
1	90-100%	0-5%	10-30%	มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยมาก
2	60-90%	5-10%	30-50%	มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย
3	30-60%	10-20%	50-70%	มีการเปลี่ยนแปลงปานกลาง
4	0-30%	> 20%	70-100%	มีการเปลี่ยนแปลงมาก

หมายเหตุ : จากบทความ Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymer : effect of several additives and processing conditions โดย M.E. Gomes, R.L. Reis, A.M. Cunha, C.A. Blitterswijk และ J.D. de Bruijn, 2001

หลังจากให้คะแนนตามเกณฑ์ในตารางที่ 2.5 แล้ว จะนำคะแนนที่ได้มารวมกันแล้วเทียบกับ Cytotoxicity Index ซึ่งจะมีช่วงคะแนนระหว่าง 0 ถึง 8 ซึ่งจะมีเกณฑ์ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.6 การจัดกลุ่มของปฏิกิริยาที่มีต่อเซลล์

Cytotoxicity Index	ปฏิกิริยาต่อเซลล์
0-1	ไม่เป็นพิษ
1-3	เป็นพิษน้อยมาก
3-5	เป็นพิษเล็กน้อย
5-7	เป็นพิษปานกลาง
7-8	เป็นพิษรุนแรง

หมายเหตุ : จากบทความ Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymer : effect of several additives and processing conditions โดย M.E. Gomes, R.L. Reis, A.M. Cunha, C.A. Blitterswijk และ J.D. de Bruijn, 2001

ถ้าได้คะแนนในช่วง 0 ถึง 3 ถือว่าผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ถ้าได้คะแนนในช่วง 3 ถึง 5 จะต้องทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง แต่ถ้าได้คะแนนตั้งแต่ 5 ขึ้นไป ถือว่าวัสดุนั้น ๆ ไม่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

## 2.4 การศึกษาไบโอแอคติวิตีของวัสดุ

ในการศึกษาไบโอแอคติวิตีของวัสดุจะมีการศึกษาแยกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาในหลอดแก้ว (*In vitro* study) และการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*In vivo* study) ตามปกติต้องทำการศึกษาในหลอดแก้วก่อน เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนการนำไปใช้ในสัตว์ทดลอง ซึ่งการศึกษาวัสดุในหลอดแก้วนั้นมีหลักการดังนี้ นำวัสดุมาไว้ในสภาวะจำลองทางชีวภาพของร่างกายในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับวัสดุ ทั้งทางด้านเคมี ทางกายภาพ และโครงสร้างจุลภาค ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าวัสดุอยู่ในประเภทใด (ค่อนข้างเฉื่อย ไบโอแอคทีฟ หรือละลายเมื่ออยู่ในร่างกาย) เพื่อที่จะช่วยในการทำนายผลที่จะเกิดขึ้นเมื่อนำมาทดสอบในสัตว์ หลังจากนั้นจึงจะนำวัสดุนั้น ๆ มาศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่าย ลิง เป็นต้น โดยศึกษาในผลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้น ๆ และศึกษาผลในระยะยาว ผลการศึกษาเหล่านี้จะเป็นตัวช่วยในการตัดสินใจว่าวัสดุนั้น ๆ เหมาะสมกับการใช้งานประเภทใด

## 2.5 สารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ (Simulated Body Fluid, SBF)

สารละลาย SBF เป็นสารละลายที่ผสมขึ้นมาให้มีปริมาณความเข้มข้นของไอออนที่ใกล้เคียงกับพลาสมาในเลือดของมนุษย์ เพื่อใช้สำหรับการทดสอบความเป็นไบโอแอคติวิตีของวัสดุที่ประดิษฐ์ขึ้น เมื่อเลือกการศึกษาทดลองแบบ *In vitro* สารละลาย SBF นี้มีการพัฒนาขึ้นหลายสูตรดังนี้

- 1) สารละลาย SBF ดั้งเดิม (conventional-SBF, c-SBF)
- 2) Revised –SBF, r-SBF
- 3) Ionized-SBF, i-SBF
- 4) Modified-SBF, m-SBF

ซึ่งสารละลายในข้อ 2 ถึง 4 นี้ เป็นการนำเอาสารละลาย SBF ดั้งเดิม มาปรับปรุงใหม่ เพื่อให้มีปริมาณไอออนของ  $Cl^-$  และ  $HCO_3^-$  ใกล้เคียงกับพลาสมาของเลือดมนุษย์มากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม SBF ที่ปรับปรุงใหม่เหล่านี้ ยังไม่มีความเสถียรเท่ากับสารละลาย SBF ดั้งเดิม (Oyane, 2002) โดยสารละลาย SBF แต่ละตัวจะมีปริมาณไอออนต่าง ๆ ดังที่แสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 สรุปความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย SBF ชนิดต่าง ๆ เทียบกับพลาสมาของ  
เลือดมนุษย์

ไอออน	ความเข้มข้น (mM)				
	พลาสมา	c-SBF	r-SBF	i-SBF	m-SBF
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0	142.0	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5	1.5	1.0	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5	2.5	1.6	2.5
Cl <sup>-</sup>	103.0	147.8	103.0	103.0	103.0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27.0	4.2	27.0	27.0	10.0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการค้นคว้าพบว่าม้งานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ของวัสดุทางชีวภาพ ซึ่งสามารถรวบรวมดังตารางที่ 2.8 – 2.10

ตารางที่ 2.8 งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแคลเซียมฟอสเฟตกลาสเซรามิก

กลุ่มนักวิจัย	ระบบแก้ว	วิฤภาคของกลาสเซรามิก	เรื่องที่ศึกษาและรายละเอียด	ผลการศึกษา
A.J. Salinas และคณะ (2000)	$3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 - \text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ – $\text{CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$	อะพาไทต์ (apatite) ไดออพไซด์ (diopside) อัลทาชไซด์ (althausite) อะเคอมาไนต์ (akermanite)	นำชิ้นงาน 3 ชนิด คือ กลาส กลาสเซรามิก และกลาสเซรามิก ที่ผ่านการกัดด้วยกรดไฮโดร- คลอริก มาแช่ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน, 7 วัน และ 6 สัปดาห์	- ชิ้นงานที่เป็นกลาส จะเกิดชั้น ของแคลเซียมฟอสเฟตชั้นที่ ผิวที่เวลาน้อยกว่า 7 วัน - ชิ้นงานที่เป็นกลาสเซรามิกไม่ พบชั้นของแคลเซียมฟอสเฟต ที่ผิวหน้าแต่อย่างใด แม้เวลา ผ่านไป 6 สัปดาห์ - กลาสเซรามิกที่กัดด้วยกรด นั้น จะพบชั้นของแคลเซียม- ฟอสเฟตที่ผิวบางส่วน หลังจากแช่ใน SBF แล้ว 4 วัน ส่วนบริเวณผิวหน้าที่เหลือ จะพบชั้นของแคลเซียม- ฟอสเฟตเพิ่มในปริมาณ เล็กน้อยภายหลังจากผ่านไป 7 วัน

ตารางที่ 2.8 งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแคลเซียมฟอสเฟตกลาสเซรามิก (ต่อ)

กลุ่มนักวิจัย	ระบบแก้ว	วิฏภาคของกลาสเซรามิก	เรื่องที่ศึกษาและรายละเอียด	ผลการศึกษา
Yong Zhang และคณะ (2001)	CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -TiO <sub>2</sub> -MgO-Na <sub>2</sub> O	$\beta$ -Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> CaTi <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> NaTi <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	นำชิ้นงานมาแช่ในสารละลาย c-SBF ที่อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส pH 7.25 เป็นเวลา 1, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์	จะพบอัญรูปของอะพาไทต์ที่ผิวหน้าชิ้นงานที่เวลา 4 สัปดาห์
M.F. Barba และคณะ (2003)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -CaO-SiO <sub>2</sub> -K <sub>2</sub> O	$\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> $\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ca <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	นำชิ้นงานมาแช่ในน้ำสารละลายแอมโมเนียมซีเทรต สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตท และสารละลายกรดซัลฟิวริก เป็นเวลา 7 วัน	พบว่าอัตราการละลายของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในกลาสเซรามิกแตกต่างกันคือ $\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> > $\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> > Ca <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>9</sub>
Melba Navarro และคณะ (2004)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -CaO-Na <sub>2</sub> O-TiO <sub>2</sub>	แคลเซียม เมตาฟอสเฟต ไพโรฟอสเฟต	นำชิ้นงานมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่เวลา 1-6 วัน	กลาสเซรามิกชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์



ตารางที่ 2.9 งานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ

กลุ่มนักวิจัย	ชนิดของชิ้นงาน	เรื่องที่ศึกษาและรายละเอียด	ผลการศึกษา
Xiao-Xiang Wang และคณะ (1999)	ไททาเนียม มาแช่ด้วย H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และ NaOH	แช่ชิ้นงานในสารละลาย c-SBF ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะ ควบคุมการสัมผัสกับภาวะของชิ้นงาน เพื่อศึกษาชิ้นงานทั้งสองที่มีการสัมผัสกับ ภาวะและไม่มีการสัมผัสกับภาวะ เป็น เวลา 7 วัน	- ชิ้นงานไทเทเนียมที่แช่ด้วย H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> จะ พบการตกตะกอนของอะพาไทต์ทั้ง ชิ้นงานที่มีการสัมผัสกับภาวะ และ ชิ้นงานที่ไม่ได้สัมผัสกับภาวะ - ชิ้นงานไทเทเนียมที่แช่ด้วย NaOH จะเกิดการตกตะกอนของอะพาไทต์ เฉพาะที่ชิ้นงานที่สัมผัสกับภาวะ
Punnama Siriphannon และคณะ (1999)	แคลเซียมซิลิเกต	ศึกษาผลของขนาดผลึกของแคลเซียม ซิลิเกตที่มีต่อปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อม ทางชีวภาพ โดยนำชิ้นงานแคลเซียม ซิลิเกตที่มีขนาดผลึกแตกต่างกันมาแช่ใน สารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 36.5 องศา เซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ กัน	ชิ้นงานแคลเซียมซิลิเกตที่มีผลึกขนาด เล็กจะเกิดการตกผลึกของไฮดรอกซี อะพาไทต์ ได้เร็วกว่าชิ้นงานแคลเซียม ซิลิเกตที่มีผลึกขนาดใหญ่ เนื่องจาก ผลึกที่มีขนาดเล็กสามารถละลายได้ง่าย กว่า ทำให้มีแคลเซียมไอออนไปรวมตัว กับไอออนต่าง ๆ ในสารละลาย SBF แล้วเกิดการตกผลึกได้เร็วกว่า

ตารางที่ 2.9 งานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ (ต่อ)

กลุ่มนักวิจัย	ชนิดของชิ้นงาน	เรื่องที่ศึกษาและรายละเอียด	ผลการศึกษา
Kimiyasu Sato และคณะ (1999)	ออร์แกนิก โมโนเลเยอร์ฟิล์ม (organic monolayer film) ที่ประกอบด้วยกลุ่มของคาร์บอกซิล (carboxyl)	นำชิ้นงานมาแช่ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส pH 7.4 ที่เวลา 1 ชั่วโมง, 1 วัน และ 10 วัน	ที่บริเวณผิวของโมโนเลเยอร์ฟิล์มจะพบพันธะระหว่างคาร์บอกซิลกับแคลเซียมไอออน หลังจากแช่ SBF แล้ว 1 ชั่วโมง และเมื่อเวลาในการแช่ SBF เพิ่มขึ้น (10 วัน) จะพบอณูรูปของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผิวของฟิล์ม
Yasuhiko Seki และคณะ (1999)	สตรอนเทียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (SrHAp; $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )	นำชิ้นงาน 3 ชิ้นมาแช่ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง, 1 วัน, 3 วัน และ 5 วัน	ผลการศึกษาพบว่ามีไฮดรอกซีไอออนเกิดขึ้น แต่มีปริมาณน้อยกว่าแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์

ตารางที่ 2.10 งานวิจัยที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธีสัมผัส โดยตรง

กลุ่มนักวิจัย	ชนิดของชิ้นงาน	เรื่องที่ศึกษาและรายละเอียด	ผลการศึกษา
C.G. Frondoza และคณะ (1998)	<p>นำเอาวัสดุที่ได้จากกระดูกวัว โดยการเตรียมชิ้นงานดังนี้</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ชิ้นงานที่ 1 ล้างสารอินทรีย์ออกจากชิ้นงาน</li> <li>- ชิ้นงานที่ 2 กำจัดสารอินทรีย์ที่อยู่ในชิ้นงานออกให้หมด</li> <li>- ชิ้นงานที่ 3 กำจัดสารอินทรีย์ออกให้หมด จากนั้นนำมาเผาที่อุณหภูมิ 950 องศาเซลเซียส</li> <li>- ชิ้นงานที่ 4 นำชิ้นงานที่กำจัดสารอินทรีย์ออกแล้ว แล้วนำมาแช่ในสารละลาย NaF จากนั้นนำมาเผาที่อุณหภูมิ 950 องศาเซลเซียส</li> </ul>	<p>นำชิ้นงานมาใส่บนเซลล์กระดูกมนุษย์ (MG63) ที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์</p>	<p>ชิ้นงานที่เตรียมขึ้นทั้งสี่ชนิดนั้น เซลล์สามารถสามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีสภาพสมบูรณ์</p>

ตารางที่ 2.10 งานวิจัยที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธีสัมผัสโดยตรง (ต่อ)

กลุ่มนักวิจัย	ชนิดของชิ้นงาน	เรื่องที่ศึกษาและรายละเอียด	ผลการศึกษา
J. Elbel และคณะ (1998)	นำชิ้นงานเซรามิกส์ คือไททานีเซรามิกส์, อะลูมินาเซรามิกส์ และแก้ว มาเคลือบด้วยไททานี โดยวิธี sol-gel	นำชิ้นงานทั้ง 3 ชนิดมาใส่ลงบนเซลล์ที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู (M199) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และ ความชื้น 95% เป็นเวลา 9 วัน	การที่เคลือบผิวชิ้นงานด้วยไททานีบนผิวเซรามิกส์ทั้งสามชนิดนั้น มีผลกระทบที่มีต่อการเจริญเติบโต และสภาพของเซลล์เหมือนกัน คือเซลล์ยังคงมีรูปร่างเหมือนเดิม แต่เซลล์ไม่มีการแพร่กระจาย หรือกล่าวได้ว่าเซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต
M.E. Gomes และคณะ (2001)	พอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด กับเอทิลีนไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด เอทิลีนไวนิลแอลกอฮอล์ และไฮดรอกซีอะพาไทต์	นำชิ้นงานมาใส่ลงบนเซลล์ที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L-929) และเซลล์กระดูกมนุษย์ (HOS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 1-3 วัน	พบว่าชิ้นงานพอลิเมอร์ที่มีไฮดรอกซีอะพาไทต์ มีการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า ชิ้นงานพอลิเมอร์ที่มีเฉพาะส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด กับเอทิลีนไวนิลแอลกอฮอล์

ตารางที่ 2.11 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไบโอแอคติวิตีและความเป็นพิษ

วัสดุ	ไบโอแอคติวิตี	ความเป็นพิษ
<u>เซรามิกส์</u>		
- แคลเซียมซิลิเกต	/	-
- สตรอนเทียมไฮดรอกซีอะพาไทต์	/	-
- ไททานีเซรามิกส์	-	X
- อะลูมินาเซรามิกส์	-	X
- แก้วที่เคลือบด้วยไททานีเซ	-	X
<u>กลาสเซรามิก</u>		
- $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO}\cdot\text{SiO}_2\text{-CaO}\cdot\text{MgO}\cdot 2\text{SiO}_2$	/	-
- $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-TiO}_2\text{-MgO-Na}_2\text{O}$	/	-
- $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-SiO}_2\text{-K}_2\text{O}$	/	-
- $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$	-	/
<u>พอลิเมอร์</u>		
- ออแกนิก โมโนเลเยอร์ฟิล์ม	/	-
- พอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด กับเอทิลีน ไวนิลแอลกอฮอล์	-	/
- พอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด กับเอทิลีน ไวนิลแอลกอฮอล์ และไฮดรอกซีอะพาไทต์	-	/
<u>โลหะ</u>		
- ไทเทเนียมที่แช่ด้วย $\text{H}_2\text{O}_2$	/	-
- ไทเทเนียมที่แช่ด้วย NaOH	/	-
<u>วัสดุที่ได้จากธรรมชาติ</u>		
- กระจุกวุ้นที่ผ่านการล้างอินทรีย์สาร	-	/
- กระจุกวุ้นที่ผ่านการกำจัดอินทรีย์สาร	-	/
- กระจุกวุ้นที่ผ่านการกำจัดอินทรีย์สารแล้ว นำมาเผาที่อุณหภูมิ 950 องศาเซลเซียส	-	/
- กระจุกวุ้นที่ผ่านการกำจัดอินทรีย์สาร, แช่ใน NaF และเผาที่อุณหภูมิ 950 องศาเซลเซียส	-	/

หมายเหตุ : เครื่องหมาย / หมายถึง ทดสอบแล้วมีสมบัติดังกล่าว, เครื่องหมาย X หมายถึง ทดสอบแล้ว

ไม่มีสมบัติดังกล่าว และ เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ได้ทดสอบสมบัตินั้น ๆ

จากการศึกษาครั้งนี้ได้พบว่าวัสดุที่เกี่ยวข้องได้แก่ผลงานของ Yong Zhang และคณะ (2001) และผลการศึกษาพบว่าอัญรูปของอะพาไทต์จะพบที่บริเวณผิวหน้าของชิ้นงานเมื่อแช่ชิ้นงานใน SBF เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่ผลงานที่ศึกษาวิจัยนี้มีความแตกต่างกันในส่วนของผลึกที่เป็นส่วนประกอบของกลาสเซรามิก จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบในเรื่องไบโอแอคติวิตีและความเป็นพิษต่อเซลล์

