

การดัดแปรฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตนด้วยโปรตีนผ่านการสร้างหมู่ฟังก์ชันด้วยพลาสมาและสารเชื่อม
ขวางคาร์โบไดไฮไมด์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MODIFICATION OF POLYCAPROLACTONE WITH PROTEINS THROUGH PLASMA FUNCTIONALIZATION AND CARBODIIMIDE CROSSLINKING AGENT

Miss Paramaporn Sahapaibounkit



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปรฟิล์มพอลิคาร์โบรแลกโตนด้วยโปรตีนผ่านการสร้างหมู่ฟังก์ชันด้วยพลาสมาและสารเชื่อมขวางคาร์โบไดไฮไมด์
โดย	นางสาวปรมาภรณ์ สหไพบุลย์กิจ
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐชาติ มงคลนาวิน

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชัย ชรินพานิชกุล)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐชาติ มงคลนาวิน)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.อิสราวุธ ประเสริฐสังข์)

ปรมาภรณ์ สหไพบุลย์กิจ : การดัดแปรฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตนด้วยโปรตีนผ่านการสร้างหมู่ฟังก์ชันด้วยพลาสมาและสารเชื่อมขวางคาร์โบไดอิมิด (MODIFICATION OF POLYCAPROLACTONE WITH PROTEINS THROUGH PLASMA FUNCTIONALIZATION AND CARBODIIMIDE CROSSLINKING AGENT) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.รัฐชาติ มงคลนาวิน, 124 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL) ด้วยพลาสมา โดยใช้ชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สอากาศ ร่วมกับการคอนจูเกตสารละลายโปรตีน โดยใช้สารคาร์โบไดอิมิด (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimides, EDC) เป็นสารเชื่อมขวาง ฟิล์ม PCL มีค่ามุมสัมผัสน้ำ 76.5 องศา และไม่มีหมู่ฟังก์ชันเอมีนปฐมภูมิและพันธะเอไมด์บนพื้นผิว หลังจากการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศมีการตรวจพบอะตอมของไนโตรเจน และสัดส่วนอะตอมของออกซิเจนต่อคาร์บอนบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL เพิ่มขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าพลาสมาอากาศสร้างหมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ (เอมีน หรือคาร์บอกซิล) จะถูกคอนจูเกตกับหมู่ฟังก์ชันของโปรตีน (เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส) ผ่านปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดอิมิด จากผลแสดงให้เห็นว่าค่ามุมสัมผัสน้ำ, ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ และปริมาณพันธะเอไมด์ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลา 15 วินาที ถึง 4 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ (ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก) เป็น 54.1-61.8 องศา, 1.3-2.8 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร และ 13.28-24.06% ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของความชอบน้ำ และการตรวจพบหมู่เอมีนปฐมภูมิ และพันธะเอไมด์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา และเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดอิมิด พิสูจน์ว่าการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอบนฟิล์ม PCL ประสบความสำเร็จ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอพบปริมาณพันธะเอไมด์สูงสุด ดังนั้น ระยะเวลาการดัดแปรด้วยพลาสมา 1 นาที จึงถูกใช้ในการศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก มีค่ามุมสัมผัสน้ำ และปริมาณพันธะเอไมด์ใกล้เคียงกัน ผลความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา และการคอนจูเกตโปรตีน (ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก) ด้วยเซลล์ผิวหนังหนู (L929) แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับบนฟิล์ม PCL ที่ไม่ผ่านการดัดแปร พื้นที่การแผ่ของเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรมากกว่าของเซลล์บนฟิล์ม PCL เมื่อเปรียบเทียบฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยโปรตีนต่างชนิดกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยโปรตีนทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่เซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยเจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบีมีพื้นที่การแผ่มากกว่าเซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ทั้งนี้ น่าจะเป็นเพราะโปรตีนทั้งสามเป็นอนุพันธ์ของคอลลาเจน ซึ่งทราบกันว่าช่วยสนับสนุนการเติบโตของเซลล์

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5470262321 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: POLYCAPROLACTONE, GELATIN, COLLAGENHYDROLYSATE, PLASMA FUNCTIONALIZATION, 124
CROSSLINKING

PARAMAPORN SAHAPAIBOUNKIT: MODIFICATION OF POLYCAPROLACTONE WITH PROTEINS THROUGH PLASMA FUNCTIONALIZATION AND CARBODIIMIDE CROSSLINKING AGENT. ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. RATTACHAT MONGKOLNAVIN, Ph.D., pp.

This research aims to study the effects of polycaprolactone surface modification through dry air plasma, generated from AC 50 Hz plasma apparatus, and protein conjugation by carbodiimide crosslinking agent. The water contact angle of neat PCL film was 76.5 degrees and no primary amine and amide bond was found on PCL surface. After air plasma treatment, nitrogen atom was found while oxygen to carbon ratio of PCL film was increased, indicating that air plasma created nitrogen- and oxygen-containing functional groups on PCL surface. The created functional groups (amine or carboxyl) were further conjugated with the functional groups of proteins (type A gelatin, type B gelatin and collagen hydrolysate) through carbodiimide crosslinking reaction. The results showed that water contact angle, the amount of primary amine and amide bond of modified PCL film with plasma treatment from 15 seconds to 4 minutes and type A gelatin conjugation (2 wt.%) were 54.1-61.8 degrees, 1.3-2.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 13.28-24.06%, respectively. Increased hydrophilicity and detected primary amine and amide bond of modified PCL film with plasma treatment and carbodiimide crosslinking proved that type A gelatin was successfully conjugated on PCL film. The modified PCL film with plasma treatment for 1 min and type A gelatin conjugation showed that highest amount of primary amine and amide bond. As a result, the plasma treatment for 1 min was used to study effects of type and concentration of protein solutions. The water contact angle and amount of amide bond of modified PCL film with plasma treatment for 1 min and conjugation with type A gelatin, type B gelatin and collagen hydrolysate at the concentration of 0.2, 1 and 2 wt.% were similar. The results on biocompatibility of neat and modified PCL films with plasma treatment for 1 min and protein conjugation (1 wt.%) using L929 mouse fibroblast showed that the attachment percentage of L929 on modified PCL film was significantly increased when compared to those on neat PCL film. The spreading area of attached cells on modified PCL film was more than those on neat PCL film. Comparing among modified PCL films with different conjugated proteins, it was found that the attachment percentages of L929 on modified PCL films with all proteins were not significantly different while the spreading areas of cells on type A and type B gelatins modified PCL were obviously more than that on collagen hydrolysate modified one. This might be because these proteins are derivatives of collagen which was known to support cell growth.

Department: Chemical Engineering

Field of Study: Chemical Engineering

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จจุล่งด้วยดีของวิทยานิพนธ์นี้เกิดจากการที่ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลหลายท่าน บุคคลแรกผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษา เป็นอย่างสูง ซึ่งท่านได้ให้โอกาสผู้วิจัยศึกษางานวิจัยนี้ รวมถึงสละเวลาอันมีค่าอบรม แนะนำ และสั่งสอนความรู้แก่ผู้วิจัย ทั้งยังให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ บุคคลท่านถัดไปผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐชาติ มงคลนาวัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สำหรับคำแนะนำ และความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ชรินพานิชกุล ประธาน, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ กรรมการ และ ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ กรรมการ ภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ ดร. ภัททิ อมรสุทธิวัฒน์ สำหรับคำแนะนำ และความช่วยเหลือใน ทุกด้านตลอดการดำเนินงานวิจัย, ดร. จุฬามาศ รัตนวราภรณ์ สำหรับคำแนะนำ และความช่วยเหลือด้านความรู้สำหรับงานการดำเนินงานวิจัยทางชีวภาพ, คุณเอกสิทธิ์ จันทร์เฒ่า สำหรับคำแนะนำด้านอุปกรณ์ และเครื่องมือทางฟิสิกส์ และขอขอบคุณพี่ เพื่อนและน้อง ๆ โดยเฉพาะ คุณจุฑาทิพย์ แซ่ลี่, คุณรุ่งนภา แยมเดช และคุณหนึ่งฤทัย ใจฉะ สำหรับการแนะนำความรู้ และความช่วยเหลือต่าง ๆ รวมทั้งการให้กำลังใจ ซึ่งทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จจุล่งด้วยดี

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติชีววัสดุสำหรับการแพทย์ ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยี พลาสมาและพลังงานพิวซ์, อาคารวิจัยนิวตรอนพลังงานสูง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่, ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับความเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และเครื่องวิเคราะห์สำหรับการดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ สำหรับการให้โอกาสและสนับสนุนในการศึกษา รวมทั้งการให้กำลังใจให้ผู้วิจัยสามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่าง ๆ ด้วยดี และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 มุลเหตุจูงใจและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1.1 การเกิดพลาสมา.....	5
2.1.3.1 ช่วงดาร์กดีสชาร์ต.....	11
2.1.3.2 ช่วงโกลดีสชาร์ต.....	13
2.1.3.3 ช่วงอาร์กดีสชาร์ต.....	13
2.2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของ PCL.....	17
2.3.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเจลาติน.....	19
2.3.2 การจำแนกประเภทเจลาตินตามกระบวนการผลิต.....	20
2.3.3 การประยุกต์ใช้เจลาติน.....	21
2.4.1 สมบัติทางกายภาพและเคมี.....	22
2.6.1 การตัดแปรด้วยสารเคมี (Wet chemical).....	28
2.6.2 การตัดแปรด้วยแก๊สที่แตกตัวเป็นไอออน (Ionized gas treatment).....	28

2.6.3 การตัดแปรด้วยการฉายรังสียูวี (UV irradiation)	29
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	36
2.9.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวทำละลายของพอลิคาร์โบรเลกโตน	36
2.9.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเชื่อมขวาง.....	37
2.9.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดด้วยพลาสมา	39
2.9.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมาและตรึงด้วยโปรตีน	45
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	48
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	48
3.2 อุปกรณ์.....	49
3.3 แผนผังดำเนินงานวิจัย.....	51
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	52
3.4.1 การเตรียมฟิล์มพอลิคาร์โบรเลกโตน.....	52
3.4.2 การตัดแปรฟิล์มพอลิคาร์โบรเลกโตนด้วยพลาสมาอากาศ.....	52
3.4.2.1 การวิเคราะห์อนุภาคที่ถูกกระตุ้นด้วย Optical emission spectrometry (OES).....	53
3.4.3 การคอนจุกต์โปรตีนบนฟิล์มพอลิคาร์โบรเลกโตน.....	54
3.4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี.....	57
3.4.4.3 การศึกษาเอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) บนพื้นผิวด้วย X-ray photo-electron spectroscopy (XPS).....	58
3.4.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงจากเทคนิค TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid)	59
3.4.5 การวิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ	60
3.4.5.1 การเตรียมเซลล์ L929 (L929 Mouse fibroblast) เพื่อใช้ในการทดสอบ.....	60

3.4.5.2 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะ (Adhesion) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตนด้วยการวัดปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ (DNA assay)	61
3.4.5.3 การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานเซลล์ L929 (Cell morphology) และพื้นที่การแผ่ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	62
3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	63
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	64
4.1 คุณลักษณะของพลาสมาอากาศ	64
4.2 สมบัติทางเคมีของฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL)	66
4.2.1 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL	66
4.3 สมบัติทางเคมีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ	69
4.4 อิทธิพลของระยะเวลาการดัดแปรด้วยพลาสมาต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของพื้นผิว PCL ภายหลังการคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ	72
4.4.1 ค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิว	72
4.4.2 ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) บนพื้นผิว	74
4.4.3 ปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว	75
4.5 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการคอนจุกต์ภายหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีบนพื้นผิว	81
4.5.1 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนต่อค่ามุมสัมผัสน้ำ	82
4.5.2 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนต่อปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว	83
4.5.3 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อพื้นฐานพื้นผิว	90
4.6 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) ในระดับห้องปฏิบัติการ	93

4.6.1 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อปริมาณการยึดเกาะและเจริญเติบโตของ เซลล์ผิวหนังหนู.....	94
4.6.2 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อโครงสร้างสัณฐานและพื้นที่การแผ่ของ เซลล์ผิวหนังหนู.....	97
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	102
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	102
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	105
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก ก.....	115
ภาคผนวก ข.....	116
ภาคผนวก ค.....	118
ภาคผนวก ง.....	120
ภาคผนวก จ.....	122
ภาคผนวก ฉ.....	123
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	124

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	ประเภทของการชนที่สำคัญในการเกิดพลาสมา.....	7
ตารางที่ 2.2	องค์ประกอบกรดอะมิโนของเจลาติน และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส.....	23
ตารางที่ 3.1	สรุปตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมีและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ	56
ตารางที่ 4.1	ความสัมพันธ์ของความยาวคลื่น และชนิดของอนุภาคของพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์	65
ตารางที่ 4.2	ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง XPS เปรียบเทียบกับค่าทางทฤษฎี.....	66
ตารางที่ 4.3	ความสัมพันธ์ของตำแหน่งเลขคลื่นที่มีการดูดกลืนแสง และชนิดของพันธะของฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR.....	68
ตารางที่ 4.4	ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL ก่อนและหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 2 นาที และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และทำปฏิกิริยากับไอของสาร TFBA (Trifluoromethylbenzaldehyde) จากการวิเคราะห์ด้วย XPS	70
ตารางที่ 4.5	สัญญาณพื้นผิว และค่า Rms ของฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย AFM	91
ตารางที่ 4.6	ตัวอย่างฟิล์ม PCL สำหรับการศึกษความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast).....	93
ตารางที่ 4.7	ร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of attachment), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Multiplication rate, μ) และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ L929 บนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และ คอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิสไตรีน (TCP).....	96

ตารางที่ 4.8 โครงสร้างสัณฐานและพื้นที่การแผ่ของเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วย สารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดย น้ำหนัก ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง	99
ตารางที่ 4.9 สรุปสมบัติทางกายภาพ เคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ L929 ของ ฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการ คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก.....	101
ตารางที่ ค.1 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์มเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจน- ไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution	118
ตารางที่ ง.1 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วย พลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ (15 วินาที ถึง 4 นาที) และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาติน ชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution.....	113
ตารางที่ ง.2 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วย พลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution.....	114

สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่ 2.1	การเคลื่อนที่ของประจุและอิเล็กตรอนในท่อกระแสไฟฟ้าความดันต่ำ	7
รูปที่ 2.2	โครงแบบการแตกตัวในบริเวณแผ่นขนาน	8
รูปที่ 2.3	ความสัมพันธ์ความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้า	11
รูปที่ 2.4	บริเวณความต่างศักย์ไฟฟ้า-กระแสไฟฟ้าของการปลดปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงความดันต่ำ	12
รูปที่ 2.5	การสังเคราะห์ PCL จาก ϵ -caprolactone	17
รูปที่ 2.6	โครงสร้างของคอลลาเจน	19
รูปที่ 2.7	โครงสร้างของเจลาติน	19
รูปที่ 2.8	กระบวนการผลิตเจลาตินด้วยกรดและต่างจากคอลลาเจน	21
รูปที่ 2.9	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเพปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส	22
รูปที่ 2.10	แผนผังทั่วไปของการกราฟมอนอเมอร์ลงบนพื้นผิวพอลิเมอร์	30
รูปที่ 2.11	แนวความคิดในการดัดแปรพื้นผิวทางชีวภาพ	30
รูปที่ 2.12	กลไกการตรึงสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพบนพื้นผิว	31
รูปที่ 2.13	กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในระดัห้องปฏิบัติการ	33
รูปที่ 3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัยโดยรวม	51
รูปที่ 3.2	ภาคตัดขวางของฟิล์ม PCL ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	52
รูปที่ 3.3	แผนผังชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์	53
รูปที่ 3.4	การวางฟิล์ม PCL ลงใน Chamber	54
รูปที่ 3.5	การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรเซส ด้วย SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	55
รูปที่ 3.6	การเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน และคาร์บอกซิลิกของโปรตีนด้วยคาร์โบไดไอไมด์	55
รูปที่ 3.7	แรงดึงผิวของของเหลวบนพื้นผิวของแข็ง	57
รูปที่ 3.8	รูปแบบมุมสัมผัสต่าง ๆ ของของเหลวบนพื้นผิวของของแข็ง	58

รูปที่ 3.9	หลักการการทำงานของเครื่อง AFM	60
รูปที่ 4.1	สเปกตรัมการปลดปล่อยแสงของพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมา โดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่อัตราการไหล 5, 10, 15 และ 20 ลูกบาศก์-เซนติเมตรต่อนาที จากการวิเคราะห์ด้วย OES.....	65
รูปที่ 4.2	การจำแนกพันธะในโครงสร้าง PCL	66
รูปที่ 4.3	สเปกตรัม C1s ของฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution	67
รูปที่ 4.4	อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR.....	67
รูปที่ 4.5	การทำปฏิกิริยา Derivatization ของเอมีนปฐมภูมิบนพื้นผิว PCL ด้วย TFBA.....	70
รูปที่ 4.6	ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก...	72
รูปที่ 4.7	ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิบนพื้นผิวฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TNBS ทั้งก่อนและหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก	74
รูปที่ 4.8	เปอร์เซ็นต์อะตอมคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนของพื้นผิวฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย XPS ทั้งก่อนและหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก	76
รูปที่ 4.9	สเปกตรัม C1s ของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลา 15 วินาที, 30 วินาที, 1 นาที, 2 นาที และ 4 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution	77
รูปที่ 4.10	ปริมาณกลุ่มพันธะของพื้นผิวฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution ทั้งก่อนและหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก.....	78
รูปที่ 4.11	แบบจำลองการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ในกระบวนการเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดไอไมด์.....	80
รูปที่ 4.12	การเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิล และเอมีนด้วยสารเชื่อมขวางคาร์โบไดไอไมด์.....	80

- รูปที่ 4.13** ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก..... 82
- รูปที่ 4.14** ปริมาณอะตอมของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS..... 84
- รูปที่ 4.15** สเปกตรัม C1s ของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจุกต์ด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution..... 86
- รูปที่ 4.16** ปริมาณกลุ่มพันธะของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution..... 88
- รูปที่ 4.17** ปริมาณเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิสไตรีน (TCP, Positive control) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% 94
- รูปที่ ก.1** กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -alanine สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐุม-ภูมิ ด้วยเทคนิค TNBS..... 115
- รูปที่ ข.1** กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -alanine สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐุม-ภูมิ ด้วยเทคนิค TNBS..... 116
- รูปที่ ข.2** ปริมาณหมู่เอมีนปฐุม-ภูมิของฟิล์มเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TNBS..... 117
- รูปที่ ค.1** สเปกตรัม C1s ของฟิล์มเจลาตินเอบริสุทธิ์ ฟิล์มเจลาตินชนิดบีบริสุทธิ์ และฟิล์มคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution 119

รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ L929 ด้วยการวัดปริมาณ DNA ของ
เซลล์ 122



บทที่ 1

บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วของวิวัฒนาการทางการแพทย์มีสาเหตุสำคัญมาจากการพัฒนาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นสาขาวิชาที่มุ่งพัฒนาวัสดุและเซลล์ที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกาย โดยผลิตภัณฑ์ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ หรือถูกทำลาย สิ่งสำคัญในการพัฒนาวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ การจำลองสภาวะสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติของเซลล์ ทั้งโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี

พอลิเมอร์สังเคราะห์เป็นวัสดุที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากพอลิเมอร์สังเคราะห์มีความเสถียรทางโครงสร้าง และมีสมบัติทางกลที่สนับสนุนการตอบสนองของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ พอลิเมอร์สังเคราะห์บางชนิดยังมีสมบัติคล้ายวัสดุทางธรรมชาติ เช่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) และมีความสามารถในการย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biodegradability) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์สังเคราะห์ส่วนใหญ่จะไม่มีความสามารถในการทำอันตรกิริยากับสิ่งมีชีวิต (Bioactivity) พอลิคาร์โพรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL) เป็นหนึ่งในพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีศักยภาพในการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แต่ขาดความสามารถในการทำอันตรกิริยากับสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก PCL มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยไม่เกิดสารพิษ มีโครงสร้างที่เสถียร มีสมบัติทางกลที่ดี และมีอัตราการย่อยสลายต่ำ แต่ PCL ขาดหมู่ฟังก์ชันที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive functional groups) มีความไม่ชอบน้ำ และพลังงานพื้นผิวต่ำ ส่งผลให้ความสัมพันธ์และอันตรกิริยากับเซลล์บนพื้นผิวน้อย เซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตต่ำ ซึ่งนำไปสู่การสร้างเนื้อเยื่อทดแทนที่ช้า [1, 2] ด้วยเหตุนี้การปรับปรุงสมบัติทางเคมีของ PCL จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาวัสดุในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

การดัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมาเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพลาสมาเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ใช้ระยะเวลาการดัดแปรสั้น และสามารถดัดแปรพื้นผิวโดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติในเนื้อวัสดุ (Bulk material) หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวที่เกิดจากการดัดแปรด้วยพลาสมาขึ้นกับแก๊สที่ใช้ในการแตกตัว เช่น พลาสมาไนโตรเจนเหนี่ยวนำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว [3, 4] พลาสมาออกซิเจนเหนี่ยวนำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว [3, 5, 6] และพลาสมาอากาศเหนี่ยวนำให้เกิดหมู่

ฟังก์ชันที่มีทั้งออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว [7-12] เป็นต้น ซึ่งหมู่ฟังก์ชันที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลให้พื้นผิวมีความชอบน้ำ และความสามารถในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์สูงขึ้น จากรายงานในปี 2012 Prasertsung, I. และคณะ [3] พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ถูกตัดแปรด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ (AC 50 Hz) ของแก๊สอากาศ ออกซิเจน และไนโตรเจน ที่มีการใช้พลังงานต่ำ ใช้งานได้ง่าย และราคาถูก สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว เช่น หมู่เอมีน ($-NH_2$) และคาร์บอกซิลิก ($-COOH$) เป็นต้น ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้จะเพิ่มความชอบน้ำให้แก่พื้นผิว ส่งผลให้ของฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมามีค่ามุมสัมผัสน้ำลดลง นอกจากนี้ การเหนี่ยวนำหมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีประจุเป็นบวกบนพื้นผิวฟิล์มเจลาตินยังช่วยสนับสนุนให้เซลล์ซึ่งมีประจุเป็นลบ สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดีขึ้น และรายงานในปี 2013 Amornsudthiwat, P. และคณะ [4] พบว่าการตัดแปรพื้นผิวไฟโบรอินไหมไทย (Thai silk fibroin) ด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ (AC 50 Hz) ของแก๊สไนโตรเจน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวไฟโบรอินไหมไทย โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิว และสมบัติทางเคมีในเนื้อวัสดุ พื้นผิวไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนจึงมีความชอบน้ำเพิ่มขึ้น และมีการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) ดีขึ้น อย่างไรก็ตามรายงานในปี 2010 โดย Prasertsung, I. และคณะ [13] พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ เมื่อถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง มีปริมาณหมู่ฟังก์ชันที่เกิดจากพลาสมาลดลง แสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวที่เกิดจากพลาสมาไม่มีความเสถียร และสามารถเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาวะเดิมได้ (Recovery) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการใช้ประโยชน์จากการสร้างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวด้วยพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ร่วมกับการคอนจุกเตสสารละลายโปรตีนด้วยสารเชื่อมขวางคาร์โบไดอิมายด์ โดยฟิล์มที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาจะถูกคอนจุกเตสต่อด้วยสารละลายโปรตีนทันที เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาวะเดิมของหมู่ฟังก์ชันที่เกิดจากพลาสมา

เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสเป็นสารอนุพันธ์ของคอลลาเจน ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนในส่วนประกอบของสารเคลือบเซลล์ (Extracellular matrix, ECM) สารอนุพันธ์ของคอลลาเจนเหล่านี้ผลิตจากกระบวนการไฮโดรไลซิสคอลลาเจน ด้วยกรด ต่างหรือเอนไซม์ ซึ่งจะทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของเกลียวสามสายของคอลลาเจนเป็นสายโซ่เกลียวเดี่ยว (Coil) ของสารอนุพันธ์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสามารถละลายน้ำได้ แต่ยังคงมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับคอลลาเจน โดยเฉพาะกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ อาร์จินีน (Arginine, Arg) ไกลซีน (Glycine, Gly) และกรดแอสพาติก (Aspartic acid, Asp) หรือที่เรียกว่า

ลำดับอาร์จีดี (RGD) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำอันตรกิริยากับเซลล์สิ่งมีชีวิต เนื่องจากลำดับ RGD เป็นลำดับเปปไทด์ที่เล็กที่สุดที่บริเวณอินทิกริน (Integrin) ของเซลล์สามารถจดจำได้ ดังนั้น การคอนจูเกตสารอนุพันธ์ของคอลลาเจนบนพื้นผิวของวัสดุจึงช่วยสนับสนุนให้เซลล์ทำอันตรกิริยาบนพื้นผิวได้ดีขึ้น ดังรายงานในปี 2011 โดย Chen, J.-P. และคณะ [6] ซึ่งพบว่าแผ่นเมมเบรนเส้นใยพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLLA) ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาออกซิเจน และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินประจุบวก (Cationic gelatin) สนับสนุนให้เซลล์กระดูกอ่อนมีปริมาณการยึดเกาะบนพื้นผิวสูงขึ้น และเซลล์สามารถผลิตสารคอลลาเจนและไกลโคโคสมิโนไกลแคน (Glycoaminoglycan, GAG) ที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้มากขึ้น และรายงานในปี 2013 He, F. และคณะ [14] พบว่าเซลล์กระดูกที่ถูกเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิแลกไทด์โคไกลโคลิกแอซิดและแคลเซียมฟอสเฟตซีเมนต์ (Poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite (PLGA/CPC) scaffold) ที่ผ่านการตรึงด้วยคอลลาเจนภายหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาแอมโมเนียมีปริมาณการยึดเกาะ และการสร้างสารอัลลาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase, ALP) สูงกว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจน

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการดัดแปรพื้นผิวฟิล์ม PCL โดยใช้ชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สอากาศ (Air zero ความบริสุทธิ์ 99.99%) ในการสร้างหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว และใช้หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวในการคอนจูเกตกับโปรตีน 3 ชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของคอลลาเจน ได้แก่ เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส โดยใช้สารคาร์โบไดอิมิดเป็นสารเชื่อมขวาง เพื่อศึกษาผลของการดัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมาอากาศร่วมกับการคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนทั้งสามชนิด ที่มีต่อสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของพื้นผิวฟิล์ม PCL

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มพอลิแคปโรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL) ด้วยพลาสมา โดยใช้ชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ (AC 50 Hz) ของแก๊สอากาศ (Air zero) ร่วมกับการคอนจูเกตสารละลายโปรตีน ด้วยสารคาร์โบไดอิมิด (1-ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl)carbodiimides, EDC) ที่มีต่อสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของพื้นผิวฟิล์ม PCL

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เตรียมฟิล์ม PCL จากสารละลาย PCL ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ด้วยการเคลือบสารละลายลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ (Glass slip) แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (Air dry)

1.3.2 ตัดแปรรูปฟิล์ม PCL ด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิรตซ์ (AC 50 Hz) ของแก๊สอากาศ ที่อัตราการไหล 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ความดันพื้นฐาน 0.1 มิลลิบาร์ และตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการตัดแปรรูปด้วยพลาสมา ตั้งแต่ 15 วินาที ถึง 4 นาที

1.3.3 คอนจูเกตโปรตีนลงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมา และเชื่อมขวางด้วยสารคาร์โบไดไอไมด์ โดยตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา คือ

(1) ชนิดของโปรตีน คือ เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส

(2) ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน คือ 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก

1.3.4 ศึกษาสมบัติทางเคมี และกายภาพ

(1) องค์ประกอบเคมีบนพื้นผิว ด้วย X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

(2) ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) บนพื้นผิว ด้วยเทคนิค TNBS

(3) ความชอบน้ำของพื้นผิว ด้วยการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle)

(4) สัณฐานพื้นผิว ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic force microscopy, AFM)

1.3.5 ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ

(1) ความสามารถในการยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblast) ด้วยการวัดปริมาณ DNA ของเซลล์

(2) โครงสร้างสัณฐาน และพื้นที่การแผ่ของเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM)

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลาสมา [15-21]

พลาสมา (Plasma) จัดเป็นสถานะที่ 4 ของสสาร เนื่องจากมีสมบัติบางประการที่แตกต่างจากของแข็ง ของเหลวและแก๊ส พลาสมาเกิดจากการแตกตัวของแก๊สที่เป็นกลางกลายเป็นอนุภาคที่มีประจุ หรือไอออน กระบวนการนี้เรียกว่า “กระบวนการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization)” โดยการแตกตัวจะเกิดขึ้นเมื่อแก๊สถูกกระตุ้นจากพลังงานภายนอก เช่น พลังงานไฟฟ้า พลังงานความร้อน คลื่นไมโครเวฟและรังสียูวี เป็นต้น การกระตุ้นส่งผลให้อะตอมสูญเสียสภาพความเป็นกลางและเกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอน ปริมาณที่ใกล้เคียงกับประจุบวกส่งผลให้ประจุไฟฟ้าสุทธิของพลาสมาเป็นศูนย์ พลาสมาแสดงพฤติกรรมเหมือนอนุภาคเป็นกลาง (Quasi-neutral) และมีการอยู่ร่วมกันแบบเป็นกลุ่ม (Collective behavior)

พลาสมาสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ พลาสมาอุณหภูมิสูงและพลาสมาอุณหภูมิต่ำ พลาสมาอุณหภูมิต่ำ คือ พลาสมาที่เกิดจากการให้พลังงานสูงแก่แก๊สเพื่อให้แก๊สเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ซึ่งแก๊สในระบบของพลาสมาประเภทนี้จะเกิดการแตกตัวเกือบสมบูรณ์และระบบประจุสุทธิอยู่ในสภาวะสมดุล เช่น ปฏิกรณ์นิวเคลียร์ ไอพ่นเครื่องยนต์ เป็นต้น ส่วนพลาสมาอุณหภูมิต่ำ คือ พลาสมาที่เกิดจากการให้พลังงานต่ำแก่แก๊ส ส่งผลให้แก๊สเกิดการแตกตัวไม่สมบูรณ์ ไอออนในระบบมีอุณหภูมิต่ำ เช่น ระบบไฟฟ้ากระแสตรงที่ความดันต่ำ การปล่อยประจุด้วยคลื่นความถี่วิทยุ เป็นต้น

2.1.1 การเกิดพลาสมา

การชนกันของอนุภาคแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การชนกันแบบยืดหยุ่น (Elastic collisions) และการชนกันแบบไม่ยืดหยุ่น (Inelastic collisions) การชนกันแบบยืดหยุ่น คือ การชนกันของอนุภาคที่มีการอนุรักษ์พลังงาน หรือพลังงานจลน์ก่อนและหลังการชนมีค่าเท่ากัน แต่การชนแบบไม่ยืดหยุ่น คือ การชนที่พลังงานจลน์ก่อนและหลังการชนมีค่าไม่เท่ากัน โดยพลังงานจลน์ก่อนการชนมีค่ามากกว่าพลังงานจลน์หลังการชน ซึ่งอนุภาคที่เกิดการชนนั้นจะเกิดการดูดซับพลังงานและเปลี่ยนสถานะไปสู่สภาวะกระตุ้น

กระบวนการชนกันของอนุภาคที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพลาสมา คือ การชนกันระหว่างอนุภาคที่มีประจุ (Charged particles) และแก๊สที่เป็นกลาง ในขณะที่เกิดการชนอะตอมที่เป็นกลางจะเกิดการดูดซับพลังงาน หรือถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคที่มีประจุ ส่งผลให้พลังงานอิเล็กตรอนของอะตอมเพิ่มสูงกว่าสภาวะกระตุ้นและเกิดการสูญเสียพลังงานในรูปการแผ่รังสี กระบวนการดังกล่าวสามารถอธิบาย

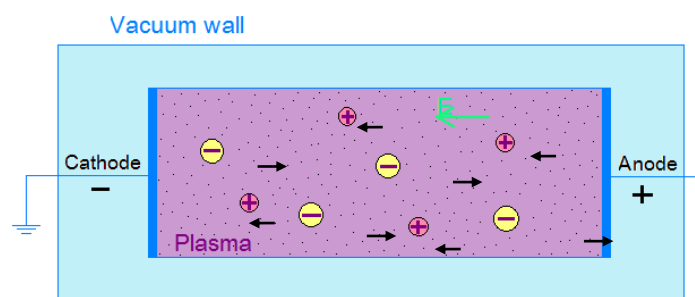
ด้วยฟังก์ชันการกระจายตัวของแมกซ์เวลล์-บอลตซ์มานน์ (Maxwell-Boltzmann distribution) ในทฤษฎีการชนของแต่ละอนุภาค หรือการเกิดพลาสมา กล่าวคือ การชนกันของแต่ละอนุภาคจะเกิดปฏิกิริยาแตกพันธะ หรือสร้างพันธะใหม่ก็ต่อเมื่อการชนมีทิศทางที่เหมาะสมและมีพลังงานเพียงพอ การชนจึงสามารถก่อให้เกิดได้ทั้งอิเล็กตรอน อีออนและอะตอม หรือโมเลกุลที่เป็นกลางดังแสดงในตารางที่ 2.1 เช่น ในปฏิกิริยาไอออไนเซชัน (Ionization) เมื่ออิเล็กตรอนชนกับอะตอม (A) ที่เป็นกลาง อะตอมจะเกิดการแตกตัวปลดปล่อยอิเล็กตรอนและคงเหลือสภาพที่เป็นประจุบวก (A^+) เมื่ออิเล็กตรอน หรืออีออนที่เกิดจากการแตกตัวได้รับพลังงานอิสระในสถานะที่เหมาะสมจะเกิดการรวมตัวเป็นอะตอม หรือโมเลกุลที่เป็นกลาง (Third body) ในปฏิกิริยารีคอมบิเนชัน (Recombination) เป็นต้น โดยแก๊สที่อยู่ในบริเวณที่เกิดการชนนั้น เรียกว่า แก๊สลอเรนซ์เซียน (Lorentzian gas)

2.1.1.1 การเคลื่อนที่ของอนุภาคภายใต้กระแสไฟฟ้าและการแตกตัว ในระบบพลาสมากระแสไฟฟ้าที่ให้ระบบแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ไฟฟ้ากระแสตรง (Direct electrical discharge, DC) และไฟฟ้ากระแสสลับ (Alternating electrical discharge, AC) รูปที่ 2.1 เป็นการเคลื่อนที่ของประจุและอิเล็กตรอนในระบบไฟฟ้ากระแสตรงความดันต่ำที่กระแสไฟฟ้าไหลในทิศทางเดียว กล่าวคือ กระแสไฟฟ้าไหลจากขั้วแคโทด (Cathode, -) ไปยังขั้วแอโนด (Anode, +) ซึ่งตรงกันข้ามกับทิศทางของสนามไฟฟ้าทำให้การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนและประจุสวนทางกัน โดยอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนด ในขณะที่ประจุจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่ำตามทิศทางของสนามไฟฟ้าไปยังขั้วแคโทด ส่งผลให้ทั้งประจุและอิเล็กตรอนในระบบเกิดการเคลื่อนที่ชนอะตอมที่เป็นกลางด้วยความเร็วคงตัว การเคลื่อนที่ของอนุภาคภายใต้ไฟฟ้ากระแสสลับความดันต่ำคล้ายกับไฟฟ้ากระแสตรง ต่างกันที่กรณีไฟฟ้ากระแสตรงไม่มีการสลับขั้วไฟฟ้า หรือไม่มีการเปลี่ยนทิศทางการไหลของกระแส หรือความต่างศักย์ระหว่างขั้วบวกและขั้วลบอย่างต่อเนื่องตามความถี่ของกระแส (ความถี่ของกระแส 50 เฮิร์ตซ์)

ตารางที่ 2.1 ประเภทของการชนที่สำคัญในการเกิดพลาสมา [19]

Electrons	
$e + A \rightarrow A^+ + e$	Ionization
$e + A \rightarrow e + A^* \rightarrow e + A + h\nu$	Excitation
$e + A^* + B \rightarrow 2e + A + B^+$	Penning ionization
$e + A \rightarrow e + A$	Elastic scattering
$e + AB \rightarrow e + A + B$	Dissociation
$e + AB \rightarrow 2e + A^+ + B$	Dissociative ionization
$e + AB \rightarrow A^- + B$	Dissociative attachment
$e + A^+ + B \rightarrow A + B^+$	Recombination
Ions	
$A^+ + B \rightarrow A + B^+$	Charge exchange
$A^+ + B \rightarrow A^+ + B$	Elastic scattering
$A^+ + B \rightarrow A^+ + B^+ + e$	Ionization
$A^+ + B \rightarrow A^+ + B^* \rightarrow A^+ + B + h\nu$	Excitation
$A^+ + e + B \rightarrow A + B$	Recombination
$A^+ + BC \rightarrow A^+ + B + C$	Dissociation
$A + BC \rightarrow C + AB$	Chemical reaction

หมายเหตุ A, B และ C แทนโมเลกุลของสารชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 2.1 การเคลื่อนที่ของประจุและอิเล็กตรอนในท่อกระแสไฟฟ้าความดันต่ำ [16]

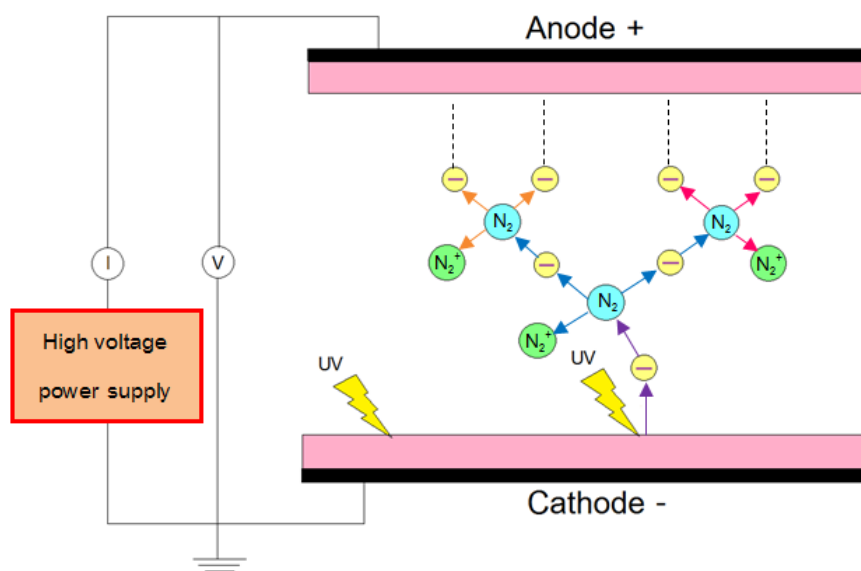
กระบวนการแตกตัวดังรูปที่ 2.2 พิจารณาเป็นการแตกตัวเนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงยูวีและการให้สนามไฟฟ้าแก่ระบบ เมื่อพื้นผิวของขั้วแคโทดดูดซับรังสีแสงยูวีและปลดปล่อยอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้าให้เคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนด เกิดการชนกับอะตอมที่เป็นกลางที่อยู่

ภายในสนามไฟฟ้าและแตกตัวเป็นอนุภาคที่มีประจุ อิเล็กตรอนที่เกิดจากการแตกตัวนั้นจะเกิดการชนกับอะตอมที่เป็นกลางตัวอื่นและแตกตัวเป็นอนุภาคที่มีประจุเช่นกัน การชนกันและแตกตัวนี้จะเกิดอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้ปริมาณอิเล็กตรอนในระบบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (อิเล็กตรอนถูกผลิตทั้งจากแหล่งกำเนิดแสงยูวีและการชนกันระหว่างอิเล็กตรอนกับอะตอมที่เป็นกลาง) ทั้งนี้การทำให้อะตอมที่เป็นกลางเกิดการแตกตัวเป็นอิเล็กตรอนต้องมีพลังงานเพียงพอและต้องเกิดการชนก่อนอิเล็กตรอนเคลื่อนที่ถึงขั้วแอโนด

2.1.2 การเกิดอนุภาคที่ถูกกระตุ้นของโกลดิสชาร์ตพลาสมา (Glow discharge plasma) [19]

การสร้างไอออนและอนุภาคที่ถูกกระตุ้นทางเคมี (Active species) ของโกลดิสชาร์ตพลาสมา เกิดจากการชนกันแบบไม่ยืดหยุ่นของอิเล็กตรอนและอะตอมที่เป็นกลางในสนามไฟฟ้า ส่งผลให้อะตอมถูกกระตุ้นและเกิดการแตกตัวเป็นอนุภาคที่มีประจุ ชิ้นส่วนของโมเลกุลและอนุภาคที่ถูกกระตุ้น

2.1.2.1 ปฏิกิริยาที่เกิดจากการกระทำของอิเล็กตรอน (Electron-based reactions) ในโกลดิสชาร์ตพลาสมา แบ่งออกเป็น 4 ประเภทดังนี้

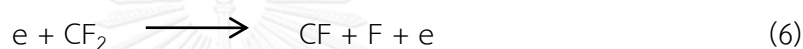
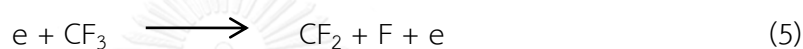
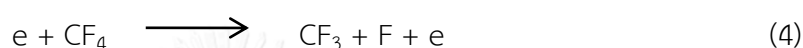
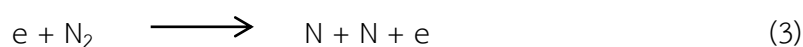


รูปที่ 2.2 โคจรแบบการแตกตัวในบริเวณแผ่นขนาน [15]

(1) ไอออนไนเซชัน (Ionization) ปฏิกริยาไอออนไนเซชันเป็นปฏิกริยาการแตกตัวของอะตอม หรือโมเลกุลที่เป็นกลางด้วยการชนของอิเล็กตรอนที่มีพลังงานเพียงพอ ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนและคู่อิเล็กตรอน ดังสมการต่อไปนี้

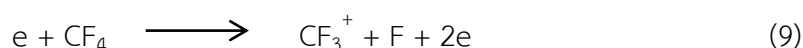
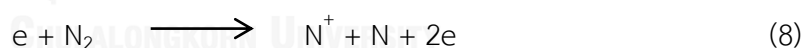


(2) ดิสโซซิเอชัน (Dissociation) ปฏิกริยาดิสโซซิเอชัน คือ ปฏิกริยาการแตกตัวของโมเลกุลที่เกิดการชนกับอิเล็กตรอนที่มีพลังงานเพียงพอ ส่งผลให้โมเลกุลที่ถูกชนเกิดการแตกตัวเป็นอิเล็กตรอนและอะตอมที่สามารถทำปฏิกริยาได้ ดังสมการต่อไปนี้

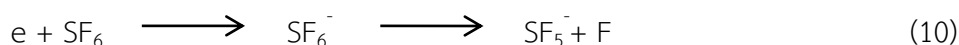


โดยอะตอมที่ได้จากปฏิกริยานี้จะมีความว่องไวสูงในการเกิดปฏิกริยาทางเคมีและช่วยสนับสนุนให้เกิดปฏิกริยาการกัดกร่อน (Etching reactions)

(3) ดิสโซซิเอทีฟ ไอออนไนเซชัน (Dissociative ionization) ปฏิกริยาดิสโซซิเอทีฟ ไอออนไนเซชัน คือ ปฏิกริยาการแตกตัวที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของอิเล็กตรอนที่มีพลังงานเพียงพอ ส่งผลให้เกิดอนุภาคที่ถูกกระตุ้นที่มีพลังงานสูงทั้งอิเล็กตรอน (โฟตอน หรืออะตอมที่มีประจุบวกและอิเล็กตรอน) และอะตอมที่สามารถทำปฏิกริยาได้ ดังสมการต่อไปนี้



(4) ดิสโซซิเอทีฟ แอทแทชเม้น (Dissociative attachment) ปฏิกริยาดิสโซซิเอทีฟ แอทแทชเม้น คือ ปฏิกริยาการชนกันของโมเลกุลและอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง โดยเมื่อเกิดการชนอิเล็กตรอนจะเกิดการยึดเกาะกับโมเลกุลและแตกโมเลกุลนั้นเป็นอิเล็กตรอนและอะตอมที่สามารถทำปฏิกริยาที่มีพลังงานสูง ดังสมการต่อไปนี้



(อิเล็กตรอนในปฏิกริยานี้ต้องมีพลังงานเพียงพอสำหรับการยึดเกาะกับโมเลกุลและแตกตัวโมเลกุลนั้นเป็นอิเล็กตรอน)

2.1.2.2 อนุภาคที่ถูกกระตุ้น (Active species) ในโกลดีสซาร์ตพลาสมาที่เกิดจากอันตรกิริยาของแก๊สและพลาสมา สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ดังนี้

(1) โฟตอน (Photons) โฟตอนเป็นอนุภาคที่ถูกกระตุ้นที่สามารถเกิดได้ทั้งในช่วงโกลดีสซาร์ตพลาสมาและอาร์กพลาสมา (Arc plasma) บนแถบสเปกตรัมความยาวคลื่นของแม่เหล็กไฟฟ้าโฟตอนบนสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้านี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

(1.1) อินฟราเรดโฟตอน (Infrared photons) เป็นโฟตอนที่มีพลังงานต่ำที่สุด พลังงานอยู่ในช่วง 1.24×10^{-3} ถึง 1.70 อิเล็กตรอนโวลต์ โฟตอนประเภทนี้สามารถเกิดอันตรกิริยากับแก๊สและแผ่รังสีจากพลาสมาในช่วงที่ตามองเห็นได้

(1.2) โฟตอนที่ตามองเห็น (Visible photons) เป็นโฟตอนที่มีพลังงานอยู่ในช่วง 1.59 ถึง 3.26 อิเล็กตรอนโวลต์ โฟตอนประเภทนี้สามารถแตกบางพันธะของโมเลกุลและกระตุ้นอะตอมด้วยการสั่นพ้องในส่วนของสเปกตรัมที่ตามองเห็น

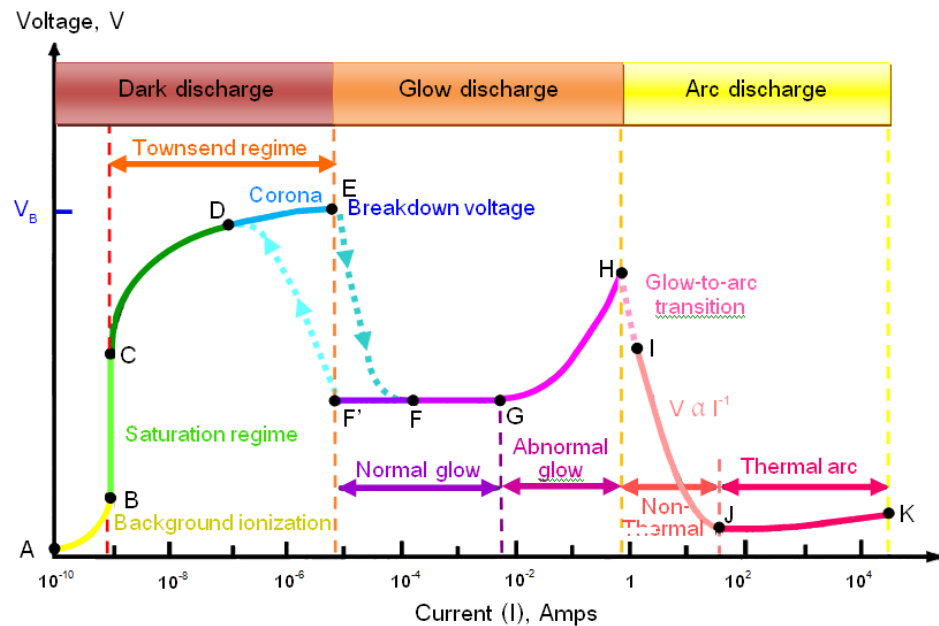
(1.3) อัลตราไวโอเล็ตโฟตอน (Ultraviolet photons) เป็นโฟตอนที่มีพลังงานมากที่สุด พลังงานอยู่ในช่วง 3.12 ถึง 95.3 อิเล็กตรอนโวลต์ โฟตอนประเภทนี้สามารถแตกตัวเป็นไอออน กระตุ้นอะตอมตัดโมเลกุลไฮโดรคาร์บอนที่มีสายยาวและแตกพันธะของโมเลกุลให้อยู่ในรูปโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า

(2) อนุภาคที่เป็นกลาง (Neutral species) อนุภาคที่เป็นกลางเป็นอนุภาคที่ถูกกระตุ้นจากการชนกันของอะตอมที่เป็นกลางกับอิเล็กตรอนและเกิดปฏิกิริยาเคมีในระบบพลาสมา อนุภาคประเภทนี้ส่วนใหญ่จะเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแกร่งกับพื้นผิววัสดุ อนุภาคที่เป็นกลางในระบบพลาสมาประกอบด้วยอะตอมที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ (Reactive atomic species) เช่น H, O และ Cl เป็นต้น มอนอเมอร์ หรือสายโซ่พอลิเมอร์ขนาดสั้นบนพื้นผิวของวัสดุ โมเลกุลเบา (Light molecular) เช่น CH₂ เป็นต้น โมเลกุลหนัก (Heavy molecular) ที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนอะตอมที่ถูกกระตุ้น (Excited atomic) และอนุมูลอิสระ (Free radicals)

(3) อนุภาคที่มีประจุ (Charged particles) เกิดจากการชนกันระหว่างอิเล็กตรอนกับอะตอมที่เป็นกลางในระบบพลาสมา อนุภาคที่มีประจุนี้สามารถเป็นได้ทั้งประจุบวกและประจุลบ โดยประจุบวกเกิดจากการแตกตัวเป็นไอออนและแลกเปลี่ยนประจุ แต่ประจุลบเกิดจากการเกาะของอิเล็กตรอนในระบบพลาสมาความดันบรรยากาศ

2.1.3 คุณลักษณะของความต่างศักย์ไฟฟ้า-กระแสไฟฟ้า (Voltage-current characteristic) [16]

คุณลักษณะของความต่างศักย์ไฟฟ้า-กระแสไฟฟ้าของการปลดปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงความดันต่ำพิจารณาจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้า ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้า [16]

ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าสามารถแบ่งได้ 3 ช่วง คือ ดาร์กดีสชาร์ต (Dark discharge) โกลดีสชาร์ต (Glow discharge) และอาร์กดีสชาร์ต (Arc discharge) ซึ่งในแต่ละช่วงการปลดปล่อยมีการแบ่งเป็นช่วงย่อยดังรูปที่ 2.4

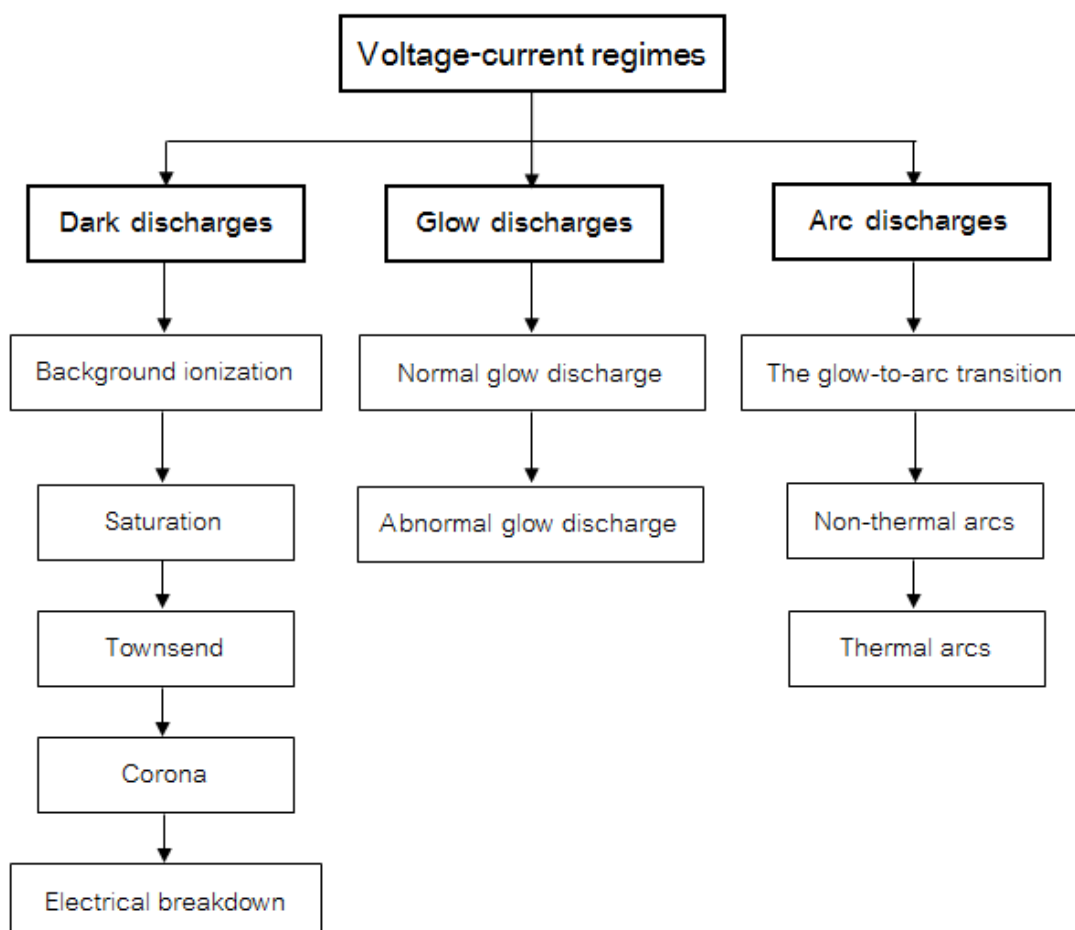
2.1.3.1 ช่วงดาร์กดีสชาร์ต

ดาร์กดีสชาร์ตเป็นช่วงที่อนุภาคถูกกระตุ้นด้วยพลังงานต่ำ ทำให้อนุภาคไม่มีพลังงานเพียงพอในการปลดปล่อยแสงที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดาร์กดีสชาร์ตแบ่งเป็น 4 ช่วงย่อย ดังนี้

(1) ช่วงการแตกตัวเป็นไอออนพื้นฐาน (Background ionization) เป็นช่วงที่อะตอมที่เป็นกลางถูกกระตุ้นด้วยการแผ่รังสีรูปแบบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วงนี้จะมีเพิ่มขึ้นสูง

(2) ช่วงอิ่มตัว (Saturation) เป็นช่วงที่ให้พลังงานไฟฟ้าแก่ระบบ ส่งผลให้อิออน (อิเล็กตรอนและอนุภาคที่มีประจุบวก) ที่เกิดจากการแตกตัวด้วยรังสี เคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่แตก-

ตัว โดยอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนด (ขั้วบวก) และอนุภาคที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ช่วงนี้อ่อนยังมีพลังงานไม่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดการแตกตัวเพิ่มเติม



รูปที่ 2.4 บริเวณความต่างศักย์ไฟฟ้า-กระแสไฟฟ้าของการปลดปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงความดันต่ำ [16]

(3) ช่วงทาวนด์เซนต์ (Townsend) เป็นช่วงที่มีการให้พลังงานไฟฟ้าสูงเพียงพอแก่ระบบ ส่งผลให้อ่อนมีพลังงานเพียงพอในการชนอะตอมที่เป็นกลางให้เกิดการแตกตัว โดยการแตกตัวนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ช่วงนี้ความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential)

(4) ช่วงโคโรนาดีสชาร์ต (Corona discharge) หรือยูนิโพลาร์ดีสชาร์ต (Unipolar discharge) เป็นช่วงที่ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าบนพื้นผิวอิเล็กโทรดบริเวณจุดคม (Sharp point) มีค่าสูง ช่วงนี้สนามไฟฟ้าจะมีพลังงานสูงกว่าพลังงานการแตกตัวของอะตอมที่เป็นกลาง การเพิ่ม

ความต่างศักย์ไฟฟ้าจนถึงจุดสูงสุดจะทำให้สนามไฟฟ้าเกิดการสลายตัว (Electrical breakdown) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่จุดนี้เรียกว่า ความต่างศักย์ไฟฟ้าสลายตัว (Breakdown voltage)

ช่วงการเปลี่ยนแปลงทั้ง 4 ช่วงดังกล่าวข้างต้นยังคงไม่เกิดการปลดปล่อยแสงที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ถ้ากระแสไฟฟ้าและปริมาณแก๊สที่เป็นกลางถูกกระตุ้นสูงเพียงพอ จะสามารถทำให้เกิดการปลดปล่อยแสงที่มนุษย์สามารถสังเกตเห็นได้

2.1.3.2 ช่วงโกลดิสชาร์ต

โกลดิสชาร์ต หรือช่วงที่พลาสมาเกิดการเรืองแสง เป็นช่วงที่อนุภาคถูกกระตุ้นด้วยการชนจนกระทั่งอิเล็กตรอนมีพลังงานและความหนาแน่นสูงเพียงพอในการปลดปล่อยแสงที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โกลดิสชาร์ตแบ่งเป็น 2 ช่วงย่อย ดังนี้

(1) ช่วงนอร์มอลดิสชาร์ต (Normal glow discharge) เป็นช่วงที่กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ขณะที่ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าคงที่ พลาสมาจะเกิดเพิ่มขึ้นจนกระทั่งปกคลุมทั่วพื้นผิวแคโทด

(2) ช่วงแอบนอร์มอลดิสชาร์ต (Abnormal glow discharge) เป็นช่วงที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามกระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น เพื่อบังคับให้กระแสไฟฟ้ามีความหนาแน่นบริเวณเหนือพื้นผิวของแคโทด

2.1.3.3 ช่วงอาร์กดิสชาร์ต

อาร์กดิสชาร์ตเป็นช่วงที่มีการปลดปล่อยแสงสูงมาก กระแสไฟฟ้ามีค่าสูงและมีความเข้ม ในขณะที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ขั้วแคโทดมีค่าลดลง อาร์กดิสชาร์ตแบ่งเป็น 3 ช่วงย่อย ดังนี้

(1) ช่วงการเปลี่ยนแปลงจากโกลไปยังอาร์ก (The glow-to-arc transition) เป็นช่วงที่ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงเป็นความร้อนบนพื้นผิวอิเล็กโทรดและเกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนที่ขั้วแคโทด

(2) ช่วงนอนเทอร์มอลอาร์ก (Non-thermal arc) เป็นช่วงที่ความต่างศักย์ไฟฟาลดลง ขณะที่กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ช่วงนี้อิเล็กตรอน อีออนและแก๊สจะมีอุณหภูมิไม่เท่ากัน

(3) ช่วงเทอร์มอลอาร์ก (Thermal arc) เป็นบริเวณที่เข้าใกล้สมดุลทางอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamic equilibrium) ความต่างศักย์ไฟฟ้าจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามกระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น อนุภาคที่มีประจุและแก๊สจะมีอุณหภูมิใกล้เคียงกัน

2.1.4 แหล่งกำเนิดพลาสมา [15]

แหล่งกำเนิดพลาสมาสามารถแบ่งเป็น 3 ประเภทหลัก ดังนี้

2.1.4.1 แหล่งกำเนิดพลาสมาแก๊ส (*Gaseous plasma sources*) เป็นแหล่งกำเนิดที่อาศัยศักย์การสลาย (Breakdown potential) ของแก๊สที่ขึ้นกับความดันและช่องว่างระหว่างอิเล็กโทรด ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าแบ่งเป็น 2 สภาวะ คือ สภาวะการปลดปล่อยกระแสไฟฟ้ารอบตัววัสดุด้วยแก๊สที่แตกตัว ซึ่งกระแสไฟฟ้าจะต่ำมากและสภาวะการผลิตพลาสมาอย่างต่อเนื่อง แก๊สจะกลายเป็นตัวนำไฟฟ้าที่สูงและความต่างศักย์ไฟฟ้าจะลดลงตามปริมาณกระแสที่เพิ่มขึ้น แหล่งกำเนิดพลาสมาชนิดนี้มักใช้ที่ความดันต่ำ

(1) แหล่งกำเนิดพลาสมาโกลดิสชาร์ตความถี่วิทยุ (Radio frequency glow discharge plasma source) แหล่งกำเนิดนี้มีการใช้อย่างกว้างขวางในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ ดำเนินการที่กึ่งกลางความถี่วิทยุ 13.6 เมกะเฮิรตซ์ ความดัน 10^{-3} ถึง 100 ทอร์ พลาสมาที่ถูกผลิตมีความสม่ำเสมอและเป็นเอกรูป

(2) แหล่งกำเนิดพลาสมาอิเล็กตรอนไซโคลตรอนเรโซแนนซ์ (Electron cyclotron resonance plasma source) แหล่งกำเนิดนี้ใช้คลื่นวิทยุเป็นแหล่งพลังงานแก่สนามแม่เหล็ก โดยสนามแม่เหล็กนี้จะทำให้อิเล็กตรอนหมุนและมีโอกาสเกิดการชนกับไอออนสูง ส่งผลให้แก๊สเกิดการแตกตัวเป็นพลาสมาที่มีความหนาแน่นสูง แต่พลาสมาที่ถูกผลิตจะไม่มีสม่ำเสมอ

(3) แหล่งกำเนิดพลาสมาโคโรนาดีชาร์ต (Corona discharge plasma source) บริเวณขั้วไฟฟ้าของแหล่งกำเนิดนี้จะมีความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง ทำให้ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนและอนุภาคที่มีประจุสูง แต่แหล่งกำเนิดนี้มีการใช้งานจำกัด เนื่องจากบริเวณที่ไม่มีการปลดปล่อยไอออนมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนต่ำมาก

(4) แหล่งกำเนิดพลาสมาอาร์กบรรยากาศ (Atmospheric arc plasma source) แหล่งกำเนิดนี้นิยมใช้ในงานวิจัยด้านวัสดุชีวภาพด้วยเทคนิคการพ่น มีการใช้กระแสไฟฟ้าและกำลังไฟฟ้าปริมาณสูงในการผลิตพลาสมา ทำให้มีอัตราการไหลและอุณหภูมิสูง

2.1.4.2 แหล่งกำเนิดพลาสมาอาร์กสุญญากาศ (*Vacuum arc plasma sources*) แหล่งกำเนิดนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ หน่วยผลิตพลาสมาและตัวกรองอนุภาค การผลิตพลาสมาอาศัยหลักการให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงไปกระตุ้นอิเล็กโทรดให้เกิดการปล่อยกระแสวังระหว่างขั้วแคโทดและแอโนด โดยขั้วแคโทดเป็นบริเวณที่ผลิตพลาสมามีความหนาแน่นกระแสสูงทำให้แก๊สเกิดการแตกตัวอย่างสมบูรณ์ แต่จะเกิดอนุภาคน้ำ หรือเศษซากต่าง ๆ ด้วย จึงต้องใช้ตัวกรองลดการปนเปื้อน การผลิตพลาสมาด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถผลิตไอออนได้จำนวนมากและวัสดุนำไฟฟ้าเกือบทุกชนิดสามารถนำมาใช้เป็นแคโทดสำหรับแหล่งกำเนิดประเภทนี้ได้ แต่มีข้อเสีย คือ การไหลของพลาสมาไม่มีเอกรูป

2.1.4.3 แหล่งกำเนิดพลาสมาเลเซอร์ (Laser plasma sources) พลาสมาจะถูกรผลิตด้วยการเกิดอันตรกิริยาของเลเซอร์ความหนาแน่นสูงกับวัสดุที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงเลเซอร์กำลังต่ำและช่วงเลเซอร์กำลังสูง ช่วงเลเซอร์กำลังต่ำเป็นช่วงที่บริเวณแหล่งกำเนิดเกิดการสูญเสียพลังงานด้วยการทำให้โลหะเหลวเกิดการระเหยและนำความร้อนไปยังวัสดุเป้าหมาย ช่วงเลเซอร์กำลังสูงเป็นช่วงที่ไอบจากการระเหยของโลหะเหลวมีอุณหภูมิสูงพอสำหรับการทำให้อะตอมถูกกระตุ้นและแตกตัวเป็นไอออนพลาสมา

2.1.5 เทคนิคการดัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมา [15]

เทคนิคการดัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมามีด้วยกันหลายประเภท เช่น การพ่นด้วยอะตอมเพื่อทำลายพื้นผิวและการกัดกร่อนด้วยพลาสมา (Plasma sputtering and etching) การฝังด้วยพลาสมา (Plasma implantation) การพอลิเมอไรเซชันพลาสมา (Plasma polymerization) และการพ่นพลาสมา (Plasma spraying) เป็นต้น

2.1.5.1 การพ่นด้วยอะตอมเพื่อทำลายพื้นผิวและการกัดกร่อนด้วยพลาสมา (Plasma sputtering and etching) กระบวนการพ่นเพื่อทำลายพื้นผิวเป็นวิธีการพื้นฐานที่ใช้ในการบำบัดพื้นผิวด้วยการให้กระแสไฟฟ้าและใช้การปล่อยความถี่วิทยุไปยังแก๊สเฉื่อยเพื่อก่อให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน (แก๊สพลาสมา) ซึ่งไอออนจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้าพลังงานต่ำไปยังพื้นผิวของวัสดุและเกิดการถ่ายเทพลังงานส่วนใหญ่ไปยังอะตอมที่พื้นผิวผ่านการชนทั้งแบบยืดหยุ่นและไม่ยืดหยุ่น อะตอมที่พื้นผิวที่ได้รับพลังงานมากเพียงพอจะหลุดออกจากพื้นผิวไปยังสถานะที่อยู่ในระบบสุญญากาศ ทำให้สิ่งปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวถูกกำจัดออก

กระบวนการกัดกร่อนด้วยพลาสมาคล้ายกับกระบวนการพ่นเพื่อทำลายพื้นผิว ซึ่งเป็นการทำความสะอาดพื้นผิวของวัสดุด้วยการทำให้อะตอมที่ผิวหน้าหลุดออก ในกระบวนการกัดกร่อนจะเกิด 2 ปฏิกริยาพร้อมกัน คือ การดัดแปรพื้นผิวและการเสื่อมสลาย โดยการเสื่อมสลาย หรือการหลุดลอกจะเกิดขึ้นกับชั้นบนสุดของวัสดุที่สัมผัสกับพลาสมาเป็นเวลานานเพียงพอเท่านั้น ส่วนพื้นผิวด้านในแทบจะไม่เกิดการกัดกร่อน ซึ่งอัตราการสูญเสียน้ำหนักขึ้นกับพลังงานของพลาสมาและธรรมชาติของวัสดุ เช่น วัสดุพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันออกซิเจน เช่น อีเทอร์ เอสเตอร์และกรดคาร์บอกซิลิก จะมีความว่องไวต่อพลาสมาสูง ส่วนวัสดุพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยพอลิโอเลฟินที่ไม่มีหมู่แทนที่ จะมีความว่องไวต่อพลาสมาต่ำ การสูญเสียน้ำหนักจากกระบวนการนี้ส่วนใหญ่เกิดจากการตัดพันธะของพอลิเมอร์และการทำปฏิกิริยาของอนุมูล (Radicals) ในสายโซ่พอลิเมอร์ที่เกิดจากโมเลกุลสัมผัสกับพลาสมา ซึ่งทั้งกระบวนการพ่นเพื่อทำลายพื้นผิวและกระบวนการกัดกร่อนจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงธาตุองค์ประกอบ โครงสร้างเคมี ระดับพอลิเมอไรเซชันและความเป็นผลึกของวัสดุเริ่มต้น

2.1.5.2 การฝังด้วยพลาสมา (Plasma implantation) เป็นกระบวนการที่อยู่นอกข้อจำกัดทางเทอร์โมไดนามิกส์ ด้วยการฝังประจุ หรือธาตุลงบนพื้นผิวของวัสดุ การฝังพลาสมาสามารถแบ่งย่อยได้ 2 ประเภท คือ การฝังประจุพลาสมาของโลหะและอัลลอยด์ (Plasma ion implantation of metals and alloys) และการฝังพลาสมาของพอลิเมอร์ (Plasma implantation of polymers)

การฝังประจุด้วยพลาสมาบนพื้นผิวของวัสดุโลหะและอัลลอยด์เป็นการทำให้เกิดพลาสมา ความหนาแน่นสูงล้อมรอบวัสดุและจ่ายกระแสไฟแบบไม่ต่อเนื่องไปยังบริเวณผนังภาชนะที่มีศักย์ลบสูง เร่งให้ประจุฝังลงบนพื้นผิววัสดุ ข้อดีของกระบวนการ คือ สามารถดัดแปรวัสดุที่มีรูปร่างซับซ้อน และสามารถดำเนินการได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ชิ้นงานเสียหายเนื่องจากอุณหภูมิน้อย และมีประสิทธิภาพสูงในการปรับปรุงสมบัติพื้นผิววัสดุ เช่น ความต้านทานการสึกกร่อน เป็นต้น

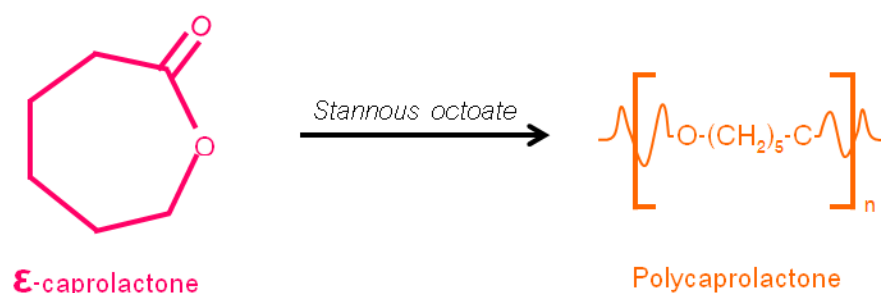
การฝังประจุด้วยพลาสมาบนพื้นผิวของพอลิเมอร์เกิดเมื่อความหนาแน่นและเวลาในการบำบัดด้วยพลาสมาเหมาะสม กระบวนการนี้จะทำการดึงไฮโดรเจนออกจากสายโซ่พอลิเมอร์เกิดเป็นสารอนุมูลบนสายโซ่และให้สารอนุมูลนั้นเกิดการรวมตัวกับอนุมูลแก๊สพลาสมาด้วยการเชื่อมขวางเกิดเป็นหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ กระบวนการฝังประจุบนพื้นผิวนั้นเป็นกระบวนการดัดแปรพื้นผิวที่มีประสิทธิภาพ สามารถเปลี่ยนสมบัติความมีขี้และไม่ขี้ของพอลิเมอร์ได้ โดยสมบัติความมีขี้ หรือไม่ขี้ของวัสดุที่เปลี่ยนแปลงนั้นขึ้นกับแก๊สที่ใช้ในการผลิตพลาสมา เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน ไนโตรเจนไดออกไซด์และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ใช้เพิ่มสมบัติความเป็นขี้ให้วัสดุ แต่สารประกอบซัลเฟอร์เตตระฟลูออไรด์เฮกซะฟลูออโรเอทิลีนและเตตระฟลูออโรเมทิลีน ใช้เพิ่มสมบัติความไม่มีขี้ให้วัสดุ เทคนิคนี้สามารถผลิตพลาสมาที่มีความสม่ำเสมอได้เป็นบริเวณกว้างและเหมาะสมกับวัสดุที่เป็นฟิล์มบาง