### บทที่ 3

## วัสดุและวิธีการทดลอง

### 3.1 อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง วิเคราะห์และทดสอบสมบัติทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	ผู้ผลิต (แบบ/รุ่น)
ตู้อบ	ELE International (model SDO 225E1)
เตาหลอมแก้ว	Elite (model BEB17/5-2416+2116)
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	Cambridge Process controls 401 plus
เครื่องขัดชิ้นงานแบบจานหมุน	Ecomet
เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Cleaner)	CREST
เครื่องตัดใบตัดเพชรความเร็วสูง	BUEHLER (ISOMET 1000)
เครื่อง X-ray Diffractometer, XRD	Bruker (AXS model 5005)
เครื่องทำระเหยสุญญากาศ (Vacuum Evaporator)	JEOL(JEE400)
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)	JEOL (JSM-6400)
ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ	ISOTEMP® VACUUM OVEN (model 282A)
ตู้นิรภัยสำหรับปฏิบัติงานด้านชีวภาพ	BIO CLEAN BENCH SANYO (model MCV-13BSF)
CO <sub>2</sub> incubator	SHEL LAB
กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic)	Nikon (TMS)
เตาอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Gallenkamp

### 3.2 วัสดุและสารเคมี

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แสดงได้ดังตารางที่ 3.2 -3.5

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมของแก้วที่ใช้ศึกษา (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

ออกไซด์ (สารเคมีที่ใช้)	ผู้ผลิต/เกรด	ชิ้นงานที่ C1	ชิ้นงานที่ C2
SiO <sub>2</sub> (SiO <sub>2</sub> )	Carlo Erba/reagent grade	4.671	-
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Carlo Erba/reagent grade	14.721	6.926
CaO (CaCO <sub>3</sub> )	Carlo Erba/reagent grade	18.684	26.031
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Unilab/reagent grade	7.732	7.882
Na <sub>2</sub> O (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Unilab/reagent grade	6.683	7.719
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Carlo Erba/reagent grade	47.309	51.442

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย c-SBF (Oyane, 2002) ที่มีปริมาณ ไอออนใกล้เคียง  
กับเลือดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารเคมี	ผู้ผลิต/เกรด	ความบริสุทธิ์	ปริมาณที่ใช้
NaCl	Carlo Erba /lab grade	99.5	8.036 กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	Fisher Chemical/ lab grade	99.5	0.352 กรัม
KCl	Carlo Erba /lab grade	99.5	0.225 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	Univar /lab grade	99.0	0.230 กรัม
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Univar /lab grade	98.0	0.311 กรัม
1.0 M-HCl	Carlo Erba /lab grade	-	40 มิลลิลิตร
CaCl <sub>2</sub>	Unilab /lab grade	95.0	0.293 กรัม
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Unilab /lab grade	99.0	0.072 กรัม
Tris(hydroxymethyl)- aminomethane	Fisher Chemical/ lab grade	99.9	6.063 กรัม
1.0 M-HCl	Carlo Erba /lab grade	-	≈ 0.2 มิลลิลิตร



ตารางที่ 3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ

วัสดุอุปกรณ์	คำอธิบาย
ขวดสีชาขนาด 50 มิลลิลิตร	ทำจากไฮเดนซิติโพลีเอทิลีนของบริษัท Nalgene
แผ่นไฮเดนซิติโพลีเอทิลีน	ตัดจากขวดไฮเดนซิติโพลีเอทิลีนขนาด 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Nalgene
บีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร	เป็นบีกเกอร์ทนความร้อนของ pyrex

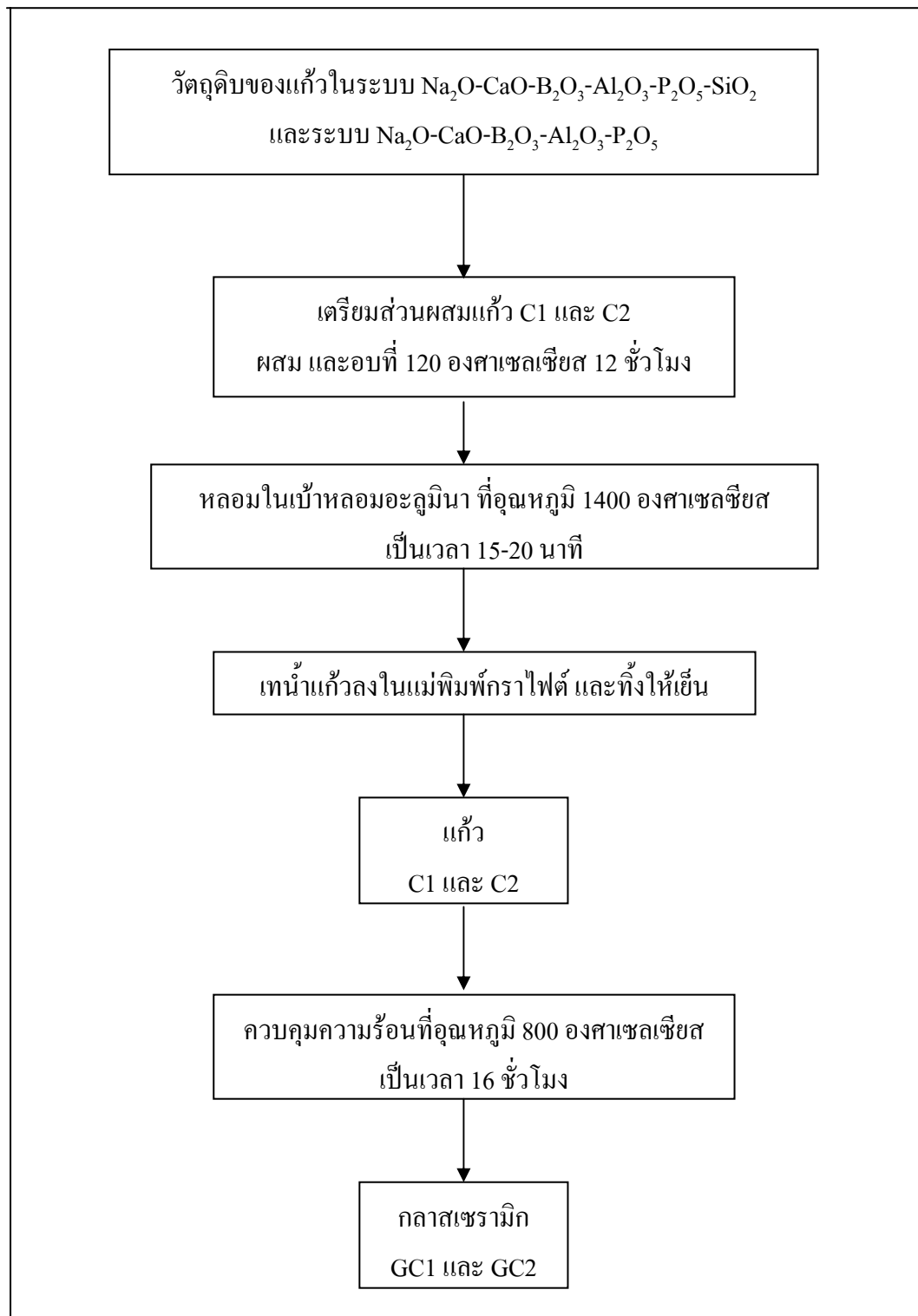
ตารางที่ 3.5 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

วัสดุอุปกรณ์	คำอธิบาย
เซลล์ (L-929)	เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหนู โดยเริ่มต้นจะอยู่ในสภาพแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว
ถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม	ใช้เลี้ยงเซลล์ในขั้นตอนทดสอบความเป็นพิษ
ขวดเพาะเชื้อขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (culture flask)	ใช้เลี้ยงเซลล์ในขั้นตอนก่อนทดสอบความเป็นพิษ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์
หลอดดูดสาร	ใช้ดูดสารละลาย และสารต่าง ๆ
หลอดดูดสารแบบใช้แล้วทิ้ง ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร	ใช้ดูดสารละลาย และสารต่าง ๆ
ตะกั่วออกไซด์	ใช้เป็นชิ้นงานควบคุมเชิงบวกซึ่งชิ้นงานนี้จะ เป็นพิษต่อเซลล์
ไฮดรอกซีอะพาไทต์	ใช้เป็นชิ้นงานควบคุมเชิงลบซึ่งชิ้นงานนี้จะไม่ เป็นพิษต่อเซลล์
MEM (Minimum Essential Medium)	ใช้เป็นสารอาหารให้แก่เซลล์ ผลิตโดยบริษัท Gibco cat no. 11095-80
PBS (Phosphate Buffered Saline)	เป็นสารละลายที่ใช้ในการล้างเซลล์
Penicillin/streptomycin	เป็นยาปฏิชีวนะใช้ใส่ใน media เพื่อฆ่าเชื้อ

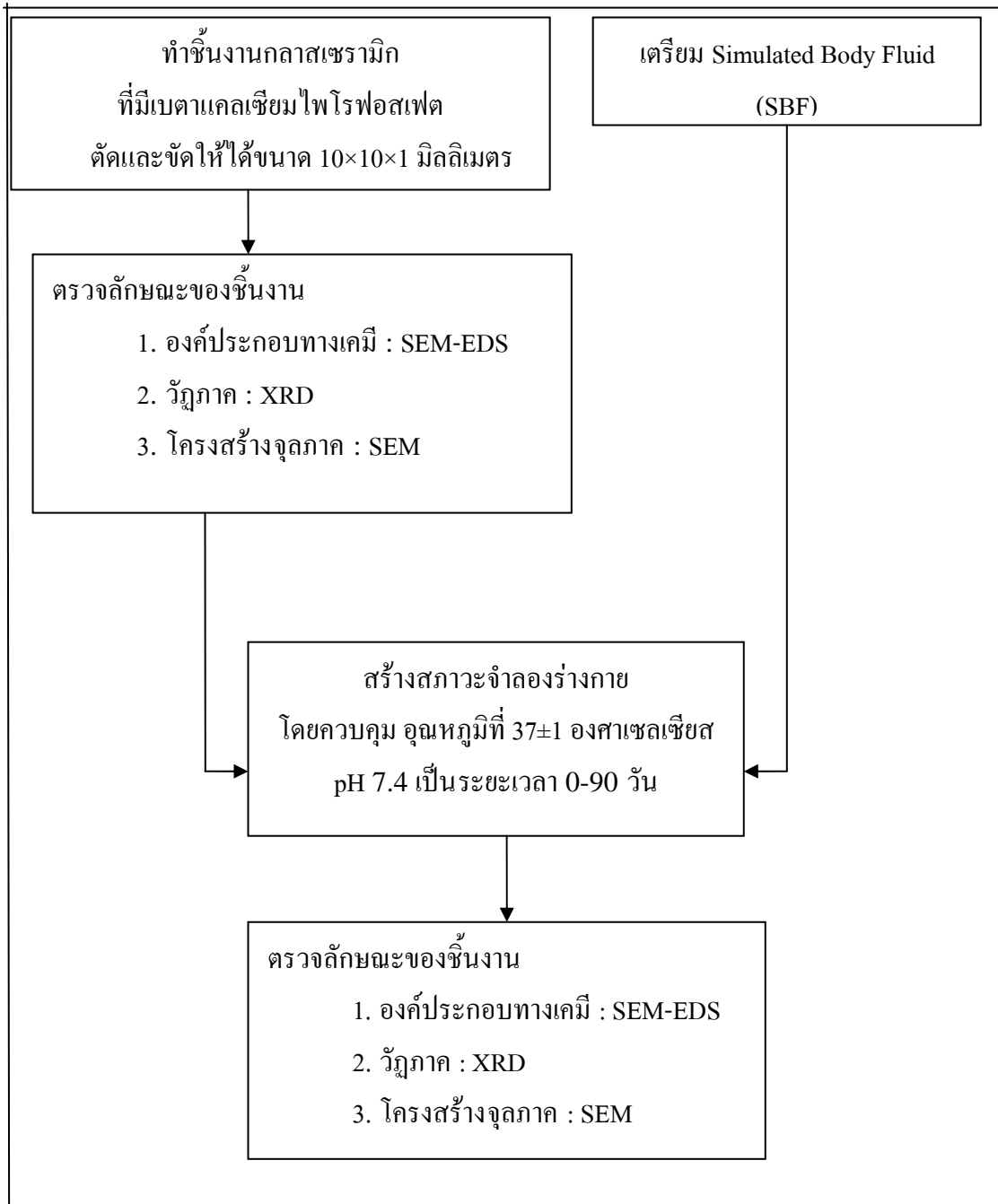
### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การออกแบบการทดลอง

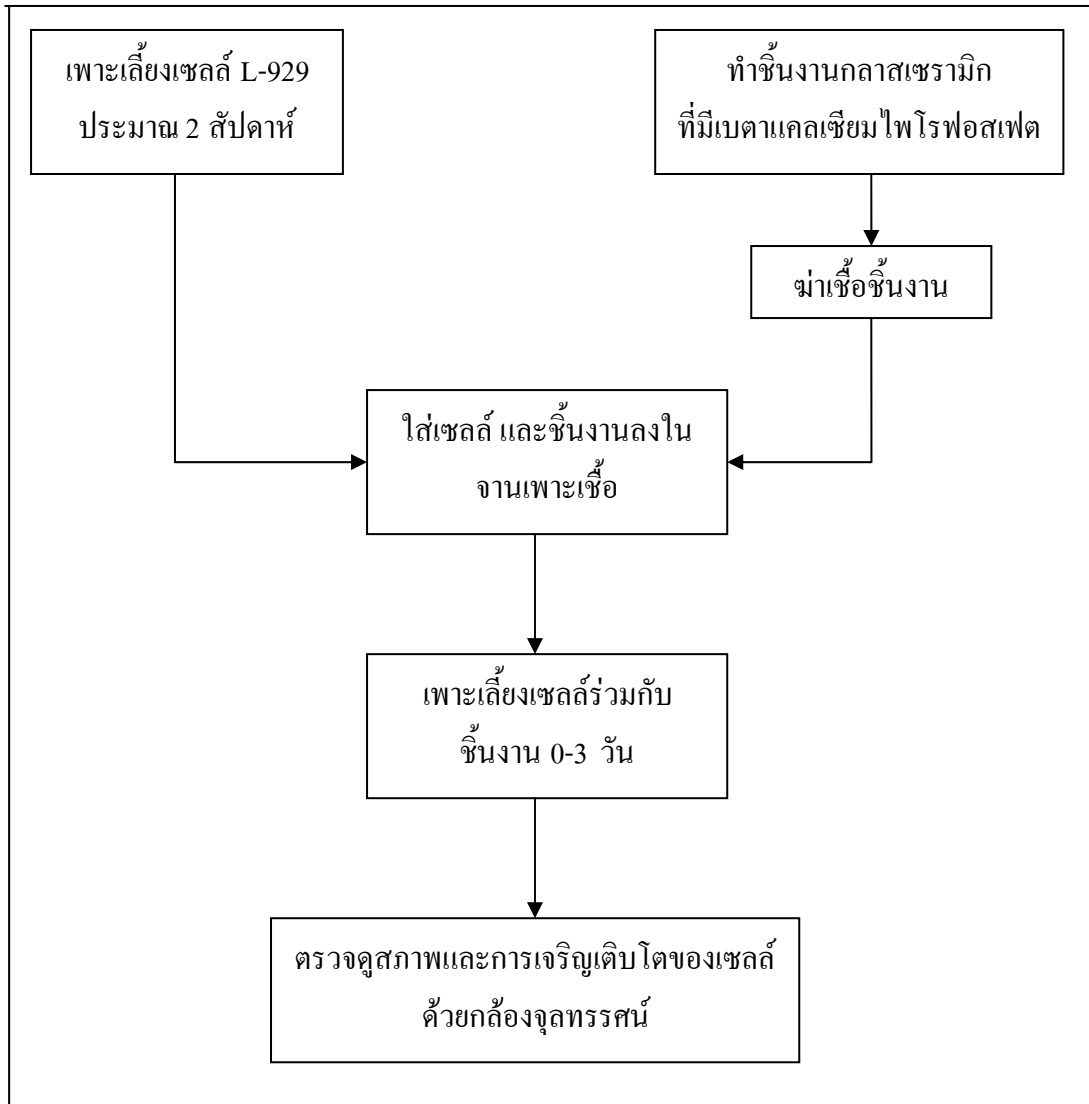
สำหรับขั้นตอนการทดลองสามารถออกแบบได้ดังแผนผังการทดลองดังรูปที่ 3.1  
แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการเตรียมวัสดุกลาสเซรามิก รูปที่ 3.2 แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการ  
การศึกษาปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และรูปที่ 3.3 แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการ  
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการเตรียมวัสดุกลาสเซรามิก



รูปที่ 3.2 แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการการศึกษาปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ



รูปที่ 3.3 แผนผังแสดงขั้นตอนและวิธีการการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

### 3.3.2 รายละเอียดวิธีการทดลอง

#### 3.3.2.1 การเตรียมกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไฟโรฟอสเฟต

- 1) เตรียมส่วนผสมต่าง ๆ โดยการชั่ง ทรายที่มีความบริสุทธิ์สูง, อะลูมินา  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaPO}_3$  และ  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 (รายละเอียดการคำนวณส่วนผสมของกลาสได้ในภาคผนวก ข)
- 2) นำส่วนผสมที่เตรียมจากข้อ 1 มาผสมกันในบีกเกอร์ทนความร้อน (pyrex beaker) เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน

- 3) นำส่วนผสมที่ผสมจนเข้ากันดีแล้วมาอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จนแห้งสนิท
- 4) บรรจุส่วนผสมที่อบแล้วลงในเบ้าหลอมอะลูมิเนียมขนาด 100 มิลลิลิตร
- 5) นำเบ้าหลอมใส่ในเตาหลอมแก้วโดยใช้อุณหภูมิในการหลอม 1400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อให้ส่วนผสมหลอมจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6) เทน้ำแก้วลงในแม่พิมพ์กราไฟต์ที่ให้ความร้อนจนร้อนแล้ว ปล่อยให้ น้ำแก้วเย็นจนกระทั่งแข็งตัว
- 7) นำแก้วที่ได้มาใส่ตู้อบเพื่อควบคุมการเกิดผลึกในเนื้อแก้ว โดยใช้อุณหภูมิในการอบ 800 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Morimoto, 2004) จะได้กลาสเซรามิก (GC1 และ GC2 ตามลำดับ)

### 3.3.2.2 การตัดและขัดชิ้นงาน

#### 3.3.2.2.1 การตัดชิ้นงาน

- 1) นำกลาสเซรามิกมาตัดด้วยเครื่องตัดใบเพชรความเร็วสูง ให้มีขนาดที่ใหญ่กว่า  $10 \times 10 \times 1$  มิลลิเมตรเล็กน้อย
- 2) ขัดชิ้นงานให้มีขนาด  $10 \times 10 \times 1$  มิลลิเมตร ด้วยกระดาษทรายเบอร์ 150 โดยใช้เครื่องขัดชิ้นงานแบบจานหมุน
- 3) ล้างชิ้นงานด้วยน้ำกลั่น



รูปที่ 3.4 เครื่องขัดชิ้นงานแบบจานหมุน

### 3.3.2.2.2 การขัดชิ้นงานให้มีความหนาตามที่ต้องการ

- 1) วัสดุอุปกรณ์ที่ต้องใช้ : - กระจกแผ่นใหญ่ (ใช้รองขัด)
  - กระจกแผ่นเล็ก (ติดชิ้นงาน)
  - น้ำกลั่น
  - เทอร์มอล กลู (thermal glue)
  - ฟงซิลิกอนคาร์ไบด์
  - $CeO_2$
- 2) นำฟงซิลิกอนคาร์ไบด์ขนาด 240 เมช จำนวนเล็กน้อย เทลงบนกระจกแผ่นใหญ่ ใส่น้ำเล็กน้อยเพื่อหล่อลื่น นำชิ้นงานที่ตัดแล้วมาถูบน ฟงซิลิกอนคาร์ไบด์ จนกระทั่งผิวด้านหนึ่งเรียบ
- 3) ทำกระจกแผ่นเล็กให้ร้อน ทากระจกด้วยเทอร์มอล กลู แล้วเอาชิ้นงานที่ขัดแล้วในข้อ 2) ติดบนกระจก โดยติดด้านที่เรียบกับแผ่นกระจกที่วางบนกระจกแก้วแข็งตัว
- 4) นำชิ้นงานที่ติดบนแผ่นกระจกเรียบร้อยแล้ว ขัดด้วยฟงซิลิกอนคาร์ไบด์ ขนาด 240, 500, 1000 และ 2000 เมช ตามลำดับ
- 5) นำแผ่นกระจกที่มีชิ้นงานติดอยู่ที่ขัดด้วยซิลิกอนคาร์ไบด์แล้ว มาขัดด้วย ฟง  $CeO_2$  บนเครื่องขัดชิ้นงานแบบจานหมุน
- 6) กลับด้านชิ้นงาน โดยให้ความร้อนกับกระจกให้กาวละลายทิ้งให้เย็น
- 7) ทำซ้ำ ข้อ 4) และข้อ 5)
- 8) นำชิ้นงานออกจากกระจก ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้ววัดความหนาด้วย thickness gauges pressure

### 3.3.2.2.3 การทำความสะอาดชิ้นงาน

- 1) นำชิ้นงานใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีอะซิโตน (acetone) แล้วนำไปวางใน ultrasonic bath ทิ้งไว้สักครู่
- 2) นำชิ้นงานที่ล้างด้วยอะซิโตนแล้วมาล้างด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 100% ด้วยวิธีเดียวกันกับล้างด้วยอะซิโตน
- 3) ผึ่งชิ้นงานบนผ้าสะอาดให้แห้ง เก็บชิ้นงานลงในถุง แล้วเก็บถุงชิ้นงานไว้ในเดซิเคเตอร์ (desiccators)

### 3.3.2.3 การศึกษาลักษณะเฉพาะของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต

#### 3.3.2.3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง เพื่อหาธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็นการวัดแบบเชิงคุณภาพ (Qualitative) โดยใช้รังสีเอ็กซ์เรย์ฟลูออเรสเซนต์แบบกระจายพลังงาน (Energy dispersive x-ray fluorescent) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ประกอบติดกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ในการศึกษาจะหาปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัส ไอออนโดยหาซ้ำ 5 ครั้งเพื่อให้ได้ค่าที่ใกล้เคียงที่สุด

#### 1) วิธีการทดสอบ

(1) นำชิ้นงานติดบนสตัปทองเหลือง

(2) เคลือบผิวด้วยคาร์บอน ด้วยเครื่องทำระเหยในสุญญากาศ

(3) นำไปวิเคราะห์หา แคลเซียม และฟอสฟอรัส

#### 2) เครื่องมือ : JEOL รุ่น JEE400 ชนิด High Vacuum Energy

dispersive x-ray spectrometer, EDS

บริษัท OXFORD (LINK)

ใช้หัววัดรังสีซิลิกอน-ลิเทียม (Si-Li detector)



รูปที่ 3.5 เครื่องทำระเหยในสุญญากาศ (Vacuum Evaporator)



### 3.3.2.3.2 การศึกษาวัฏภาค

การตรวจวิเคราะห์วัฏภาคของตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการการหักเหของรังสีเอ็กซ์ (X-Ray diffraction, XRD) จากผลึกของสารจะให้แพทเทิร์น (Pattern) การหักเหเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดตามกฎของแบร็กก์ (Bragg) ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาชิ้นงานที่มีลักษณะเป็นแผ่นเนื่องจากต้องการศึกษาความเปลี่ยนแปลงเฉพาะที่บริเวณผิวของชิ้นงาน

#### 1) วิธีการทดลอง

- (1) นำชิ้นงานที่ตัดไว้แล้วมาติดกับที่ใส่ตัวอย่างด้วยดินน้ำมัน
- (2) ใช้แผ่นกระจกกดตัวอย่างที่อยู่ในกรอบที่ใส่ตัวอย่าง
- (3) นำไปตรวจวิเคราะห์

#### 2) เครื่องมือ : XRD ของบริษัท Bruker AXS

ใช้  $\text{CuK}\alpha$  เป็นแหล่งกำเนิดรังสี

- #### 3) สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ :
- |               |   |             |
|---------------|---|-------------|
| Start angle   | = | 15 องศา     |
| End angle     | = | 40 องศา     |
| Time per step | = | 0.02 วินาที |
| Step size     | = | 0.020 องศา  |

### 3.3.2.3.3 การศึกษาโครงสร้างจุลภาค

ศึกษาลักษณะและรูปร่างของอนุภาคโดยการถ่ายภาพของอนุภาคที่กำลังขยายต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

#### 1) วิธีทดสอบ

- (1) ติดชิ้นงานบนสตัปทองเหลือง
- (2) นำไปเคลือบคาร์บอน แล้วทำการถ่ายภาพ

#### 2) เครื่องมือ : JEOL รุ่น JSM-1100E



รูปที่ 3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

#### 3.3.2.4 การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ

นำชิ้นงานที่เก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ มาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่เตรียมไว้โดยทำการทดลองควบคุมอุณหภูมิตู้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือนเพื่อหาค่าความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิภายในตู้ ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนที่ได้คือ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียสโดยจะสังเกตที่เวลาแตกต่างกัน

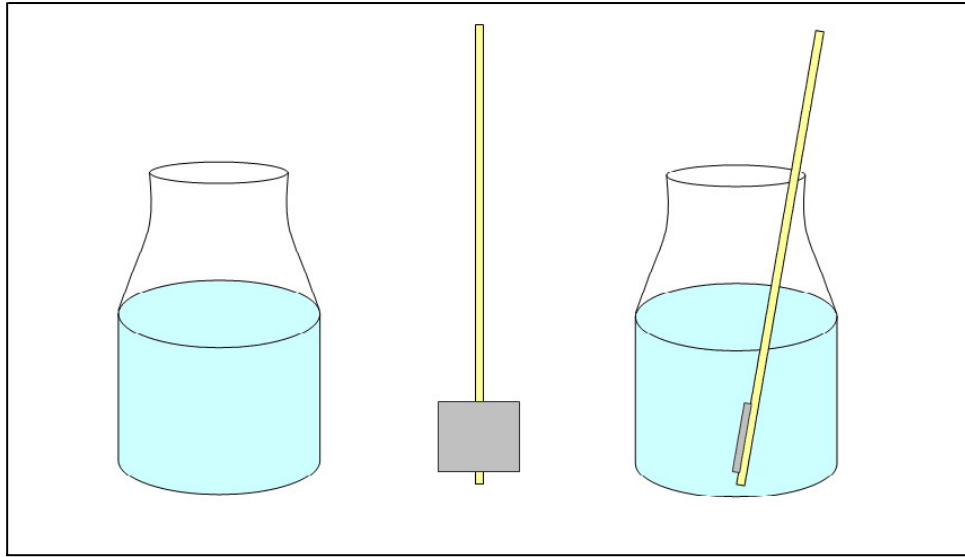
##### 1) วิธีการทดลอง

- (1) นำชิ้นงานมาสอดเข้าไปในช่องที่ตัดไว้กลางแผ่นโพลีเอทิลีนโดยที่แผ่นโพลีเอทิลีน มีขนาด  $15 \times 1 \times 0.1$  เซนติเมตร ซึ่งอยู่ห่างจากปลาย 0.5 เซนติเมตร
- (2) เตรียมสารละลาย SBF โดยนำสารเคมีดังตารางที่ 3.3 มาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 โดยใช้ 1.0 M-HCl วัดค่าด้วยเครื่องวัด pH ซึ่งได้ทำการสอบเทียบด้วยสารละลายที่รู้ค่า pH คือ 2.0 และ 9.0 หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นเพิ่มจนกระทั่งได้สารละลายปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 อีกครั้ง
- (3) เติมสารละลาย SBF ลงในขวดพลาสติกสีน้ำตาลเพื่อป้องกันแสงเข้าไปรบกวนที่ทำจากไฮเดนซิติโพลีเอทิลีน (HDPE) ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณสารละลาย SBF ที่ใส่ใน

แต่ละขวด สามารถคำนวณได้จากนำ พื้นที่ผิวสัมผัสของชิ้นทดสอบ  
หารด้วยปริมาณของสารละลายให้เท่ากับ 0.1 หลังจากนั้นให้นำแผ่น  
ให้นำแผ่น โพลีเอทิลีนที่ใส่ชิ้นงานแล้วใส่ลงไป ในขวด โดยตั้งฟิง  
ปากขวดตรวจสอบให้สารละลายท่วมชิ้นงาน ดังแสดงในรูปที่ 3.7

- (4) นำชิ้นงานที่เตรียมเสร็จแล้วเข้าสู่ควบคุมอุณหภูมิที่จำลองสภาวะใน  
ร่างกายและนำออกมาวิเคราะห์ในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังนี้; 0 วัน, 1 วัน,  
7 วัน, 14 วัน, 30 วัน, 60 วัน และ 90 วัน โดยเปลี่ยนสารละลาย SBF  
ทุก ๆ 7 วัน ซึ่งในการเปลี่ยนสารละลายแต่ละครั้งนั้นจะต้องเตรียม  
สารละลาย SBF ขึ้นใหม่ทุกครั้ง สำหรับวิธีการเปลี่ยนสารละลายจะ  
ใช้หลอดดูดสาร ดูดสารละลายเก่าออกก่อน แล้วดูดสารละลายใหม่  
ใส่ลงไปแทน ในขณะที่เปลี่ยนจะต้องระวังไม่ให้กระทบกระเทือน  
ชิ้นงาน ในการนำชิ้นงานออกมาวิเคราะห์ จะเอาชิ้นงานออกมา  
ครั้งละ 3 ชิ้นต่อชนิด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเก็บในเคซิเคเตอร์เพื่อรอ  
นำไปวิเคราะห์
- 2) เครื่องมือ : ควบคุมอุณหภูมิของบริษัท ISOTEMP® VACUUM OVEN
- 3) สภาวะที่ใช้ในการทดลอง : อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส

ค่า pH  $7.4 \pm 0.5$



รูปที่ 3.7 แสดงการวางชิ้นงานในภาชนะ



รูปที่ 3.8 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ภายหลังจากนำชิ้นงานออกจากสารละลาย SBF ที่เวลา 1 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 30 วัน, 60 วันและ 90 วันแล้ว นำชิ้นงานมาวิเคราะห์ห่อจ้กประกอบทางเคมี วัฏภาคและโครงสร้างจุลภาค โดยวิธีการและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเหมือนกันกับ ข้อ 3.3.2.3 ทั้งหมด เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลการศึกษา

### 3.3.2.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

สำหรับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ใช้วิธีการนำชิ้นงานปมร่วมกับเซลล์โดยตรงเพื่อดูปฏิกิริยาของเซลล์ที่มีต่อชิ้นงาน และขนาดของชิ้นงาน ในช่วงระยะเวลา 1-3 วัน เซลล์ที่นำมาใช้คือ L-929 ซึ่งเป็นเซลล์ของหนู และได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์คืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 10 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการศึกษานี้ทำในตู้นิรภัยสำหรับปฏิบัติงานด้านชีวภาพ เพื่อให้ทุกขั้นตอนปลอดเชื้อ วัสดุอุปกรณ์ทุกชิ้นผ่านการฆ่าเชื้อโดยอบในตู้อบความดัน (autoclave) และเช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ทุกครั้งก่อนนำไปใช้งานในตู้นิรภัยสำหรับปฏิบัติงานด้านชีวภาพ รวมถึงผู้ทำการทดลองต้องสวมถุงมือ และเช็ดซ้ำด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เช่นกัน

#### 1) การทดลอง

- (1) การเตรียม media : นำ MEM cat no. 11095-80 ของบริษัท Gibco 90 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Horse serum ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเติม penicillin/streptomycin 10 มิลลิลิตร โดยที่ความเข้มข้นของ penicillin และความเข้มข้น streptomycin คือ 100 µg/ml และ 100 µg/ml ตามลำดับ ให้เข้ากัน
- (2) การเตรียมสารละลาย PBS: ละลาย KCl 0.2 กรัม  $K_2HPO_4$  0.2 กรัม NaCl 8 กรัม และ  $Na_2HPO_4$  1.15 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร
- (3) การเตรียมเซลล์ : เซลล์ L-929 ที่ได้มาอยู่ย่นอยู่ในสภาพถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ทำการละลายเซลล์โดยวิธีการกำหวิดที่บรรจุเซลล์ไว้ในมือ จนกระทั่งภายในละลายได้เป็นของเหลวปริมาณประมาณ 1.8 มิลลิลิตร เตรียมขวดเพาะเชื้อขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 4 ขวด ใส่อาหารเพาะเชื้อ (MEM) หรือที่เรียกว่า media ลงในขวดเพาะเชื้อขวดที่ 1 ปริมาณ 2.2 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ที่ละลายใส่ลงไป จะได้ของเหลวในขวดเพาะเชื้อขวดที่ 1 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งของเหลวที่ผสมเข้ากันแล้วใส่ในขวดเพาะเชื้อที่เหลือ โดยใส่ขวดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม MEM ขวดละ 4 มิลลิลิตร นำชิ้นงานใส่ตู้อบที่เปิดไว้แล้วจนอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และ 10 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ เลี้ยงจนกระทั่ง

เซลล์เจริญเต็มขวด ประมาณ 1 สัปดาห์ ในระหว่างนี้จะต้องเปลี่ยน media ทุก ๆ 2 วัน โดยค่อย ๆ คูด media ด้วยหลอดดูดสารจากขวด เพราะเชื้อโดยระวังไม่ให้สัมผัสกับภาชนะ แล้วนำ media ใหม่ ใสลงไป 5 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวดทำการเปลี่ยนขวดเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้เพียงพอต่อการทดสอบ โดยคูด media ออกจากขวดล้างด้วยสารละลาย PBS เททิ้งแต่เหลือไว้เล็กน้อย แล้วเติมทริปซินลงไปขวดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อปลดปล่อยเซลล์ออกจากผนังขวดตามวิธีที่เรียกว่าทริปซินไนส์เซชัน (trypsinization) ทิ้งไว้ 3-5 นาที เมื่อเริ่มเห็นตะกอนสีขาวขุ่นหลุดออก เติม media 3-5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน คูดสารละลายเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเชื้อที่มีขนาด 25 ลูกบาศก์ เซนติเมตร ขวดละ 1 มิลลิลิตร เติม media ขวดละ 4 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อ 1 สัปดาห์ ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนในสัปดาห์แรก