2.1.5.3 การพอลิเมอร์ไรเซชันด้วยพลาสมา (Plasma polymerization) เป็นหนึ่งในกระบวนการการสะสมพลาสมา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (มอนอเมอร์) ไปเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (พอลิเมอร์) คล้ายกับการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันทั่วไป แต่กระบวนการสร้างพอลิเมอร์ทางเคมีต่างกันทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมี สมบัติทางเคมี และกายภาพต่างไป โดยมอนอเมอร์ในกระบวนการนี้จะถูกกระตุ้นด้วยพลาสมากลายเป็นอนุมูลเกิดการรวมตัวและทำปฏิกิริยาเกิดเป็นโมเลกุล ซึ่งพอลิเมอร์ที่ได้จะไม่มีหน่วยมอนอเมอร์ซ้ำ (Repeating unit) แต่มีหน่วยซับซ้อนที่เกิดจากการเชื่อมขวาง การแยกส่วนและการจัดเรียงโมเลกุลใหม่นอกจากนี้ เมื่อวัสดุพอลิเมอร์เกิดการสัมผัสกับพลาสมาเกิดเป็นอนุมูลที่สายโซ่พอลิเมอร์ อนุมูลนั้นสามารถทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันกับมอนอเมอร์เกิดเป็นกราฟบนพื้นผิวของวัสดุได้ กระบวนการนี้เรียกว่า การเกิดกราฟของโคพอลิเมอร์ (Plasma-grafting copolymerization)

2.1.5.4 การพ่นด้วยพลาสมา (Plasma spraying) เป็นการใช้พลาสมาเหนี่ยวนำให้ผงของวัสดุเกิดการเคลือบลงบนพื้นผิววัสดุที่ต้องการ ด้วยการให้พลาสมาที่มีอุณหภูมิและอัตราการไหลสูงทำให้ผงเคลือบเกิดการหลอม (อาจเกิดการหลอมบางส่วน) และเคลื่อนที่ไปยังวัสดุด้วยความเร็วสูง การเคลือบจะเกิดเป็นชั้นบาง ๆ ที่พื้นผิว ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถใช้บำบัดชิ้นงานที่มีรูปร่างซับซ้อนได้และการเคลือบสามารถช่วยต้านทานอุณหภูมิสูง ต้านทานการกัดกร่อน และสามารถปรับปรุงสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพด้วย แต่ข้อเสีย คือ อาจเกิดการยึดเกาะที่ไม่ดีระหว่างผงเคลือบและพื้นผิววัสดุ

2.2 พอลิคาร์โพรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL) [22]

PCL เป็นหนึ่งในพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biodegradable polymer) ที่นิยมนำมาใช้ทดแทนวัสดุทางธรรมชาติ PCL ผลิตจากกระบวนการเปิดวง (Ring opening polymerization) ของมอนอเมอร์ ϵ -caprolactone โดยใช้ Stannous octoate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.5 PCL มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (Ester bond, -COO-) ที่เรียกว่า “Linear aliphatic polyester”



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ PCL จาก ϵ -caprolactone [23]

2.2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของ PCL

PCL เป็นของแข็งสีขาวขุ่น ที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบกึ่งผลึก (Semi-crystalline polymer) มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 3,000-80,000 กรัม/โมล PCL เป็นพอลิเมอร์ที่มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) มีอุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature) ประมาณ 60 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature) ประมาณ -60 องศาเซลเซียส ที่ความเค้นแรงดึงสูงสุด (Yield stress) 11 เมกะปาสคาล PCL สามารถยืดได้ 30% และมีค่าโมดูลัสความยืดหยุ่น (Elastic modulus) 0.3 จิกะปาสคาล

PCL สามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วที่อุณหภูมิต่ำ เช่น คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbon tetrachloride) เบนซีน (Benzene) โทลูอีน (Toluene) ไซโคลเฮกซะโนน (Cyclohexanone) และไนโตรโพรเพน (2-nitropropane) เป็นต้น แต่สามารถละลายในอะซิโตน (Acetone) บิวทานอน (2-butanone) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ไดเมทิลฟอร์มามายด์ (Dimethylformamide) และอะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) ได้น้อย และไม่ละลายในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ (Alcohol) ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) และไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether)

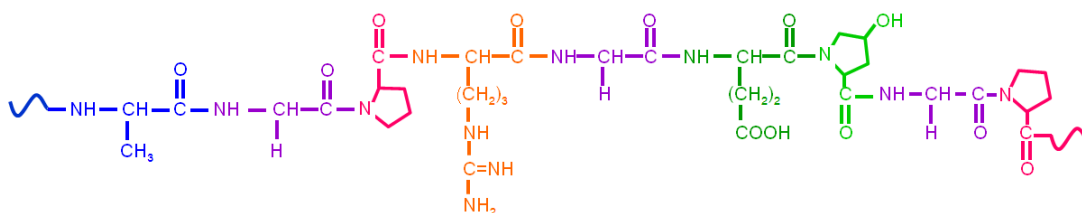
PCL เป็นพอลิเมอร์เนื้อเดี่ยว (Homopolymer) ที่ใช้ระยะเวลาการย่อยสลายประมาณ 2-4 ปี ขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลของวัสดุเริ่มต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการย่อยสลายของ PCL ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การย่อยสลายหมู่เอสเทอร์ใน PCL โดยไม่ใช้เอนไซม์ และการย่อยสลาย PCL ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำด้วยเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intercellular degradation) โดย PCL จะถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์กลายเป็นฟาโกโซม (Phagosome) แล้วถูกย่อยสลายภายในเซลล์ นอกจากนี้สมบัติความสามารถในการย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ PCL ยังมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ไม่เป็นพิษ (Non-toxic) และเป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและยา (Food and drug administration, FDA)

2.3 เจลาติน (Gelatin) [24-33]

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยที่เป็นต้นกำเนิดของเจลาติน สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูกและผิวหนังของสัตว์ คอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลัก 3 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine, Gly) โพลีน (Proline, Pro) และไฮดรอกซิลโพลีน (Hydroxyproline, Hyp) ซึ่งเชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ด้วยพันธะโควาเลนต์ และในสายโซ่เดียวกันจะมีการเชื่อมต่อระหว่างหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลด้วยพันธะไฮโดรเจน เป็นสาเหตุให้สายโซ่บิดเป็นเกลียว โดยแต่ละสาย เรียกว่าสายโซ่แอลฟา (α -chain หรือ α -helix) หรือไตรโปกคอลลาเจน (Tripocollagen) และแต่ละสายโซ่จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) ดังรูปที่ 2.6 การผลิตเจลาตินต้องทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของคอลลาเจนผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยกรด หรือด่างเพื่อทำให้เกิดโครงสร้างการจัดเรียงตัวที่ไม่เสถียร ไม่เป็นระเบียบ และบางส่วนของพันธะเคมีถูกทำลายเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเกลียวของคอลลาเจนเป็นคอยล์ (Coil) ของเจลาติน



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของคอลลาเจน [34]



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเจลาติน [35]

2.3.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเจลาติน

เจลาตินเป็นของแข็งสีเหลืองใส ไร้กลิ่น ไร้รสที่ไม่สามารถพบได้ในธรรมชาติ มีกรดอะมิโนประมาณ 19 ชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไปมีความชื้น 8-13% ความหนาแน่นสัมพัทธ์ 1.3-1.4 น้ำหนักโมเลกุลของ เจลาตินอยู่ในช่วง 15,000-400,000 ธาตุพื้นฐานของเจลาตินประกอบด้วย คาร์บอน 50.5% ไฮโดรเจน 6.8% ไนโตรเจน 17% และออกซิเจน 25.2% ซึ่งโครงสร้างของเจลาตินแสดงดังรูปที่ 2.7

เจลาตินสามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น น้ำ กลีเซอรอลและกรดอะซิติก เป็นต้น แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย เช่น อะซิโตน และเบนซีน เป็นต้น สารละลายเจลาตินมีสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและต่างขั้วกับชนิดของตัวทำละลาย กล่าวคือ กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบย่อยของเจลาตินจะเกิดการแตกตัวเป็นประจุทั้งบวกและลบ เรียกว่า สวิทเทอร์ไอออน (Zwitterion) ในตัวทำละลายที่มีสภาวะเป็นกลาง ในภาวะนี้ ประจุสุทธิของสารละลายมีค่าเป็นศูนย์ สารละลายมีการละลายต่ำที่สุดและเกิดการตกตะกอน เรียกจุดนี้ว่า จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ความเป็นกรดในสารละลายเจลาตินเกิดจากตัวทำละลาย ($\text{pH} < \text{pI}$) มีโปรตอน (H^+) ปริมาณมากจับกับหมู่คาร์บอกซิลไอออน (COO^-) ของสวิทเทอร์ไอออนของเจลาติน ทำให้ประจุรวมของสวิทเทอร์ไอออนมีค่าเป็นบวก ส่วนความเป็นต่างขั้วในสารละลายเจลาตินเกิดจากตัวทำละลาย ($\text{pH} > \text{pI}$) มีประจุลบปริมาณมากจับกับหมู่แอมโมเนียมไอออน (NH_3^+) ของ สวิทเทอร์ไอออนของเจลาติน ทำให้ประจุรวมของสวิทเทอร์ไอออนมีค่าเป็นลบ ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการละลายของเจลาติน คือ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง กระบวนการผลิต การผ่านกระบวนการทางความร้อน (Thermal history) และความเข้มข้น

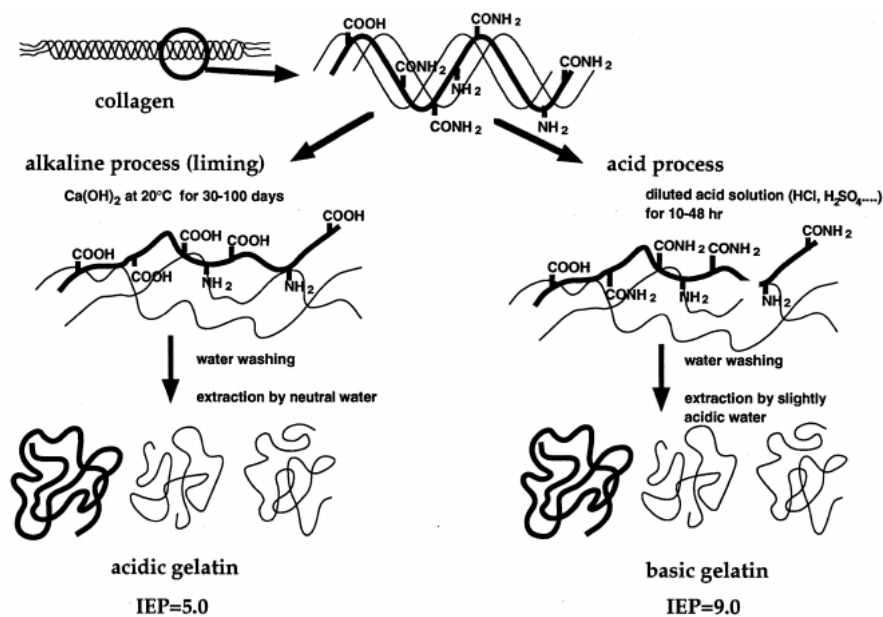
สมบัติที่สำคัญของเจลาติน คือ การเป็นเจลที่สามารถผันกลับได้ด้วยความร้อน (Thermo-reversible gel) การให้ความร้อนในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส แก่สารผสมของเจลาตินกับน้ำส่งผลให้เจลาตินเกิดการละลายเป็นสารละลาย และการลดอุณหภูมิของสารละลายส่งผลให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้นและสารละลายเปลี่ยนสภาพเป็นเจลในที่สุด ซึ่งการเปลี่ยนสภาพจากสารละลายเป็นเจลนี้เป็นผลจากการกลับคืนสภาพ (Renaturation) บางส่วนแบบสุ่มของสารละลายไปเป็นโครงสร้างคล้ายเกลียวของคอลลาเจนและเกิดการเชื่อมขวางในแต่ละสายโซ่แบบไม่เจาะจงเป็นเส้นใยต่อเนื่อง 3 มิติ

2.3.2 การจำแนกประเภทเจลาตินตามกระบวนการผลิต

เจลาตินสามารถจำแนกตามกระบวนการผลิตได้ 2 ประเภท คือ เจลาตินชนิดเอ หรือเบซิกเจลาติน (Basic gelatin) และเจลาตินชนิดบี หรืออะซิดิกเจลาติน (Acidic gelatin) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ซึ่งแต่ละกระบวนการผลิตส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนในองค์ประกอบของเจลาตินทั้ง 2 ประเภทแตกต่างกัน ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2.2 เป็นเจลาตินที่ผลิตจากบริษัท Nitta Gelatin NA, Inc. ประเทศญี่ปุ่น

2.3.2.1 เจลาตินชนิดเอ เป็นเจลาตินที่ผลิตจากการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนด้วยกรด (Acidic process) โดยนิยมใช้คอลลาเจนที่ได้จากผิวหนังของหมู ไก่และปลาบางชนิด เจลาตินชนิดนี้มีค่า pi ประมาณ 7-9 เหมาะในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับคอลลาเจนต้นกำเนิด

2.3.2.2 เจลาตินชนิดบี เป็นเจลาตินที่ผลิตจากการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนด้วยด่าง (Alkaline process) คอลลาเจนที่ใช้โดยมากได้จากกระดูกอ่อนและกระดูกของวัวควายที่มีการเชื่อมขวางสูง ซึ่งต้องใช้กระบวนการที่รุนแรง (เช่น ก่อนการบำบัดแช่ในสารละลายด่างหินปูน) เพื่อให้ได้เจลาตินที่สามารถละลายน้ำได้ เจลาตินชนิดนี้มีหมู่คาร์บอกซิลในองค์ประกอบสูง มีค่า pi ประมาณ 5 เจลาตินชนิดนี้มีการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารอย่างจำกัด แต่มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร



รูปที่ 2.8 กระบวนการผลิตเจลาตินด้วยกรดและด่างจากคอลลาเจน [26]

2.3.3 การประยุกต์ใช้เจลาติน

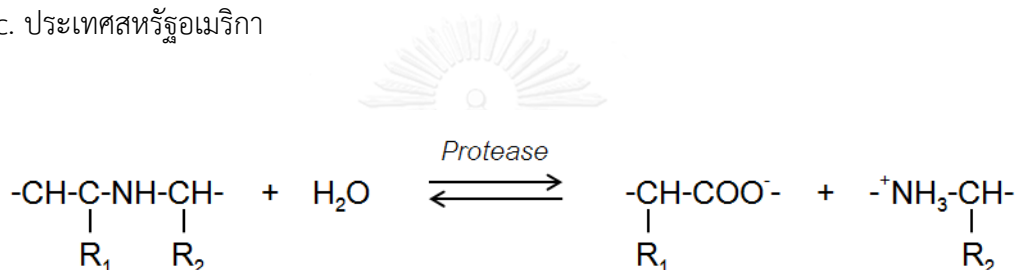
เนื่องจากเจลาตินเป็นโปรตีนจากการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโปรตีนในสัตว์ เจลาตินจึงมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับคอลลาเจนต้นกำเนิด ทำให้สามารถเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์และสัตว์ (Biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biodegradability) ไม่เป็นพิษ (Non-toxic) ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้าง ภายหลังการย่อยสลาย ทั้งเจลาตินยังมีสมบัติทางกายภาพและเคมีที่ดี เช่น ขึ้นรูปง่าย ละลายในน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส และเกิดเป็นเจลของแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส มีความหนืดและยืดหยุ่น เป็นต้น เจลาตินจึงถูกนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมมากมาย

เจลาตินในทางเภสัชกรรมถูกใช้เป็นส่วนเคลือบยาทั้งแคปซูลชนิดแข็ง อ่อนนุ่มและชนิดเม็ด เพื่อป้องกันตัวยาที่อยู่ภายในจากความชื้น อุณหภูมิและแสงจากภายนอก ช่วยรักษาเสถียรภาพ สนับสนุนการยึดเกาะของตัวยาและระงับกลิ่นจากตัวยา ในการแพทย์ เจลาตินถูกใช้ผลิตเลือดเทียม และฟองน้ำห้ามเลือดสำหรับในผู้ป่วยที่มีการสูญเสียเลือดอย่างรุนแรงเพื่อทดแทนหน้าที่บางประการของเลือดและลดการสูญเสียเลือด ฟองน้ำจากเจลาตินมีความสามารถในการดูดซับสูง ช่วยทำให้เลือดเกิดการแข็งตัวและช่วยสมานแผล เจลาตินเมื่อถูกใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะจะเข้ากับร่างกายได้ดี ช่วยสนับสนุนการเกิดเนื้อเยื่อใหม่และย่อยสลายง่ายโดยไม่เกิดสารตกค้าง เจลาตินถูกใช้อย่างกว้างขวางในการเป็นสารเพิ่มความหนืด ช่วยให้เกิดเจล เพิ่มความคงตัวในสารผสมและเคลือบผิวในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เยลลี่ ไอศกรีม มาชเมลโล พุดดิ้ง มากาριν ครีมชีส นมและอาหารกระป๋อง

เป็นต้น ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เจลาตินถูกใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดในเนื้อครีม ที่มีสมบัติในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง บำรุงผิวและเพิ่มความแข็งแรงแก่รากผมและเล็บ

2.4 คอลลาเจนไฮโดรไลเซส (Collagen hydrolysate) [28, 36-38]

คอลลาเจนไฮโดรไลเซสเป็นโปรตีนสายสั้นที่ได้จากการย่อยคอลลาเจน หรือเจลาตินด้วยกรดเบสหรือเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเจลาตินมี 3 แหล่ง คือ เอนไซม์จากสัตว์ เช่น เปปซิน (Pepsin) ทริปซิน (Trypsin) เป็นต้น เอนไซม์จากพืช เช่น ปาเปน (Papain) เป็นต้น และเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) เป็นต้น ปฏิกริยาการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเซส แสดงดังรูปที่ 2.9 และตารางที่ 2.2 เป็นตัวอย่างคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ผลิตจากบริษัท Norland Product, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา



รูปที่ 2.9 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสพันธะเพปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส [36]

2.4.1 สมบัติทางกายภาพและเคมี

คอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000-10,000 ดาลตัน มีสีเหลืองหรือขาวเหลือง มีความสามารถในการละลายน้ำและสามารถดูดซับน้ำได้ 30 เท่าของน้ำหนัก มีความเสถียรทางความร้อน และทนทานต่ออ็อกซิเจนของโลหะและค่าพีเอช

เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีต้นกำเนิดจากคอลลาเจนจึงทำให้มีปริมาณกรดอะมิโน ไกลซีนและโพลีนสูง แต่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine, His) ทริปโตเฟน (Tryptophan, Try) และ คริสติน (Cystine, Cry) ต่ำ ไม่มีความเป็นพิษ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อภายหลังผ่าตัด ช่วยซ่อมแซมเอ็นและข้อต่อ สนับสนุนการสังเคราะห์กระดูกอ่อน และมีความสามารถในย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ นอกจากนี้ คอลลาเจนไฮโดรไลเซสยังเป็นโปรตีนที่ให้พลังงานสูง มีความสามารถในการย่อยที่ดีเยี่ยม (Superb digestibility) และสามารถเข้าสู่กระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว (Bioavailability) [38] โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเซส 95% สามารถดูดซับได้ภายใน 12 ชั่วโมงแรกหลังจากรับเข้าสู่ร่างกาย แต่คอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีคุณค่าทางชีวภาพต่ำ (Low biological value) เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซสไม่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมด [37]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าหนูที่รับประทานคอลลาเจนไฮโดรไลเซสในอัตราส่วน 1.66 กรัม ต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อวันมีความปลอดภัย แต่อาจมีผลข้างเคียงเล็กน้อย เช่น แน่นท้อง ท้องป่องหรือโรคกรดไหลย้อน [37]

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบกรดอะมิโนของเจลาติน และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส

Amino acid	Type A gelatin*	Type B gelatin*	Collagen hydrolysate**
Glycine	330	335.3	347
Alanine	111.7	116.6	109
Valine	25.9	21.9	16
Leucine	24	24.3	18
Isoleucine	9.5	10.8	10
Serine	37.4	32.8	63
Threonine	17.9	18.3	33
Aspartic acid	45.8	46.7	37
Glutamic acid	72.1	72.6	68
Cysteine	0	0	0
Methionine	3.6	3.9	12
Lysine	26.6	27.6	32
Hydroxylysine	6.4	4.3	9
Arginine	49	48	62
Histidine	4	4.2	15
Phenylalanine	13.6	14	13
Tyrosine	2.6	1.2	3
Tryptophan	0	0	0
Proline	131.9	124.2	98
Hydroxyproline	90.7	93.3	55

หมายเหตุ *(เจลาตินชนิดเอผลิตจากผิวหนังหมู และเจลาตินชนิดบีผลิตจากกระดูกวัว) บริษัท Nitta Gelatin Inc. ประเทศญี่ปุ่น

** (คอลลาเจนไฮโดรไลเซสผลิตจากผิวหนังปลาน้ำลึก) บริษัท Norland Product Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.5 การเชื่อมขวาง (Crosslinking) [29, 39-42]

การเชื่อมขวาง คือ การสร้างพันธะระหว่างหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ ที่อยู่ใกล้เคียงกัน เช่น การเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก (Carboxylic group) และหมู่เอมีน (Amine group) เกิดเป็นพันธะเอไมด์ (Amide bond) การเชื่อมขวางระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) และหมู่คาร์บอกซิลิก เกิดเป็นพันธะเอสเตอร์ (Ester bond) และการเชื่อมขวางระหว่างหมู่ไทออล (Thiol group) และหมู่คาร์บอกซิลิก เกิดเป็นพันธะไทโอเอสเตอร์ (Thioester bond) เป็นต้น การเชื่อมขวางช่วยเพิ่มสมบัติทางกลให้แก่วัสดุ ทั้งมอดูลัสแรงกด (Compressive modulus) และมอดูลัสแรงดึง (Tensile modulus) ทำให้วัสดุมีความเสถียรภาพ มีประสิทธิภาพการทำงานเพิ่มขึ้นและอัตราการย่อยสลายช้าลง การเชื่อมขวางแบ่งเป็น 2 ประเภทหลัก คือ การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking) และการเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)

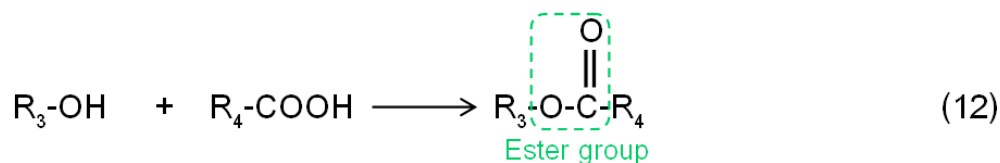
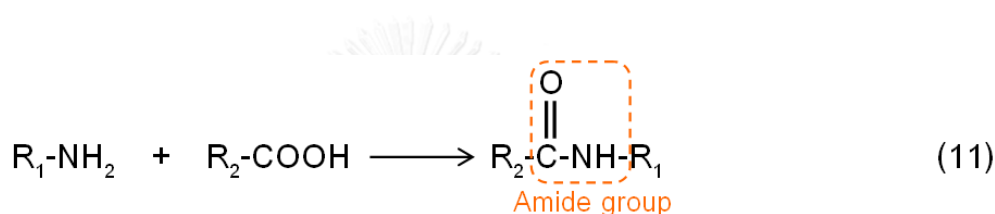
2.5.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ [29, 39, 41, 42]

การเชื่อมขวางทางกายภาพเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในการปรับปรุงวัสดุในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากการเชื่อมขวางทางกายภาพไม่ใช้สารเคมีที่อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงระหว่างสารเคมีและสารกระตุ้นทางชีวภาพ วัสดุไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการกำจัดสารเคมีก่อนการนำไปใช้งาน แต่การเชื่อมขวางทางกายภาพมีข้อเสีย คือ ปริมาณการเชื่อมขวาง หรือความหนาแน่นในการเชื่อมขวางยากต่อการควบคุม และวัสดุอาจมีการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ (Denaturation) บางส่วน แต่การการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติบางส่วนของวัสดุนี้ สามารถช่วยลดการอักเสบ ระคายเคืองแก่ผู้ได้รับการปลูกถ่ายได้ เนื่องจากวัสดุมีความอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นมากขึ้น สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเซลล์ และทำให้สารอาหารและของเสียซึมผ่านได้ดี ตัวอย่างการเชื่อมขวางทางกายภาพ ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet, UV) และการเชื่อมขวางด้วยการดีไฮโดรเทอร์มอล (Dehydrothermal, DHT)

2.5.1.1 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เมื่อโปรตีนสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ต บริเวณหมู่ฟังก์ชันที่เป็นอะโรมาติกส์ (Aromatic) ของกรดอะมิโนในสายโซ่โปรตีน เช่น โพลีน (Proline, Pro) และไฮดรอกซิลโพลีน (Hydroxylproline, Hyp) เป็นต้น จะสร้างอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะเป็นตัวเชื่อมขวางกับกรดอะมิโนอื่น ข้อจำกัดของการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้ คือ ความหนาแน่นของการเชื่อมขวางขึ้นกับจำนวนของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกส์ในสายโซ่พอลิเมอร์ แต่มีข้อดี คือ ระยะเวลาในการเชื่อมขวางสั้น ขึ้นงานมีการย่อยสลายช้าลงและช่วยส่งเสริมสมบัติทางกลของวัสดุ

2.5.1.2 การเชื่อมขวางด้วยการดีไฮโดรเทอร์มอล หรือการเชื่อมขวางด้วยความร้อน ภายใต้สภาวะสูญญากาศเป็นการเชื่อมขวางด้วยปฏิกิริยาการควบแน่น (Condensation reaction) ที่

เกิดจากการให้ความร้อนและกำจัดโมเลกุลของน้ำ (Dehydration) แต่การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้ต่างจากการทำแห้งด้วยความร้อน (Dry heat) ที่มีการใช้ระบบความดันสุญญากาศร่วมด้วย กล่าวคือ กระบวนการดีไฮเดรเทอร์มอลต้องลดความดันของระบบให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิให้โมเลกุลของน้ำถูกกำจัดออกไป ซึ่งการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกจากสายโซ่ส่งผลให้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่อะมิโนอิสระ (Free amino group) และหมู่ไฮดรอกซิล เกิดเป็นหมู่เอไมด์ และหมู่เอสเทอร์ ดังสมการที่ (11) และ (12) การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้สามารถส่งเสริมสมบัติทางกล รักษาเสถียรภาพและลดอัตราการย่อยสลายของวัสดุได้ ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง เนื่องจากอุณหภูมิและระยะเวลาการเชื่อมขวางส่งผลต่อความหนาแน่นในการเชื่อมขวางของวัสดุ



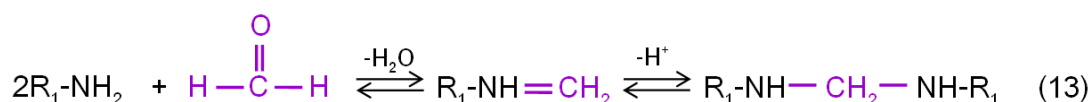
2.5.2 การเชื่อมขวางทางเคมี [40, 41] วิทยาลัย

การเชื่อมขวางทางเคมีเป็นการใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของสายโซ่พอลิเมอร์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน เช่น หมู่อะมิโนกับหมู่คาร์บอกซิลิก เป็นต้น โดยหมู่ฟังก์ชันจะถูกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้สามารถออกแบบและผลิตโครงสร้างเซลล์ที่มีความหนาแน่นในการเชื่อมขวางและสมบัติตามความต้องการในการนำไปใช้งาน แต่มีข้อเสีย คือ สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมขวางมักเป็นพิษต่อเซลล์ ต้องมีกระบวนการกำจัดสารเคมีออกก่อนนำวัสดุไปใช้งาน สารเคมีอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงแก่สารกระตุ้นทางชีวภาพ หรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายวัสดุเป็นพิษต่อเซลล์ ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมขวาง คือ ฟอมอลดีไฮด์ (Formaldehyde) กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) สารประกอบอีพอกซี (Epoxy compound) และคาร์โบไดอิมิด (Carbodiimides)

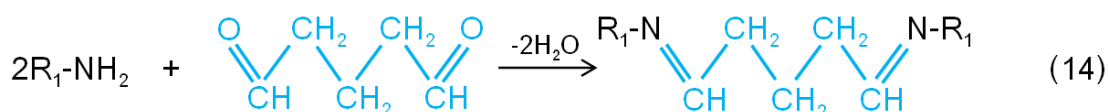
2.5.2.1 การเชื่อมขวางด้วยฟอมอลดีไฮด์

ฟอมอลดีไฮด์เป็นสารแอลดีไฮด์ (Aldehyde) ชนิดหนึ่งที่มีความนิยมในการเชื่อมขวาง เนื่องจากสามารถทำการเชื่อมขวางได้ในสภาวะไอ วัสดุที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยฟอมอลดีไฮด์สามารถดูดซึมในร่างกายนานแม้ความ

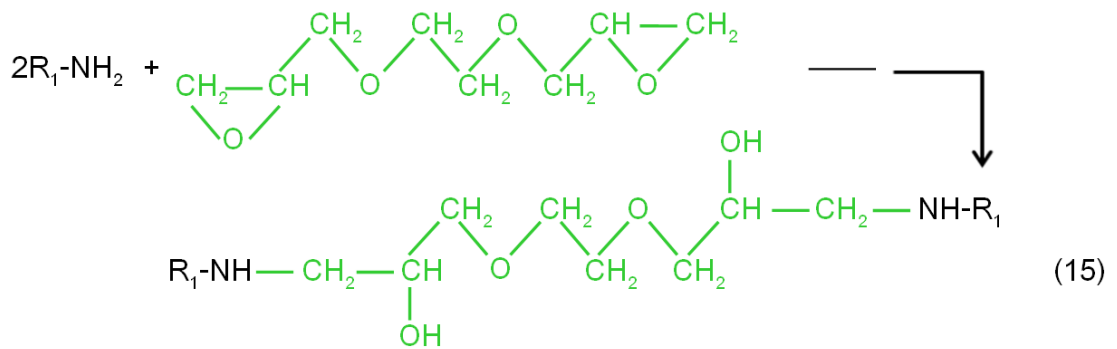
ต้านทานแรงดึงของวัสดุลดลง ในคอลลาเจน ฟอมอลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับไลซีน (Lysine) และไฮดรอกซิล (Hydroxylysine) เกิดเป็นสารตัวกลาง (Intermediate) คือ ไอมีน (Imine) ซึ่งจะทำการเชื่อมขวางกับไทโรซีน (Tyrosine) แอสพาราจีน (Asparagine) และกลูตามีน (Glutamine) ดังสมการ (13) การเชื่อมขวางด้วยฟอมอลดีไฮด์มีข้อเสีย คือ วัสดุที่ได้มีความเปราะ ฟอมอลดีไฮด์ที่อยู่ในวัสดุมีความเป็นพิษต่อเซลล์และอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้



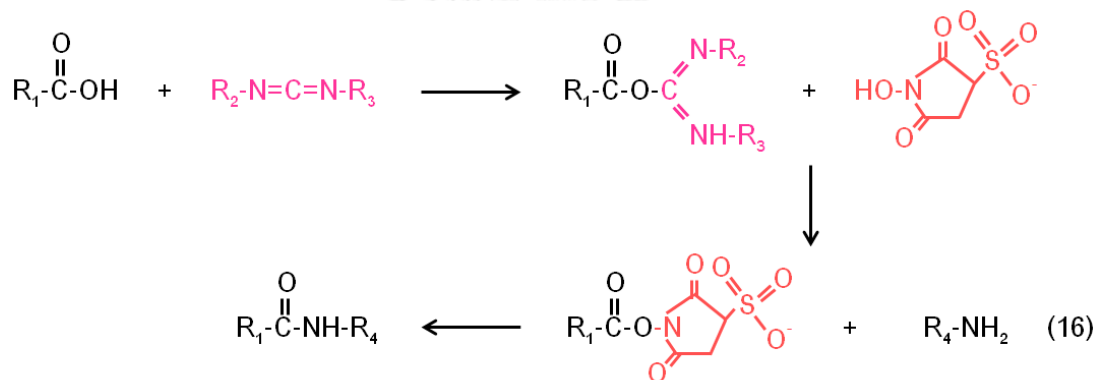
2.5.2.2 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารแอลดีไฮด์ที่ได้รับ ความนิยมใช้ในการเชื่อมขวางมากที่สุด เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางสูง ราคาถูกระยะเวลาในการเชื่อมขวางสั้นและวัสดุที่ได้มีความทนทานกว่าวัสดุที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยฟอมอลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์สามารถทำการเชื่อมขวางกับหมู่เอมิโน หมู่คาร์บอกซิลิก หมู่เอไมด์และหมู่โปรตีนอื่นที่อยู่ในสายโซ่ได้ ดังสมการ (14) ซึ่งประสิทธิภาพการเชื่อมขวางของกลูตารัลดีไฮด์ขึ้นกับค่าพีเอช ตัวทำละลาย ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของกลูตารัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์สามารถช่วยลดความต้านทานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายและเพิ่มความต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และใช้เชื่อมขวางวัสดุคอมโพสิตได้ แต่มีข้อเสีย คือ ภายหลังการปลูกถ่ายวัสดุที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์อาจเกิดเกลือแคลเซียม (Calcification) หรือเกิดปฏิกิริยาดีโพลิเมอร์ไรเซชัน (Depolymerization)



2.5.2.3 การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี เช่น เอทิลีนไกลคอล ไดโกลซิไดลอีเทอร์ (Ethylene glycol diglycidyl ether) ไกลคอล พอลิโกลซิไดลอีเทอร์ (Glycerol polyglycidyl ether) และเมทิลโกลซิไดลอีเทอร์ (Methylglycidyl ether) เป็นต้น สารประกอบอีพอกซีใช้ระยะเวลาการเชื่อมขวางนานกว่ากลูตารัลดีไฮด์ แต่วัสดุที่ได้สามารถลดการเกิดเกลือแคลเซียมและมีความยืดหยุ่นกว่าวัสดุที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ สมการ (15) แสดงการเชื่อมขวางสายโซ่โปรตีนด้วยเอทิลีนไกลคอล ไดโกลซิไดลอีเทอร์



2.5.2.4 การเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดไฮไมด์ หรือ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)คาร์โบไดไฮไมด์ (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimides, EDC) มีข้อดีที่ต่างจากการเชื่อมขวางด้วยสารอื่น คือ คาร์โบไดไฮไมด์สามารถสนับสนุนการเกิดพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่เอมิโนในโมเลกุลได้ กล่าวคือ คาร์โบไดไฮไมด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิก เกิดเป็นสารตัวกลางที่จะทำการเชื่อมขวางต่อกับหมู่เอมิโน ดังสมการ (16) โดยสารอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยานี้สามารถล้างออกได้



2.6 เทคนิคการสร้างหมูฟง์ชันบนพื้นผิว [43]

เทคนิคการสร้างหมูฟง์ชันบนพื้นผิวเพื่อปรับปรุงสมบัติพื้นผิวของวัสดุสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การดัดแปรด้วยสารเคมี (Wet chemical) การดัดแปรด้วยแก๊สที่แตกตัวเป็นไอออน (Ionized gas treatment) หรือการฉายรังสียูวี (UV irradiation) เป็นต้น

2.6.1 การดัดแปรด้วยสารเคมี (Wet chemical)