- (4) การเตรียมชิ้นงานทดสอบ: ชิ้นงานทดสอบที่ต้องการทดสอบคือ กลาสเซรามิก และวัสดุเปรียบเทียบ 2 ชนิด คือชิ้นงานควบคุมเชิงบวกและชิ้นงานควบคุมเชิงลบ โดยชิ้นงานควบคุมเชิงบวก (ตะกั่ว) เป็นชิ้นงานที่เป็นพิษต่อเซลล์ เตรียมโดยการนำตะกั่วออกไซด์อัดให้เป็นแท่ง แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทุบเป็นชิ้นเล็ก ๆ และคัดเลือกชิ้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 12 ชิ้น ชิ้นงานควบคุมเชิงลบ (HA) เป็นชิ้นงานที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่ง HA นี้เป็น HA ที่ รศ. ดร. จรัสศรี ลอประยูร สังเคราะห์ขึ้นมา นำ HA นี้มาทุบแล้วเลือกให้มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นงานควบคุมเชิงบวก จำนวน 12 ชิ้น กลาสเซรามิก GC1 และ GC2 เตรียมโดยทุบให้แตกแล้วเลือกชิ้นงานที่มีขนาดใกล้เคียง 12 ชิ้น เมื่อเตรียมชิ้นงานเสร็จนำชิ้นงานห่อในกระดาษฟอยด์เพื่อนำไปทำการอบฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- (5) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ : ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยการเปรียบเทียบเซลล์ที่อยู่ร่วมกับชิ้นงาน กับเซลล์ที่อยู่ร่วมกับชิ้นงานที่เป็นชิ้นงานควบคุมเชิงบวก (เป็นพิษ) ชิ้นงานควบคุมเชิงลบ (ไม่เป็นพิษ) และเซลล์ที่อยู่ตามลำพังโดยไม่มีวัสดุใด ๆ โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำเซลล์ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนที่ 1 แยกลงในถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม ทริปซินไนส์เซลล์ออกจาก

ขวดเพาะเชื้อตามขั้นตอนที่ระบุในหัวข้อการเตรียมเซลล์ เดิม media ใส่ลงในขวด ขวดละ 25 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์กระจายทั่วกัน นับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) รายละเอียดวิธีการนับจำนวนเซลล์แสดงในภาคผนวก ค ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เป็น  $2.42 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดของเหลวที่อยู่ในขวด (ประกอบด้วย media และเซลล์) ใส่ในหลุมบนถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร โดยยกเว้นแถวล่าง เพื่อใช้สำหรับการเปรียบเทียบ เดิม media 1.5 มิลลิลิตร บ่มเซลล์ (incubate) ในตู้บ่มเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยน media ใหม่พร้อมนำชิ้นงานที่เตรียมไว้วางลงในหลุมที่มีเซลล์อยู่ ลักษณะการวางแสดงดังรูปที่ 3.8 โดย GC1 และ GC2 อยู่คนละถาด ซึ่งชิ้นงานแต่ละชนิดมีอยู่ 2 ถาดเพื่อเป็นการทดสอบซ้ำ นำถาดเพาะเชื้อเข้าบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 1-3 วัน

- 2) เครื่องมือ : ตู้บ่ม CO<sub>2</sub> Incubator ยี่ห้อ SHEL LAB  
ตู้นิรภัยสำหรับปฏิบัติงานด้านชีวภาพ  
ยี่ห้อ BIO CLEAN BENCH SANYO (model MCV-13BSF)
- 3) สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ (ภายในตู้บ่ม) : อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
10 เปอร์เซ็นต์ CO<sub>2</sub>

ชิ้นงานควบคุม เชิงบวก (ตะกั่ว)	ชิ้นงานควบคุม เชิงลบ (HA)	ชิ้นงาน ทดสอบ	เซลล์เปล่า (blank)	หลุมว่าง	หลุมว่าง
ชิ้นงานควบคุม เชิงบวก (ตะกั่ว)	ชิ้นงานควบคุม เชิงลบ (HA)	ชิ้นงาน ทดสอบ	เซลล์เปล่า (blank)	หลุมว่าง	หลุมว่าง
ชิ้นงานควบคุม เชิงบวก (ตะกั่ว)	ชิ้นงานควบคุม เชิงลบ (HA)	ชิ้นงาน ทดสอบ	เซลล์เปล่า (blank)	หลุมว่าง	หลุมว่าง
หลุมว่าง	หลุมว่าง	หลุมว่าง	หลุมว่าง	หลุมว่าง	หลุมว่าง

รูปที่ 3.9 แสดงการวางชิ้นงานลงในแต่ละถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม



รูปที่ 3.10 แสดงถาดเพาะเชื้อขนาด 24 หลุมเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์



- 4) การวิเคราะห์ชิ้นงาน : นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscopy) ทุกวัน เพื่อดูการเจริญเติบโตและสภาพโดยทั่วไปของเซลล์ แต่ต้องกระทำอย่างรวดเร็วเพราะอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์เนื่องจากอยู่ภายนอกตู้บ่มเป็นเวลานาน ซึ่งสามารถทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นวันที่ 3 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการบ่มได้ทำการถ่ายรูปเซลล์เพื่อบันทึกผลของชิ้นงานต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการศึกษาลักษณะเฉพาะของกลาสเซรามิก ที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต

##### 4.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณไอออนของแคลเซียม และฟอสฟอรัสในชิ้นงาน โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์ GC1 และ GC2 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 4.1-4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมไอออนและฟอสฟอรัสไอออนของชิ้นงาน GC1 และ GC2

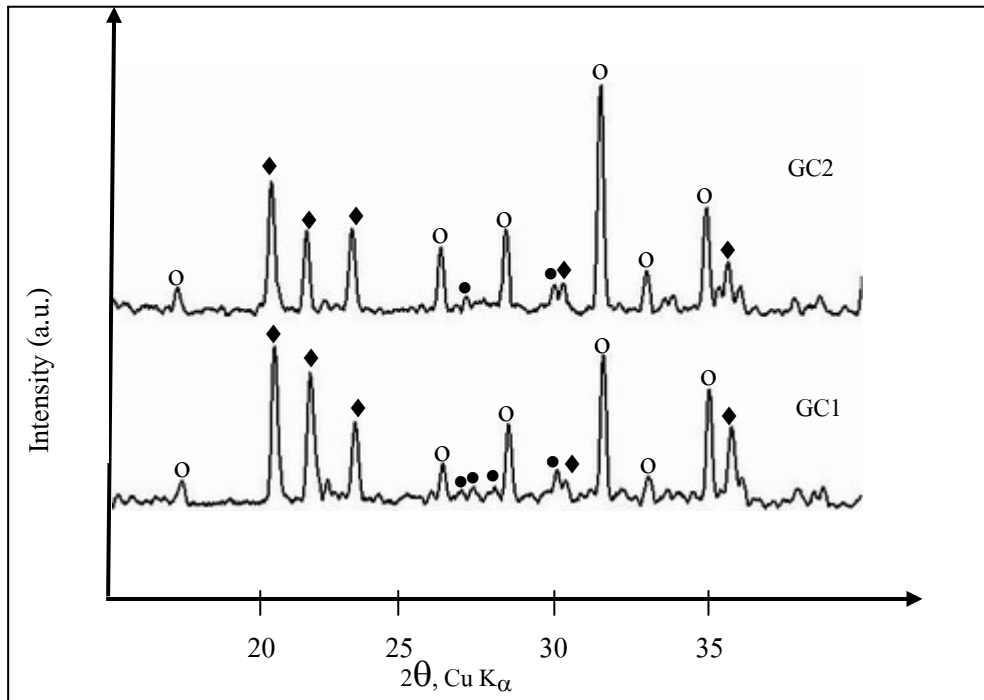
ชิ้นงานกลาสเซรามิก	แคลเซียมไอออน %	ฟอสฟอรัสไอออน %
GC1	20.03 ± 1.65	48.93 ± 1.32
GC2	27.76 ± 1.87	53.34 ± 1.55

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าปริมาณแคลเซียมของ GC1 และ GC2 เท่ากับ 20.03 ± 1.65 เปอร์เซ็นต์ และ 27.76 ± 1.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณฟอสฟอรัสของ GC1 และ GC2 เท่ากับ 48.93 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์ และ 53.34 ± 1.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เตรียมในส่วนผสมแล้วจะพบว่า GC1 มีแคลเซียม 18.68 เปอร์เซ็นต์, ฟอสฟอรัส 47.31 เปอร์เซ็นต์ และ GC2 มีแคลเซียม 26.03 เปอร์เซ็นต์, ฟอสฟอรัส 51.44 เปอร์เซ็นต์ อาจกล่าวได้ว่าค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าเริ่มต้นมีค่าใกล้เคียงกัน

เมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca : P) ในกลาสเซรามิก GC1 เท่ากับ 2.44 และ GC2 จะเท่ากับ 1.92

##### 4.1.2 ผลการศึกษาวัฏภาค

เมื่อนำชิ้นงานกลาสเซรามิกมาวิเคราะห์วัฏภาค จะพบว่าทั้งชิ้นงาน GC1 และ GC2 ประกอบด้วยวัฏภาคหลายชนิดซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 4.1 และ ตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.1 กราฟ XRD ของ GC1 และ GC2,  $\blacklozenge$  :  $\text{AlPO}_4$ ,  $\circ$  :  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\bullet$  :  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

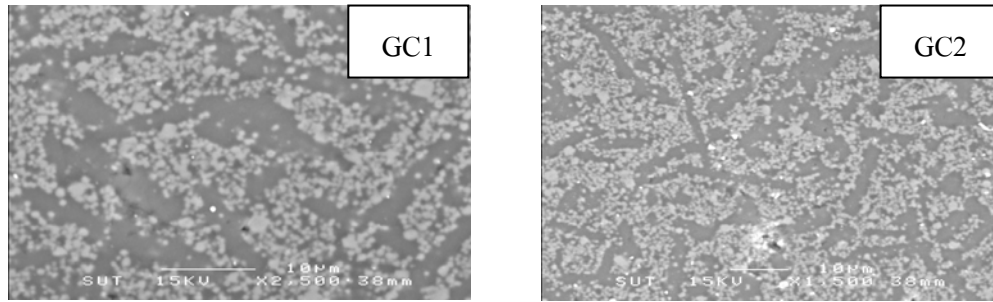
ตารางที่ 4.2 วัฏภาคที่ปรากฏใน GC1 และ GC2

ชิ้นงาน	วัฏภาคที่พบ
GC1	$\text{AlPO}_4$ , $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
GC2	$\text{AlPO}_4$ , $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

จากรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 จะพบว่า วัฏภาคของ  $\text{AlPO}_4$  และ  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  มีปริมาณมาก ส่วนวัฏภาคของ  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  มีปริมาณที่น้อยกว่า ทั้ง GC1 และ GC2

#### 4.1.3 ผลการศึกษาโครงสร้างจุลภาค

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคของ GC1 และ GC2 แสดงได้ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ไมโครกราฟจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ GC1 (รูปซ้าย) และ GC2 (รูปขวา)

GC1 และ GC2 มีลักษณะโครงสร้างจุลภาคดังแสดงในรูปที่ 4.2 จะเห็นว่ากลาสเซรามิกเหล่านี้ประกอบด้วยวัฏภาคหลายวัฏภาครวมกันซึ่งสอดคล้องตามผลของ XRD ผลึกที่มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ คือ  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  และส่วนผลึกที่มีรูปร่างกลม ๆ เป็น  $\text{AlPO}_4$  และ  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Motimoto,2004) GC1 มีผลึก  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  ขนาดใหญ่กว่าผลึกที่มีใน GC2 ผลึกมีขนาดใหญ่สามารถหยุดการแตกร้าวของชิ้นงานได้ ทำให้ชิ้นงานแข็งแรงขึ้น กลาสเซรามิกที่มีผลึกขนาดใหญ่นี้มีสมบัติพิเศษคือ สามารถตัดตกแต่งให้ได้รูปร่างและขนาดตามต้องการได้ด้วยเครื่องมือตัดโดยไม่ทำให้แตก (Waldemar,1995)

#### 4.2 ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ

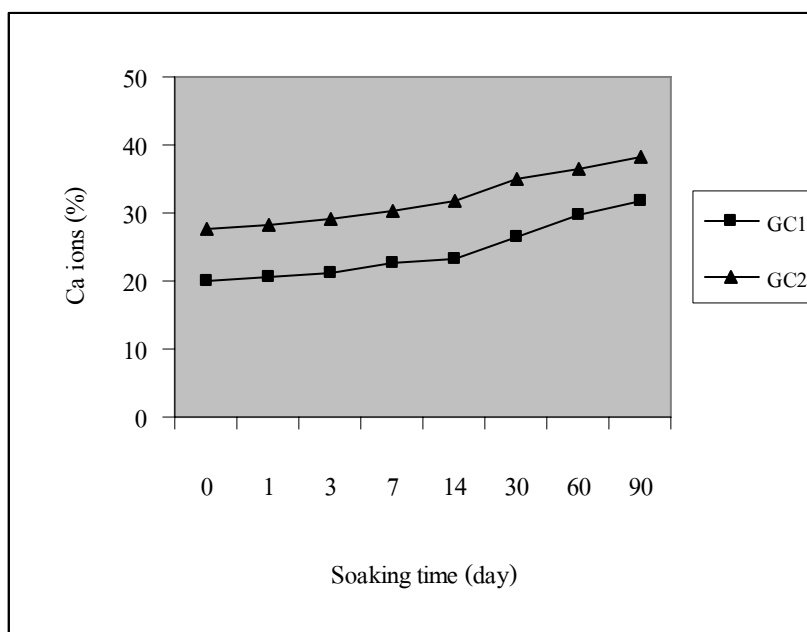
จากการศึกษาพฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิกในสารละลาย SBF ในช่วงเวลาต่าง ๆ ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชิ้นงานที่เกิดขึ้นดังนี้

##### 4.2.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชิ้นงาน

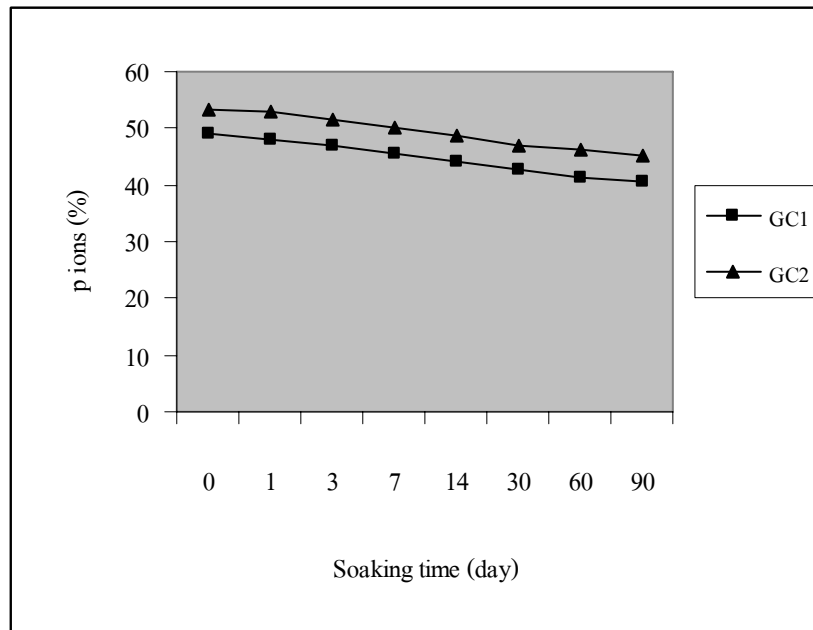
การเปลี่ยนแปลงของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคลเซียมไอออนและฟอสฟอรัสไอออน ซึ่งศึกษาโดย SEM-EDS ผลที่ได้พบว่าเมื่อระยะเวลาในการแช่ชิ้นงาน GC1 และ GC2 ใน SBF เพิ่มมากขึ้นปริมาณของแคลเซียมไอออนก็จะเพิ่มขึ้น ส่วนฟอสฟอรัสไอออนจะมีปริมาณลดลงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ปริมาณแคลเซียมไอออนและฟอสฟอรัสไอออนใน GC1 และ GC2 ที่แช่ใน SBF ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลา (วัน)	กลาสเซรามิก GC1		กลาสเซรามิก GC2	
	แคลเซียม (%)	ฟอสฟอรัส (%)	แคลเซียม (%)	ฟอสฟอรัส (%)
0	20.03 ± 1.65	48.93 ± 1.32	27.76 ± 1.87	53.34 ± 1.55
1	20.73 ± 1.74	48.16 ± 1.65	28.14 ± 1.34	52.93 ± 1.75
3	21.24 ± 2.05	46.99 ± 1.88	28.98 ± 1.76	51.69 ± 1.66
7	22.56 ± 1.76	45.43 ± 1.84	30.38 ± 1.76	50.02 ± 1.63
14	23.09 ± 1.89	44.27 ± 2.02	31.69 ± 1.49	48.74 ± 1.95
30	26.33 ± 1.81	42.84 ± 1.97	35.07 ± 1.53	47.03 ± 1.42
60	29.78 ± 1.94	41.21 ± 1.63	36.53 ± 1.98	46.11 ± 1.50
90	31.72 ± 1.62	40.55 ± 1.85	38.24 ± 1.96	45.15 ± 1.77



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมไอออนหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ



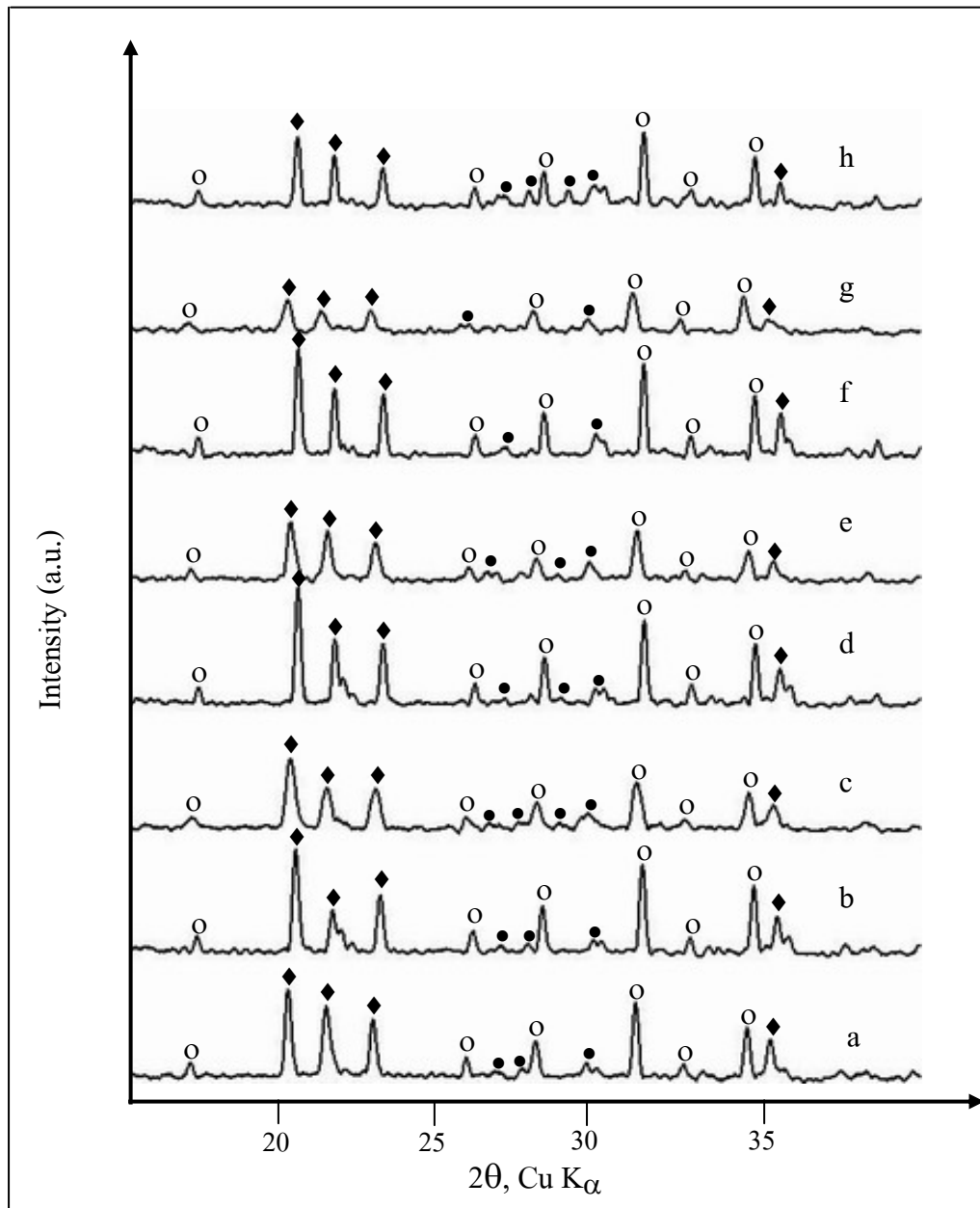
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณฟอสฟอรัสไอออนหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ

#### 4.2.2 ผลการศึกษาวัฏภาค

จากการศึกษาวัฏภาคของ GC1 และ GC2 โดย XRD โดยศึกษาชิ้นงานในลักษณะเป็นแผ่นเนื่องจากต้องการศึกษาที่บริเวณผิวของชิ้นงาน ซึ่งผลที่ได้มีดังนี้

ตารางที่ 4.4 วัฏภาคต่าง ๆ ที่ปรากฏใน GC1 เมื่อแช่ใน SBF ที่เวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาในการแช่ชิ้นงาน (วัน)	วัฏภาคหลัก	วัฏภาครอง
0	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
1	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
3	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
7	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
14	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
30	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
60	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
90	AlPO <sub>4</sub> และ β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	β-Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>



รูปที่ 4.5 กราฟ XRD แพทเทิร์น ของ GC1 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน : a) 0 วัน, b) 1 วัน, c) 3 วัน, d) 7 วัน, e) 14 วัน, f) 30 วัน, g) 60 วัน และ h) 90 วัน;  $\blacklozenge$  :  $\text{AlPO}_4$ ,  $\circ$  :  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  และ  $\bullet$  :  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

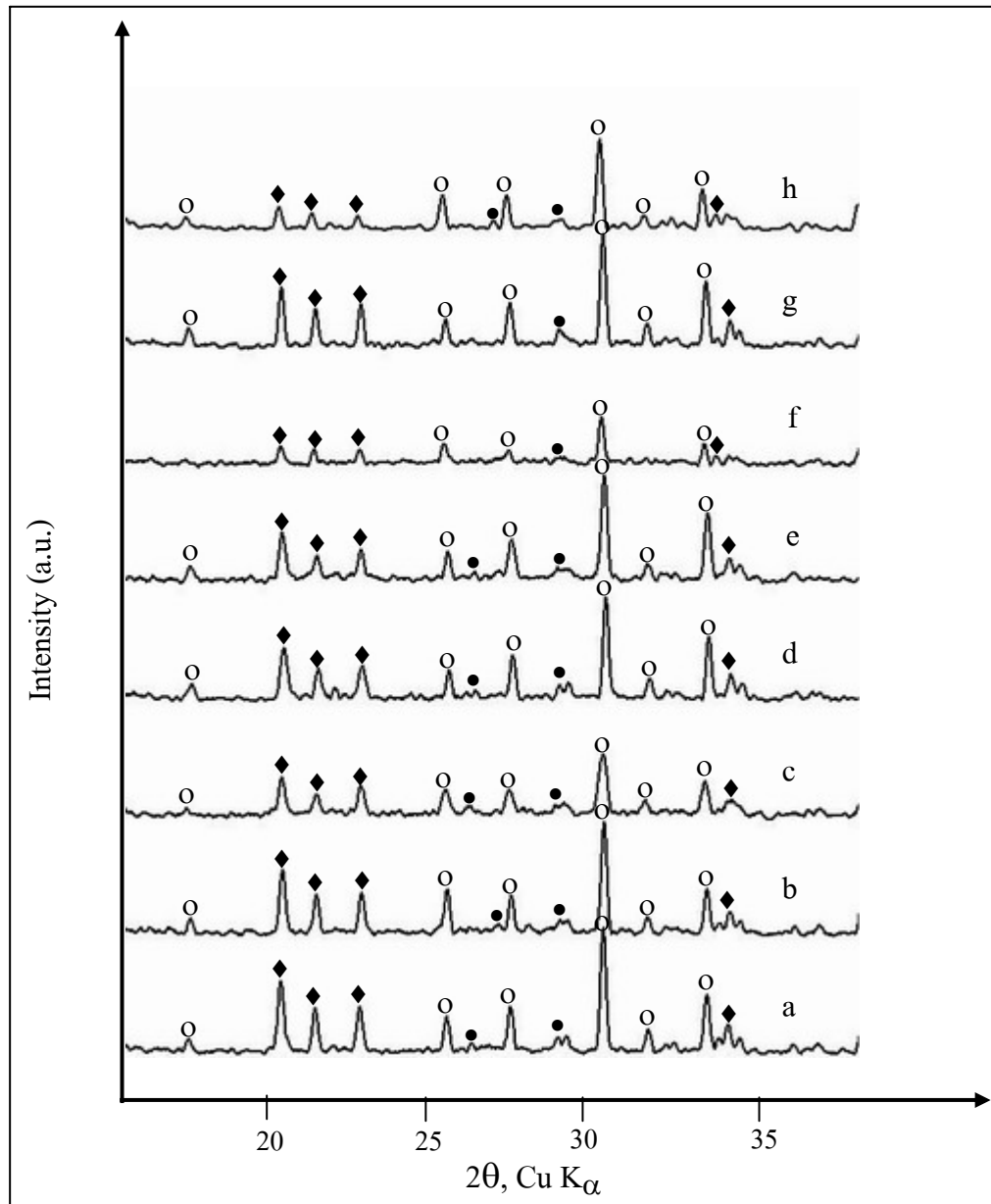
สารประกอบตัวใหม่ที่คิดว่าจะเป็นแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ จึงทำให้มีปริมาณแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นและมีปริมาณฟอสเฟตลดลง แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยมากไม่สามารถตรวจ

ด้วย XRD ได้เป็นผลให้ไม่พบว่ามีวัฏภาคไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในรูปที่ 4.5 และ 4.6 ซึ่งภายหลังจากการทดสอบไม่พบการเปลี่ยนแปลงของวัฏภาคใด ๆ ยังคงมีวัฏภาคเป็น  $\text{AlPO}_4$  และ  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  เป็นวัฏภาคหลัก และ  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  เป็นวัฏภาครอง

ตารางที่ 4.5 วัฏภาคต่าง ๆ ที่ปรากฏใน GC2 เมื่อแช่ใน SBF ที่เวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาในการแช่ชิ้นงาน (วัน)	วัฏภาคหลัก	วัฏภาครอง
0	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
1	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
3	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
7	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
14	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
30	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
60	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
90	$\text{AlPO}_4$ และ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$





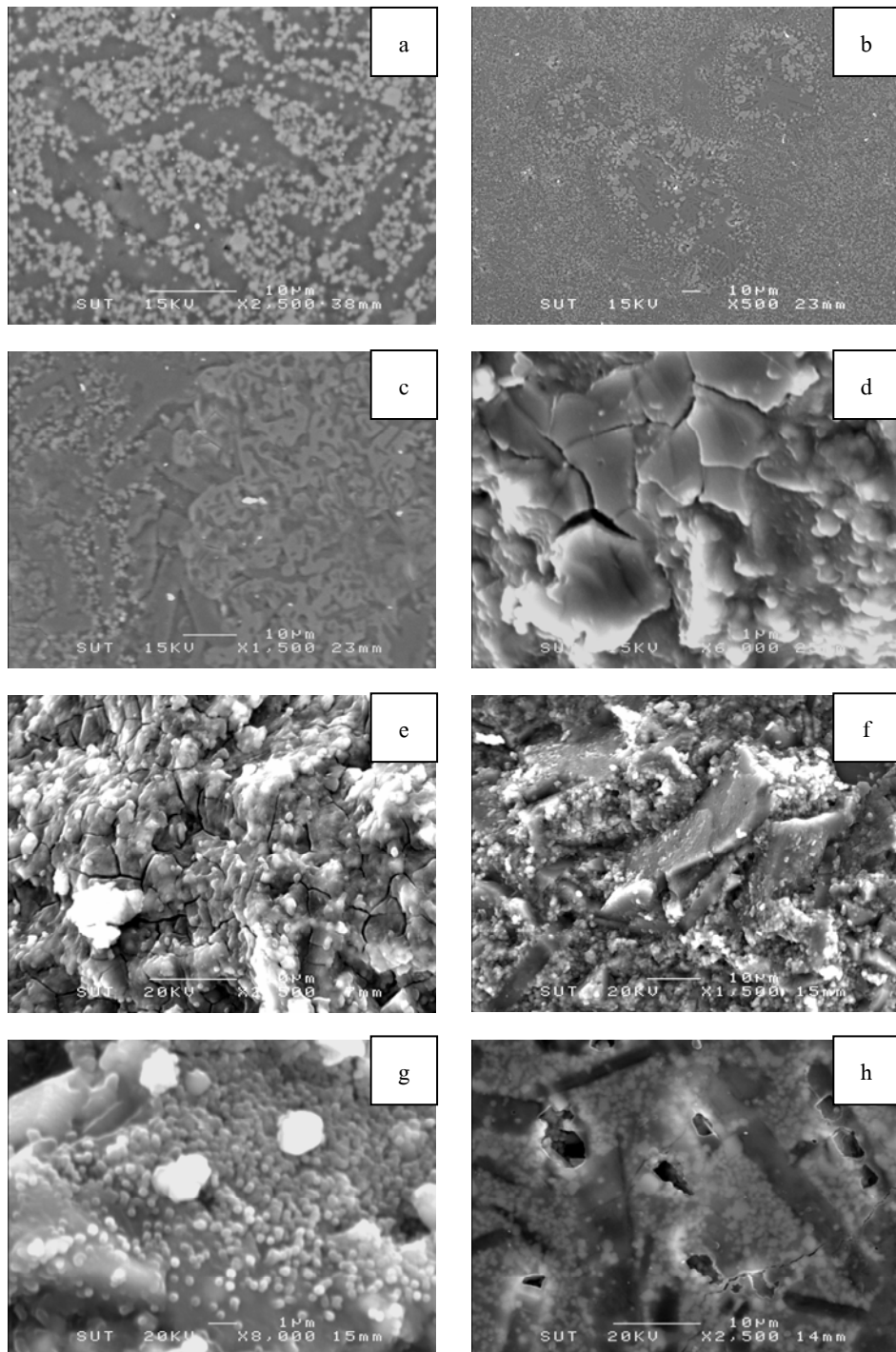
รูปที่ 4.6 กราฟ XRD แพทเทิร์น ของ GC2 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน : a) 0 วัน, b) 1 วัน, c) 3 วัน, d) 7 วัน, e) 14 วัน, f) 30 วัน g) 60 วัน และ h) 90 วัน; ♦ :  $\text{AlPO}_4$ , o :  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  และ • :  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

#### 4.2.3 ผลการศึกษาโครงสร้างจุลภาค

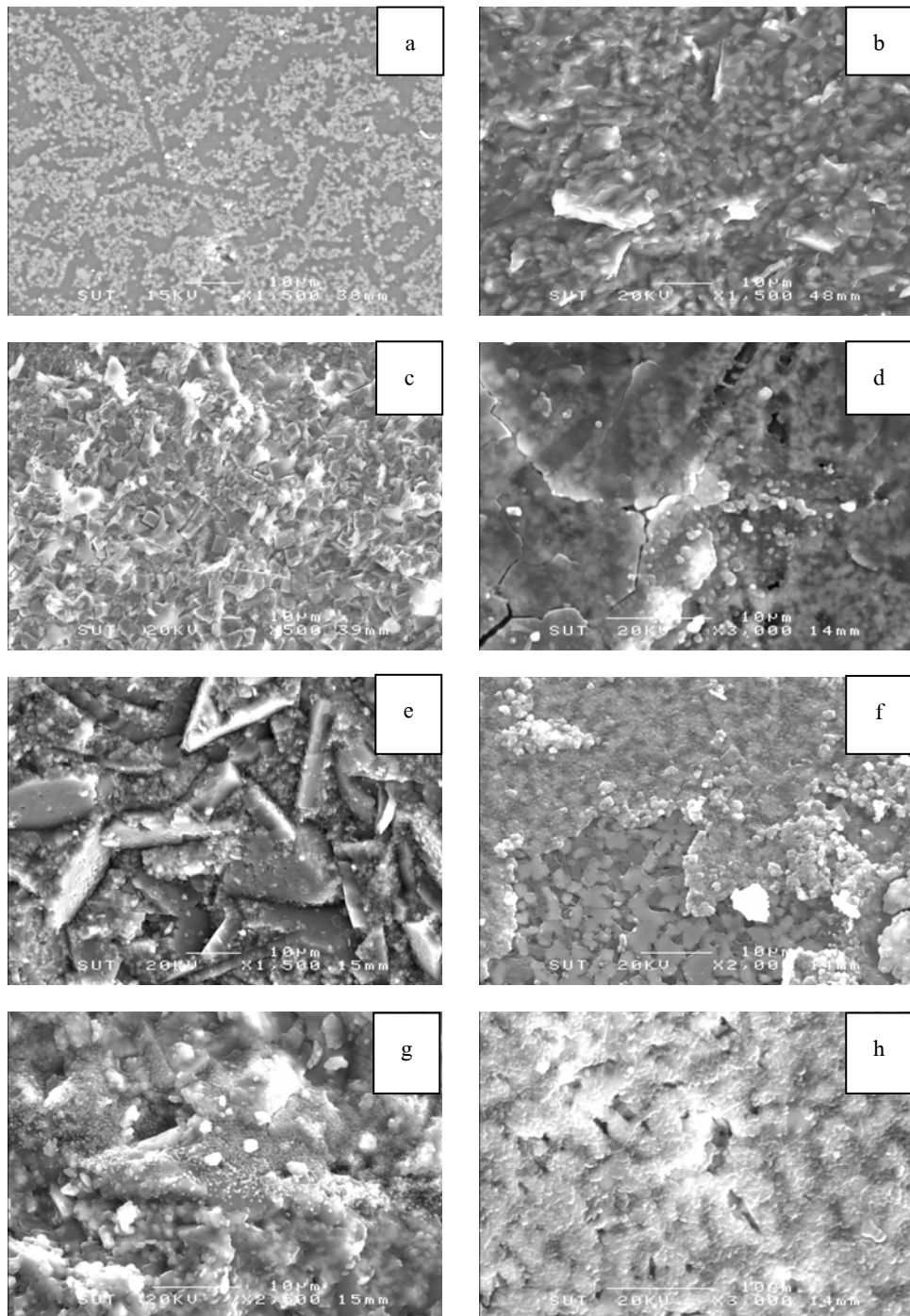
ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของ GC1 มีลักษณะดังรูปที่ 4.7 จากรูปมีการเปลี่ยนแปลงของผิวชิ้นงานที่ละน้อย เห็นว่าผิวหน้าของชิ้นงานในวันที่ 1 และวันที่ 3 ยังไม่สังเกตเห็น

เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ที่ผิวหน้าของชิ้นงาน GC1 เริ่มขรุขระและมีรอยแตก ดังรูปที่ 4.7 d) สังเกตเห็นการตกผลึกของวัฏภาคใหม่เมื่อเวลา 14 วัน ดังรูปที่ 4.7 e) และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้นคือ 30, 60 และ 90 วัน ดังรูปที่ 4.7 f), 4.7 h) และ 4.7 g)

รูปที่ 4.8 เป็นผิวหน้าของชิ้นงาน GC2 จะเห็นว่าผิวหน้าของชิ้นงานในวันที่ 1 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ จนกระทั่งเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น โดยผิวหน้าของชิ้นงานจะเริ่มขรุขระ ดังรูปที่ 4.8 c) และจะเกิดการตกผลึกของวัฏภาคใหม่เมื่อเวลา 7 วัน ดังรูปที่ 4.8 d) และจะมีปริมาณของผลึกเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลา 30, 60 และ 90 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 โครงสร้างจุลภาคของ GC1 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน : a) 0 วัน, b) 1 วัน, c) 3 วัน, d) 7 วัน, e) 14 วัน, f) 30 วัน, g) 60 วัน และ h) 90 วัน