เทคนิคนี้ทำได้โดยการแช่วัสดุลงในสารละลายเข้มข้น เพื่อให้เกิดหมูฟง์ชันบนพื้นผิว เช่น แช่พอลิเอทิลีน (Polyethylene, PE) ลงในสารละลายผสมของ Chromium trioxide, Sulfuric acid และน้ำในอัตราส่วน 29:29:42 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อสร้างหมูฟง์ชันกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) บนพื้นผิว PE เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องการอุปกรณ์เฉพาะเหมาะสำหรับทดลองในห้องปฏิบัติการ และเป็นเทคนิคที่สามารถสร้างหมูฟง์ชันภายในโครงสร้าง 3 มิติ ได้มากกว่าการดัดแปรด้วยแก๊สที่แตกตัวเป็นไอออน แต่เนื่องจากเทคนิคนี้ใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงจึงทำให้พื้นผิววัสดุเสียสภาพไปจากเดิม และมีการสร้างขยะสารเคมีที่อันตราย

2.6.2 การดัดแปรด้วยแก๊สที่แตกตัวเป็นไอออน (Ionized gas treatment)

เทคนิคนี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ พลาสมา (Plasma) โคโรนาดีชาร์ต (Corona discharge) และเฟรม (Flame treatment)

2.6.2.1 พลาสมา เป็นเทคนิคการดัดแปรพื้นผิวโดยการใช้แก๊สที่แตกตัวเป็นอนุภาคที่มีประจุ อิเล็กตรอนและโมเลกุลนิวตรอน ซึ่งการดัดแปรมีความลึกในระดับนาโนเมตร หมูฟง์ชันที่ถูกสร้างบนพื้นผิวของวัสดุขึ้นกับแก๊สที่เลือกใช้ในการทำให้แตกตัวเป็นพลาสมา เช่น พลาสมาออกซิเจน พลาสมาคาร์บอนไดออกไซด์และพลาสมาอากาศใช้สร้างหมูฟง์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว พลาสมาแอมโมเนียและพลาสมาไนโตรเจนใช้สร้างหมูเอมีนบนพื้นผิว เป็นต้น เทคนิคนี้สามารถดัดแปรพื้นผิวได้โดยปราศจากการใช้สารเคมี ทำให้วัสดุมีการเสื่อมสลายน้อยและมีความขรุขระของพื้นผิวหลังการดัดแปรต่ำ แต่เทคนิคนี้ต้องการระบบสุญญากาศที่ปราศจากการปนเปื้อนจากแก๊สอื่นก่อนการดำเนินการจึงต้องทำความสะอาดอุปกรณ์อย่างเพียงพอ

2.6.2.2 โคโรนาดีชาร์ต เป็นเทคนิคที่การดัดแปรพื้นผิวด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าแตกตัวอากาศให้เป็นไอออน เพื่อทำลายพื้นผิวของวัสดุ (Bombard) เทคนิคนี้ถูกใช้ในการเพิ่มความสามารถในการพิมพ์ (Printability) และเพิ่มการยึดเกาะบนพอลิเมอร์

2.6.2.3 เฟรม เป็นเทคนิคการดัดแปรพื้นผิวด้วยการเผาแก๊สผสมที่มีออกซิเจนจำนวนมาก เพื่อให้แตกตัวเป็นไอออน เทคนิคนี้คล้ายกับการดัดแปรด้วยโคโรนาดีชาร์ต คือ ทำให้เกิดการทำลายพื้นผิว และการสร้างหมูฟง์ชันที่ไม่เฉพาะเจาะจงบนพื้นผิว เทคนิคนี้สามารถทำได้ง่าย

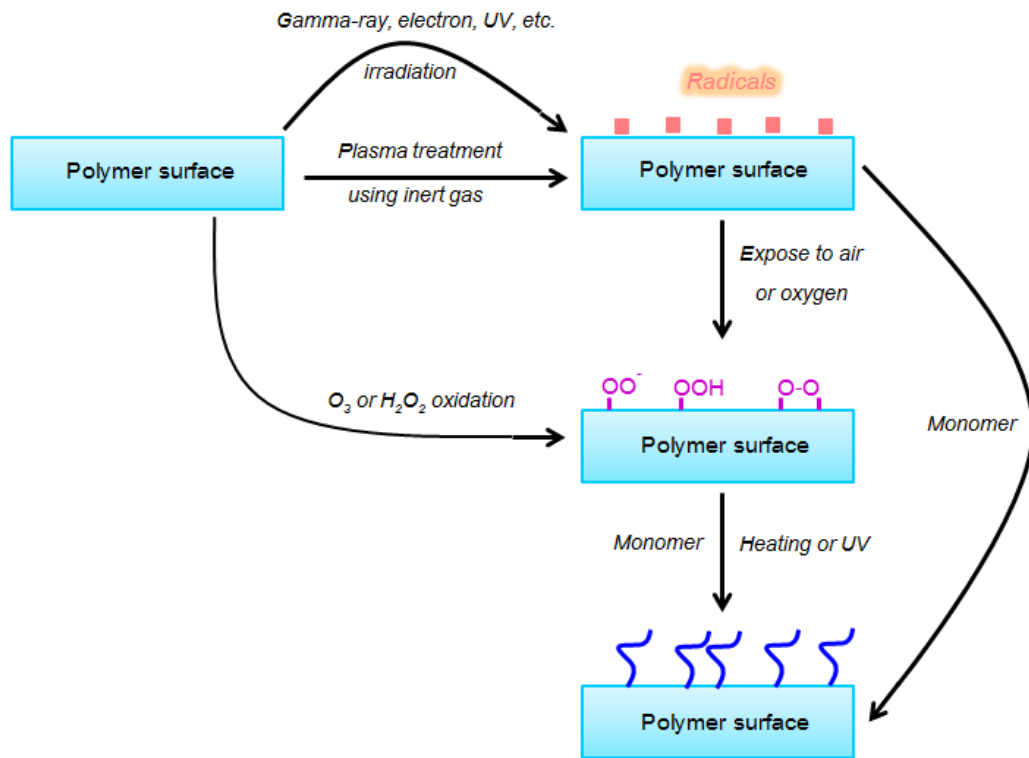
และราคาไม่แพง แต่ทำให้ความใสของพอลิเมอร์ลดลง และต้องควบคุมหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิการเผา (Flame temperature) เวลาในการสัมผัส (Contact time) เป็นต้น ให้แม่นยำเพื่อให้การตัด-แปรรูปร่างเสมอ และไม่เกิดการเผาไหม้

2.6.3 การตัดแปรรูปร่างด้วยการฉายรังสียูวี (UV irradiation)

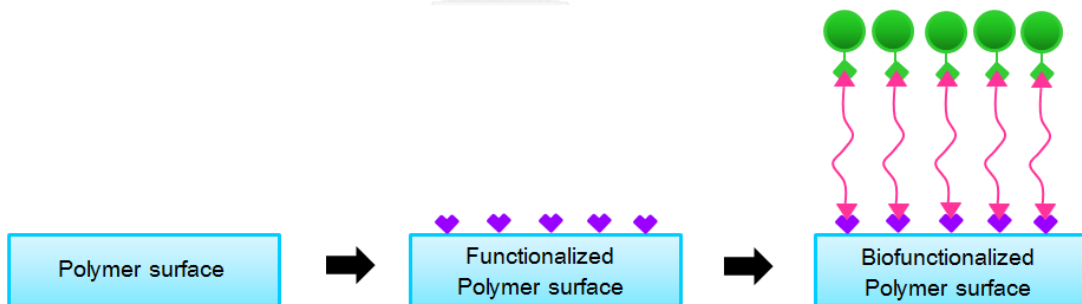
เทคนิคนี้ทำได้โดยการฉายแสงยูวี เพื่อสร้างบริเวณที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยา (Reactive sites) ซึ่งเมื่อบริเวณนี้สัมผัสกับแก๊สจะเกิดการสร้างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของวัสดุ หรืออาจใช้แสงยูวีเป็นตัวเหนี่ยวนำเริ่มต้นก่อนการกราฟพอลิเมอร์บนพื้นผิว เทคนิคนี้สามารถปรับแต่งความลึกของการตัดแปรรูปร่างได้จากความยาวคลื่นของรังสี และสัมประสิทธิ์การดูดซึม (Absorption coefficient) แต่มีข้อเสีย คือ ทำให้สมบัติแสงของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไป

2.7 การตรึงโปรตีนบนพื้นผิววัสดุ (Protein immobilization or conjugation on surface) [43, 44]

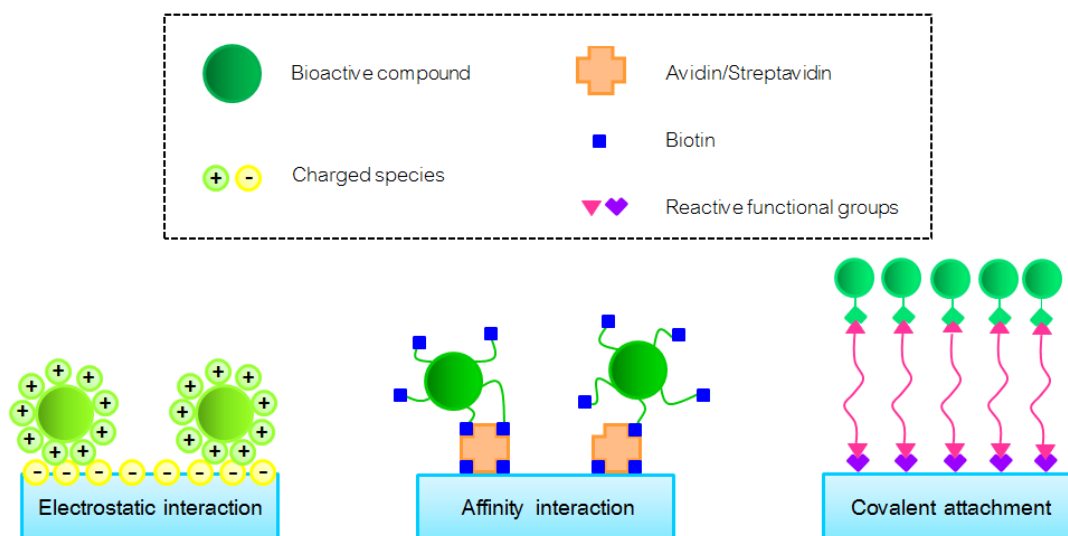
การตรึงโปรตีนบนพื้นผิววัสดุเป็นกระบวนการตัดแปรรูปร่างพื้นผิว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความชอบน้ำ และสร้างหมู่ฟังก์ชันให้แก่พื้นผิวของวัสดุ ส่งผลให้เกิดการส่งเสริมความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ การตัดแปรรูปร่างพื้นผิวด้วยการตรึงโปรตีนมีกระบวนการเบื้องต้น คือ การเลือกพอลิเมอร์ที่มีสมบัติตามความต้องการ เช่น ความยืดหยุ่น ความแข็งแรง หรือการนำไฟฟ้า การสร้างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวพอลิเมอร์ และการเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวกับสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังรูปที่ 2.10 และ 2.11 โดยการเชื่อมต่อนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ การเชื่อมต่อโดยไม่ใช้พันธะโควาเลนต์ (Non-covalent linkages) เช่น การดูดซับ (Adsorption) อันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interaction) และการจับคู่ของลิแกนด์และตัวรับ (Ligand-receptor pairing) ส่วนการเชื่อมต่อด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent linkages) จะมีข้อดี คือ พันธะมีความเสถียร สารประกอบทางชีวภาพถูกย่อยสลายช้า และสารประกอบทางชีวภาพสามารถทำกิจกรรมทางชีวภาพได้อย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แผนผังทั่วไปของการกราฟมอนอเมอร์ลงบนพื้นผิวพอลิเมอร์ [44]



รูปที่ 2.11 แนวความคิดในการดัดแปรพื้นผิวทางชีวภาพ [43]



รูปที่ 2.12 กลไกการตรึงสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพบนพื้นผิว [43]

โปรตีนที่ถูกตรึงบนพื้นผิวแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ โปรตีนที่ได้จากสารเคลือบเซลล์ (Extra cellular matrix, ECM) และโปรตีนที่ได้จากโกลตแพคเตอร์ (Growth factor) โปรตีนที่ได้จากสารหลั่งนอกเซลล์ เช่น ไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ลามินิน (Laminin) ไวโตรเนคติน (Vitronectin) และคอลลาเจน เป็นต้น โปรตีนประเภทนี้สนับสนุนการยึดเกาะเซลล์ผ่านอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และตัวรับ (Ligand-acceptor interaction) โปรตีนที่ได้จากโกลตแพคเตอร์ เช่น Epidermal growth factor, Vascular endothelial growth factor และ Bone morphogenetic proteins เป็นต้น โปรตีนชนิดนี้สามารถปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์ได้ เช่น การเจริญเติบโต (Proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่น (Differentiation) เป็นต้น

โดยทั่วไป หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของพอลิเมอร์จะถูกกราฟด้วยสารตัวกลาง เช่น พอลิอะคริก-แอซิด (Polyacrylic acid) หรือพอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG) เพื่อสร้างหมู่มฟังก์ชันที่ต้องการ แล้วนำไปเชื่อมต่อกับสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยสารเชื่อมขวาง (Crosslinking agent) การกราฟพอลิเมอร์ตัวกลางนี้มีข้อดี คือ ช่วยเพิ่มบริเวณหมู่มฟังก์ชันที่ทำปฏิกิริยาบนพื้นผิวกับสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และช่วยรักษาความว่องไวของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นอกจากการตัดแปรพื้นผิวด้วยการตรึงโปรตีนแล้ว การดูดซับของโปรตีน (Protein adsorption) บนพื้นผิวก็เป็นสิ่งสำคัญต่อการตอบสนองของเซลล์ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการดูดซับของโปรตีน คือ ความชอบน้ำของวัสดุ พื้นผิวที่มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic surface) สามารถดูดซับโปรตีนได้ดี แต่ถ้าพื้นผิวมีความไม่ชอบน้ำสูงจะเกิดการดูดซับของโปรตีนอย่างรุนแรงบนพื้นผิว ส่งผล

ทำให้โปรตีนอาจเสียสภาพเดิม (Denature) ได้ ส่วนพื้นผิวที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilic surface) จะยับยั้งการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว แต่สนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดีบนพื้นผิว

2.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์ [45]

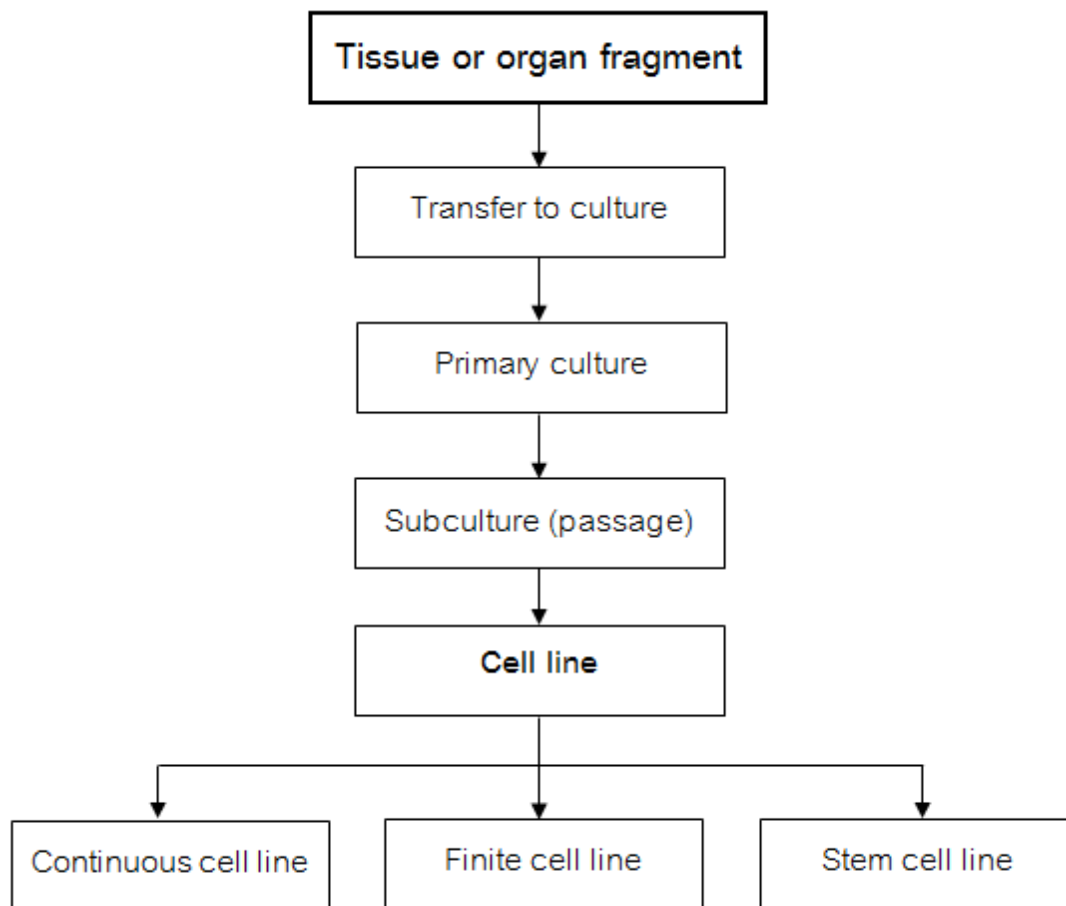
เนื่องจากวัสดุสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เข้ากับร่างกายสิ่งมีชีวิตได้ สามารถสนับสนุนกิจกรรมของเซลล์ เหนียวนาให้เซลล์เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และย่อยสลายทางชีวภาพได้ โดยไม่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์จึงเป็นกระบวนการเบื้องต้นในการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ รวมทั้งทดสอบความสามารถของวัสดุในการเหนียวนาให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวน

ในการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณานอกจากสารอาหารที่เหมาะสม คือ ความหนาแน่นของเซลล์และสภาวะของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ดังนั้น ภายหลังจากแยกเซลล์ออกจากอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อ เซลล์จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงให้มีความสมบูรณ์แข็งแรง หลังจากนั้นเซลล์บางส่วนจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (Fresh media) เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมและปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปศึกษา โดยการแบ่งส่วนเซลล์เพื่อนำไปเพาะเลี้ยง เรียกว่า Subculture แสดงดังรูปที่ 2.13

2.8.1 ประเภทของเซลล์ [45]

เซลล์ที่แยกจากเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ คอนทิวนิวส์เซลล์ไลน์ (Continuous cell line) ไฟไนท์เซลล์ไลน์ (Finite cell line) และสเต็มเซลล์ไลน์ (Stem cell line)

2.8.1.1 *คอนทิวนิวส์เซลล์ไลน์* เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งส่วน เพื่อเลี้ยงต่อได้แบบไม่สิ้นสุดโดยเซลล์ยังคงความเสถียรและไม่เกิดการเสื่อมสภาพ เซลล์ประเภทนี้จึงเหมาะสำหรับการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการขั้นพื้นฐาน แต่ในการเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาต้องระมัดระวังไม่ให้เซลล์เกิดการสัมผัสรังสี สารกลายพันธุ์ (Mutagens) หรือสารก่อมะเร็ง (Carcinogens) แยกบริเวณเพาะเลี้ยงให้ห่างจากบริเวณที่เพาะเลี้ยงไวรัสติดเชื้อ ไม่แยกเซลล์จากสัตว์ที่เกิดจากการจำลองพันธุ์ (Transgenic animals) และหลีกเลี่ยงการตัดแปรพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประเภทนี้มักเป็นการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่ผันกลับไม่ได้ ส่งผลให้เซลล์มีความเสถียรต่างจากเซลล์ประเภทอื่น



รูปที่ 2.13 กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ [45]

2.8.1.2 *ไฟไนท์เซลล์ไลน์* เป็นเซลล์ที่นิยมใช้ในงานที่ต้องการเซลล์ที่คงคุณลักษณะและคุณภาพที่ดี เซลล์ประเภทนี้สามารถแบ่งส่วนเพื่อเลี้ยงต่อได้เหมือนคอนทิวนิวอัสเซลล์ไลน์ แต่การแบ่งส่วนมีขีดจำกัด เนื่องจากเมื่อเซลล์เจริญเติบโตระยะหนึ่ง เซลล์จะเข้าสู่สภาวะการเสื่อมสภาพ (Senescence) ที่สภาวะนี้เซลล์จะหยุดการเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโต แต่ยังคงทำกิจกรรมของเซลล์และมีชีวิตอยู่จึงสามารถนำเซลล์ไปใช้ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการได้ แต่เซลล์ประเภทนี้ไม่เหมาะในการบอขีดจำกัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็น 2 เท่า หรือการแบ่งตัวเป็นทวีคูณ (Population doubling limit) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ

2.8.1.3 *สเต็มเซลล์ไลน์* หรือเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่ต้องการการดูแลรักษา มากกว่าเซลล์ประเภทอื่น เนื่องจากสเต็มเซลล์ไลน์เป็นเซลล์ที่ไม่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง แต่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีความเฉพาะเจาะจงด้วยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น อาหารเลี้ยง-เซลล์ เป็นต้น ดังนั้น สเต็มเซลล์ไลน์จึงต้องการการดูแลรักษา เพื่อคงคุณลักษณะและความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง

2.8.2 สารสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับปฏิบัติการ [45]

การเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมทั้งการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงของเซลล์ต้นกำเนิดต้องการสารสำคัญ ดังนี้

2.8.2.1 *อาหารเลี้ยงเซลล์* หรือ Medium เป็นสารอาหารพื้นฐานของเซลล์ สามารถเสริมด้วยซีรัม (Serum) หรือสารเติมแต่ง (Additives) ที่ช่วยให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้ ความแตกต่างของสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงเล็กน้อยสามารถทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะได้อย่างมีนัยสำคัญ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ต้องพิจารณาจากชนิดของเซลล์และปริมาณการเตรียมควรกำหนดให้สอดคล้องกับการใช้งาน

2.8.2.1 *ซีรัม* เป็นสารผสมที่มีความซับซ้อน ซึ่งเกิดจากการผสมกันของสารชีวโมเลกุลที่มีน้ำหนักสูงและต่ำที่สกัดได้จากสัตว์โตเต็มวัย หรือสัตว์ทารก เช่น เฟทอลโบวีนเซรัม (Fetal Bovine Serum, FBS) เป็นซีรัมที่สกัดจากทารกในครรภ์แม่วัว เป็นต้น ซีรัมเป็นตัวสนับสนุนให้เกิดความสมดุลในระบบสรีรวิทยาของการเจริญเติบโตและช่วยในการบำรุงรักษา อาหารเลี้ยงเซลล์จึงมักเติมซีรัมเป็นส่วนประกอบด้วย โดยซีรัมแต่ละชนิดจะตอบสนองการใช้งานที่เฉพาะเจาะจง นอกจากความสามารถในการสนับสนุนการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตแล้ว ซีรัมยังมีความสามารถในการกระตุ้นการยับยั้งการเจริญเติบโตและเป็นแหล่งที่เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เช่น โรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ด้วย ทำให้มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติมซีรัม

2.8.2.3 *ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)* เป็นสารที่มีความสามารถในการจับและทำลายเซลล์โพรคาโยติก (Prokaryotic cells) เช่น เซลล์แบคทีเรีย เป็นต้น แต่ยาปฏิชีวนะยังเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ด้วย ทำให้มีการหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ การใช้งานยาปฏิชีวนะโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ด้าน คือ ป้องกันเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะในการเพาะเลี้ยงจากสิ่งปนเปื้อน และเลือกเซลล์จำลองพันธุ์ (Recombinant cell clones) ที่มียีนส์ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้

2.8.3 ปัจจัยสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับปฏิบัติการ [45]

ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์จำเป็นต้องถูกควบคุมให้เหมาะสมเพื่อให้การเพาะเลี้ยงเซลล์มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ คือ อุณหภูมิ บรรยากาศ ค่าพีเอช (pH) พื้นผิววัสดุที่เพาะเลี้ยง (Cell culture surface/matrix) และภาวะโภชนาการ (Nutritional status)

2.8.3.1 *อุณหภูมิ* เซลล์แต่ละประเภทต้องการอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน เช่น เซลล์แมลงต้องการอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต้องการอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิสูงกว่า 39 องศาเซลเซียส เซลล์สัตว์เลี้ยง

ลูกด้วยนมจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอโทซิส (Apoptosis) และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะช้าลง ทั้งนี้เซลล์แต่ละประเภทจะมีความไวต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน

2.8.3.2 *บรรยากาศ* ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศเป็นก๊าซที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์มากที่สุด เนื่องจากเป็นก๊าซที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ปริมาณ หรือระดับของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์จึงต้องปรับให้เหมาะสมสอดคล้องกับชนิดของเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์และวัตถุประสงค์การใช้งาน โดยปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง จะเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ จะส่งผลให้การเติบโตของเซลล์ช้าลง บรรยากาศสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ คือ บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยปริมาตร

2.8.3.3 *ค่าพีเอช* เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบของเซลล์ การเจริญเติบโต การทำงานและการดำรงชีวิตของเซลล์ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ 7.2-7.4 และสำหรับแมลง คือ 6.0

2.8.3.4 *พื้นผิววัสดุที่เพาะเลี้ยง* พื้นผิววัสดุที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ต้องผ่านการล้างทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก ปรับค่าพีเอชที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ และทำให้พื้นผิวมีความชื้นทั่วถึง

2.8.3.5 *ภาวะโภชนาการ* หรือปริมาณสารอาหารมีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ กล่าวคือ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงต้องได้รับสารอาหารที่เพียงพอต่อการทำกิจกรรมของเซลล์ เนื่องจากสารอาหารที่ไม่เพียงพอจะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ หน้าที่ของเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวทำละลายของพอลิคาร์โพรแลกโตน

ในปี 2004 Tang, Z.G. และคณะ [46] ได้ศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของฟิล์ม PCL ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ คลอโรฟอร์ม เตตระไฮโดรฟูแลน (Tetrahydrofuran, THF) อะซิโตน (Acetone) และเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) แล้วขึ้นรูปบนงานแก้ว เพาะเลี้ยงเชื้อ โดยได้ทำการศึกษาพื้นผิวฟิล์มทั้งด้านที่สัมผัสกับงานเพาะเลี้ยงเชื้อ (SG) และด้านที่สัมผัสกับอากาศ (SA) จากการวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำ (Contact angle) พบว่าฟิล์ม PCL ที่ละลายด้วยตัวทำละลายที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic solvents) คือ คลอโรฟอร์มและเอทิลอะซิเตต มีค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มด้านที่สัมผัสกับอากาศสูงกว่าด้านที่สัมผัสกับงานเพาะเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือ ฟิล์มด้านที่สัมผัสกับงานเพาะเลี้ยงเชื้อมีความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มด้านที่สัมผัสกับอากาศ ซึ่งตรงกันข้ามกับฟิล์ม PCL ที่ละลายด้วยตัวทำละลายที่ชอบน้ำ (Hydrophilic solvents) คือ เตตระไฮโดรฟูแลนและอะซิโตน เมื่อศึกษาโครงสร้างสัณฐานพื้นผิวด้วย Field emission scanning electron microscope (FE-SEM) พบว่าฟิล์ม PCL ที่ได้จากตัวทำละลายอะซิโตนและเอทิลอะซิเตตมีโครงสร้างสัณฐานเป็นเส้นใยขนาดเล็กเชื่อมต่อกันเป็นแผ่นฟิล์ม ส่วนฟิล์ม PCL ที่ได้จากตัวทำละลาย คลอโรฟอร์มและเตตระไฮโดรฟูแลนมีโครงสร้างสัณฐานคล้ายทรงกลมขนาดเล็กที่เชื่อมต่อกันเป็นแผ่นฟิล์ม และฟิล์มด้านที่สัมผัสกับงานเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีรูพรุนขนาดใหญ่กว่าด้านที่สัมผัสกับอากาศ โดยความแตกต่างของโครงสร้างสัณฐานของแผ่นฟิล์มเกิดจากความสามารถในการละลาย PCL ในตัวทำละลายแต่ละชนิด และการแยกเฟสระหว่างกระบวนการขึ้นรูป กล่าวคือ คลอโรฟอร์มและเตตระไฮโดรฟูแลนมีความสามารถในการละลายสูง ทำให้โมเลกุลของ PCL เกิดการรวมตัวเป็นทรงกลม แต่อะซิโตนและเอทิลอะซิเตตมีความสามารถในการละลายต่ำจึงทำให้โมเลกุลของ PCL เกิดการรวมตัวเป็นเส้นใย เมื่อศึกษาสมบัติทางเคมีของฟิล์มทั้งสองด้านด้วย Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) พบว่าฟิล์มทั้งสองด้านมีสมบัติทางเคมีคล้ายกัน และการศึกษาสมบัติทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts) พบว่าฟิล์ม PCL ที่ได้จากการละลายในเอทิลอะซิเตตและเป็นด้านที่สัมผัสกับงานเพาะเลี้ยงเชื้อสนับสนุนให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ และเจริญเติบโตสูงที่สุด

ในปี 2007 Cristescu, R. และคณะ [47] ได้ทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์ม PCL ที่ขึ้นรูปด้วย Matrix assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพด้วย AFM พบว่า ลักษณะของฟิล์มขึ้นกับความรุนแรงของเลเซอร์ โดยฟิล์มที่ได้รับเลเซอร์พลังงานสูง (900 มิลลิจันต่อตารางเซนติเมตร) จะมีลักษณะเป็นโครงข่ายคล้ายเกาะที่เชื่อมต่อกัน ซึ่งเกิดจากการหลอม การเสียรูปและการตกผลึกของพอลิเมอร์ แต่ฟิล์มที่ขึ้นรูปด้วยพลังงานต่ำ

(500 มิลลิจุนต่อตารางเซนติเมตร) จะมีลักษณะพื้นผิวส่วนใหญ่เป็นกลุ่มก้อนทรงกลมขนาดประมาณ 500 นาโนเมตร โดยแต่ละกลุ่มมีการเชื่อมต่อกัน ทำให้ได้ฟิล์มที่มีพื้นผิวเหมือนกันทั้งหมด ซึ่งเหมาะในการนำไปใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยา และจากการศึกษาสมบัติทางเคมีด้วย FTIR พบว่าการขึ้นรูปด้วย MAPLE สามารถผลิตฟิล์มที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับฟิล์มที่ขึ้นรูปด้วยการหยดเคลือบ (Dropcast)

ในปี 2011 Schueren, L.V. และคณะ [48] ได้ศึกษาผลของตัวทำละลายที่มีต่อความเสถียรขนาดและลักษณะของเส้นใยที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) โดยทำการเปรียบเทียบการละลาย PCL ในตัวทำละลายต่าง ๆ คือ คลอโรฟอร์ม (Chloroform) กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดฟอร์มิก (Formic acid) เมทานอล (Methanol) เอทานอล (Ethanol) และตัวทำละลายผสมระหว่างกรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก จากการศึกษาพบว่าเมทานอลและเอทานอลไม่สามารถเป็นตัวทำละลายของ PCL ได้ แต่สามารถเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเป็นเส้นใยในกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต เมื่อผสมกรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกรวมกับคลอโรฟอร์มแล้วทำการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต พบว่าเส้นใยที่ได้ไม่มีความเสถียร เนื่องจากกรดฟอร์มิกมีความเป็นขี้ผึ้ง เมื่อจ่ายสนามไฟฟ้าให้แก่สารละลายในระหว่างการขึ้นรูป โมเลกุลภายในสารละลายจะเกิดเปลี่ยนแปลงทิศทางทำให้ระบบไม่มีความเสถียร และกรดอะซิติกมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำจึงส่งผลให้ระบบไม่มีความเสถียรเช่นกัน แต่เมื่อละลาย PCL ในตัวทำละลายผสมของกรดอะซิติก 10% และกรดฟอร์มิก 30% (ความเข้มข้นของสารละลาย 10% โดยน้ำหนัก) พบว่าระบบมีความเสถียร และเมื่อศึกษาด้วย SEM พบว่า PCL ที่ละลายในตัวทำละลายผสมสามารถผลิตเป็นเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตร ซึ่งเล็กกว่า PCL ที่ละลายในคลอโรฟอร์มถึง 10 เท่า (เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอยู่ในระดับไมโครเมตร) ส่วน PCL ที่ละลายในกรดฟอร์มิกเกิดโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นเม็ด และในกรดอะซิติกไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้

2.9.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเชื่อมขวาง

ในปี 2005 Chen, P.-R. และคณะ [49] ได้ทำการศึกษาสมบัติทางความร้อนและสมบัติทางชีวภาพของเมมเบรนเจลาติน (Gelatin membranes) ที่ผลิตจากการเชื่อมขวางด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์ (GTA) และ EDC จากการศึกษาอุณหภูมิการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ (Denaturation temperature, Td) ของเจลาตินด้วย Differential scanning calorimetry (DSC) พบว่าเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางทั้ง GTA และ EDC มีค่า Td เพิ่มขึ้น แสดงว่ามีความเสถียรทางความร้อนเพิ่มขึ้น โดยเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GTA มีค่า Td ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก GTA ที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการเชื่อมขวางที่ไม่สม่ำเสมอบนวัสดุ บางจุดมีการเชื่อมขวางที่สมบูรณ์ แต่

บางจุดมีการเชื่อมขวางที่ไม่สมบูรณ์ แต่เจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ค่า Td มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ EDC ที่เพิ่มขึ้น (0.2-0.8% EDC) แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ EDC เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เจลาตินมีปริมาณการเชื่อมขวางสูงขึ้น และเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GTA 0.05% (ความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน 15%) มีค่า Td สูงสุด ที่ 66.2 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาสมบัติทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมหมวกไตหนู (Rat adrenal gland pheochromocytoma cells, PC 12 cell) จำนวน 2.5×10^4 เซลล์ต่อหลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม แล้วศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จากจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยการย้อมสีแบบ MTT assay พบว่าเมมเบรนเจลาตินที่ผลิตด้วยการเชื่อมขวางของ EDC ความเข้มข้น 0.8% และเมมเบรนเจลาตินที่ผลิตด้วยการเชื่อมขวางของ GTA ความเข้มข้น 0.05% มีการเจริญเติบโตของเซลล์สูงที่สุด ซึ่งคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุม (งานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้บรรจุเมมเบรนเจลาติน) กล่าวคือ เมมเบรนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.8% มีปริมาณการเชื่อมขวางน้อย ทำให้เมมเบรนเกิดการย่อยสลายในระหว่างการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์น้อย แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.8% เจลาตินจะเกิดการเชื่อมขวางที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์น้อยเช่นกัน ส่วนเมมเบรนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วย GTA ความเข้มข้นสูงกว่า 0.05% จะทำให้เจลาตินเกิดการเชื่อมขวางที่ไม่สม่ำเสมอบนวัสดุ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์

ในปี 2010 Ratanavaraporn, J. และคณะ [50] ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตของสารละลายเจลาตินชนิดเอและชนิดบี และเทคนิคการเชื่อมขวางที่ส่งผลต่อปริมาณการเชื่อมขวางและโครงสร้างของแผ่นเส้นใยเจลาติน จากการศึกษาด้วย SEM พบว่าค่าศักย์ไฟฟ้า (Electrical potential) ไม่ส่งผลต่อโครงสร้างสัณฐานของแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผลิตได้ แต่ความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินส่งผลต่อโครงสร้างสัณฐานของแผ่นเส้นใยเจลาติน โดยสารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ได้เส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าเส้นใยที่ผลิตจากสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า และความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับผลิตเส้นใยเจลาตินด้วยกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตที่ 20 กิโลโวลต์ คือ 20-40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) จากการศึกษาการเชื่อมขวางด้วยเทคนิคต่าง ๆ พบว่า การเชื่อมขวางด้วยการให้ความร้อนภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Dehydrothermal, DHT, 140 องศาเซลเซียส, 48 ชั่วโมง) การเชื่อมขวางด้วยการตัด-แปรรองพลาสมาอาร์กอน (Pulsed inductively coupled plasma treatment, PICP) และการเชื่อมขวางด้วย DHT ร่วมกับ PICP ทำให้มีปริมาณการเชื่อมขวางต่ำ และยังคงรักษาโครงสร้างเดิมของแผ่นเส้นใยเจลาตินได้ เนื่องจาก DHT และ PICP ทำให้เกิดการเชื่อมขวางบริเวณพื้นผิวของแผ่นเส้นใย แต่ไม่ก่อให้เกิดการเชื่อมขวางภายในเนื้อของแผ่นเส้นใย และการเชื่อมแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านกระบวนการ DHT ด้วย PICP พบว่า PICP ไม่ส่งผลให้เกิดให้เกิดการเพิ่มปริมาณการเชื่อมขวางให้แก่แผ่นเส้นใยได้ โดย DHT เป็นการเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโนที่อยู่บริเวณ

ใกล้เคียงกัน ส่วน PICP เป็นการเชื่อมขวางที่เกิดจากอนุภาคที่ถูกกระตุ้น (Active species) ในกระบวนการพลาสมาซึ่งมีพลังงานเพียงพอในการผลิตอนุมูล (Radicals) ที่สามารถทำอันตรกิริยากับสายโซ่ของพอลิเมอร์ที่บริเวณพื้นผิวของแผ่นเส้นใยเจลาติน สำหรับการเชื่อมขวางด้วย DHT ร่วมกับการเชื่อมขวางทางเคมี คือ EDC และ GTA พบว่าแผ่นเส้นใยเจลาตินมีปริมาณการเชื่อมขวางสูงขึ้นเมื่อเทียบกับแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย DHT อย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเจลาตินชนิดบีมีปริมาณการเชื่อมขวางด้วย DHT ร่วมกับ EDC/N-hydroxysuccinimide (NHS) สูงกว่าเจลาตินชนิดเอ เนื่องจาก EDC เป็นสารเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและอะมิโน เจลาตินชนิดบีซึ่งมีปริมาณหมู่คาร์บอกซิลสูงกว่าเจลาตินชนิดเอ จึงมีปริมาณการเชื่อมขวางมากกว่า โดยแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านกระบวนการ DHT แล้วนำมาเชื่อมขวางต่อด้วยการแช่ในสารละลาย EDC/NHS จะทำให้แผ่นเส้นใยบวม และรูพรุนเกิดการเชื่อมต่อกัน แต่เมื่อนำมาพ่นด้วยสารละลาย EDC/NHS จะมีโครงสร้างคล้ายตะกร้าสาน (Basket-weave structure) การเชื่อมขวางแผ่นเส้นใยเจลาตินด้วย DHT ร่วมกับการอบไอของ GTA ในระบบสุญญากาศ พบว่าแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางนี้มีปริมาณการเชื่อมขวางสูงที่สุด แต่เส้นใยเกิดการเสีรูป คือ เส้นใยเกิดการหลอมรวมกัน

2.9.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดด้วยพลาสมา

ในปี 2008 Yu, H.-Y. และคณะ [8] ได้ทำการศึกษาความชอบน้ำ และองค์ประกอบทางเคมีของเมมเบรนเส้นใยกลวงพอลิโพรพิลีน (Polypropylene hollow fiber microporous membranes, PPHFMMs) ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ ในระบบความถี่วิทยุ 13.56 เมกกะเฮิร์ตซ์ กำลัง 30 วัตต์ จากการศึกษาความชอบน้ำด้วยการวัดค่ามุมสัมผัสของน้ำบนพื้นผิว PPHFMMs พบว่า PPHFMMs มีค่ามุมสัมผัสลดลงตามระยะเวลาการดัดแปรที่มากขึ้นจาก 128.5 องศา เป็น 35 องศาเมื่อผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 8 นาที และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย XPS ของ PPHFMMs ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ พบว่า PPHFMMs มีปริมาณออกซิเจนและไนโตรเจนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปรที่เพิ่มขึ้น สัดส่วน O/C และ N/C เพิ่มขึ้นจาก 2.8 และ 0.0 เป็น 14.9 และ 0.9 ตามลำดับ เมื่อผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 8 นาที ซึ่งแสดงว่ามีพันธะ C-O (531.5 อิเล็กตรอนโวลต์), O=C (532.2 อิเล็กตรอนโวลต์), N-C และ N-H (402.1 อิเล็กตรอนโวลต์) และ N-C=O (404.2 อิเล็กตรอนโวลต์) เพิ่มขึ้น

ในปี 2010 Prasertsung, I. และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาการดัดแปรพื้นผิวของฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยพลาสมาแก๊สออกซิเจน จากการศึกษาวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของฟิล์มเจลาตินที่ดัดแปรด้วยพลาสมาแก๊สออกซิเจนพบว่าเมื่อกำลังไฟฟ้าและความดันของระบบชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50

เฮิร์ตซ์ (AC 50 Hz plasma) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินลดลง เนื่องจากกำลังไฟฟ้าและความดันในระบบทำให้ออกซิเจนเกิดการแตกตัวเป็นอนุภาคที่ถูกกระตุ้น (Active species) ซึ่งอนุภาคนี้จะรวมตัวกับพื้นผิวของฟิล์มเจลาตินในรูปของหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้ว เช่น C=O และ O=C-O เป็นต้น ทำให้พื้นผิวฟิล์มเจลาตินมีความชอบน้ำมากขึ้น จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของฟิล์มเจลาตินด้วย Atomic force microscopy (AFM) พบว่าการตัดแปรด้วยพลาสมาแก๊สออกซิเจนสามารถทำให้พื้นผิวของฟิล์มเจลาตินมีความขรุขระเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของอุณหภูมิเก็บรักษาฟิล์มเจลาตินภายหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาแก๊สออกซิเจน พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาแก๊สออกซิเจนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้เคมีพื้นผิวของฟิล์มกลับคืนสู่สภาพก่อนการบำบัด (Recover) เร็วกว่าฟิล์มที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิการเก็บรักษาไม่ส่งผลให้เกิดการกลับคืนของสภาพความขรุขระของฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา

ในปี 2011 Jacobs, T. และคณะ [10] ได้ทำการศึกษาการตัดแปรฟิล์ม PCL ขนาด 20 มิลลิเมตร x 20 มิลลิเมตร x 3 มิลลิเมตร ด้วยพลาสมาดีซาร์จข้ามฉนวน (Dielectric barrier discharge plasma, DBD) กระแสสลับ ความถี่ 5 กิโลเฮิร์ตซ์ ของแก๊สอากาศ (Dry air) ฮีเลียม (Helium, He) และอาร์กอน (Argon, Ar) จากการศึกษาค่ามุมสัมผัสพบว่าฟิล์ม PCL มีค่ามุมสัมผัส น้ำ 74 องศา ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยอากาศ ฮีเลียมและอาร์กอนมีค่ามุมสัมผัส 52, 45 และ 52 องศา ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวฟิล์ม PCL ภายหลังการตัดแปรด้วยพลาสมามีความชอบน้ำมากขึ้น และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิวด้วย XPS พบว่าฟิล์ม PCL ประกอบด้วย 3 พันธะ คือ C-C (285 อิเล็กตรอนโวลต์) C-O (286.5 อิเล็กตรอนโวลต์) และ O=C-O (289.1 อิเล็กตรอนโวลต์) แต่ภายหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาของแก๊สทั้ง 3 ชนิด พบว่าพันธะ C-C มีความเข้มข้นลดลง ขณะที่พันธะ C-O และ O=C-O มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และพบพันธะใหม่ C=O (287.7 อิเล็กตรอนโวลต์) เนื่องจากการตัดแปรด้วยพลาสมาของแก๊สทั้ง 3 ชนิด สร้างอนุภาคที่ถูกกระตุ้นให้แก่พื้นผิวของฟิล์ม PCL ซึ่งอนุภาคที่ถูกกระตุ้นนี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ ก่อให้เกิดการฝังตัว (Implantation) ของหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว นอกจากนี้ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาฮีเลียมยังพบพันธะ C-N (287.7 eV) เนื่องจากพลาสมาฮีเลียมเกิดในช่วงโกลดิสชาร์ต (Glow discharge) ทำให้มีฮีเลียมที่อยู่ในสถานะเมตาสเตเบิล (Metastable) สูง โดยเมตาสเตเบิลสามารถสร้างไอออน N_2^+ ผ่านปฏิกิริยา $He(2^3s) + He + N_2 \rightarrow 2He + N_2^+ + e^-$ (Penning ionization) และเมื่อ N_2^+ ทำปฏิกิริยากับอิเล็กตรอนบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL จะเกิดการฝังตัวของไนโตรเจนบนพื้นผิว ($N_2^+ + e^-_{surface} \rightarrow 2N^+ + 4e^-$) โดยอะตอมของไนโตรเจนที่พบเกิดจากการปนเปื้อนของแก๊สไนโตรเจนในระบบพลาสมา

ในปี 2012 Prasertsung, I. และคณะ [3] ได้ทำการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ MSCs บนฟิล์มเจลาตินที่ตัดแปรด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ของแก๊สไนโตรเจน ออกซิเจนและอากาศ จากการศึกษาคุณสมบัติของน้ำบนพื้นผิวของฟิล์มเจลาตินที่ตัดแปรด้วยพลาสมา พบว่ามุมสัมผัสน้ำมีค่าเฉลี่ยลงตามระยะเวลาการตัดแปรที่สูงขึ้น และมีแนวโน้มเดียวกันสำหรับแก๊สทั้งสามชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตัดแปรด้วยพลาสมาของแก๊สทั้งสามชนิดสามารถเพิ่มความชอบน้ำให้แก่พื้นผิวของฟิล์มเจลาติน เมื่อศึกษาเคมีพื้นผิวด้วย XPS พบว่าสัดส่วน N/C และ O/C เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาที่นานขึ้น แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาที่นานขึ้น ส่งผลให้พื้นผิวของฟิล์มเจลาตินมีหมู่ฟังก์ชันไนโตรเจนและออกซิเจนเพิ่มขึ้น เช่น หมู่เอมีน (-NH₂) และคาร์บอกซิลิก (-COOH) เป็นต้น โดยหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวจะเพิ่มความมีขั้วให้แก่ฟิล์มเจลาตินทำให้ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มเจลาตินที่ตัดแปรด้วยพลาสมามีค่าลดลง แต่จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวด้วย AFM พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาของแก๊สทั้งสามชนิดมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวน้อยมากและความขรุขระของพื้นผิวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฟิล์มเจลาตินที่ไม่ได้รับการตัดแปรด้วยพลาสมา เมื่อศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ไขกระดูกหนู (Rat bone marrow-derived stem cells, MSCs) บนฟิล์มเจลาตินที่ตัดแปรด้วยพลาสมา พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ตัดแปรด้วยพลาสมาแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 15 และ 30 วินาที จะมีจำนวนเซลล์ยึดเกาะมากที่สุดและเซลล์ที่ยึดเกาะจะมีลักษณะแผ่ขยายมากที่สุด เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเพิ่มประจุบวกให้แก่พื้นผิวของฟิล์มเจลาติน ทำให้พื้นผิวฟิล์มเจลาตินทำอันตรกิริยาได้ดีกับพื้นผิวของเซลล์ที่เป็นประจุลบ นอกจากนี้หมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนยังสามารถทำอันตรกิริยากับโปรตีนได้ดี ทำให้การยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์มในช่วงเริ่มต้นสูง

ในปี 2012 Fang, Z. และคณะ [11] ได้ทำการศึกษาการตัดแปรพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมทิลเมทาคริลเลตที่มีความหนา 0.2 มิลลิเมตร (Polymethylmetacrylate, PMMA) ด้วยพลาสมาความดันบรรยากาศ (Atmospheric pressure non-thermal plasma) ระบบ DBD (กำลัง 17.86 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) จากการศึกษาคุณสมบัติของน้ำ และพลังงานพื้นผิว พบว่าฟิล์ม PMMA ที่ถูกตัดแปรด้วยพลาสมามีค่ามุมสัมผัสของน้ำต่ำลงตามระยะเวลาการตัดแปรที่เพิ่มขึ้น จนถึงระยะเวลา 30 วินาที และพลังงานพื้นผิวมีค่าเพิ่มขึ้น ตามระยะเวลาการตัดแปรที่เพิ่มขึ้น จนถึงระยะเวลา 30 วินาที เช่นเดียวกัน โดยการเพิ่มเวลาการตัดแปรมากกว่า 30 วินาที ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่ามุมสัมผัสและค่าพลังงานพื้นผิว กล่าวคือ ฟิล์ม PMMA ที่ไม่ได้รับการตัดแปรมีค่ามุมสัมผัส 83.5 องศา และค่าพลังงานพื้นผิว 30.14 มิลลิจูลต่อตารางเมตร หลังการตัดแปร 30 วินาที มีค่ามุมสัมผัสต่ำสุดที่ 41 องศา และค่าพลังงานพื้นผิวสูงสุดที่ 63.32 มิลลิจูลต่อตารางเมตร จากการศึกษาฟิล์ม PMMA ภายหลังการตัดแปร 30 วินาที ด้วย FTIR พบว่าความเข้มของการดูดกลืนแสง (Intensity of absorption) ที่เลขคลื่น 1750 ต่อเซนติเมตร ของพันธะ C=O และ 1241 ต่อเซนติเมตร ของพันธะ

C-O-C มีค่าเพิ่มขึ้น และพบพันธะใหม่ที่ 3450 ต่อเซนติเมตร ของ -OH แสดงว่าฟิล์ม PMMA ที่ผ่านตัดแปรด้วยพลาสมามีหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษา XPS ที่พบว่าฟิล์ม PMMA ภายหลังจากตัดแปรด้วยพลาสมามีพันธะ O-C ใน O-C-O, O-CO-O, -OH (แอลกอฮอล์) หรือ -CO-O- (เอสเทอร์) เกิดขึ้นใหม่ และจากการศึกษาพื้นผิวฟิล์ม PMMA ด้วย AFM พบว่าลักษณะพื้นผิวฟิล์ม PMMA ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมามีความขรุขระ คล้ายเกิดภูเขาจำนวนมาก ซึ่งต่างจากฟิล์ม PMMA ที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาซึ่งมีลักษณะผิวเรียบ

ในปี 2013 Choi, Y.-R. และคณะ [12] ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแคลเซียมฟอสเฟต (Biphasic calcium phosphate) ภายหลังจากตัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนและพลาสมาอากาศ โดยการศึกษาแบ่งวัสดุเป็น 2 รูปแบบ คือ จาน (Disc) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร สำหรับวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสน้ำของลักษณะพื้นผิว และองค์ประกอบทางเคมี และโครงเลี้ยงเซลล์ขนาด 2 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร สำหรับวิเคราะห์การยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ไขกระดูกหนู (Mouse osteoblast-like cell line, MC3T3-E1) จากการศึกษาความชอบน้ำ พบว่าค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวแคลเซียมฟอสเฟตที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนและพลาสมาอากาศลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับพื้นผิวที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา โดยไม่มีความแตกต่างในพลาสมาทั้งสองชนิด จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย XPS พบว่าภายหลังจากตัดแปรด้วยพลาสมาทั้งสองชนิด จานแคลเซียมฟอสเฟตมีปริมาณคาร์บอนลดลง และมีออกซิเจนเพิ่มขึ้น เนื่องจากอนุภาคที่ถูกกระตุ้นแตกพันธะของ C-C และ C-H เพื่อสร้างอนุมูลบนพื้นผิว ซึ่งอนุมูลนี้จะทำปฏิกิริยาสร้างหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบแทนที่ แต่แคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของวัสดุไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวด้วย AFM พบว่าพื้นผิวของของแคลเซียมฟอสเฟตที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาสมบัติทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 บนโครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนและพลาสมาอากาศแตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณการยึดเกาะของเซลล์ MC3T3-E1 บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาทั้งสองชนิดไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าเซลล์ MC3T3-E1 บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนมีปริมาณการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ MC3T3-E1 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ

ในปี 2013 Jacobs, T. และคณะ [9] ได้ทำการศึกษาการตัดแปรฟิล์ม PCL ขนาด 20 มิลลิเมตร x 20 มิลลิเมตร x 3 มิลลิเมตร และโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร ด้วยพลาสมา DBD กระแสสลับ ความถี่ 5 กิโลเฮิรตซ์ ของแก๊สอากาศ

อีเลียมและอาร์กอน ที่ส่งผลต่อองค์ประกอบเคมีและอันตรกิริยาระหว่างเซลล์และวัสดุ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย XPS พบว่าฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาของแก๊สทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณออกซิเจนสูงขึ้นทั้งบนพื้นผิวและด้านในของโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงว่าพลาสมาสามารถเข้าสู่ด้านในโครงเลี้ยงเซลล์ได้โดยไม่สูญเสียความว่องไวของอนุภาคที่ถูกกระตุ้น สำหรับการศึกษานันตรกิริยาระหว่างเซลล์และวัสดุ ฟิล์ม PCL ถูกเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (Human foreskin fibroblasts, HFF-1) จำนวน 40,000 เซลล์/ฟิล์ม และโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ถูกเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์กระดูกหนู (Mouse calvaria preosteoblast, MC3T3-E1) จำนวน 855,000 เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ จากการศึกษาการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ HFF-1 บนฟิล์ม พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์มที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาของแก๊สทั้ง 3 ชนิด ไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา แต่เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและแผ่นบนฟิล์มที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาได้ดีกว่าฟิล์มที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา เมื่อศึกษาการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 ในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 วัน เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศมีปริมาณมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา แต่ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 21 วัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา

ในปี 2013 Mangindaan, D. และคณะ [5] ได้ทำการศึกษากการตัดแปรเมมเบรน PCL หนา 150 ไมโครเมตร ด้วยพลาสมาออกซิเจน ในระบบความถี่วิทยุ กำลัง 100 วัตต์ ระยะเวลาการตัดแปร 60 วินาที ที่ส่งผลต่อการปลดปล่อยยา Ketoprofen และ Silver sulfadiazine (AgSD) ที่บรรจุอยู่ในโซลเจล (Sol-gel) ผสมระหว่างไคโตซาน (Chitosan) และ Tetraorthosilicate (TEOS) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย Electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA) พบว่าเมมเบรน PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาออกซิเจนมีปริมาณอะตอมของออกซิเจนสูงขึ้น แสดงว่าพลาสมาอากาศสามารถเพิ่มหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบให้แก่เมมเบรน PCL ได้ สอดคล้องกับค่ามุมสัมผัสน้ำของเมมเบรน PCL ที่ลดลงจาก ~103 องศา เป็น ~40 องศา ภายหลังจากการตัดแปรด้วยพลาสมาออกซิเจน กำลัง 20 วัตต์ ระยะเวลา 60 วินาที จากการศึกษาการปลดปล่อยยา ด้วยเครื่อง Franz cell พบว่าเมมเบรน PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาออกซิเจนสามารถเพิ่มการปลดปล่อยยา Ketoprofen ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จาก 33% เป็น 41% แต่เมื่อเวลานานขึ้น การปลดปล่อยจะลดลงจาก 71% เป็น 62% ส่วนยา AgSD มีการปลดปล่อยสูงขึ้นที่ระยะเวลา 4-6 วัน แล้วลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากความชอบน้ำของเมมเบรน PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาออกซิเจนจะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และจากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเมมเบรน PCL และเซลล์ผิวหนังของหนู (L929 fibroblasts) พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24

ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนเมมเบรน PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ (2.0×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) มากกว่าบนเมมเบรน PCL ที่ไม่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา (1.7×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร)

ในปี 2013 Prasertsung, I. และคณะ [51] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบพฤติกรรมของเซลล์ผิวหนังหนู (Mouse fibroblast, L929) และเซลล์ไขกระดูกหนู (Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC) ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการดัดแปรด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สไนโตรเจน จากการศึกษาปริมาณเซลล์ที่เกาะที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถยึดเกาะบนฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนได้มากขึ้น เมื่อเทียบกับฟิล์มเจลาตินที่ไม่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา โดยปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะทั้งสองชนิดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาโครงสร้างสัณฐานและพื้นที่การแผ่ของเซลล์ทั้งสองชนิดด้วย SEM พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนมีลักษณะแบนราบไปกับพื้นผิว ขณะที่เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์มเจลาตินที่ไม่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมามีลักษณะกลม จากโครงสร้างสัณฐานแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนมีการแผ่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับพื้นที่การแผ่ของเซลล์ (Spreading area) ที่เพิ่มขึ้น โดยพื้นที่การแผ่ของเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปรที่เพิ่มขึ้น แต่เซลล์ที่ยึดเกาะทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองชนิดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนมีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์มเจลาตินที่ไม่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญ และเซลล์ผิวหนังหนูมีความสามารถในการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ไขกระดูกหนู

ในปี 2013 Amornsudthiwat, P และคณะ [4] ได้ทำการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนังหนู (Mouse fibroblast, L929) บนฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย (Thai silk fibroin) ที่ผ่านการดัดแปรด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สไนโตรเจน จากการศึกษาค่ามุมสัมผัสพื้นผิว พบว่าฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนมีค่ามุมสัมผัสพื้นผิวลดลงเป็น 2 ช่วง คือ ฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนเป็นเวลา 5-40 วินาที มีค่ามุมสัมผัสพื้นผิวประมาณ 40 องศา และฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนเป็นเวลา 80-160 วินาที มีค่ามุมสัมผัสพื้นผิวประมาณ 20 องศา ขณะที่ฟิล์มไฟโบรอินมีค่ามุมสัมผัสพื้นผิว 70 องศา จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบนพื้นผิวด้วย XPS พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาไนโตรเจนมีปริมาณอะตอมของไนโตรเจนและออกซิเจนเพิ่มขึ้น โดยปริมาณอะตอมจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปรที่เพิ่มขึ้น และจากการ

วิเคราะห์ปริมาณพันธะแสดงให้เห็นว่าพลาสติกไนโตรเจนเหนียวทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันเอมีน (C-NH₂) เอไมด์ (O=C-N) ไฮดรอกซิล (C-O) อีเทอร์ (C=O) และคาร์บอกซิล (O=C-OH) บนพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอิน ส่งผลให้พื้นผิวมีความชอบน้ำมากขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบเกิดจาก 2 ปัจจัย คือ มีการปนเปื้อนของแก๊สออกซิเจนภายใน chamber และหมู่ฟังก์ชันที่ถูกกระตุ้นจากการตัดแปรด้วยพลาสติกไนโตรเจนทำปฏิกิริยากับอากาศภายหลังการตัดแปร เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีภายในวัสดุด้วย FTIR และสัญญาณพื้นผิวด้วย AFM พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกไนโตรเจนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีภายในเนื้อวัสดุ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณพื้นผิวอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าระบบพลาสติกที่ใช้ในการตัดแปรมีพลังงานต่ำ สามารถสร้างหมู่ฟังก์ชันได้โดยไม่ทำลายพื้นผิว จากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้สูงที่สุดบนฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกไนโตรเจนเป็นเวลา 90 วินาที โดยที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 3 ชั่วโมง เซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกไนโตรเจนเป็นเวลา 90 วินาที มีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่ยึดเกาะบนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Positive control) และมีจำนวนเซลล์ประมาณ 80,000 เซลล์ เนื่องจากฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกไนโตรเจนเป็นเวลา 90 วินาที มีการพัฒนาความชอบน้ำ และมีหมู่เอมีน และคาร์บอกซิลบนพื้นผิวสูงที่สุด

2.9.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสติกและตรึงด้วยโปรตีน

ในปี 2003 Gancarz, I. และคณะ [52] ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของฟิล์มพอลิซัลโฟน (Polysulfone, PSU) ที่ถูกตัดแปรในพลาสติกไมโครเวฟ (Microwave) ความถี่ 2.45 เฮิร์ตซ์ ของแก๊ส 3 ชนิด คือ แอมโมเนีย (Ammonia) บิวทิลเอมีน (n-Butyl amine) และอัลลิแอมีน (Allyamine) โดยทำการศึกษาทั้งในระบบที่มีแก๊สอาร์กอนร่วมด้วย และไม่มีแก๊สอาร์กอนร่วมด้วย แล้วตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคส ไอโซเมอเรส (Glucose isomerase) โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง จากการศึกษาฟิล์ม PSU ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกของแก๊สทั้ง 3 ชนิด ทั้งที่มีแก๊สอาร์กอนร่วมและไม่ร่วมด้วย จากผล FTIR-ATR พบว่าเกิดพีคพันธะใหม่ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1650 และ 2200 ต่อเซนติเมตร ของพันธะ =C=N- และ -C≡N- ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพลาสติกสามารถสร้างหมู่ฟังก์ชันที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวฟิล์ม PSU ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผล XPS ที่ตรวจพบธาตุไนโตรเจนภายหลังฟิล์ม PSU ถูกตัดแปรด้วยพลาสติก โดยฟิล์ม PSU ที่ถูกตัดแปรด้วยพลาสติกแอมโมเนียจะพบปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด แต่เมื่อเพิ่มระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดและเติมแก๊สอาร์กอนเข้าร่วมในระบบจะพบปริมาณไนโตรเจนลดลง และเมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของฟิล์ม

PSU ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาและตรึงเอนไซม์ด้วย FTIR-ATR พบว่าเกิดพันธะใหม่ที่เลขคลื่น 3187.8 ต่อเซนติเมตร และ 1630.0 ต่อเซนติเมตร ของ NH และ 1554.5 ต่อเซนติเมตร ของ C=O แสดงว่าโปรตีนถูกตรึงบนพื้นผิว และจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) พบว่าฟิล์ม PSU ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอัลลูมิเนียมร่วมกับอาร์กอน มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

ในปี 2008 Jingrun, R. และคณะ [53] ได้ทำการศึกษการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มพอลิเอทิลีนทาเลฟทาเรต (Polyethylene terephthalate, PET) ด้วยโปรตีนอัลบูมินและเจลาติน โดยฟิล์ม PET จะถูกดัดแปรด้วยพลาสมาออกซิเจน ในระบบความถี่วิทยุ กำลัง 80 วัตต์ และรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) 200 วัตต์ เพื่อกราฟด้วยอะคริลิกแอซิด (Acrylic acid) แล้วตรึงด้วยโปรตีนเจลาตินหรือเจลาตินร่วมกับอัลบูมิน (Albumin) โดยใช้ EDC เป็นสารเชื่อมขวาง จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิวด้วย XPS พบว่า ฟิล์ม PET ภายหลังกการดัดแปรด้วยโปรตีนมีธาตุไนโตรเจนเกิดขึ้น โดยฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาตินร่วมกับอัลบูมินมีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาติน แสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงเจลาตินและอัลบูมินบนพื้นผิวได้ จากการศึกษาการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulation) ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าฟิล์ม PET และฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาตินมีเกล็ดเลือดกระจายเต็มพื้นผิว โดยฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาตินมีปริมาณการยึดเกาะของเกล็ดเลือดสูงที่สุด ส่วนฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาตินร่วมกับอัลบูมิน มีปริมาณการยึดเกาะของเกล็ดเลือดต่ำที่สุด และจากการศึกษาการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดดำสายสะดือมนุษย์ (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาติน เซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมา คือ ฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาตินร่วมกับอัลบูมิน และฟิล์ม PET เนื่องจากเจลาตินเป็นโปรตีนที่มีสมบัติในการเพิ่มความเข้ากันได้ทางชีวภาพให้แก่วัสดุและเซลล์ แต่เจลาตินมีสมบัติทำให้เลือดแข็งตัวด้วยส่วนอัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีสมบัติในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ดังนั้นฟิล์ม PET ที่ถูกตรึงด้วยเจลาตินร่วมกับอัลบูมินจึงมีคุณสมบัติเหมาะต่อการนำไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อหลอดเลือด กล่าวคือ วัสดุสำหรับการนำไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อหลอดเลือด ต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ แต่ต้องไม่ก่อให้เกิดการแข็งตัวของเลือดก่อนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่

ในปี 2010 López-Pérez, P.M. และคณะ [54] ได้ทำการศึกษการดัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลลผสมแป้งและพอลิคาร์โพรแลกโตน (Thermoplastic starch and poly(ϵ -caprolactone) SPCL (30/70 wt.%) โดยใช้ระบบพลาสมาความถี่วิทยุ (Radio frequency) 13.56 เฮิร์ตซ์ กำลัง 30 วัตต์ ของแก๊สออกซิเจน เป็นเวลา 15 นาที แล้วกราฟด้วยมอนอเมอร์ คือ ไวนิลฟอสเฟตแอซิด (Vinyl phosphonic acid, VPA) หรือไวนิลซัลโฟนิคแอซิด (Vinyl sulfonic acid, VSA) ด้วยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาแล้วลงในสารละลายมอนอเมอร์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิว พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SPCL มีอะตอม

ของคาร์บอนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแสดงในรูปพันธะ C-C, C-O และ O=C-O, C=O โครงสร้างเซลล์ที่ถูกกราฟด้วย VSA จะตรวจพบอะตอมของซัลเฟอร์ (Sulfur, S) และพบพันธะเกิดใหม่ที่ตำแหน่ง 287.9 อิเล็กตรอนโวลต์ ส่วนโครงสร้างเซลล์ที่ถูกกราฟด้วย VPA จะตรวจพบอะตอมของฟอสฟอรัส (Phosphorous, P) แต่ไม่พบพันธะที่เกิดใหม่ เนื่องจากตำแหน่งพันธะ C-P มีค่าพลังงานยึดเหนี่ยว (Binding energy) ใกล้เคียงกับพันธะ C-O เมื่อศึกษาการดูดซึมของโปรตีนไฟโบรเนคติน (Fibronectin, Fn) และไวโทรเนคติน (Vitronectin, Vn) ที่มีส่วนสำคัญต่อการยึดเกาะ (Adhesion) การแผ่ (Spreading) และการอพยพของเซลล์ (Migration) พบว่าไฟโบรเนคตินไม่ดูดซึมบนโครงสร้างเซลล์ SPCL ทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการกราฟด้วย VSA หรือ VPA แต่ดูดซึมไวโทรเนคติน เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ศึกษาการดูดซึมของโปรตีนมีไวโทรเนคตินปริมาณมากกว่าไฟโบรเนคติน และอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) จะสูญเสียไฟโบรเนคติน แต่ไม่สูญเสียไวโทรเนคติน นอกจากนี้ยังมีวอร์แมนเอ็กเฟค (Vorman effect) ที่โปรตีนชนิดอื่นถูกดูดซึมบนพื้นผิวแทนไฟโบรเนคติน และจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระดูกมนุษย์ (Human osteosarcoma cell line, SaOs-2) พบว่าโครงสร้างเซลล์ที่ถูกกราฟด้วย VPA มีการเจริญเติบโตของเซลล์สูงที่สุดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 3 วัน แต่ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน เซลล์มีการกระจายปกคลุมทั่วเส้นใยและรอยต่อระหว่างเส้นใยของโครงสร้างเซลล์ทั้ง 3 ชนิด (โครงสร้างเซลล์ SPCL โครงสร้างเซลล์ SPCL ที่ถูกกราฟด้วย VSA และโครงสร้างเซลล์ SPCL ที่ถูกกราฟด้วย VPA)

ในปี 2013 He, F. และคณะ [14] ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ MSCs ที่มีต่อโครงสร้างเซลล์พอลิแลคไทด์โคไกลโคลิกแอซิดและแคลเซียมฟอสเฟตซีเมนต์ (Poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite (PLGA/CPC) scaffold) ที่ผ่านการตรึงด้วยคอลลาเจนภายหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาแอมโมเนีย (Co/PLGA/CPC scaffold) จากการศึกษาด้วย FTIR และ XPS พบว่าโครงสร้างเซลล์ PLGA/CPC ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาแอมโมเนียก่อนการตรึงคอลลาเจนจะแสดง Peak ของ เอไมด์ 1 (Amide I, O=C-N) ที่ 1650 ต่อเซนติเมตร และเอไมด์ 2 (Amide II, C-NH₂) ที่ 1550 ต่อเซนติเมตร คล้ายกับคอลลาเจน แต่โครงสร้างเซลล์ PLGA/CPC ที่ไม่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาก่อนการตรึงคอลลาเจน เมื่อถูกล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณมากจะไม่พบ Peak ของเอไมด์ 1 และเอไมด์ 2 โดยเส้นกราฟที่ได้จะคล้ายกับโครงสร้างเซลล์ PLGA/CPC แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่ถูกตรึงถูกชะหายไป เนื่องจากการตัดแปรด้วยพลาสมาแอมโมเนียช่วยเพิ่มประจุบนพื้นผิวของโครงสร้างเซลล์ PLGA/CPC ทำให้โครงสร้างเซลล์สามารถทำอันตรกิริยาระหว่างประจุและสร้างพันธะกับสารชีวโมเลกุลได้ การศึกษาผลการยึดเกาะ เจริญเติบโต และการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกบนโครงสร้างเซลล์ พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะเจริญเติบโต และสร้างเอนไซม์ ALP บนโครงสร้างเซลล์ Co/PLGA/CPC ได้ดีกว่าโครงสร้างเซลล์ PLGA/CPC

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 พอลิคาร์โพรแลกโตน (6-Caprolactone polymer (PCL), $(C_6H_{10}O_2)_n$, Mn 70,000-90,000 g/mol, Aldrich chemistry, USA)

3.1.2 เจลาตินชนิดเอ (Type A gelatin, pl = 9, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)

3.1.3 เจลาตินชนิดบี (Type B gelatin, pl = 5, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)

3.1.4 คอลลาเจนไฮโดรไลเซส (Hydrolyzed fish collagen, CollaHealth, Samutprakan, Thailand)

3.1.5 β -alanine ($NH_2CH_2CH_2COOH$, MW 89.09 g/mol, Nacal tesque, Kyoto, Japan)

3.1.6 Chloroform ($CHCl_3$, MW 119.38 g/mol, VWR International Ltd., UK)

3.1.7 Dulbecco's modified eagle powder medium (D-MEM(s), 10% medium+L-gluta-mine+AB, Hyclone, USA)

3.1.8 Dulbecco's phosphate buffer saline without calcium and magnesium (PBS (-) powder, Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, Japan)

3.1.9 Dimethylsulfoxide (Cell culture tested DMSO, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.10 Ethanol 99.7-100% (C_2H_5OH , MW 46.04 g/mol, VWR International Ltd., UK)

3.1.11 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.12 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone or Biochrom or ICP, USA)

3.1.13 Hydrochloric (HCl 37%, MW 36.46 g/mol, QReC, New Zealand)

3.1.14 N-Hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.15 Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units/ml, Hyclone, USA)

3.1.16 Phenol, 4-[5-(4-methyl-1-piperazinylo)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-, trihydrochloride (Hoechst 33258, pentahydrate(bis-benzimide) 10 mg/ml solution in water, $C_{25}H_{37}Cl_3N_6O_6$, MW= 623.96 g/mol, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

3.1.17 Sodium chloride (NaCl, MW 58.44 g/mol, Ajax Finechem, Australia)

3.1.18 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 , MW 84.01 g/mol, Merck, Germany)

3.1.19 Sodium citrate ($\text{HO}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MW 294.10 g/mol, Merck, Germany)

3.1.20 SDS lysis buffer Sodium dodecylsulfate (SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$, MW 288.38 g/mol, Biotech Basic Canada Inc., Canada)

3.1.21 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS, $(\text{NO}_2)_3\text{C}_6\text{H}_2\text{SO}_3\text{Na} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, MW 315.15 g/mol, Nacal Tesque, Kyoto, Japan)

3.1.22 Trypan blue stain (Gibco, USA)

3.1.23 Trypsin with EDTA.4Na (0.25% Trypsin/EDTA, Hyclone, USA)

3.1.24 จานเพาะเชื้อ (Petri dish, D 9 cm)