รูปที่ 4.8 โครงสร้างจุลภาคของ GC2 ในช่วงระยะเวลาการแช่สารละลาย SBF ที่แตกต่างกัน : a) 0 วัน, b) 1 วัน, c) 3 วัน, d) 7 วัน, e) 14 วัน, f) 30 วัน, g) 60 วัน และ h) 90 วัน

จากการศึกษาไปโอแอกติวิตีของ GC1 และ GC2 พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดเมื่อแช่อยู่ในสารละลาย SBF ที่จำลองให้เหมือนกับพลาสมาของเลือดมนุษย์ ภายใต้สภาวะการควบคุมที่  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส และ pH 7.4 พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิวหน้า โดยพบว่ามีปริมาณแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้น และปริมาณฟอสฟอรัสไอออนลดน้อยลง แสดงว่ามีสารประกอบใหม่ที่เป็นแคลเซียมฟอสเฟตที่มี Ca : P เพิ่มมากขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นสารประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่ไม่สามารถตรวจโดย XRD ได้เพราะมีปริมาณน้อยมากและมีขนาดที่เล็กมาก และพบว่ามีเปลี่ยนแปลงของผิวหน้าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาในการทดลองนานขึ้น โดย GC2 ซึ่งเป็นชิ้นงานที่ไม่มีซิลิกาเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิวชิ้นงานได้เร็วกว่า GC1 ที่มีซิลิกาเป็นส่วนประกอบ

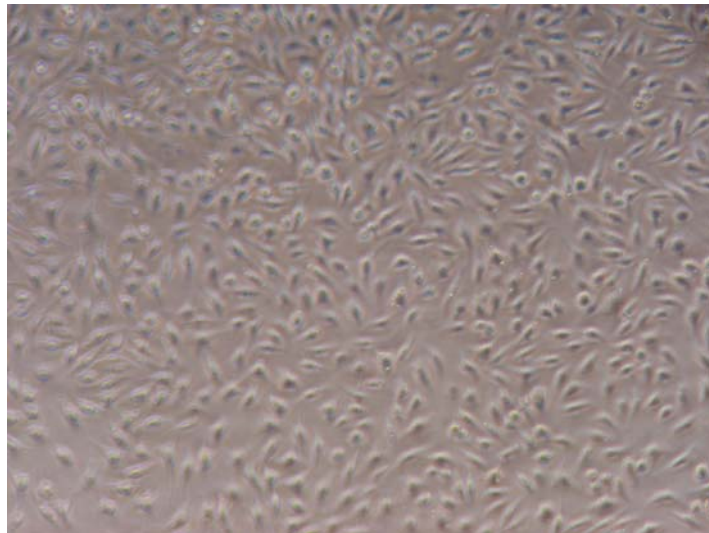
A.G. Dias และคณะ (2005) ได้ศึกษาพฤติกรรมต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพของกลาสเซรามิก ในระบบที่มีแคลเซียมฟอสเฟตแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ ,  $\text{TiP}_2\text{O}_7$  และ  $\alpha$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  และพบว่ากลาสเซรามิกมีวิฤภาคต่างกันจะเกิดปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพแตกต่างกันด้วย กล่าวคือ วิฤภาคที่แตกต่างกันจะมีอัตราการละลายเร็วช้าต่างกัน

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้กลาสเซรามิก GC1 และ GC2 ประกอบไปด้วยวิฤภาค  $\text{AlPO}_4$ ,  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  และ  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  เหมือนกัน แต่ GC1 และ GC2 ทำมาจากแก้วในระบบที่แตกต่างกัน GC1 อยู่ในระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  และ GC2 อยู่ในระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5$  ผลการทดลองทั้ง GC1 และ GC2 ต่างก็เป็นสารไปโอแอกทีฟ ผลของการมีปฏิกิริยาต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ ทำให้เกิดสารแคลเซียมฟอสเฟตที่ผิว ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hench และ Wilson (1984) ที่พบว่าวัสดุแคลเซียมฟอสเฟตหลายชนิดแสดงสมบัติไปโอแอกทีฟ เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), เบตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) เป็นต้น นอกจากนี้จากผลการวิจัยที่พบว่า GC1 มีการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวช้ากว่า GC2 ซึ่งสันนิษฐานว่า  $\text{SiO}_2$  ในแก้วระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  มีผลทำให้ปฏิกิริยาที่ผิวของ GC1 ช้ากว่าของ GC2 เนื่องจาก  $\text{SiO}_2$  ที่หลอมตัวเป็นเนื้อแก้วนั้นทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะผลึกต่าง ๆ ในเนื้อกลาสเซรามิก แต่ GC2 ไม่มี  $\text{SiO}_2$  เป็นส่วนประกอบจึงส่งผลให้ผลึกต่าง ๆ ภายในเนื้อกลาสเซรามิกละลายเกิดการละลายเร็วกว่า GC1

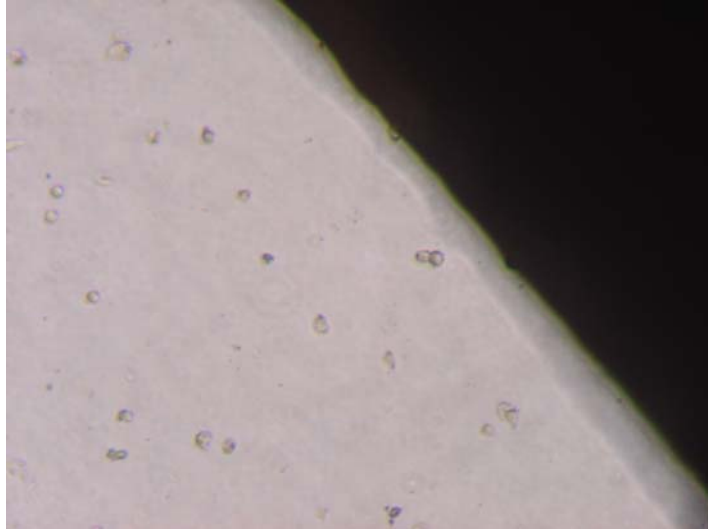
#### 4.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธีสัมผัสโดยตรงกระทำโดยบ่มเซลล์ L-929 กับชิ้นงานเป็นเวลา 3 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เทียบกับ เซลล์ที่บ่มกับชิ้นงานควบคุมเชิงบวก (เป็นพิษ) ชิ้นงานควบคุมเชิงลบ (ไม่เป็นพิษ) และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีชิ้นงานใด ๆ จากการศึกษาลักษณะทั่วไปของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ L-929 เมื่อเวลาผ่านไป

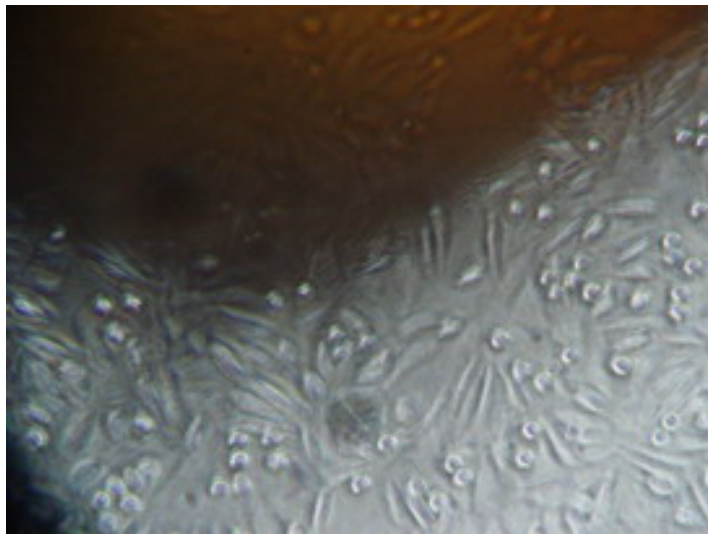
ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีชิ้นงานใด ๆ) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.9 คือ เซลล์มีสภาพสมบูรณ์ดี (รูปร่างคล้ายกระสวย) สามารถยึดเกาะกับหลุมได้ดี ขณะที่เซลล์ L-929 ซึ่งอยู่ร่วมกับชิ้นงานควบคุมเชิงบวกคือตะกั่ว (เป็นพิษ) มีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ในทางตรงกันข้าม ลักษณะของเซลล์ที่อยู่ร่วมกับชิ้นงานควบคุมเชิงลบคือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (ไม่เป็นพิษ) มีการเจริญของเซลล์มากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.11 เมื่อนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงของ L-929 เมื่ออยู่ร่วมกับชิ้นงาน GC1 และ GC2 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ดังที่แสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ



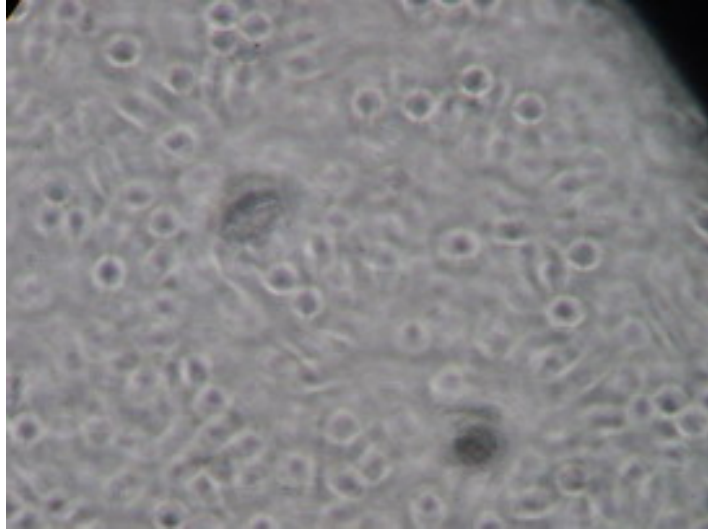
รูปที่ 4.9 เซลล์ L-929 กลุ่มควบคุม (ไม่มีชิ้นงานใด ๆ) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน  
กำลังขยาย 100 เท่า



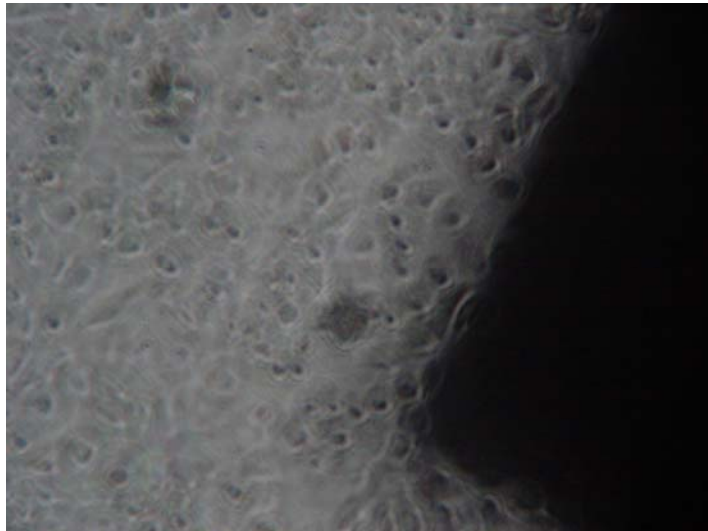
รูปที่ 4.10 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงานควบคุมเชิงบวก (เป็นพิษ) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน  
กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.11 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงานควบคุมเชิงลบ (ไม่เป็นพิษ) เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน  
กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.12 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงาน GC1 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน  
กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.13 เซลล์ L-929 เมื่อมีชิ้นงาน GC2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน  
กำลังขยาย 100 เท่า



เซลล์ L-929 ที่อยู่ร่วมกับ GC1 พบว่าในวันที่ 3 เซลล์ที่ไม่เจริญเติบโตประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ L-929 ที่อยู่ร่วมกับ GC2 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าคือพบความผิดปกติของเซลล์ตั้งแต่วันที่ 1

แสดงว่าเซลล์ L-929 ที่อยู่ร่วมกับ GC1 และ GC2 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่อยู่ร่วมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่ถ้าเปรียบเทียบกับเซลล์ที่อยู่ร่วมกับตะกั่วแล้ว เซลล์ที่อยู่ร่วมกับ GC1 และ GC2 อยู่ในสภาพที่ต่ำกว่ามาก

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการเจริญเติบโตและลักษณะทั่ว ๆ ไปของเซลล์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของชิ้นงาน GC1 และ GC2

วันที่	GC1	GC2
1	เซลล์เจริญเติบโตได้ดี	เซลล์น้อยกว่า 10% เริ่มมีลักษณะเป็นวงกลม แทนการยึดตัวของเซลล์ตามปกติ
2	เซลล์เจริญเติบโตได้ดี หนาแน่นขึ้น	มีเซลล์ประมาณ 10% มีรูปร่างที่ผิดปกติ
3	มีเซลล์ที่ไม่เจริญเติบโต ประมาณ 10%	มีเซลล์ที่ไม่เจริญเติบโต ประมาณ 10%

เซลล์ L-929 ที่บ่มร่วมกับ GC1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในระยะเวลา 1-2 วัน และมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น แต่ในวันที่ 3 พบว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์หยุดการเจริญเติบโต การหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ L-929 เมื่อบ่มร่วมกับ GC2 มีความรุนแรงมากกว่า กล่าวคือสามารถส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ตั้งแต่วันที่ 1 และเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น ในวันที่ 3 มีเซลล์ที่ไม่เจริญเติบโตประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นผลการทดลองชี้แนะว่าชิ้นงาน GC1 ซึ่งมีซิลิกาอยู่ในส่วนประกอบมีผลกระทบต่อเซลล์น้อยกว่าชิ้นงานที่ไม่มีซิลิกาเป็นส่วนประกอบ

เมื่อพิจารณาจากหลักเกณฑ์การให้คะแนนของเซลล์ในตารางที่ 4.7 และ 4.8 แล้วเซลล์ L-929 ที่บ่มร่วมกับ GC1 และ GC2 มี cytotoxicity index โดยพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.7 เกณฑ์การให้คะแนนสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

คะแนน	ความหนาแน่นของเซลล์	จำนวนเซลล์ที่ลอย	เซลล์ที่ไม่มี การเจริญเติบโต	การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์
0	100%	0%	0-10%	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
1	90-100%	0-5%	10-30%	มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยมาก
2	60-90%	5-10%	30-50%	มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย
3	30-60%	10-20%	50-70%	มีการเปลี่ยนแปลงปานกลาง
4	0-30%	> 20%	70-100%	มีการเปลี่ยนแปลงมาก

หมายเหตุ : จากบทความ Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymer : effect of several additives and processing conditions โดย M.E. Gomes, R.L. Reis, A.M. Cunha, C.A. Blitterswijk และ J.D. de Bruijn, 2001

ตารางที่ 4.8 การจัดกลุ่มของปฏิกิริยาที่มีต่อเซลล์

Cytotoxicity Index	ปฏิกิริยาต่อเซลล์
0-1	ไม่เป็นพิษ
1-3	เป็นพิษน้อยมาก
3-5	เป็นพิษเล็กน้อย
5-7	เป็นพิษปานกลาง
7-8	เป็นพิษรุนแรง

หมายเหตุ : จากบทความ Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymer : effect of several additives and processing conditions โดย M.E. Gomes, R.L. Reis, A.M. Cunha, C.A. Blitterswijk และ J.D. de Bruijn, 2001

ตารางที่ 4.9 สรุปการให้คะแนน Cytotoxicity index ของ GC1 และ GC2

วันที่	GC1	GC2
1	0	0
2	0	1
3	1	1
ปฏิกิริยาต่อเซลล์	ไม่เป็นพิษ หรือเป็นพิษน้อยมาก	ไม่เป็นพิษ หรือเป็นพิษน้อยมาก

การทดลองพบว่าชิ้นงาน GC1 มี Cytotoxicity index เท่ากับ 1 ในวันที่ 3 และชิ้นงาน GC2 มี Cytotoxicity index เท่ากับ 1 ตั้งแต่วันที่ 1

ตามเอกสารอ้างอิง (M.E. Gomes, 2001) คะแนนที่อยู่ในช่วง 0 ถึง 3 ถือว่าผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ คะแนนในช่วง 3 ถึง 5 หมายถึงต้องทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง แต่ถ้าได้คะแนนตั้งแต่ 5 ขึ้นไป ถือว่าวัสดุที่ทดสอบ ไม่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ดังนั้นจะเห็นว่า Cytotoxicity index ของ GC1 และ GC2 อยู่ในช่วง 0-3 จึงถือว่าชิ้นงานทั้งสองผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและการวิจัยพฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต โดยศึกษาพฤติกรรมต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการศึกษาและวิจัยนี้ สามารถเตรียมกลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟต ที่พัฒนาโดย รศ. ดร.จรัสศรี ลอประยูร และ Asst. Prof. Dr. Shigeki Morimoto อาจารย์สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เข้าได้สำเร็จ โดยกลาสเซรามิกที่ทำขึ้นมีวิถุภาคต่าง ๆ ดังต่อไปนี้  $AlPO_4$ ,  $\beta-Ca_3(PO_4)_2$  และ  $\beta-Ca_2P_2O_7$  ซึ่ง  $\beta-Ca_2P_2O_7$  ซึ่งมีลักษณะรูปร่างของอนุภาคเป็นแผ่นบาง ๆ อนุภาคนี้ส่งผลให้ชิ้นงานสามารถตัดแต่งด้วยเครื่องมือตัดทั่วไปได้ในขณะที่อนุภาคของ  $AlPO_4$  และ  $\beta-Ca_3(PO_4)_2$  มีลักษณะค่อนข้างกลม แต่ขนาดของอนุภาคของ  $\beta-Ca_2P_2O_7$  ที่ได้มีขนาดเล็กกว่ากลาสเซรามิกที่เตรียมโดย รศ. ดร.จรัสศรี ลอประยูร และ Asst. Prof. Dr. Shigeki Morimoto