3.1.25 จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 24, 48 และ 96 หลุม (24-, 48- and 96-well tissue culture plates, Corning, USA)

3.1.26 กระจกปิดสไลด์ (Glass slip, D 15 mm, Matsunami, Japan)

3.1.27 กระจกสไลด์ (Glass slide, 25.4 x 76.2 x 1.2 mm, Sail band, China)

3.1.28 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifugal tubes, Corning, USA)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิทัล (AL204, Mettler TOLEDO, USA)

3.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Kubota corporation 6500, Japan)

3.2.3 เครื่องปั่นสาร (Magnetic stirrer, IKA C-MAGHS7, UL, USA)

3.2.4 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer, MX-S, Dragon Lab, China)

3.2.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Micropipette, Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)

3.2.5 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติแบบหลายช่อง (Multi-channel pipette, Pipetman, USA)

3.2.6 ตู้อบ (Oven, VD23, Binder, Germany)

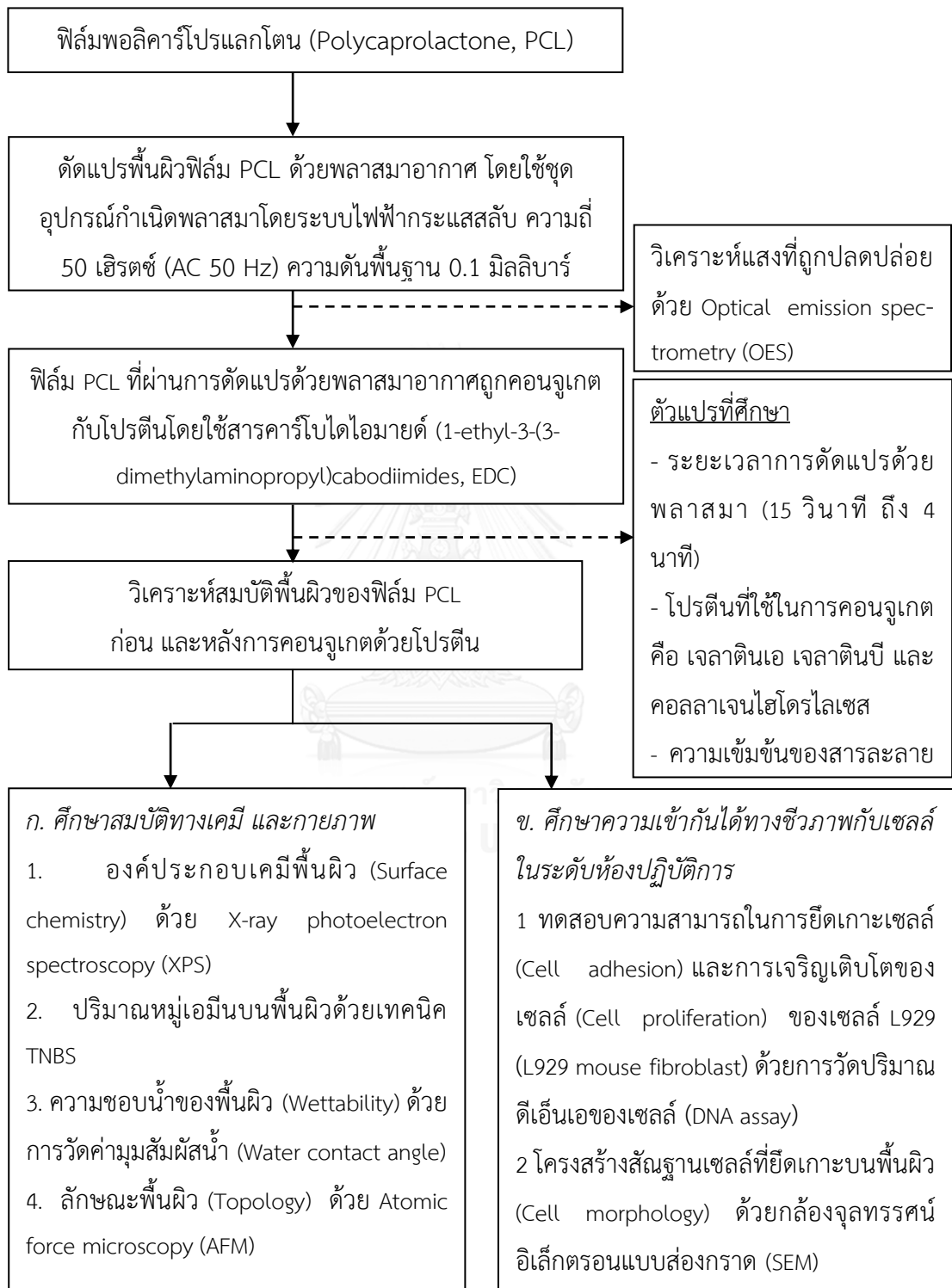
3.2.7 ตู้อบความร้อนแบบสุญญากาศ (Vacuum oven, VD23, Binder, Germany)

3.2.8 ชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ (In-house AC 50 Hz plasma)

- 3.2.9 กล้องจุลทรรศน์ (Eclipse TS100, Nikon, Japan)
- 3.2.10 กล้องจุลทรรศน์ (Eclipse 80i, Nikon, Japan)
- 3.2.11 กล้องถ่ายรูป (D5000, Nikon, Japan)
- 3.2.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow, HWS Series 254473, Australia)
- 3.2.13 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Incubator, Series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, USA)
- 3.2.14 Fluorescence microplate reader (FLUO star Omega, BMG Labtech, Germany)
- 3.2.15 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy (SEM), JSM-5410LV, Jeol, Japan)
- 3.2.16 Optical emission spectroscopy (OES, Ocean optics USB4000, USA)
- 3.2.17 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, AXIS Ultra DLD, Kratos analytical Ltd., UK)
- 3.2.18 Contact angle (Camplus Micro, Tanteq Inc, USA)
- 3.2.19 Atomic force microscope (AFM, MFP-3D-BIO, Asylum Research, USA)
- 3.2.20 Critical point dryer (Tousimis Samdri 780, USA) JSM-5410LV, Jeol, Japan)
- 3.2.21 Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR, Perkin Elmer, Spectrum One, USA)

3.3 แผนผังดำเนินงานวิจัย

แผนผังการดำเนินงานวิจัยโดยรวมสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 3.1

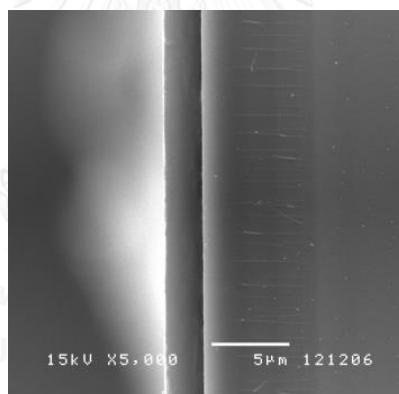


รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัยโดยรวม

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตน

เตรียมสารละลาย PCL ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ด้วยการละลายเม็ดพลาสติก PCL ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม (Chloroform) แล้วปั่นกวน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นขึ้นรูปฟิล์ม PCL บนกระจกปิดสไลด์ ขนาด 1.5 เซนติเมตร ด้วยการเทสารละลาย PCL เคลือบลงบนผิวหน้าของกระจกปิดสไลด์ที่วางอยู่ในจานเพาะเชื้อ แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นอบฟิล์ม PCL ที่ได้ในระบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดตัวทำละลายที่ตกค้าง จากการเตรียมฟิล์ม PCL ด้วยการเทสารละลายลงบนกระจกปิดสไลด์จะได้ฟิล์ม PCL ที่มีความหนาประมาณ 2.98 ± 0.08 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.2 หมู่ฟังก์ชันของพื้นผิวฟิล์ม PCL จะถูกวิเคราะห์ด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR, Perkin Elmer, USA) และแสดงผลในหัวข้อ 4.2



รูปที่ 3.2 ภาพตัดขวางของฟิล์ม PCL ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

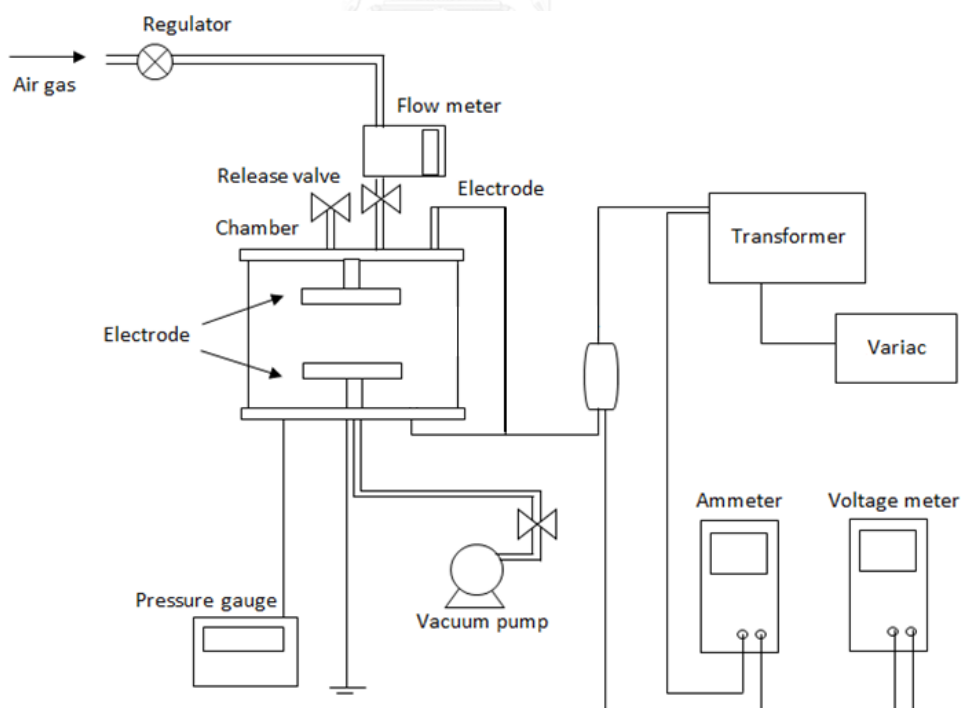
3.4.2 การตัดแปรรูปฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตนด้วยพลาสมาอากาศ

ฟิล์ม PCL จะถูกตัดแปรรูปด้วยพลาสมาอากาศที่กำเนิดจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ซึ่งประกอบด้วย Chamber ที่ทำจากแก้ว ภายในบรรจุแผ่นอิเล็กโทรดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น วางขนานกัน ระยะห่าง 1 เซนติเมตร โดยแผ่นอิเล็กโทรดด้านบนเชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดไฟฟ้า ส่วนล่างของ Chamber เชื่อมต่อกับปั๊มสุญญากาศและสายดินดังแสดงในรูปที่ 3.3 การตัดแปรรูปฟิล์ม PCL ด้วยระบบพลาสมาเริ่มจากวางฟิล์ม PCL ลงบนแผ่นอิเล็กโทรดด้านล่างดังรูปที่ 3.4 แล้วปิดฝา หลังจากนั้นลดความดันของระบบให้เข้าสู่ความดันพื้นฐาน (Base pressure) ที่ 0.1 มิลลิบาร์ เพื่อกำจัดอากาศหรือแก๊ส

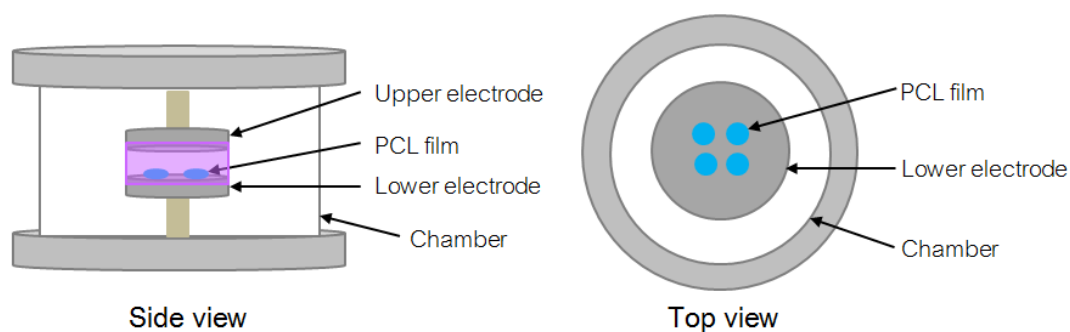
ปนเปื้อนภายใน Chamber แล้วเติมแก๊สอากาศ (แก๊สอากาศ 99.9%) เข้าสู่ระบบด้วยอัตราการไหล 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที (Standard cubic centimeters per minute, sccm) และจ่ายกระแสไฟฟ้าให้แก่ระบบพร้อมกับจับเวลาที่ใช้ในการตัดแปร (15 วินาที, 30 วินาที, 1 นาที, 2 นาที, และ 4 นาที) เพื่อให้แก๊สอากาศในระบบเกิดการแตกตัวเป็นไอออน

3.4.2.1 การวิเคราะห์อนุภาคที่ถูกกระตุ้นด้วย Optical emission spectrometry (OES)

เมื่อจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์สูงให้แก่แก๊สอากาศจะทำให้อิเล็กตรอนของอนุภาคแก๊สที่ถูกกระตุ้นเกิดการเคลื่อนที่จากสถานะพื้นฐาน (Ground state) ไปสู่สถานะกระตุ้น (Excited state) ซึ่งไม่เสถียร อิเล็กตรอนจึงเกิดการปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เพื่อกลับสู่สถานะพื้นฐานที่มีความเสถียร โดยแสงที่ถูกปลดปล่อยสามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Optical emission spectrometry (OES, Ocean optics USB4000) ซึ่งจำแนกแสงตามความยาวคลื่น ทำให้ทราบถึงชนิดและความหนาแน่นของพลาสมา โดยแก๊สแต่ละชนิดจะเกิดการปลดปล่อยแสงที่แตกต่างกัน สำหรับสภาวะการศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ ความดันพื้นฐาน 0.1 มิลลิบาร์ ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรด 1 เซนติเมตร ระยะเวลาการตัดแปร 2 นาที และอัตราการไหล 5, 10, 15 และ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที



รูปที่ 3.3 แผนผังชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิรตซ์ [13]

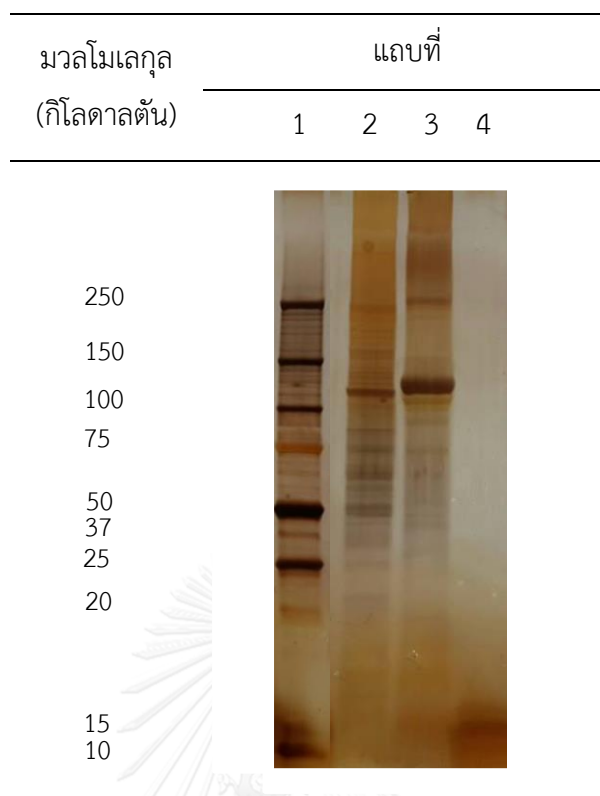


รูปที่ 3.4 การวางฟิล์ม PCL ลงใน Chamber

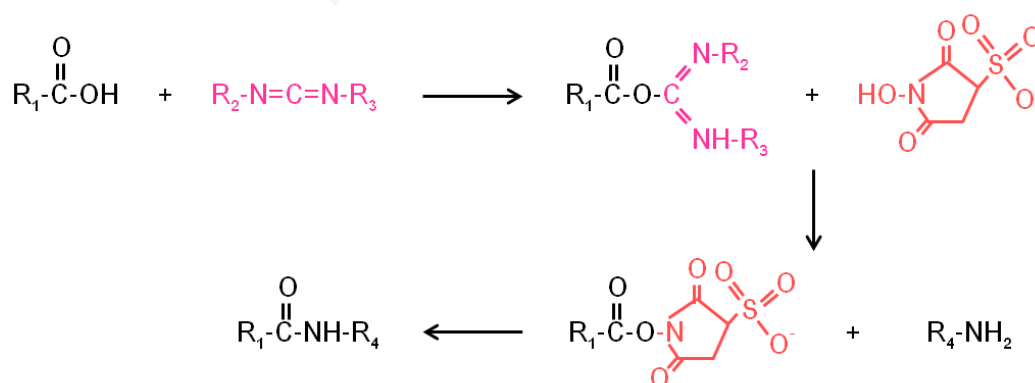
3.4.3 การคอนจูเกตโปรตีนบนฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตน

เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ใช้เป็นสารละลายโปรตีนสำหรับคอนจูเกตบนพื้นผิวฟิล์ม PCL มีมวลโมเลกุลประมาณ 125,000, 125,000 และ 15,000 ดาลตัน ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) คือ ดังแสดงในรูปที่ 3.5

การเตรียมสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก เพื่อใช้ในการคอนจูเกตทำได้โดยผสมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 0.25, 1.25 หรือ 2.5% โดยน้ำหนัก ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร กับสารละลาย EDC 0.5 มิลลิกรัม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย NHS 0.7 มิลลิกรัม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วปั่นกวนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศออกจาก Chamber บรรจุลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 24 หลุม แล้วเติมสารละลายโปรตีนที่เตรียมไว้ทันที โดยเติมสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL ซึ่งเกิดจากการตัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมาอากาศคอนจูเกตกับหมู่ฟังก์ชันในสายโซ่ของโปรตีน โดยใช้ EDC เป็นสารเชื่อมขวาง ดังรูปที่ 3.6 หลังจากนั้นดูดสารละลายโปรตีนออก แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ 3 ครั้ง เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ถูกคอนจูเกตออกจากพื้นผิว และตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วันก่อนนำไปวิเคราะห์



รูปที่ 3.5 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารละลายเจลาตินชนิดเอ (แถบที่ 2) เจลาตินชนิดบี (แถบที่ 3) และคอลลาเจนไฮโดรเซส (แถบที่ 4) ด้วย SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แถบที่ 1)



รูปที่ 3.6 การเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน และคาร์บอกซิลิกของโปรตีนด้วยคาร์โบไดอิมൈต์ [40, 41]

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยพลาสมา อิทธิพลของระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมา ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน

ที่ใช้ในการคอนจุกต์ต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) ซึ่งสามารถสรุปตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 3.1

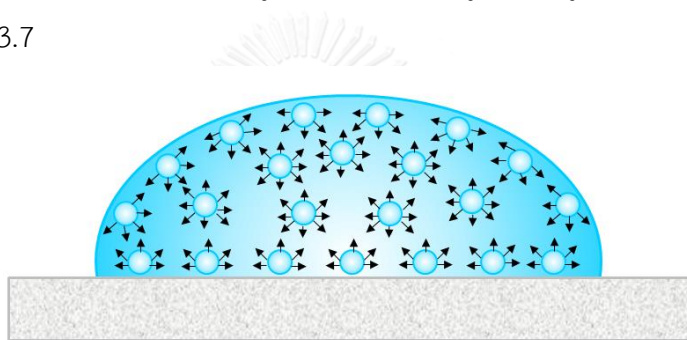
ตารางที่ 3.1 สรุปตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมีและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

ตัวแปรต้น	ตัวแปรควบคุม	ตัวอย่าง
-	-	PCL
ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ 2 นาที	-	P2min
ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ 2 นาที และทำปฏิกิริยากับไอสาร Trifluoromethyl benzaldehyde (TFBA)	-	P2minTFBA
ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ (15 วินาที ถึง 4 นาที)	คอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก	P15secGA2% P30secGA2% P1minGA2% P1minGA2% P1minGA2%
ชนิดของสารละลายโปรตีน (เจลาตินชนิดเอ (GA), เจลาตินชนิดบี (GB) และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส (CH)) และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการคอนจุกต์ (0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก)	ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ 1 นาที	P1minGA0.2%
		P1minGA1%
		P1minGA2%
	ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ 1 นาที	P1minGB0.2%
		P1minGB1%
		P1minGB2%
	ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ 1 นาที	P1minCH0.2%
		P1minCH1%
		P1minCH2%

3.4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี

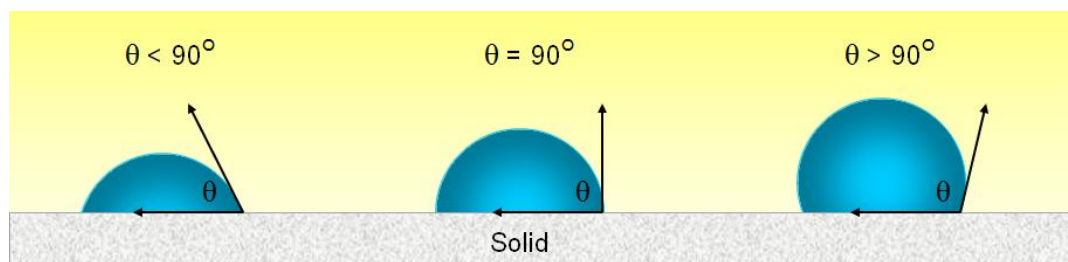
3.4.4.1 การวิเคราะห์ความชอบน้ำของพื้นผิว (Wettability) ด้วยการวัดมุมสัมผัส (Contact angle) [55-57]

การวัดค่ามุมสัมผัสเพื่อศึกษาความชอบน้ำของพื้นผิวเป็นการวิเคราะห์คุณลักษณะของพื้นผิว จากรูปทรงของหยดน้ำบนพื้นผิวของแข็ง กล่าวคือ เมื่อหยดของเหลวลงบนพื้นผิวของแข็ง ของเหลวจะมีแรงระหว่างโมเลกุลที่เรียกว่าแรงตึงผิว (Surface tension) ที่จำกัดพื้นที่ผิวของของเหลวให้น้อยที่สุด ทำให้ของเหลวมีรูปร่างเป็นทรงกลม โดยโมเลกุลของเหลวที่อยู่ภายในจะมีโมเลกุลข้างเคียงในทุกทิศทาง ทำให้มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเท่ากันในทุกทิศทาง แต่โมเลกุลที่อยู่บริเวณผิวหน้าจะไม่มีโมเลกุลข้างเคียงในทุกทิศทาง โมเลกุลที่อยู่บริเวณผิวหน้าจึงถูกดึงเข้าสู่ภายใน ส่งผลให้ของเหลวเกิดการหดตัวดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แรงตึงผิวของของเหลวบนพื้นผิวของแข็ง [57]

การวัดค่ามุมสัมผัสจากรูปทรงของหยดน้ำบนพื้นผิวของแข็ง สามารถทำได้โดยการวัดค่ามุมระหว่างเส้นสัมผัสระหว่างพื้นผิวของแข็งและของเหลว (Solid-liquid interface) และเส้นสัมผัสระหว่างของเหลวและไอ (Liquid-vapor interface) ดังรูปที่ 3.8 พื้นผิวของแข็งที่ทำให้ของเหลวมีการขยายพื้นที่มากจะมีมุมสัมผัสน้อย (ค่ามุมสัมผัสน้อยกว่า 90 องศา) แสดงว่าพื้นผิวของแข็งมีความชอบน้ำ แต่พื้นผิวของแข็งที่ทำให้ของเหลวมีรูปร่างเป็นทรงกลม หรือมีบริเวณของเหลวสัมผัสกับพื้นผิวของแข็งน้อย (ค่ามุมสัมผัสมากกว่า 90 องศา) แสดงว่าพื้นผิวมีความไม่ชอบน้ำ โดยพื้นผิวของแข็งที่มีความชอบน้ำมากจะมีค่ามุมสัมผัสเป็น 0 องศา ขณะที่พื้นผิวที่ไม่มีความชอบน้ำจะมีค่ามุมสัมผัสมากกว่า 150 องศา



รูปที่ 3.8 รูปแบบมุมสัมผัสต่าง ๆ ของของเหลวบนพื้นผิวของแข็ง [57]

ความชอบน้ำของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยโปรตีน สามารถวิเคราะห์ได้จาก การวัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำของน้ำปราศจากประจุกับพื้นผิวฟิล์มภายหลังการหยดเป็นเวลา 30 วินาที (Sessile drop contact method) [58]

3.4.4.2 การศึกษาองค์ประกอบเคมีบนพื้นผิวด้วย X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) [59-65]

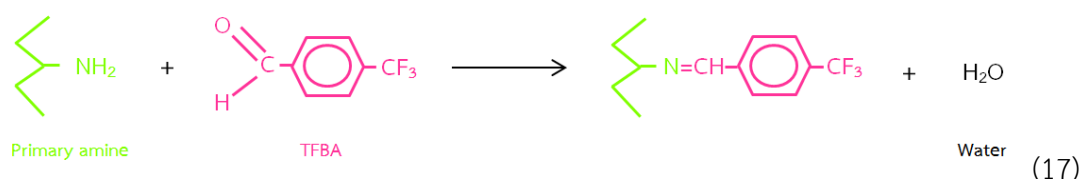
XPS เป็นเครื่องมือวิเคราะห์เคมีพื้นผิวของแข็งที่มีความไวสูง สามารถวัดตัวอย่างได้ลึกถึง 10 นาโนเมตร โดยอาศัยหลักการการเกิดโฟโตอิเล็กตรอน (Photoelectron) คือ การให้แสงในช่วงรังสีเอ็กซ์บนพื้นผิวของวัสดุ อิเล็กตรอนบนพื้นผิวที่ได้รับพลังงานแสงมากกว่าพลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างอะตอมจะเกิดการหลุดออก และเคลื่อนที่ด้วยพลังงานจลน์จากพลังงานที่เหลือของแสงที่ได้รับ ซึ่งพลังงานของอิเล็กตรอนในอะตอมแต่ละชนิดจะมีค่าแตกต่างกันทำให้สามารถบ่งบอกองค์ประกอบของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้

งานวิจัยนี้ใช้ XPS รุ่น AXIS Ultra DLD (UK) ที่มี Al-K α เป็นแหล่งกำเนิดรังสีเอ็กซ์ ความดันพื้นฐานในระบบ 6.67×10^{-9} มิลลิบาร์ ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์ กำลัง 150 วัตต์ และตรวจวัดอิเล็กตรอนที่มุม 45 องศา ในการศึกษาเคมีพื้นผิวของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยโปรตีน

3.4.4.3 การศึกษาเอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) บนพื้นผิวด้วย X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

เทคนิค Derivatization [59-65] เป็นเทคนิคการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางอ้อม ด้วยการใส่สารเคมีที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับหมู่ฟังก์ชัน แล้วตรวจสอบโมเลกุลที่เกิดขึ้นภายหลังการทำปฏิกิริยา ซึ่งโมเลกุลที่ตรวจวัดสามารถคำนวณกลับไปเป็นปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ งานวิจัยนี้ใช้สาร TFBA ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับหมู่เอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) โดย

ฟิล์ม PCL ที่ผ่านตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ความดันพื้นฐาน 0.1 มิลลิบาร์ อัตราการไหล 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ระยะเวลาในการตัดแปร 1 นาที จะทำปฏิกิริยากับไอของสาร TFBA ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะปิด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออรีน (Fluorine) ของผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค XPS ดังสมการที่ (17) โดยปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิสามารถคำนวณได้จากสมการที่ (18) [65]

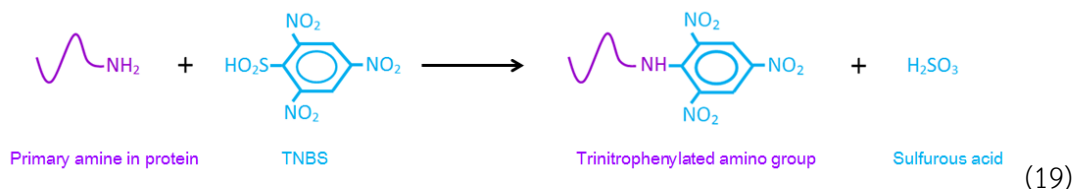


$$[\text{NH}_2] = \frac{\frac{[\text{F}]}{3}}{\left(\frac{[\text{C}]}{8} - \frac{[\text{F}]}{3}\right)} \times 100\% \quad (18)$$

เมื่อ [F] คือ ปริมาณฟลูออรีนที่วิเคราะห์ได้ [C] คือ ปริมาณคาร์บอนที่วิเคราะห์ได้และ [NH₂] คือ ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ

3.4.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงจากเทคนิค TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid)

เทคนิค TNBS เป็นเทคนิคการหาปริมาณหมู่เอมีนของโปรตีน โดยสาร TNBS จะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับหมู่เอมีน เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์สีเหลือง ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ดังสมการที่ 19 [66, 67]

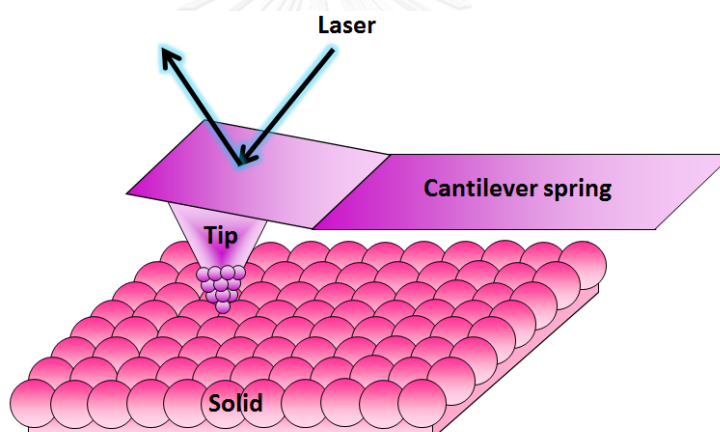


งานวิจัยนี้ทำการศึกษาปริมาณหมู่เอมีนที่เกิดขึ้นภายหลังการตัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยโปรตีนชนิดต่าง ๆ โดยการใส่ฟิล์ม PCL ลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 24 หลุม จากนั้นเติมน้ำปราศจากประจุ สารละลาย NaHCO₃ 0.4% โดยน้ำหนัก และสารละลาย TNBS 0.5% โดยน้ำหนัก อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้หมู่เอมีนทำ-

ปฏิกิริยากับ TNBS เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ หลังจากนั้นเติมกรด HCl 6 นอร์มอล (N) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อย่อยโปรตีนทั้งหมดที่เกาะอยู่บนฟิล์ม PCL ซึ่งปริมาณหมู่เอมีนจะถูกวิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน β -alanine ที่ทราบความเข้มข้น

3.4.4.4 การวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิว (Topology) ด้วย Atomic force microscopy (AFM) [68]

AFM เป็นเทคนิควิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของฟิล์มบางในระดับนาโน โดยใช้หลักการส่งผ่านแสงเลเซอร์ลงปลายแหลม (Tip) บนคานยื่น (Cantilever) ที่สามารถเคลื่อนที่ขึ้นลงได้ตามลักษณะของพื้นผิววัสดุ ด้วยแรงปฏิกิริยาที่กระทำในแนวตั้งฉากระหว่างอะตอมบนพื้นผิววัสดุและอะตอมบนปลายแหลมของคานยื่นดังรูปที่ 3.9 แล้วตรวจวัดออกมาในรูปแบบของพลังงาน และแปลงเป็นภาพสามมิติ



รูปที่ 3.9 หลักการทำงานของเครื่อง AFM [68]

งานวิจัยนี้ใช้เครื่อง AFM (MFP-3D-BIO, Asylum Research, USA ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ในการศึกษาลักษณะพื้นผิวของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัด-แปรรด้วยโปรตีน

3.4.5 การวิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ

3.4.5.1 การเตรียมเซลล์ L929 (L929 Mouse fibroblast) เพื่อใช้ในการทดสอบ

เตรียมเซลล์ L929 ที่จะใช้ในการทดลอง โดยนำสารละลายเซลล์ที่ถูกรักษาและเลี้ยงมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบ

ต่อมาที่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้งให้เหลือเพียง ตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และใช้ปิเปตดูด-ปล่อยสารละลาย (Flush) ให้เซลล์กระจายตัว แล้วเทสารละลายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีองค์ประกอบของซีรัม FBS 10%, streptomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% และเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตมีปริมาณ 90% ของพื้นที่ภาชนะ ให้แบ่งเซลล์ (Subculture) ด้วยการ Trypsinization โดยใช้สารละลาย Trypsin-EDTA.4Na และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยง-เซลล์และแบ่งสารละลายเซลล์ที่ได้เติมลงภาชนะเพาะเลี้ยงใหม่ แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์จนได้ปริมาณที่เพียงพอสำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อไป

3.4.5.2 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะ (Adhesion) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตนด้วยการวัดปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ (DNA assay)

นำฟิล์ม PCL ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 24 หลุม แล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยการอบแก๊สเอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสุญญากาศเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นวางวงแหวนสแตนเลสกลวงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.2 เซนติเมตร ทับด้านบนของแผ่นฟิล์ม เพื่อป้องกันฟิล์ม PCL หลุดออกจากกระจกรองรับ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลุม หลุมละ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์จำนวน 20,000 เซลล์ (ความหนาแน่นประมาณ 15,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% โดยงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยโปรตีนชนิดต่าง ๆ เทียบกับฟิล์ม PCL และจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture plate, TCP)

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ตามระยะเวลาที่กำหนด (6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง) นำวงแหวนสแตนเลสและอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม แล้วย้ายฟิล์มไปยังจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่ และล้างด้วย PBS เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้เกาะบนผิวฟิล์มออก จากนั้นนำฟิล์มที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และนำมาละลายที่อุณหภูมิห้องจนครบ 3 รอบ แล้วเติมสารละลาย SDS และบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ทั้งหมดแตก จากนั้นทำการดูด-ปล่อยสารละลายให้สารละลายเข้ากันมากที่สุด แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบน (Supernatant) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมนลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสี่ตำแหน่งขนาด 96 หลุม แล้วเติมสารละลาย Hoechst 33258 0.1 มิลลิลิตร ในที่มีดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 355/460 นาโนเมตร [69] ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ด้วยการวัดปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์เป็นการวัดสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่เกิดจากการย้อมด้วย Hoechst 33258 เทียบกับกราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 ที่ทราบจำนวน โดยงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ L929 บนแผ่นฟิล์ม หลังจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนแผ่นฟิล์ม หลังจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งร้อยละการยึดเกาะของเซลล์สามารถคำนวณจากสมการ (20) อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในช่วงยกกำลัง (Log phase) ของกราฟการเจริญเติบโตของเซลล์ (Multiplication rate, μ) สามารถคำนวณจากสมการ (21) และระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (Population doubling time, PDT) สามารถคำนวณจากสมการ (22)

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง}} \times 100 \quad (20)$$

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \quad (21)$$

$$\text{PDT} = (1/\mu) \quad (22)$$

เมื่อ N_1 คือ จำนวนเซลล์ที่ช่วงเวลา t_1 และ N_2 คือ จำนวนเซลล์ที่ช่วงเวลา t_2

3.4.5.3 การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานเซลล์ L929 (Cell morphology) และพื้นที่การแผ่ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำวงแหวนสแตนเลสและอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม แล้วย้ายฟิล์มไปยังจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่ และล้างด้วย PBS เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้เกาะบนผิวฟิล์มออก จากนั้นเติมสารละลายสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยระมัดระวังไม่ให้สัมผัสกับแสง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อตรึงเซลล์ให้คงรูป หลังจากนั้นล้างฟิล์มด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วทำการดึงน้ำออก (Dehydration) ด้วยการเจือจางในสารละลายเอทานอลเป็นลำดับ (Serial dilution) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 70, 95 และ 100% โดยปริมาตร แล้วทำแห้งด้วยเครื่อง Critical

point dryer (Tousimis Samdri 780, USA) ก่อนเคลือบด้วยทอง และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-5410LV, Jeol, Japan) เพื่อศึกษาโครงสร้างสัณฐานของเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์ม จากนั้นวิเคราะห์พื้นที่การแผ่ของเซลล์ด้วยโปรแกรม Image J และรายงานเป็นพื้นที่ของเซลล์ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเซลล์จำนวน 40 เซลล์ต่อตัวอย่าง

3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาข้อมูล 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของข้อมูลด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) แบบ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P -value $<$ 0.05)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 คุณลักษณะของพลาสมาอากาศ

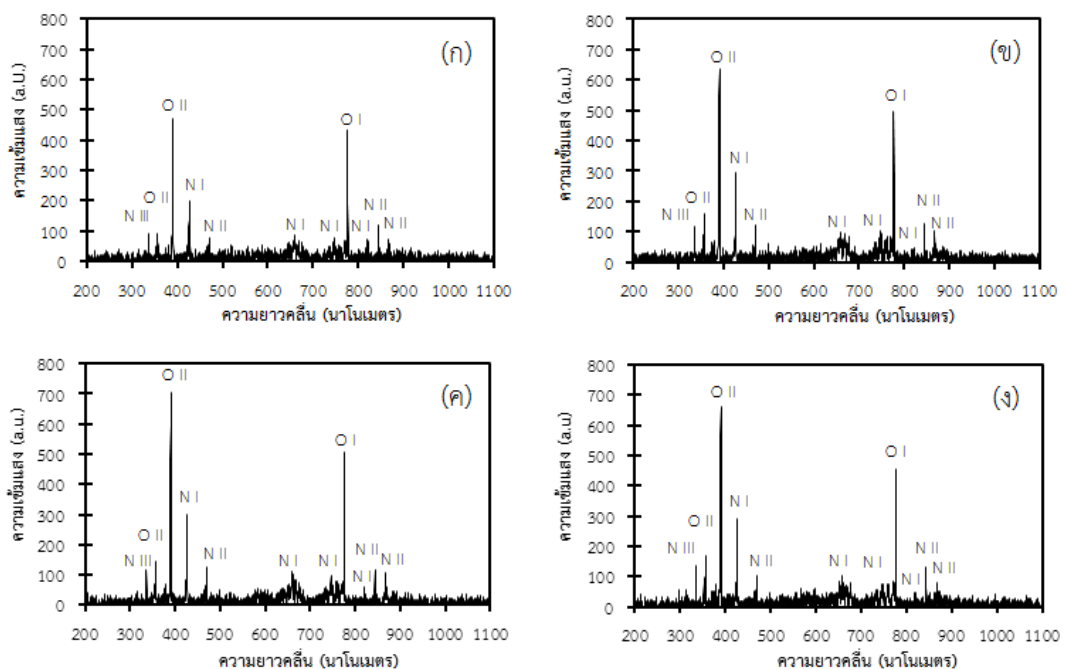
อนุภาคที่ถูกกระตุ้นของพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่อัตราการไหลของแก๊สอากาศต่าง ๆ (5, 10, 15 และ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที) ถูกวิเคราะห์ด้วย Optical emission spectrometry (OES) เนื่องจาก OES เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดค่าการปลดปล่อยแสง (Light) หรือการแผ่รังสี (Electromagnetic radiation) ของการเปลี่ยนระดับพลังงานของอนุภาคที่ถูกกระตุ้น ซึ่งอนุภาคที่ถูกกระตุ้นของธาตุแต่ละชนิดจะเกิดการปลดปล่อยแสงที่มีความจำเพาะเจาะจง จึงสามารถวิเคราะห์อนุภาคที่เกิดขึ้นได้ จากการทดลองเมื่อวิเคราะห์ความยาวคลื่นแสงกับชนิดของอนุภาคด้วยฐานข้อมูลสเปกตรัมของอะตอม [70] พบว่าชนิดของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นในพลาสมาอากาศประกอบด้วย ไนโตรเจน I ไนโตรเจน II ไนโตรเจน III ออกซิเจน I และออกซิเจน II โดยสเปกตรัมการปลดปล่อยแสงของออกซิเจน II มีความเข้มแสงมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.1

รูปที่ 4.1 แสดงอิทธิพลของอัตราการไหลของแก๊สอากาศที่มีต่อความเข้มแสงของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นในชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ จากผลการศึกษา พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สอากาศจาก 5 ถึง 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ความเข้มแสงของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นมีค่าเพิ่มขึ้น กล่าวคือ การเติมแก๊สเข้าสู่ระบบ (Chamber) ด้วยอัตราการไหลสูงขึ้นจะทำให้โมเลกุลของอากาศภายในระบบที่มีโอกาสได้รับพลังงานเพิ่มขึ้น จึงมีค่าความเข้มแสงเพิ่มขึ้น โดยความเข้มแสงของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นแสดงถึงความหนาแน่นของอนุภาคที่ถูกกระตุ้น ดังนั้น การเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สอากาศจาก 5 ถึง 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ส่งผลให้ความหนาแน่นของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น แต่ที่อัตราการไหล 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที พบว่าอนุภาคที่ถูกกระตุ้นมีความเข้มแสงลดลง ทั้งนี้ เนื่องจากภายในระบบถูกเติมด้วยโมเลกุลของอากาศที่มากเกินไป พลังงานที่อนุภาคได้รับจึงมีค่าลดลง ส่งผลให้ความเข้มแสงของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นลดลง หรือความหนาแน่นของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นลดลง

จากการศึกษาด้วย OES พบว่าพลาสมาอากาศสามารถผลิตอนุภาคที่ถูกกระตุ้นของธาตุออกซิเจนและไนโตรเจนได้ โดยที่อัตราการไหล 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที จะพบความหนาแน่นของอนุภาคที่ถูกกระตุ้นสูงที่สุด ดังนั้น พลาสมาอากาศที่ผลิตด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ อัตราการไหล 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที จึงถูกใช้ในการสร้างหมู่ฟุ้งกึ่งชั้นที่มีธาตุออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL ต่อไป

ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของความยาวคลื่น และชนิดของอนุภาคของพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ [70]

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ชนิดของอนุภาค
336.11	N III
356.67	O II
390.75	O II
427.07	N I
470.34	N II
660.71	N I
746.26	N I
776.91	O I
821.00	N I
844.06	N II
867.54	N II

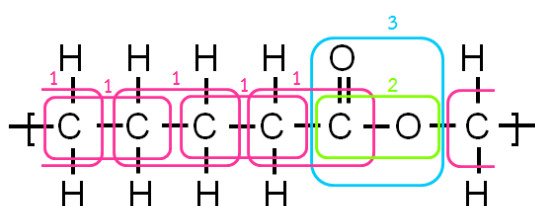


รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการปลดปล่อยแสงของพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่อัตราการไหล (ก) 5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที, (ข) 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที, (ค) 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาทีและ (ง) 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที จากการวิเคราะห์ด้วย OES

4.2 สมบัติทางเคมีของฟิล์มพอลิคาร์โพรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL)

4.2.1 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL

PCL เป็นพอลิเอสเทอร์ที่มีหน่วยซ้ำที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม และออกซิเจน 2 อะตอม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่ออะตอมคาร์บอนและออกซิเจนได้ 75% และ 25% ตามลำดับ ภายในโครงสร้างโมเลกุลของ PCL ประกอบด้วยพันธะ C-C, C-O และ O=C-O จำนวน 5, 1 และ 1 พันธะตามลำดับ หรือคิดเป็นปริมาณพันธะ C-C 71.42% พันธะ C-O 14.29% และพันธะ O=C-O 14.29% ดังแสดงในรูปที่ 4.2

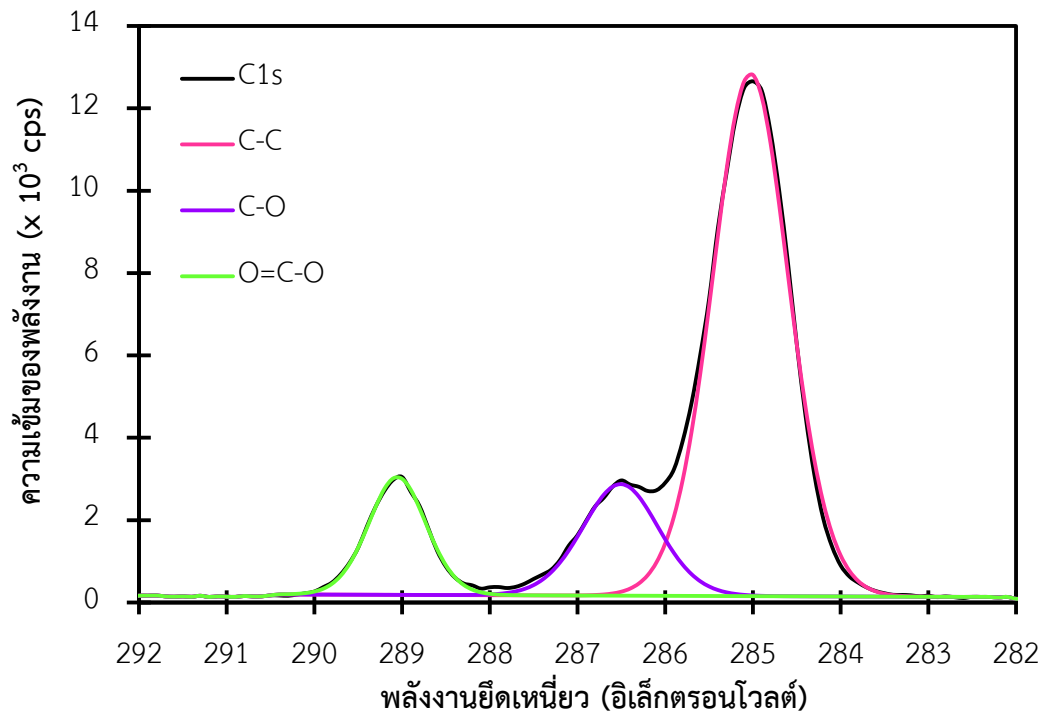


รูปที่ 4.2 การจำแนกพันธะในโครงสร้าง PCL

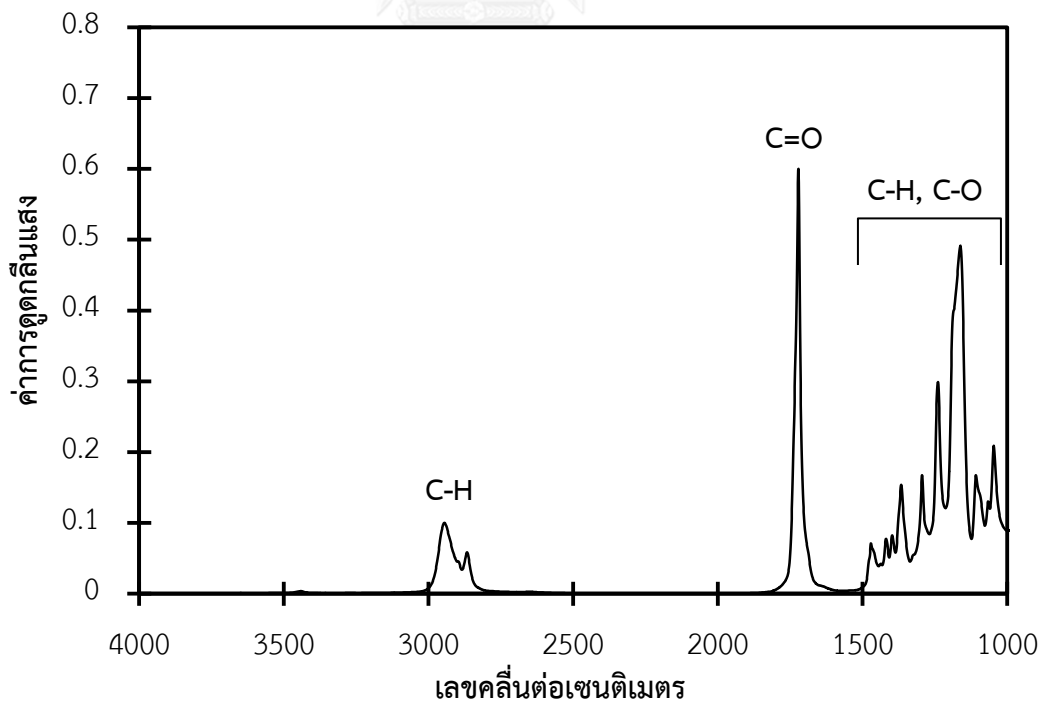
ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL ที่คำนวณได้ทางทฤษฎี และผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง XPS และการจำแนกพันธะคาร์บอน (สเปกตรัม C1s) ของฟิล์ม PCL ด้วยการ Deconvolution (รูปที่ 4.3) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ทางทฤษฎี และผลงานวิจัยที่ผ่านมา [5, 9, 10, 54]

ตารางที่ 4.2 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) เปรียบเทียบกับค่าทางทฤษฎี

ที่มา	ปริมาณอะตอม (%)			ปริมาณพันธะ (%)		
	C	O	N	C-C	C-O	O=C-O
ทฤษฎี	75.00	25.00	-	71.42	14.29	14.29
ผลการวิเคราะห์	75.03	24.97	-	72.29	15.45	12.26



รูปที่ 4.3 สเปกตรัม C1s ของฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution



รูปที่ 4.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR

การวิเคราะห์ฟิล์ม PCL ด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) แสดงในรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.3 พบว่าฟิล์ม PCL มีการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งเลขคลื่นต่าง ๆ คือ ตำแหน่ง

เลขคลื่น 2900-3000 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะ C-H stretching ของหมู่ฟังก์ชันอัลเคน (Alkane), 1723 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะ C=O stretching ของหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ (Ester), 1300-1400 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะ C-H bending ของหมู่ฟังก์ชันอัลเคน และ 1000-1300 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะ C-O stretching ของหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาในปี 2007 ของ Cristescu, R. และคณะ [47] ที่พบการดูดกลืนของฟิล์ม PCL ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 3000-2850 ต่อเซนติเมตร และ 1250-1450 ต่อเซนติเมตร ของพันธะ $-(CH_2)_4-$, 1750 ต่อเซนติเมตร ของพันธะ C=O และ 1150-1250 ต่อเซนติเมตร ของพันธะ C-O

ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์ของตำแหน่งเลขคลื่นที่มีการดูดกลืนแสง และชนิดของพันธะของฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR

เลขคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	พันธะ
2953	C-H stretching
2872	
1723	C=O stretching
1474	C-H bending
1422	
1400	
1369	
1295	C-O stretching
1245	
1166	
1111	
1049	

4.3 สมบัติทางเคมีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ

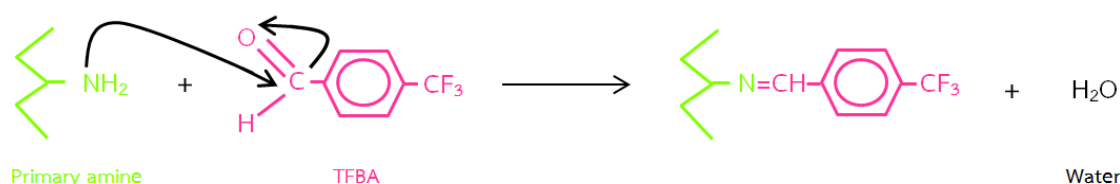
การศึกษาสมบัติทางเคมีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศถูกพิจารณาเป็น 2 ประเด็น คือ การศึกษาปริมาณอะตอมและพันธะโดยรวมของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และการศึกษาปริมาณพันธะเอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ

สำหรับการศึกษาปริมาณอะตอมและพันธะโดยรวมของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 2 นาที (P2min) ด้วย XPS พบว่าปริมาณอะตอมของคาร์บอนลดลงจาก 75.03% เป็น 59.30% ปริมาณอะตอมของออกซิเจนเพิ่มขึ้นจาก 24.97% เป็น 38.89% และยังมีพบอะตอมของไนโตรเจนที่เกิดขึ้นใหม่คิดเป็น 1.81% จากการศึกษาปริมาณอะตอมแสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่ถูกกระตุ้นในพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ เหนี่ยวนำให้เกิดพลาสมาพริ้งกซ์ที่มีออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL โดยอนุภาคที่ถูกกระตุ้นที่มีพลังงาน เช่น อีออน อิเล็กตรอน อะตอมที่ถูกกระตุ้น โมเลกุลที่ถูกกระตุ้น และโฟตอน ฯลฯ จะโจมตีพื้นผิววัสดุทำให้เกิดการสร้างอนุมูล (Radicals) บนพื้นผิว โดยอนุมูลที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวนี้อันตรกิริยากับอนุภาคที่ถูกกระตุ้นของออกซิเจนหรือไนโตรเจนแล้วเกิดเป็นพริ้งกซ์ที่มีออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิว [11] และจากการศึกษาปริมาณพันธะ พบว่ากลุ่มพันธะของฟิล์ม PCL ภายหลังจากการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศประกอบด้วยพันธะ C-C, C-N และ C-O, O=C-N และ O=C-O ที่ค่าพลังงานยึดเหนี่ยว 284.6-285.0, 285.5-287.0, 287.4-288.4 และ 288.5-289.6 อิเล็กตรอนโวลต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ เนื่องจากค่าพลังงานยึดเหนี่ยวของพันธะ C-N และ C-O มีค่าใกล้เคียงกันมาก และยากต่อการจำแนกพันธะ ดังนั้น ในช่วงพลังงานยึดเหนี่ยว 285.5-287.0 อิเล็กตรอนโวลต์ จึงพิจารณาเป็นกลุ่มของพันธะ C-N และ C-O โดยภายหลังจากการดัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศ พันธะ C-C และ O=C-O จะลดลง ขณะที่พันธะ C-N, C-O เพิ่มขึ้น และพบพันธะใหม่ O=C-N เกิดขึ้น (3.82%) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 เนื่องจากในระหว่างการดัดแปรพื้นผิวฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศ พันธะเดิม (C-C, C-O, O=C-O) ที่มีอยู่ในโครงสร้าง PCL จะถูกทำลายและมีการสร้างใหม่พร้อม ๆ กัน [7] โดยการลดลงของปริมาณพันธะ C-C และ O=C-O ชี้ให้เห็นว่าอัตราการสร้างพันธะใหม่ของ C-C และ O=C-O น้อยกว่าอัตราการถูกทำลาย และการเพิ่มขึ้นของพันธะ C-N, C-O เป็นผลจาก 2 ปัจจัย คือ 1) อัตราการสร้างพันธะใหม่ของ C-O สูงกว่าอัตราการถูกทำลาย ซึ่งเห็นได้จากสัดส่วนอะตอมออกซิเจนต่อคาร์บอน (O/C) บนพื้นผิวที่เพิ่มขึ้น จาก 0.33 เป็น 0.66 และ 2) อาจมีการสร้างพันธะใหม่ของ C-N บนพื้นผิว นอกจากนี้ พลาสมาอากาศยังก่อให้เกิดการสร้างพันธะ O=C-N บนพื้นผิวฟิล์ม PCL ด้วย

ตารางที่ 4.4 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL ก่อนและหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 2 นาที และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ แล้วทำปฏิกิริยากับไอของสาร TFBA (Trifluoromethylbenzaldehyde) จากการวิเคราะห์ด้วย XPS

ตัวอย่าง		PCL	P2min	P2minTFBA
ปริมาณอะตอม (%)	C	75.03	59.30	58.29
	O	24.97	38.89	37.04
	N	0	1.81	2.03
	F	0	0	2.64
สัดส่วนอะตอม	O/C	0.33	0.66	-
	N/C	0	0.03	-
ปริมาณพันธะ (%)	C-C	72.29	69.42	-
	C-N, C-O	15.45	15.97	-
	O=C-N	-	3.82	-
	O=C-O	12.26	10.79	-

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณพันธะเอมีนปฐมภูมิ (Primary amine, $-NH_2$) บนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของพันธะเอมีนปฐมภูมิ ซึ่งใช้ในการทำปฏิกิริยากอนจูเกตกับหมู่คาร์บอกซิลบนสายโซ่ของโพรตีน ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารคาร์โบไดอิมิด (1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) โดยการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ ด้วย XPS ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิจะถูกตรวจวัดในรูปปริมาณอะตอมของฟลูออรีน จาก Derivatization technique ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีนปฐมภูมิบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL กับไอของสาร TFBA ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 การทำปฏิกิริยา Derivatization ของเอมีนปฐมภูมิบนพื้นผิว PCL ด้วย TFBA

เมื่อพิจารณาการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีนปฐมภูมิกับสาร TFBA ในรูปที่ 4.5 พบว่า อะตอมของไนโตรเจน 1 อะตอม ของหมู่เอมีนปฐมภูมิ 1 หมู่ จะทำปฏิกิริยากับสาร TFBA 1 โมเลกุล เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณอะตอมของฟลูออรีน 3 อะตอม แสดงให้เห็นว่าปริมาณอะตอมของ ฟลูออรีนที่ตรวจวัดเป็น 3 เท่าของปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ ดังนั้น ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิจะเท่ากับ $[F]/3$ นอกจากนี้ สารผลิตภัณฑ์ยังประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 8 อะตอม ปริมาณอะตอมของ คาร์บอนที่เพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีนปฐมภูมิกับสาร TFBA จะเท่ากับ $8([F]/3)$ และ ปริมาณอะตอมของคาร์บอนบนพื้นฟิล์ม PCL เท่ากับผลต่างระหว่างปริมาณอะตอมของคาร์บอน ทั้งหมด ($[C]$) กับปริมาณอะตอมของคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีนปฐมภูมิ กับสาร TFBA ($8([F]/3)$) ดังนั้น ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิต่อปริมาณอะตอมของคาร์บอนบนพื้นผิว สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ (23)

$$\%[\text{NH}_2] = \frac{\frac{[F]}{3}}{\left([C] - \frac{8}{3}[F]\right)} \times 100\% \quad (23)$$

เมื่อ $[C]$ และ $[F]$ คือ ปริมาณอะตอมของคาร์บอน และฟลูออรีนที่ตรวจพบบนพื้นผิว PCL ที่ผ่านการ ดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และทำปฏิกิริยากับสาร TFBA ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะตอมของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็น เวลา 2 นาที และทำปฏิกิริยากับสาร TFBA (P2minTFBA) แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าฟิล์ม PCL ภายหลังจากการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และทำปฏิกิริยากับสาร TFBA มีปริมาณอะตอมของ คาร์บอน เท่ากับ 58.29% และอะตอมของฟลูออรีน 2.64% ซึ่งสามารถคิดเป็นร้อยละของปริมาณหมู่ เอมีนปฐมภูมิ เท่ากับ 1.72% แสดงว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศมีหมู่เอมีน- ปฐมภูมิตั้งบนพื้นผิว หรือพลาสมาอากาศสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างหมู่เอมีนปฐมภูมิตั้งบนพื้นผิว ฟิล์ม PCL

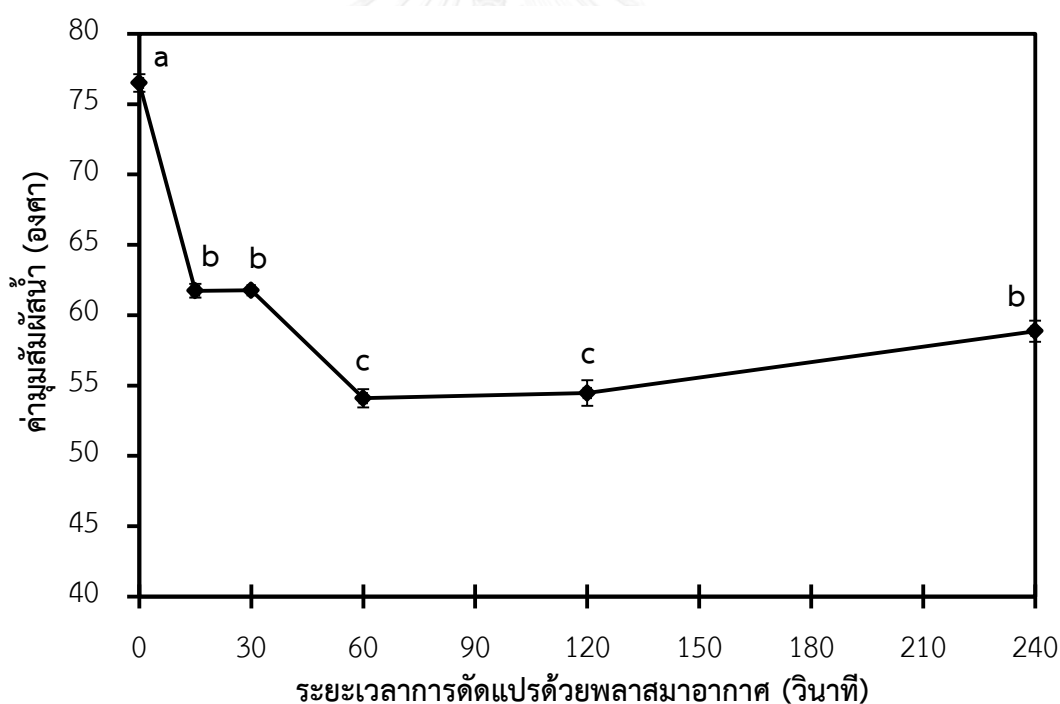
จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของฟิล์ม PCL ภายหลังจากการดัดแปรด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิด พลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สอากาศ พบว่าพลาสมาอากาศ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจน และไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ซึ่งแสดงให้เห็นจากปริมาณอะตอมของออกซิเจน และไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การวิเคราะห์ ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จาก Derivatization technique ยังสนับสนุนว่าบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศมีหมู่เอมีนปฐม-

ภูมิ ซึ่งหมู่เอมีนปฐมภูมินี้จะถูกใช้ในการคอนจูเกตกับหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (-COOH) บนสายโซ่ของโปรตีนผ่านการเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดไมด์

4.4 อิทธิพลของระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของพื้นผิว PCL ภายหลังจากคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ

จากการศึกษาสมบัติทางเคมีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ พบว่าพลาสมาอากาศสามารถสร้างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว เพื่อใช้คอนจูเกตกับโปรตีนบนพื้นผิวผ่านการเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดไมด์ได้ ในส่วนนี้ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ส่งผลต่อการคอนจูเกตโปรตีนบนพื้นผิว โดยสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการศึกษา คือ สารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก

4.4.1 ค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิว

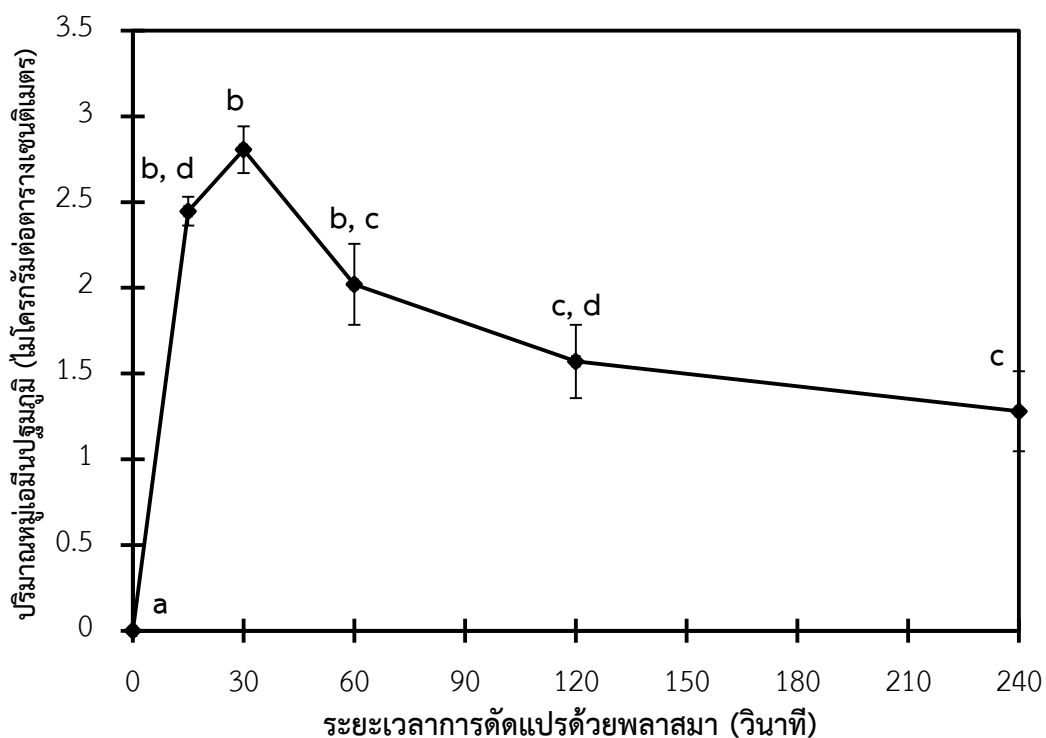


รูปที่ 4.6 ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก (a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

รูปที่ 4.6 แสดงค่ามูมสัมพัทธ์ของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ จากรูปที่ 4.6 จะสังเกตว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศและการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีค่ามูมสัมพัทธ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฟิล์ม PCL โดยฟิล์ม PCL มีค่ามูมสัมพัทธ์ 76.5 องศา ใกล้เคียงกับรายงานในปี 2013 ของ Jacob, T. และคณะ [9] (ฟิล์ม PCL ที่เตรียมจากกระบวนการขึ้นรูปด้วยความร้อนมีมูมสัมพัทธ์ 74.0 องศา) เมื่อฟิล์ม PCL ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลา 15 วินาที, 30 วินาที, 1 นาที, 2 นาที และ 4 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอจะทำให้มีค่ามูมสัมพัทธ์ 61.7, 61.8, 54.1, 54.5 และ 58.9 องศา ตามลำดับ โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 และ 2 นาที มีค่ามูมสัมพัทธ์ต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นผลจากฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ช่วงเวลา 1 และ 2 นาที สามารถสร้างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวฟิล์ม PCL เพื่อใช้ในการคอนจูเกตสารละลายเจลาตินชนิดเอได้มากที่สุด

การลดลงของค่ามูมสัมพัทธ์แสดงถึงความชอบน้ำของพื้นผิวที่เพิ่มขึ้น เป็นผลจากการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL เนื่องจากโมเลกุลของเจลาตินชนิดเอมีความชอบน้ำสูง ซึ่งสามารถเกิดแรงอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำด้วยการดึงดูดโมเลกุลของน้ำให้เคลื่อนที่เข้าล้อมรอบโมเลกุลของเจลาตินชนิดเอ ส่งผลให้แรงดึงผิวของน้ำมีค่าลดลง (น้ำมีการแผ่ตัวบนพื้นผิวเพิ่มขึ้น) ค่ามูมสัมพัทธ์จึงมีค่าลดลง [11, 55-57]

4.4.2 ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิ (Primary amine) บนพื้นผิว



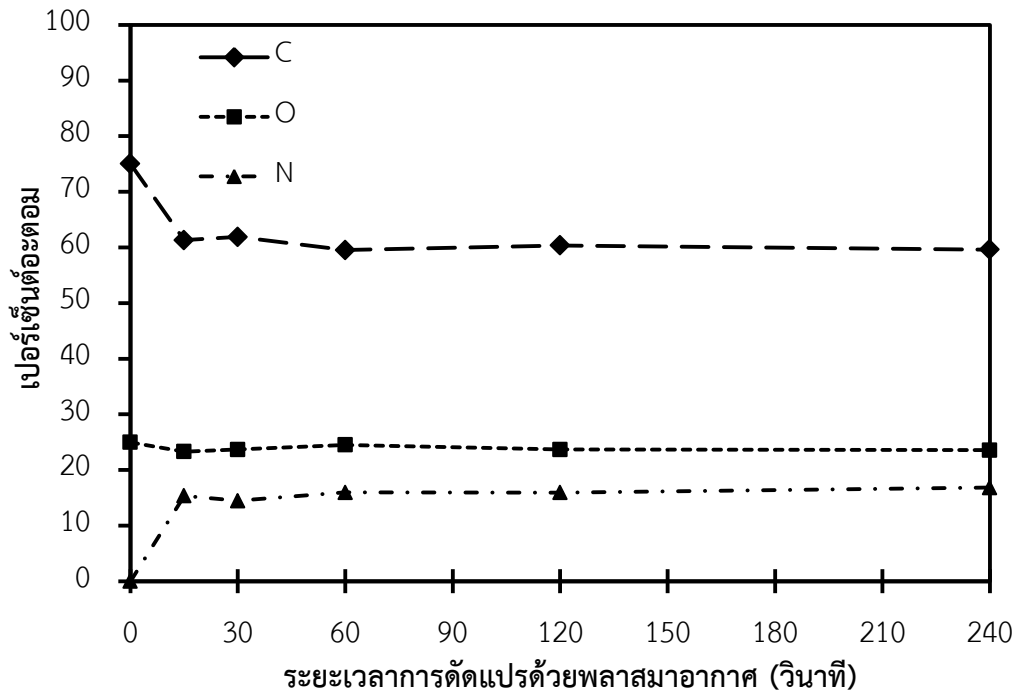
รูปที่ 4.7 ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิบนพื้นผิวฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TNBS ทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก (a, b, c และ d แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิของฟิล์ม PCL ทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ภายหลังจากตัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตกับสารละลายเจลาตินชนิดเอ พบว่ามีหมู่เอมีนปฐมภูมิเกิดขึ้นบนพื้นผิว โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 15 วินาที, 30 วินาที, 1 นาที, 2 นาที และ 4 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิต่อพื้นที่เป็น 2.5, 2.8, 2.0, 1.6 และ 1.3 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 15 วินาที ถึง 1 นาที มีปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิสูงกว่าฟิล์ม PCL ที่ตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 2 และ 4 นาที ทั้งนี้เทคนิค TNBS เป็นการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนอิสระ (Free amine) หรือเอมีน-