2) ในการศึกษาพฤติกรรมต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ โดยนำชิ้นงานใส่ในสภาวะจำลองของเหลวในร่างกายที่เตรียมขึ้น พบว่าการเปลี่ยนแปลงของผิวชิ้นงานในช่วงระยะเวลา 0-90 วัน มีการตกผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตวิถุภาคใหม่ในชิ้นงานทั้ง GC1 และ GC2 โดย GC1 แสดงสมบัติไบโอแอคทีฟสูงกว่า GC2 เนื่องจากใน GC1 มีส่วนที่เป็นกลาสเมทริกซ์ซึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อแก้วเพื่อทำหน้าที่ยึดเกาะผลึกต่าง ๆ ในเนื้อกลาสเซรามิก ในที่นี้คือซิลิกาและอะลูมินา ซึ่งมีปริมาณมากกว่า GC2 จึงส่งผลให้ผลึกต่าง ๆ ยึดเกาะกันได้ดีกว่า GC2 ทำให้ผิวหน้าของชิ้นงานเกิดการละลายได้สูงกว่า GC2 เมื่อมีการละลายซ้ำการตกผลึกใหม่ก็จะเกิดขึ้น

3) สำหรับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำชิ้นงานที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งพร้อมต่อการทดสอบ แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในช่วงระยะเวลา 1-3 วัน พบว่ากลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียมไพโรฟอสเฟตทั้ง 2 ชนิด ไม่มีพิษต่อเซลล์และ GC1 มีผลกระทบต่อเซลล์สูงกว่า GC2 เป็นผลเนื่องมาจากสารละลายที่ละลายออกมาจากชิ้นงาน ซึ่ง GC1 เกิดการละลายได้สูงกว่า GC2 นั้น เป็นผลจากเหตุผลเช่นเดียวกับในข้อ 2)

การศึกษาวิจัยโดยการนำชิ้นงานกลาสเซรามิกที่ประดิษฐ์ขึ้นในห้องปฏิบัติการของ สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก โดย รศ. ดร. จรัสศรี ลอประยูร และ Asst. Prof. Dr. Shigeki Morimoto มาศึกษาพฤติกรรมต่อสภาพแวดล้อมทางชีวภาพและศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ครั้งนี้ นับได้ว่ามี ประโยชน์มาก เพราะทำให้เกิดความเชื่อมั่นว่าสามารถนำกระบวนการผลิตนี้ไปใช้งานจริงในระดับ อุตสาหกรรม การศึกษาพฤติกรรมต่อสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์ครั้งนี้ เป็น ตัวบ่งบอกให้ทราบว่าวัสดุนี้มีความปลอดภัย และจากความโดดเด่นของสมบัติเชิงกลที่พิเศษที่ทำให้ กลาสเซรามิกที่ผลิตนี้มีความแตกต่างจากกลาสเซรามิกชนิดอื่น ๆ คือสามารถเจาะ ตัด ตกแต่งขนาด ได้ให้เหมาะกับการใช้งาน โดยไม่แตกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย จะช่วยส่งเสริมให้แพทย์เลือกใช้ได้เพราะ สะดวก จึงนับได้ว่างานประดิษฐ์นี้น่าจะมีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ได้ในอนาคต และสามารถ ผลิตได้ในประเทศ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกลาสเซรามิกที่นำมาศึกษานี้มีสมบัติที่น่าสนใจคือสามารถตัดแต่งด้วยเครื่องมือตัด แบบทั่วไปได้ และจากการศึกษา วิจัยพฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิกที่มีเบตาแคลเซียม ไพรอโรฟอสเฟต พบว่ากลาสเซรามิกชนิดนี้แสดงสมบัติไบโอแอกทีฟ และไม่มีพิษต่อเซลล์ ดังนั้น เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับวัสดุทดแทนกระดูก จึงควรค่าต่อการศึกษาต่อในด้านต่าง ๆ ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

1) ศึกษาพฤติกรรมในหลอดแก้วของกลาสเซรามิกในช่วงระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อสังเกตผล ในระยะยาว

2) การประยุกต์ใช้งานจริงในสัตว์ทดลอง โดยศึกษาผลที่เกิดขึ้นทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

3) การประยุกต์ใช้งานจริงในมนุษย์

## รายการอ้างอิง

- จินตมัย สุวรรณประทีป. (2546). นิตยสารอแพคเทท. ฉบับที่ 185 เดือนมกราคม 2546.
- A.G. Dias, J.M.S. Skakle, I.R. Gibson, M.A. Lopes and J.D. Santos (2005). In situ thermal and structure characterization of bioactive calcium phosphate glass ceramics containing  $\text{TiO}_2$  and  $\text{MgO}$  oxides. **J. of Non-Crystalline Solids**.
- A.J. Salinas, J. Roman, M. Vallet-Regi, J.M. Oliveira, R.N. Correia and M.H. Fernandes (2000). In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the  $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO}\cdot\text{SiO}_2\text{-CaO}\cdot\text{MgO}\cdot 2\text{SiO}_2$ . **Biomaterials** **21**. pp.251-257.
- Billotte W.G. (2000). Ceramic Biomaterials. **The Biomedical Engineering Handbook** (vol.1, 2<sup>nd</sup> ed., pp. [38-1]-[38-26]. United State of America: CRC Press LLC.
- Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. schoen and Jack E. Lemons (2004). **Biomaterials Science (An Introduction to Materials in Medicine 2<sup>nd</sup> ed)**. England: John Wiley & Son Ltd.
- C.G. Frondoza, R.Z. LeGeros and D.S. Hungerford (1998). Effect of Bovine-Derived Materials on Human Osteoblast-like Cells. **Bioceramics vol. 11**. pp. 289-291.
- David Hill . (1998). **Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices**. England: John Wiley & Son Ltd.
- Gomes M.E., Reis R.L., Cunha A.M., Blitterswijk C.A. and J.D. de Bruijn (2001). Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymer : effect of several additives and processing conditions. **Biomaterials** **22**. pp. 1911-1977.
- Hanson S. et al. (1996). Testing Biomaterials. **Biomaterials Science: An Introduction to materials in Medicine**. pp.221-228.
- Kimiyasu Sato, Yuri Kumagai and Junzo Tanaka. (1999). Nucleation of Hydroxyapatite crystal on Organic Monolayer films. **Bioceramics vol. 12**. pp. 137-140.
- J. Elbel, L. Polonchuk, K.L. Eckert, H. Eppenberger and E. Wintermantel (1998). Sol-gel Derived Titania Coating for Cell-Culture Substrates. **Bioceramics vol. 11**. pp. 305-308.

- Joon B. Park and Joseph D. Bronzino (2003). **Biomaterials Principles and Applications**. United State of America: CRC Press LLC.
- Larry L. Hench and June Wilson (1984). Surface-Active Biomaterials. **J. Biomaterials Science**. Pp 630-636.
- Larry L. Hench and June Wilson (1993). **An Introduction to Bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- LeGeros R.Z., LeGeros J.P., Daculsi G. and Kijikowska R. (1995). Calcium Phosphate Biomaterials : Preparation, Properties and Biodegradation. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materials Vol. 2**. pp. 1429-1464.
- Nakamura M. et al. (1995). The In Vitro Testing of Cytotoxicity and Cell Adhesion of Biomaterials in the Dental Field. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materials Vol. 2**. pp. 1431-1465.
- Northup S.J. (1996). In Vitro Assessment of Tissue Compatibility. **Biomaterials Science: An Introduction to materials in Medicine**. pp.215-220.
- Morimoto S. and Lorprayoon C. (2004). Preparation of Machinable Glass-Ceramic based on  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> crystal. **Proceedings of The International Conference on Smart materials**. pp. 59-60.
- Oyane A., Kim H.-M., Furuya T., Kokubo T. and Nakamura T. (2002). Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **Key Engineering Materials vols. 192-195**. pp 188-195.
- Punnama Siriphannon, Yoshikazu Kameshima, Atsuo Yasumori and Kiyoshi Okada (1999). Influence of Grain Size of Calcium Silicate Ceramics on Hydroxyapatite precipitation in SBF Solution. **Bioceramics vol. 12**. pp.145-148.
- Waldemar G. de Rijk (1995). Dental Porcelains and Ceramics. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materials Vol. 2**. pp. 1525-1544.
- Xiao-Xiang Wang, Satoshi Hayakawa and Akiyoshi Osaka (1999). In Vitro Bioactivity of Titania Gel Layer at by Reaction between Titanium Substrate and an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TaCl<sub>5</sub> Solution. **Bioceramics vol. 12**. pp. 121-124.
- Yasuhiko S., Masataka O., Shizuko I., Toshio T. and Kimihiro Y. (1999). Enhanced Bioactivity of Poled Strontium Hydroxyapatite Ceramics. **Bioceramics vol 12**. pp. 105-108.

Yong Zhang and J.D. Santos (2000). Crystallization and microstructure analysis of calcium phosphate-based glass ceramics for biomedical applications. **J. of Non-Crystalline Solid 272**. pp. 14-21.



**ภาคผนวก ก**

**ISO 10993-5**

INTERNATIONAL  
STANDARD

ISO  
10993-5

Second edition  
1999-05-15



**Biological evaluation of medical devices —  
Part 5:  
Tests for *in vitro* cytotoxicity**

*Évaluation biologique des dispositifs médicaux —  
Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro*

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์  
ห้ามคัดถ่ายโดยไม่ได้รับอนุญาต

**TISI Library**  
ห้องสมุดมาตรฐาน



S0026177

Thai Industrial Standards Institute : TISI  
Rama VI Rd., Rajathevee Bangkok 10400 Tel : 202-3510



10 มาตรฐาน 2542

Reference number  
ISO 10993-5:1999(E) Add

13

## Contents

1 Scope .....	1
2 Normative references .....	1
3 Terms and definitions .....	1
4 Sample preparation .....	2
5 Cell lines .....	4
6 Culture medium.....	4
7 Preparation of cell stock culture .....	4
8 Test procedures .....	5
9 Test report .....	8
10 Assessment of results.....	8

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์  
ห้ามคัดลอกโดยไม่ได้รับอนุญาต

© ISO 1999

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from the publisher.

International Organization for Standardization  
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Switzerland  
Internet iso@iso.ch

Printed in Switzerland

## Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

International Standards are drafted in accordance with the rules given in the ISO/IEC Directives, Part 3.

Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

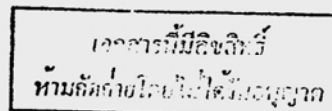
International Standard ISO 10993-5 was prepared by Technical Committee ISO/TC 194, *Biological evaluation of medical devices*.

This second edition cancels and replaces the first edition (ISO 10993-5:1992), which has been technically revised.

ISO 10993 consists of the following parts, under the general title *Biological evaluation of medical devices*:

- Part 1: Evaluation and testing
- Part 2: Animal welfare requirements
- Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
- Part 4: Selection of tests for interactions with blood
- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
- Part 6: Tests for local effects after implantation
- Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals
- Part 8: Guidance for reference materials
- Part 9: Framework for the identification and quantification of potential degradation products
- Part 10: Tests for irritation and sensitization
- Part 11: Tests for systemic toxicity
- Part 12: Sample preparation and reference materials
- Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymers
- Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics
- Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys
- Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables
- Part 17: Methods for establishment of allowable limits for leachable substances using health-based risk assessment
- Part 18: Chemical characterization

Future parts will deal with other relevant aspects of biological testing.



## Introduction

Due to the general applicability of *in vitro* cytotoxicity tests and their widespread use in evaluating a large range of medical devices and materials, it is the purpose of this part of ISO 10993, rather than to specify a single test, to define a scheme for testing which requires decisions to be made in a series of steps. This should lead to the selection of the most appropriate test.

Three categories of test are listed: extract test, direct-contact test, indirect-contact test.

The choice of one or more of these categories depends upon the nature of the sample to be evaluated, the potential site of use and the nature of the use.

This choice then determines the details of the preparation of the samples to be tested, the preparation of the cultured cells, and the way in which the cells are exposed to the samples or their extracts.

At the end of the exposure time, the evaluation of the presence and extent of the cytotoxic effect is undertaken. It is the intention of this part of ISO 10993 to leave open the choice of type of evaluation. Such a strategy makes available a battery of tests, which reflects the approach of many groups which advocate *in vitro* biological tests.

The numerous methods used and end-points measured in cytotoxicity determination can be grouped into categories of evaluation type:

- a) assessments of cell damage by morphological means;
- b) measurements of cell damage;
- c) measurements of cell growth;
- d) measurements of specific aspects of cellular metabolism.

There are, therefore, several alternative means of producing results in each of these four categories. The investigator should be aware of the categories of test and into which a particular technique fits, in order that comparisons may be made with other results on similar medical devices or materials, and in order that interlaboratory tests may be conducted.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์  
ห้ามทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

## Biological evaluation of medical devices —

### Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity



#### 1 Scope

This part of ISO 10993 describes test methods to assess the *in vitro* cytotoxicity of medical devices.

These methods specify the incubation of cultured cells either directly or through diffusion

- a) with extracts of a device, and/or
- b) in contact with a device.

These methods are designed to determine the biological response of mammalian cells *in vitro* using appropriate biological parameters.

#### 2 Normative references

The following normative documents contain provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this part of ISO 10993. For dated references, subsequent amendments to, or revisions of, any of these publications do not apply. However, parties to agreements based on this part of ISO 10993 are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of the normative documents indicated below. For undated references, the latest edition of the normative document referred to applies. Members of ISO and IEC maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing*.

ISO 10993-12:1996, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*.

#### 3 Terms and definitions

For the purposes of this part of ISO 10993, the terms and definitions given in ISO 10993-1 and the following apply.

##### 3.1

##### **negative control material**

material which, when tested in accordance with this part of ISO 10993, does not produce a cytotoxic response

**NOTE** The purpose of the negative control is to demonstrate background response. For example, high-density polyethylene<sup>1)</sup> for synthetic polymers, and aluminium oxide ceramic rods for dental material, have been used as negative controls.

1) High-density polyethylene can be obtained from the U.S. Pharmacopeia (Rockville, Maryland, USA) and Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257 - Japan). This information is given for the convenience of the user of this part of ISO 10993 and does not constitute an endorsement by ISO of these products.

**3.2****positive control material**

material which, when tested in accordance with this part of ISO 10993, provides a reproducible cytotoxic response

**NOTE** The purpose of the positive control is to demonstrate appropriate test system response. For example, an organo-tin stabilized poly(vinylchloride)<sup>2)</sup> has been used as a positive control for solid materials and extracts. Dilutions of phenol, for example, have been used as a positive control for extracts.

**3.3****reagent control**

extraction vehicle without test material subjected to extraction conditions and test procedures

**NOTE** For the purposes of this part of ISO 10993, this definition replaces that given in 3.1 of ISO 10993-12:1996.

**3.4****culture vessels**

vessels appropriate for cell culture, including glass Petri dishes, plastic culture flasks or plastic multiwells and microtitre plates

**NOTE** These vessels may be used interchangeably in these methods provided that they meet the requirements of tissue culture grade and are suitable for use with mammalian cells.

**3.5****subconfluency**

approximately 80 % confluency, i.e. the end of the logarithmic phase of growth

**4 Sample preparation****4.1 General**

The test shall be performed on either

- a) an extract of the material; and/or
- b) the material itself.

Sample preparation shall be in accordance with ISO 10993-12.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์  
ห้ามคัดลอกโดยไม่ได้รับอนุญาต

**4.2 Preparation of liquid extracts of material****4.2.1 Principles of extraction**

Extraction conditions should attempt to simulate or exaggerate the conditions of clinical use so as to determine the potential toxicological hazard, without causing significant changes in the test material such as fusion, melting or alteration of the chemical structure.

**NOTE** The concentration of any endogenous or extraneous substances in the extract, and hence the amount of exposure to the test cells, depends on the interfacial area, extraction volume, pH, chemical solubility, diffusion rate, osmolarity, agitation, temperature, time and other factors.

<sup>2)</sup> Organo-tin poly(vinyl chloride) positive control material is available from SIMS Portex Ltd, Hythe, Kent, CT21 6JL, UK, (product No 499-300-000). The ZDEC and ZDBC polyurethanes are available from Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan). This information is given for the convenience of the user of this part of ISO 10993 and does not constitute an endorsement by ISO of the product.

#### 4.2.2 Extraction vehicle

For mammalian cell assays, one or more of the following solvents shall be used. The choice of the extraction vehicle(s) shall be justified:

- a) culture medium with serum;
- b) culture medium without serum;
- c) physiological saline solution;
- d) other suitable solvent.

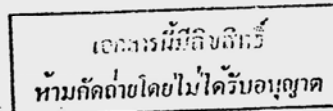
**NOTE** The choice of solvent should reflect the aim of the extraction and consideration shall be given to the use of both a polar and a nonpolar solvent. Suitable solvents include purified water, vegetable oil and dimethyl sulfoxide (DMSO). DMSO is known to be cytotoxic in selected assay systems at greater than 0,5 % (volume fraction) concentrations.

#### 4.2.3 Extraction conditions

**4.2.3.1** The extraction shall be performed in sterile, chemically inert closed containers using aseptic techniques, in general accordance with ISO 10993-12.

**4.2.3.2** Recommended extraction conditions are:

- a) not less than 24 h at  $(37 \pm 2)$  °C;
- b)  $(72 \pm 2)$  h at  $(50 \pm 2)$  °C;
- c)  $(24 \pm 2)$  h at  $(70 \pm 2)$  °C;
- d)  $(1 \pm 0,2)$  h at  $(121 \pm 2)$  °C.



The recommended conditions may be applied according to the device characteristics and specific conditions for use.

Extraction procedures using culture medium with serum can only be used under the conditions specified in 4.2.3.2 a).

**4.2.3.3** If the extract is filtered, centrifuged or processed by other methods prior to being applied to the cells, this shall be included in the final report (see clause 9). Any pH adjustment of the extract shall be reported. Manipulation of the extract, such as by pH adjustment, could influence the result.

#### 4.3 Preparation of material for direct-contact tests

**4.3.1** Materials that have various shapes, sizes or physical states (i.e. liquid or solid) may be tested without modification in the cytotoxicity assays.

The preferred sample of a solid specimen should have at least one flat surface.

Adjustments shall be made for other shapes and physical states.

**4.3.2** Sterility of the test specimen shall be taken into account.

**4.3.2.1** Test materials from sterilized devices shall be handled aseptically throughout the test procedure.

**4.3.2.2** Test materials from devices which are normally supplied non-sterile but are sterilized before use shall be sterilized by the method recommended by the manufacturer and handled aseptically throughout the test procedure.

The effect of sterilization methods or agents on the device should be considered in defining the preparation of the test material prior to use in the test system.



**4.3.2.3** Test materials from devices not required to be sterile in use shall be used as supplied and handled aseptically throughout the test procedure.

**4.3.3** Liquids shall be tested by either

- a) direct deposition; or
- b) deposition onto a biologically inert absorbent matrix.

**NOTE** Filter discs have been found to be suitable.

**4.3.4** If appropriate, materials classed as superabsorbent shall be soaked with culture medium prior to testing to prevent sorption of the culture medium in the testing vessel.

## 5 Cell lines

**5.1** Established cell lines are preferred and where used shall be obtained from recognized repositories<sup>3)</sup>.

**5.2** Where specific sensitivity is required, primary cell cultures, cell lines and organo-typic cultures obtained directly from living tissues shall only be used if reproducibility and accuracy of the response can be demonstrated.

**5.3** If a stock culture of a cell line is stored, storage shall be at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  or below in the corresponding culture medium but containing a cryoprotectant, e.g. dimethylsulfoxide or glycerol. Long-term storage (several months up to many years) is only possible at  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  or below.

**5.4** Only cells free from mycoplasma shall be used for the test. Before use, stock cultures should be tested for the absence of mycoplasma.

## 6 Culture medium

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์  
ห้ามคัดลอกโดยไม่ได้รับอนุญาต

**6.1** The culture medium shall be sterile.

**6.2** The culture medium with or without serum shall meet the growth requirements of the selected cell line.

**NOTE** Antibiotics may be included in the media provided that they do not adversely affect the assays.

The stability of the culture medium varies with the composition and storage conditions. Media containing serum and glutamine shall be stored at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  for no more than one week. Glutamine-containing media without serum shall be stored at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  for no more than two weeks.

**6.3** The culture medium shall be maintained at a pH of between 7.2 and 7.4.

## 7 Preparation of cell stock culture

**7.1** Using the chosen cell line and culture medium, prepare sufficient cells to complete the test. If the cells are to be grown from cultures taken from storage, remove the cryoprotectant, if present. Subculture the cells at least once before use.

<sup>3)</sup> For example, recommended cell lines are American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5) and CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) and CCL 10 [(BHK-21 (C-13))] and V-79 379A. This information is given for the convenience of the user of this part of ISO 10993 and does not constitute an endorsement by ISO of the products named. Other cell lines may be used if they can be shown to lead to the same or more relevant results.

7.2 Remove and resuspend the cells by enzymatic and/or mechanical disaggregation, using a method appropriate for the cell line.

**8 Test procedures**

**8.1 Number of replicates**

A minimum of three replicates shall be used for test samples and controls.

**8.2 Test on extracts**

8.2.1 This test allows both qualitative and quantitative assessment of cytotoxicity.

8.2.2 Pipette an aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of vessels for exposure to the extracts. Distribute the cells evenly over the surface of each vessel by gentle rotation.

8.2.3 Incubate the cultures at  $(37 \pm 2)$  °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium.

The test should be performed on a subconfluent monolayer or on freshly suspended cells.

In the colony-forming assay, only an appropriate low cell density shall be used.

8.2.4 Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

8.2.5 Perform the test on

- a) the original extract; and
- b) a dilution series of the extract, using the culture medium as diluent.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์  
ห้ามคัดถ่ายโดยไม่ได้รับอนุญาต

If monolayers are used for the test, remove and discard the culture medium from the cultures and add an aliquot of the extract or dilution thereof into each of the vessels.

If suspended cells are used for the test, add the extract or dilution thereof into each of the replicate vessels immediately after preparation of the cell suspension.

8.2.6 When a non-physiological extract is used, e.g. water, the extract shall be tested at the highest physiologically compatible concentration after dilution in culture medium.

NOTE Concentrated culture medium, e.g. 2x, 5x, is recommended for use in diluting aqueous extracts.

8.2.7 Add known aliquots of the reagent blank and the negative and positive controls into additional replicate vessels.

NOTE A fresh culture medium control may also be tested, if appropriate.

8.2.8 Incubate the vessels, using the same conditions as described in 8.2.3, for an appropriate interval corresponding to the selected specific assay.

8.2.9 After an incubation period of at least 24 h, determine the cytotoxic effects in accordance with 8.5.

**8.3 Test by direct contact**

8.3.1 This test allows both qualitative and quantitative assessment of cytotoxicity.

**8.3.2** Pipette a known aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of vessels for direct exposure to the test sample. Distribute the cells evenly over the surface of each vessel by gentle horizontal rotation.

**8.3.3** Incubate the culture at  $(37 \pm 2)$  °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium until the cultures have grown to subconfluency.

**8.3.4** Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

**8.3.5** Remove and discard the culture medium. Then add fresh culture medium to each vessel.

**8.3.6** Carefully place individual specimens of the test sample on the cell layer in the centre of each replicate vessel. Ensure that the specimen covers approximately one-tenth of the cell layer surface.

Exercise care to prevent unnecessary movement of the specimens, as this could cause physical trauma to the cells, for example patches of dislodged cells.

**NOTE** When appropriate, the specimen can be placed in the culture vessel prior to the addition of the cells.

**8.3.7** Prepare replicate vessels for both the negative-control and positive-control materials.

**8.3.8** Incubate the vessels, under the same conditions as in 8.3.3, for an appropriate interval (a minimum of 24 h) corresponding to the selected specific assay.

**8.3.9** Discard the supernatant culture medium and determine the cytotoxic effects in accordance with 8.5.

#### **8.4 Test by indirect contact**

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์

ห้ามคัดลอกโดยไม่ได้รับอนุญาต

##### **8.4.1 Agar diffusion test**

**8.4.1.1** This test allows a qualitative assessment of cytotoxicity. This assay is not appropriate for leachables that cannot diffuse through the agar layer, or that should react with agar.

**8.4.1.2** Pipette a known aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of replicate vessels for the test. Distribute the cells evenly over the surface of each vessel by gentle horizontal rotation.

**8.4.1.3** Incubate the cultures at  $(37 \pm 2)$  °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium until the cultures have grown to approximate confluence at the end of the logarithmic phase of the growth curve.

**8.4.1.4** Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

**8.4.1.5** Remove and discard the culture medium from the vessel. Then mix fresh culture medium containing serum with melted agar to obtain a final mass concentration of agar of 0,5 % to 2 %, and pipette an appropriate volume into each vessel. Use only agar that is suitable for the growth of mammalian cells in culture. The agar culture medium mixture should be in a liquid state and at a temperature that is compatible with mammalian cells.

**NOTE** Agar is available in various molecular weight ranges and purities.

**8.4.1.6** Carefully place replicate specimens of the test sample on the solidified agar layer in each vessel. Ensure that the specimen covers approximately one-tenth of the cell layer surface.

Pre-soak any absorbent material with the culture medium before placing it on the agar to prevent dehydration of the agar.

**8.4.1.7** Prepare replicate vessels with both negative-control and positive-control specimens.

**8.4.1.8** Incubate the vessels, using the same conditions as described in 8.4.1.3, for between 24 h and 72 h.

**8.4.1.9** Examine the cells to determine cytotoxic effects before and after carefully removing the specimens from the agar.

Use of a vital stain, e.g. neutral red, may aid in the detection of cytotoxicity. The vital stain may be added before or after the incubation with the specimen. If the stain is added before the incubation, protect the cultures from light to prevent cell damage elicited by photoactivation of the stain.

**8.4.2 Filter diffusion test**

**8.4.2.1** This test allows a qualitative assessment of cytotoxicity.

**8.4.2.2** Place a surfactant-free filter of pore size 0,45 µm into each vessel, and add a known aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of replicate vessels for the test. Distribute the cells evenly over the surface of each filter by gentle rotation.

**8.4.2.3** Incubate the cultures at (37 ± 2) °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium until the cultures have grown to approximate confluence at the end of the logarithmic phase of the growth curve.

**8.4.2.4** Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

**8.4.2.5** Remove and discard the culture medium from the vessels. Then transfer the filters, cell-side down, on to a layer of solidified agar (see 8.4.1.6).

**8.4.2.6** Carefully place the replicate specimens of the test sample on the acellular (top) side of the filter. Retain liquid extracts and freshly mixed compounds in non-reactive rings placed on the filter.

**8.4.2.7** Prepare replicate filters with both the negative-control and positive-control specimens.

**8.4.2.8** Incubate the vessels, using the same conditions described in 8.4.2.3, for 2 h ± 10 min.

**8.4.2.9** Carefully remove the specimens from the filter and carefully separate the filter from the agar surface.

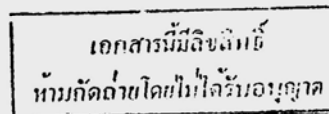
**8.4.2.10** Determine the cytotoxic effects using an appropriate stain procedure.

**8.5 Determination of cytotoxicity**

**8.5.1** Determine cytotoxic effects by either qualitative or quantitative means.

a) **Qualitative evaluation:** examine the cells microscopically, using cytochemical stain if desired. Assess changes in, for example, general morphology, vacuolization, detachment, cell lysis and membrane integrity. The change from normal morphology shall be recorded in the test report descriptively or numerically. A useful way to grade test materials is presented below.

Cytotoxicity scale	Interpretation
0	Noncytotoxic
1	Mildly cytotoxic
2	Moderately cytotoxic
3	Severely cytotoxic



The method of evaluation and the results of the evaluation shall be included in the test report.

b) **Quantitative evaluation:** measure the parameter cell death, inhibition of cell growth, cell proliferation or colony formation. The number of cells, amount of protein, release of enzymes, release of vital dye, reduction of vital dye or other measurable parameter may be quantified by objective means. The objective measure and response shall be recorded in the test report.

NOTE For particular methods of determining cytotoxicity, a zero time or baseline cell culture control may be necessary.

**8.5.2** Ensure that care is taken in the choice of evaluation methods, as the test results may be invalid if the test specimen releases substances that interfere with the test system or measurement.

**NOTE** Materials that may release formaldehyde can only be reliably tested when cell viability is evaluated.

**8.5.3** If there are evident differences in the test result for replicate culture vessels, then the test is either inappropriate or invalid.

**8.5.4** If the negative, positive and any other controls (reference, medium, blank, reagent, etc.) do not have the expected response in the test system, then repeat the assay(s).

## 9 Test report

The test report shall include the following details:

- a) description of the sample;
- b) cell line and justification of the choice;
- c) culture medium;
- d) assay method and rationale;
- e) extraction procedure (if appropriate) and if possible the nature and concentration of the leached substance(s);
- f) negative, positive and other controls;
- g) cell response and other observations; and
- h) any other relevant data necessary for the assessment of results.

## 10 Assessment of results

The overall assessment of the results shall be carried out by a person capable of making informed decisions based on the test data. If the results are inconsistent among replicates or invalid, the tests shall be repeated.

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์  
ห้ามคัดลอกโดยไม่ได้รับอนุญาต

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณวัตถุดิบที่ใช้ในการหลอมแก้ว

## การคำนวณวัตถุดิบที่ใช้ในการหลอมแก้ว

ในการศึกษานี้จะเตรียมกลาสเซรามิกส์จากแก้ว 2 ระบบคือ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  และระบบ  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5$  โดยเริ่มจากการหลอมแก้วที่มีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ ข.1 แสดงส่วนประกอบร้อยละโดยโมลของแก้ว

แก้ว	$\text{SiO}_2$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{B}_2\text{O}_3$	$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{CaO}$	$\text{Na}_2\text{O}$
C1	7	13	10	30	30	10
C2	-	6	10	32	41	11

เมื่อคำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักของแก้วทั้ง 2 ชนิด จะได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ ข.2 แสดงส่วนประกอบร้อยละโดยน้ำหนักของแก้วทั้ง 2 ชนิด

แก้ว	$\text{SiO}_2$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{B}_2\text{O}_3$	$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{CaO}$	$\text{Na}_2\text{O}$
C1	4.671	14.721	7.732	47.309	18.684	6.683
C2	-	6.926	7.882	51.442	26.031	7.719

หลังจากนั้นนำข้อมูลจากตารางที่ 2 มาคำนวณหาปริมาณของวัตถุดิบที่ต้องใช้ในการหลอมแก้ว เพื่อให้ได้แก้ว 100 กรัม ในการหลอมแต่ละครั้ง ซึ่งจะต้องใช้วัตถุดิบดังต่อไปนี้

ตารางที่ ข.3 แสดงปริมาณวัตถุดิบที่ต้องใช้ในการหลอมแก้ว (กรัม)

แก้ว	$\text{SiO}_2$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{HBO}_3$	$\text{H}_3\text{PO}_4$	$\text{CaCO}_3$	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
C1	4.671	14.721	13.734	76.800	33.364	11.770
C2	-	6.926	14.000	83.510	46.484	13.200

ภาคผนวก ค

วิธีนับจำนวนเซลล์



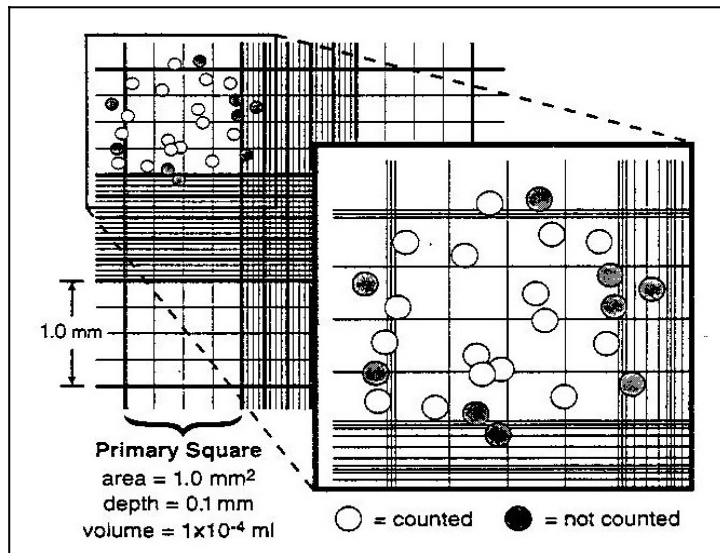
## วิธีนับจำนวนเซลล์

ในการนับจำนวนเซลล์ต้องทำการย้อมสีเซลล์ก่อนโดยใช้ crystal violet เซลล์ที่มีชีวิตไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีม่วง เมื่อย้อมเซลล์แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์มาเล็กน้อยใส่ลงในฮีโมไซโตมิเตอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นแก้วที่ติดตารางไว้เป็นช่อง ๆ ในแต่ละช่องจะมีพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร ดังรูปที่ 1 การนับเซลล์จะนับเซลล์ที่ไม่ติดสีคือมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ๆ ใส ๆ (เซลล์ที่มีชีวิต) จากตารางโดยนับเพียงช่องเดียว จากรูปเห็นว่าเซลล์ที่พบบนเส้นขอบของตารางนั้นจะนับเพียง 2 ด้านเท่านั้น ส่วนด้านที่เหลือเซลล์ที่อยู่บนเส้นจะไม่ถูกนับ เมื่อนับเซลล์ที่ปรากฏอยู่ภายในตารางแล้วนำจำนวนที่นับได้มากำหนดหาปริมาณเซลล์โดยใช้สมการ

$$\text{จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร} = \text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 1 ช่อง} \times 1000 \times \text{dilution factor}$$

โดย dilution factor หาได้จาก

$$\text{Dilution factor} = (\text{ปริมาตรของตัวอย่าง} + \text{ปริมาตรของสารที่ใช้ย้อม}) / \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}$$



รูปที่ ค.1 แสดงตารางที่ปรากฏในฮีโมไซโตมิเตอร์ และตัวอย่างการนับจำนวนเซลล์ในตาราง

ภาคผนวก ง

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

รายชื่อบทความที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในขณะศึกษา

N. Umponpisol and C. Lorprayoon. Bioactive behaviour of a new machinable glass-ceramic containing  $\beta$ -calcium pyrophosphate. **The Sixth Asian Bioceramics Symposium 2006**. 7-10 November 2006

## ประวัติผู้เขียน

นางนิตา จันทร์พวง เกิดเมื่อวันที่ 7 มิถุนายน พ.ศ. 2522 ที่อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น เริ่มการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนอนุบาลศรีสะเกษ ระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนศรีสะเกษวิทยาลัย จังหวัดศรีสะเกษ และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วิศวกรรมเซรามิก) สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อ พ.ศ. 2544 ภายหลังจากสำเร็จการศึกษาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2545 ขณะที่ยังศึกษาอยู่ได้นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ภายใต้วหัวข้อ “Bioactive behaviour of a new machinable glass-ceramic containing  $\beta$ -calcium pyrophosphate” และได้รับการตีพิมพ์ลงใน The Sixth Asian Bioceramics Symposium 2006