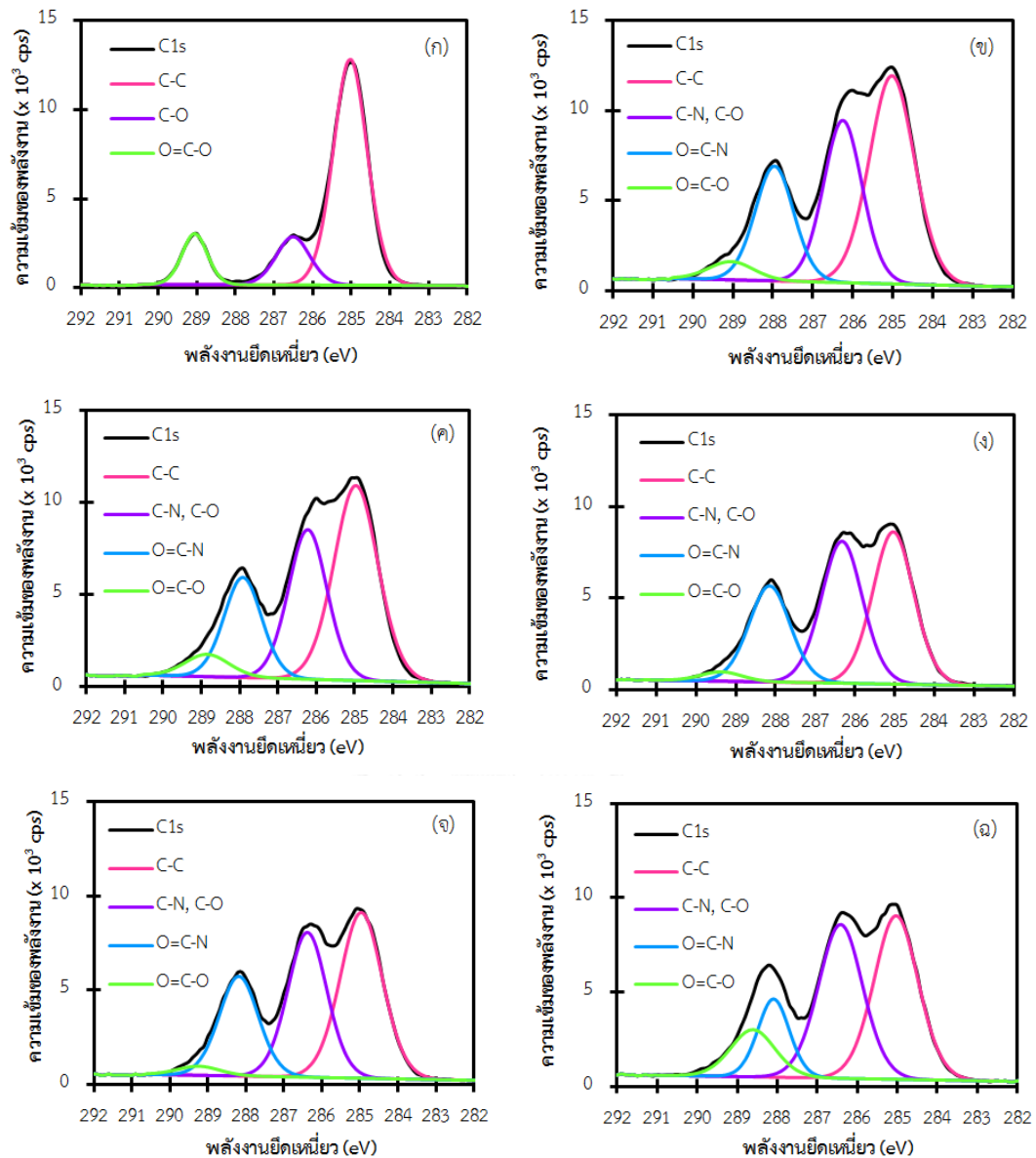
ปฏิกิริยาในวัสดุ โดยการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีนปฏิกิริยาในวัสดุกับสารละลาย 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ได้สารผลิตภัณฑ์ (Trinitrophenylated amino group) ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร [66, 67] ดังนั้น การตรวจพบหมู่เอมีนปฏิกิริยาบนฟิล์ม PCL ซึ่งไม่มีหมู่เอมีนปฏิกิริยาเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง แสดงให้เห็นว่าเจลาตินชนิดเอถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันเอมีนปฏิกิริยาเป็นหมู่ฟังก์ชันที่พบบริเวณปลายสายโซ่ (N-terminal end) ของพอลิเพปไทด์ และพบในพอลิเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asparagine) กลูตามีน (Glutamine) ไลซีน (Lysine) และอาร์จินีน (Arginine) เป็นองค์ประกอบ

4.4.3 ปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว

รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนของพื้นผิวฟิล์ม PCL ทั้งก่อนและหลังการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ ซึ่งพบว่าภายหลังการดัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศและการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ ปริมาณอะตอมของคาร์บอนบนพื้นผิวมีค่าลดลงจาก 75.03% เป็น 59.51-61.87% ปริมาณอะตอมของออกซิเจนบนพื้นผิวมีค่าลดลงเล็กน้อยจาก 24.97% เป็น 23.30-24.52% และพบอะตอมของไนโตรเจนบนพื้นผิว 14.46-16.83% โดยปริมาณอะตอมของธาตุทั้ง 3 ชนิดที่ตรวจพบบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาตั้งแต่ 15 วินาที ถึง 4 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากฟิล์ม PCL ไม่มีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และอะตอมของไนโตรเจนบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 2 นาที (ยังไม่ได้คอนจูเกตด้วยเจลาติน) มีปริมาณน้อยมากเพียง 1.81% (แสดงดังตารางที่ 4.4) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของอะตอมของไนโตรเจนบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตสารละลายเจลาตินชนิดเอเป็นผลมาจากการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวฟิล์ม PCL นั้นเอง



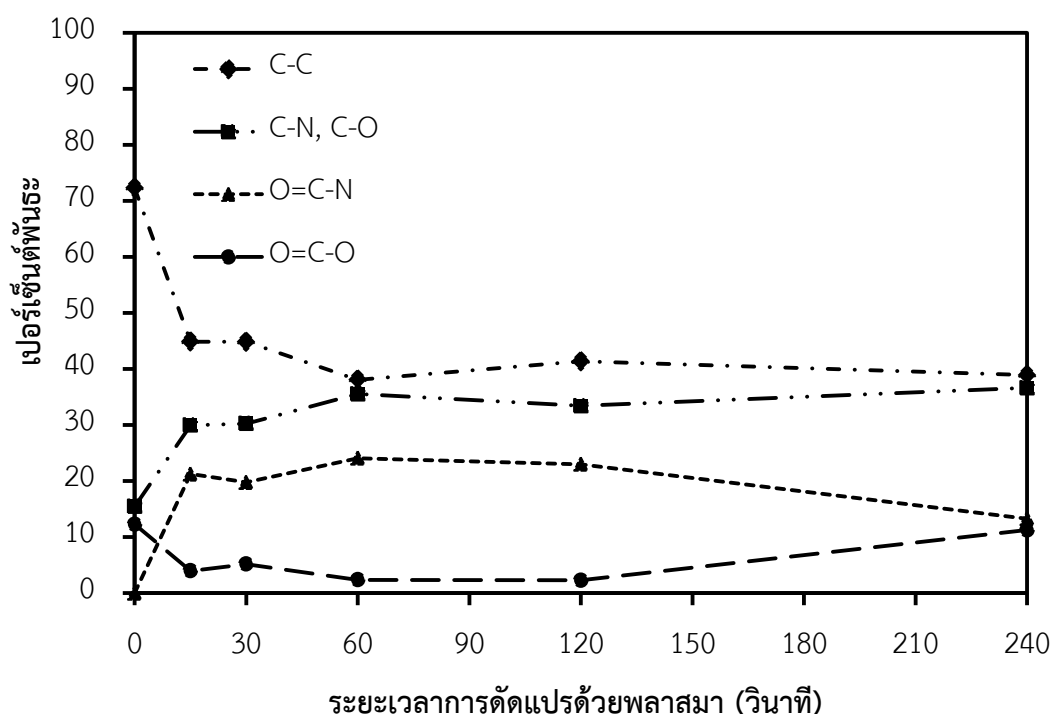
รูปที่ 4.8 เปอร์เซนต์อะตอมคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนของพื้นผิวฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย XPS ทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมา โดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลาย เจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.9 สเปกตรัม C1s ของ (ก) फिल्म PCL และ फिल्म PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา (ข) 15 วินาที (ค) 30 วินาที (ง) 1 นาที (จ) 2 นาที และ (ฉ) 4 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลาย เจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

รูปที่ 4.9 แสดงการจำแนกพันธะคาร์บอน (สเปกตรัม C1s) ที่เป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวของ फिल्म PCL และ फिल्म PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วย

สารละลายเจลาตินชนิดเอ ด้วยวิธี Decovolution โดยฟิล์ม PCL (ก) ประกอบด้วย 3 พันธะ คือ C-C, C-O และ O=C-O ที่ค่าพลังงานยึดเหนี่ยว 284.6-285.0, 285.5-287.0 และ 288.5-289.6 อิเล็กตรอนโวลต์ ตามลำดับ แต่ภายหลังจากการตัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลา 15 วินาที (ข), 30 วินาที (ค), 1 นาที (ง), 2 นาที (จ) และ 4 นาที (ฉ) และการคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอจะพบองค์ประกอบของพันธะบนพื้นผิวที่เปลี่ยนไปโดยพบกลุ่มพันธะเพิ่มขึ้นเป็น 4 กลุ่มพันธะ คือ C-C, C-N และ C-O, O=C-N และ O=C-O ที่ค่าพลังงานยึดเหนี่ยว 284.6-285.0, 285.5-287.0, 287.4-288.4 และ 288.5-289.6 อิเล็กตรอนโวลต์ ตามลำดับ [71]



รูปที่ 4.10 ปริมาณกลุ่มพันธะของพื้นผิวฟิล์ม PCL จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution ทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์กลุ่มพันธะทั้ง 4 ที่พบภายหลังจากการตัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ (รูปที่ 4.10) จะเห็นว่าปริมาณกลุ่มพันธะ C-C และ O=C-O มีค่าลดลงจาก 72.29% และ 12.26% เป็น 38.07-44.85% และ 2.36-11.24% ตามลำดับ ขณะที่ C-N, C-O มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 15.45% เป็น 29.96-36.6% และ

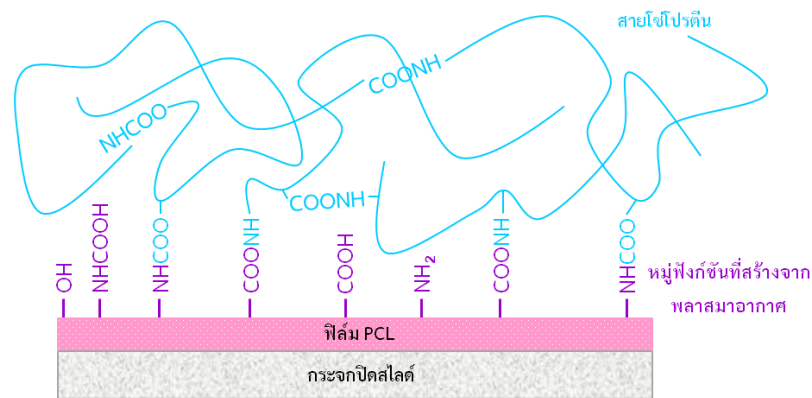
เกิดพันธะใหม่ (O=C-N) 13.28-24.06% โดยที่ปริมาณกลุ่มพันธะต่าง ๆ ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาในช่วงเวลา 15 วินาที ถึง 4 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีค่าใกล้เคียงกัน

การตรวจพบพันธะ O=C-N (Amide) ซึ่งไม่มีในโครงสร้างของ PCL และการลดลงของพันธะ O=C-O (O=C-OH, Carboxyl) ซึ่งถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับพันธะ -NH₂ (Amine) ในรูปพันธะ O=C-N แสดงให้เห็นว่าเจลาตินชนิดเอถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์กลุ่มพันธะในช่วงพลังงานพันธะ 285.5-287.0 อิเล็กตรอนโวลต์ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ 2 พันธะ คือ C-N และ C-O เมื่อพิจารณาสัดส่วนอะตอม O/C และ N/C พบว่าฟิล์ม PCL มีสัดส่วน O/C เท่ากับ 0.33 และสัดส่วน N/C เท่ากับ 0 (ฟิล์ม PCL ไม่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จึงมีสัดส่วน N/C เท่ากับ 0) แต่ภายหลังการตัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ สัดส่วน O/C มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.38-0.41 ขณะที่สัดส่วน N/C มีค่าเป็น 0.23-0.28 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์พันธะในช่วงพลังงานพันธะนี้ส่วนใหญ่เป็นผลจากพันธะ C-N โดยการตรวจพบพันธะนี้ช่วยสนับสนุนว่าเกิดการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวฟิล์ม PCL

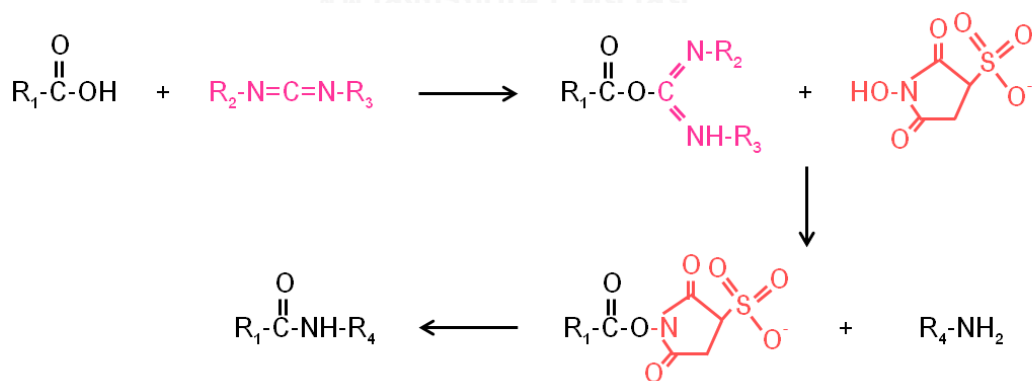
จากการวิเคราะห์ผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณพันธะเอไมด์สูงที่สุด และมีค่ามุมสัมผัสน้ำต่ำที่สุด ซึ่งการพบปริมาณพันธะเอไมด์สูงที่สุดที่ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมา 1 นาที อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณพันธะบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ในระหว่างการตัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ กล่าวคือ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 15 วินาที ถึง 1 นาที อาจสร้างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาที่เพิ่มขึ้น แต่หากใช้ระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมามากกว่า 1 นาที (2, 4 นาที) อาจทำให้เกิดการทำลายหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวได้ เนื่องจากกลไกกระบวนการตัดแปรพื้นผิวจะเกิดในช่วงแรกของการตัดแปรพื้นผิวด้วยพลาสมา และการเพิ่มระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดกีดกันพื้นผิว [8, 72] สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาในปี 2013 Zhe, L. และคณะ [7] ที่ทำการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศต่อปริมาณหมู่ฟังก์ชัน และการยึดเกาะของเรซินบนพื้นผิว โดยเขาพบว่าเส้นใย Poly (p-phenylene-2, 6-benzobisoxazole) (PBO) ที่ถูกตัด-แปรด้วยพลาสมาอากาศมากกว่า 12 วินาที จะมีปริมาณอะตอมและหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวลดลง ส่งผลให้การคอนจูเกตเรซินบนเส้นใย PBO ลดลง ทั้งนี้ การลดลงของหมู่ฟังก์ชันที่ระยะเวลาการตัดแปรที่มากขึ้นเป็นผลจาก 2 ปัจจัย คือ การลดลงหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้ว (Polar functional groups) บน

พื้นผิว หรือความเป็นขั้ว (Polarity) ของพื้นผิวมีค่าต่ำลง และการเกิดการกัดกร่อนบนพื้นผิว (Plasma etching effect) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ

จากการวิเคราะห์ข้างต้นสามารถชี้ให้เห็นว่า พลาสมาอากาศสร้างหมู่ฟังก์ชันเอมีน (Amine) หรือคาร์บอกซิล (Carboxyl) บนพื้นผิวของฟิล์ม PCL และหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ทำปฏิกิริยาควบคู่กันเกิดกับ หมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล หรือเอมีนของสายโซ่เจลาตินชนิดเอ ในกระบวนการเชื่อมขวางด้วยคาร์โบได-ไอไมด์ ดังแบบจำลองในรูปที่ 4.11 และปฏิกิริยาการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิล ด้วยคาร์โบไดไอไมด์ แสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.11 แบบจำลองการควบคู่กันของเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ในกระบวนการเชื่อมขวางด้วยคาร์โบไดไอไมด์



รูปที่ 4.12 การเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิล และเอมีนด้วยสารเชื่อมขวางคาร์โบไดไอไมด์

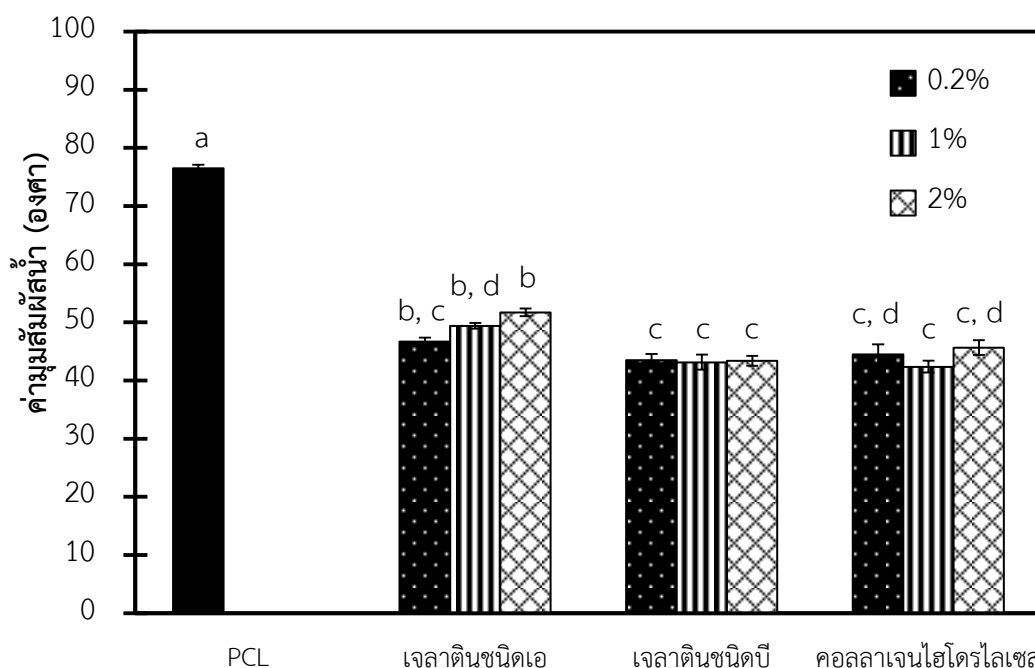
นอกจากพันธะเอไมด์จะแสดงถึงการควบคู่กันของเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวแล้ว พันธะเอไมด์ยังเป็นพันธะหลักในสายโซ่ของเจลาตินชนิดเอด้วย กล่าวคือ กรดอะมิโนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเจลาตินมีการเชื่อมต่อแต่ละโมเลกุลด้วยพันธะเอไมด์ หรือที่เรียกว่า พันธะเพปไทด์ (Peptide bond) (ดังรูปที่ 2.7) แต่จากการวิเคราะห์สัดส่วนอะตอม N/C บนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาที่

ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ และฟิล์มเจลาตินชนิดเอบริสุทธิ์ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอมีสัดส่วน N/C 0.23-0.28 และฟิล์มเจลาตินชนิดเอบริสุทธิ์มีสัดส่วน N/C 0.21 เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิวด้วย XPS มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ความลึกไม่เกิน 10 นาโนเมตร ดังนั้น การที่สัดส่วนอะตอม N/C ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอมีค่าใกล้เคียงกับฟิล์มเจลาตินชนิดเอบริสุทธิ์จึงชี้ให้เห็นว่าพื้นผิวที่วิเคราะห์เป็นพื้นผิวของเจลาตินชนิดเอที่ถูกคอนจูเกตบนฟิล์ม PCL ซึ่งปริมาณพันธะเอไมด์ที่ตรวจพบจะสอดคล้องกับปริมาณของเจลาตินชนิดเอบนพื้นผิวกรณีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณพันธะเอไมด์สูงสุด (24.06%) จึงเลือกระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมา 1 นาที สำหรับการศึกษาต่อไป

4.5 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการคอนจูเกตภายหลังการตัดแปรด้วยพลาสมาต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีบนพื้นผิว

จากการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศต่อการคอนจูเกตสารละลายเจลาตินชนิดเอ พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณพันธะเอไมด์สูงสุด ดังนั้นในหัวข้อนี้จะได้ทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการคอนจูเกตบนฟิล์ม PCL ภายหลังจากตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที โดยสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการศึกษา คือ เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส และความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการศึกษา คือ 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก

4.5.1 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนต่อค่ามัมสัมผัสน้ำ



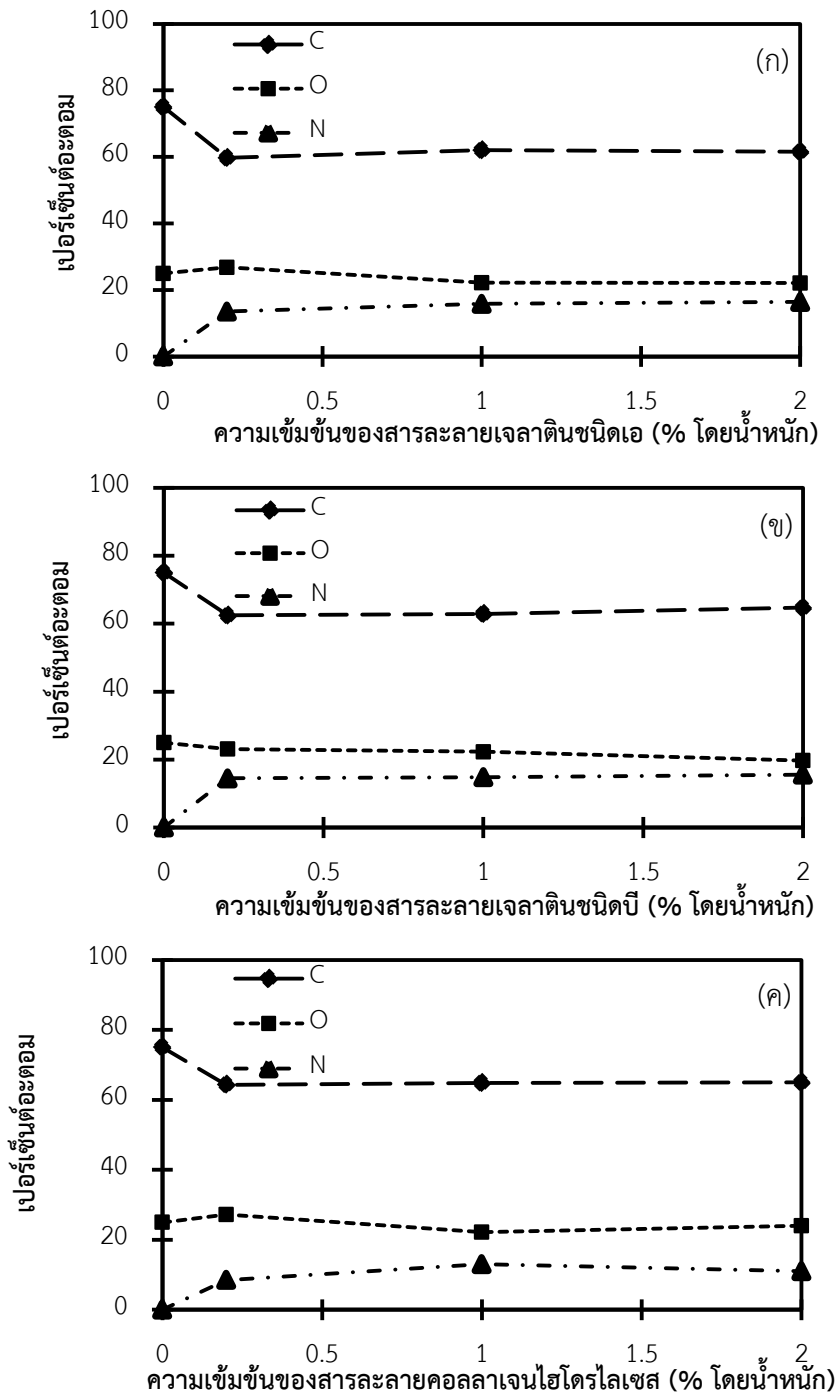
รูปที่ 4.13 ค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก (a, b, c และ d แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

รูปที่ 4.13 แสดงค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากผลการศึกษาพบว่าค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL เท่ากับ 76.5 องศา ในขณะที่ค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก มีค่าลดลงเป็น 46.7-51.7, 43.2-43.5 และ 42.4-45.7 องศา ตามลำดับ โดยค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนทุกชนิดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL (ลดลงประมาณ 40.5%) โดยการลดลงของค่ามัมสัมผัสน้ำ หรือความชอบน้ำที่เพิ่มขึ้นของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยโปรตีน

แต่ละชนิดเป็นผลจากโปรตีนบนพื้นผิวช่วยให้โมเลกุลของน้ำสามารถกระจายตัวบนพื้นผิวดีขึ้น หรือช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุลของน้ำและอากาศ [11, 55-57, 73] อย่างไรก็ตาม ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีแนวโน้มสูงที่สุด เมื่อเทียบกับค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส แต่เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่มีต่อค่ามุมสัมผัสน้ำ พบว่าค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี หรือคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4.5.2 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนต่อปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว

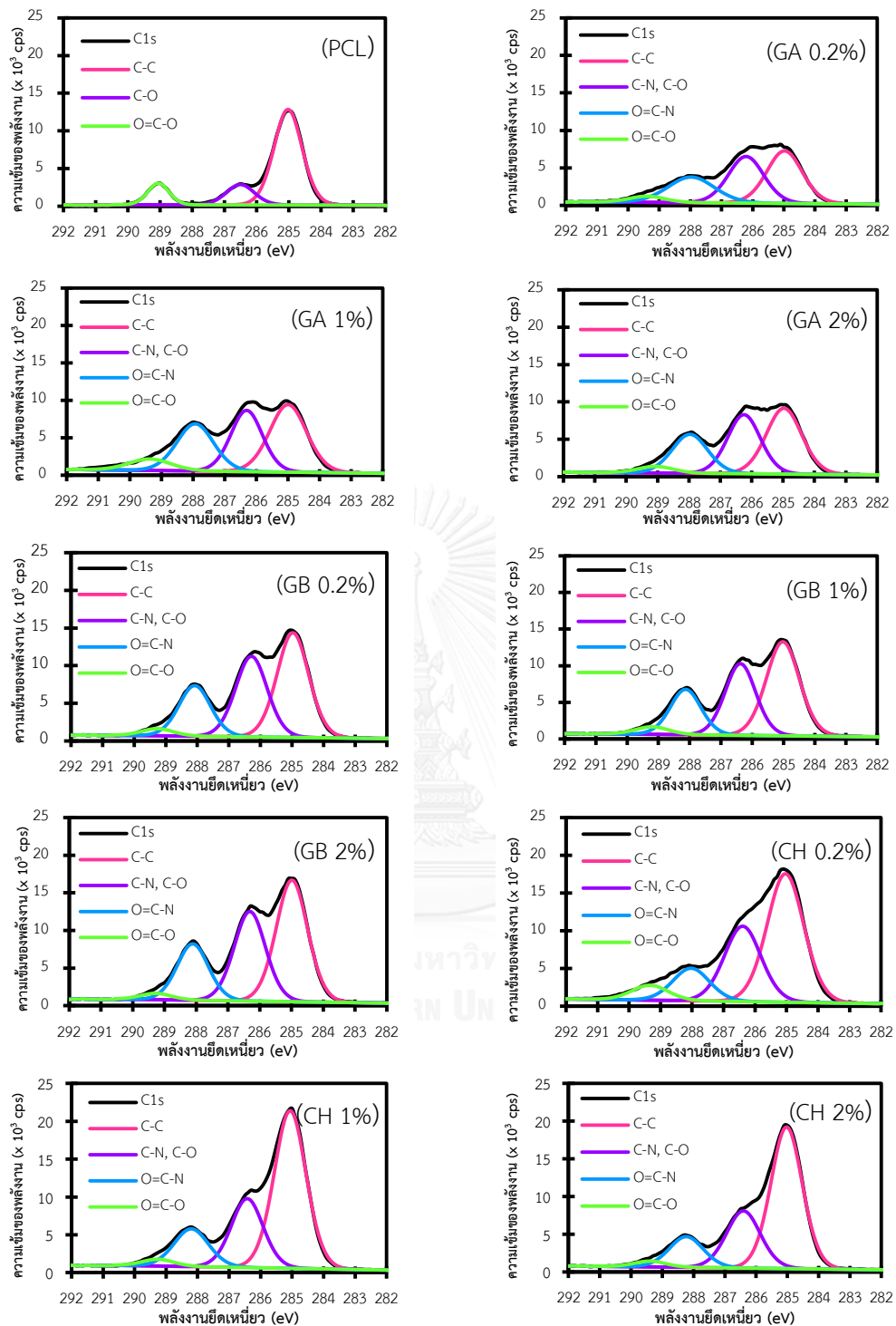
รูปที่ 4.14 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะตอมของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ (ก) เจลาตินชนิดบี (ข) และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส (ค) ที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากรูปแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะตอมของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยโปรตีนทั้งสามมีแนวโน้มเดียวกับฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 15 วินาที ถึง 4 นาที และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ (หัวข้อ 4.4.3) กล่าวคือปริมาณอะตอมของคาร์บอน และออกซิเจนมีค่าลดลง และพบอะตอมของไนโตรเจนเกิดขึ้นใหม่ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะพบว่ามีปริมาณอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนใกล้เคียงกัน โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก คือ 59.69-62.01, 22.07-26.79 และ 13.52-16.39% ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดบีความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก คือ 62.44-64.72, 19.71-23.10 และ 14.46-15.57% ตามลำดับ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจนของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา



รูปที่ 4.14 ปริมาณอะตอมของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลาย (ก) เจลาตินชนิดเอ (ข) เจลาตินชนิดบี และ (ค) คอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS

และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก คือ 64.30-65.01, 22.18-23.99 และ 8.48-13.02% ตามลำดับ เนื่องจาก PCL มีเพียงอะตอมของคาร์บอนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการพบอะตอมของไนโตรเจนบนพื้นผิวแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามชนิดถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวฟิล์ม PCL และการพบอะตอมของธาตุไนโตรเจนบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และการคอนจูเกตด้วยสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเซสต่ำที่สุดชี้ให้เห็นว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมิโปรตีนบนพื้นผิวต่ำที่สุด

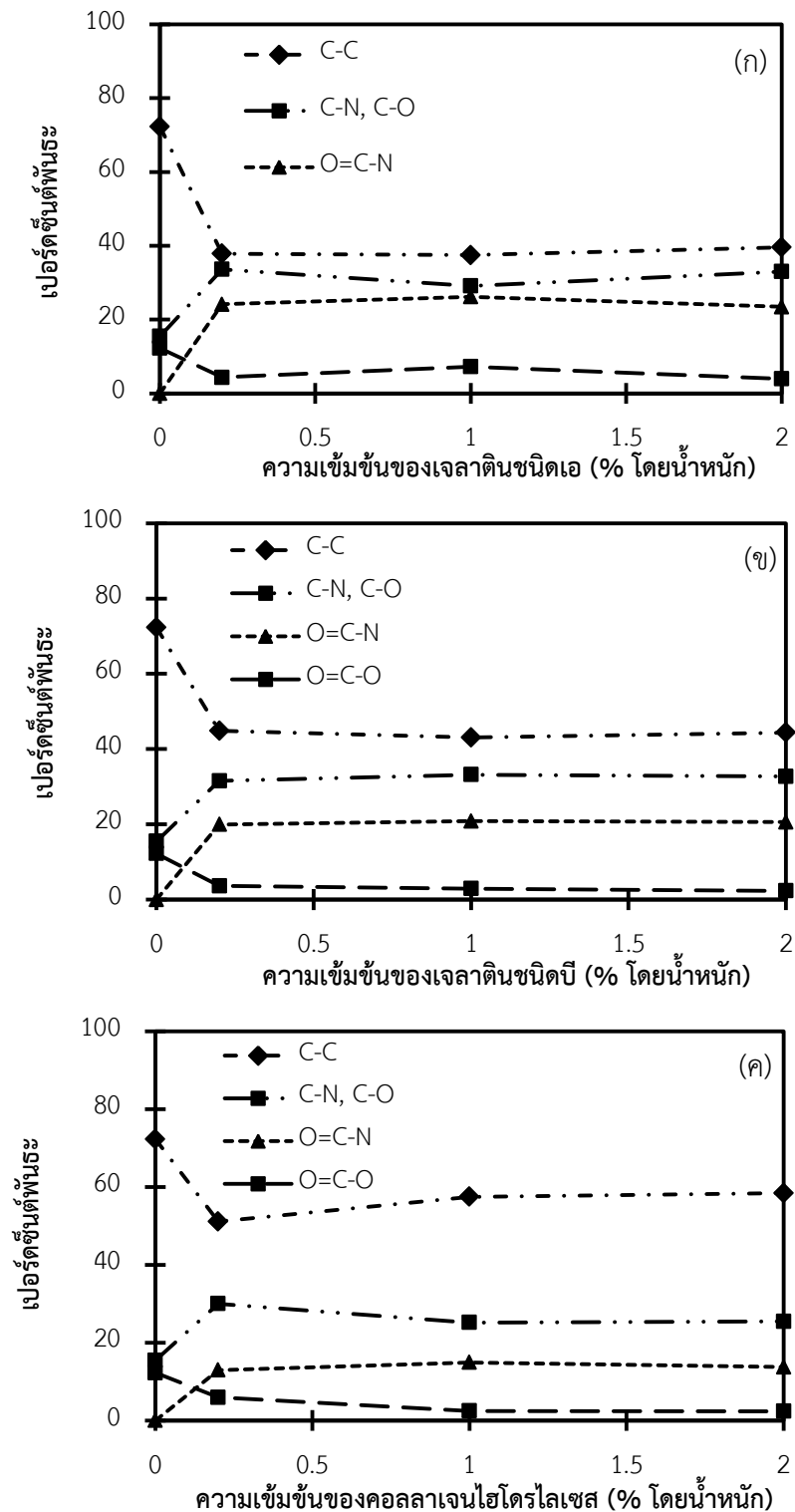
รูปที่ 4.15 แสดงการจำแนกพันธะคาร์บอน (สเปกตรัม C1s) ที่เป็นองค์ประกอบบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก ด้วยวิธี Deconvolution จากรูปแสดงให้เห็นว่า ฟิล์ม PCL ประกอบด้วยพันธะ C-C, C-O และ O=C-O สอดคล้องกับโครงสร้างโมเลกุลของ PCL $[-(\text{CH}_2)_5\text{-COO}-]$ ที่เป็นสารประกอบพอลิเอสเทอร์ และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก พบพันธะใหม่ของ C-N และ O=C-N เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามชนิดถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL เหมือนที่รายงานในหัวข้อ 4.4.3 ในส่วนการเปลี่ยนแปลงพันธะของฟิล์ม PCL ภายหลังจากการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ



รูปที่ 4.15 สเปกตรัม C1s ของฟิล์ม PCL (PCL) และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิรตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดความเข้มข้น 0.2% (GA 0.2%), 1% (GA 1%) และ 2% โดยน้ำหนัก (GA 2%), เจลาตินชนิดปีความเข้มข้น 0.2% (GB 0.2%), 1% (GB 1%), และ 2% โดยน้ำหนัก (GB 2%), คอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 0.2% (CH 0.2%), 1% (CH 1%) และ 2% โดยน้ำหนัก (CH 2%) จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

จากที่กล่าวมาแล้วในตอนท้ายของหัวข้อ 4.4.3 ว่าปริมาณพันธะเอไมด์ที่พบบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินได้จากพันธะในสายโซ่ของเจลาติน ซึ่งพันธะเอไมด์ที่พบในสายโซ่ของโปรตีน นอกจากจะเป็นพันธะเปปไทด์แล้ว ยังอาจเกิดจากการเชื่อมขวางทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโปรตีนด้วย (Intra- and inter-molecular bonding) ดังนั้น ความเป็นไปได้ของการพบพันธะเอไมด์จึงมาจาก 2 แหล่ง คือ การเชื่อมขวางภายในสายโซ่ของโปรตีนด้วยคาร์โบไดเอไมด์ และการเชื่อมขวางระหว่างสายโซ่ของโปรตีนด้วยคาร์โบไดเอไมด์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มพันธะสเปกตรัม C1s ของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอเจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก ซึ่งจำแนกด้วยวิธี Deconvolution แสดงดังรูปที่ 4.16 (รูปที่ 4.15) โดยจะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณพันธะของโปรตีนทั้งสามชนิดมีแนวโน้มเดียวกัน คือ ปริมาณพันธะ C-C และ O=C-O ลดลง ขณะที่พันธะ C-N, C-O เพิ่มขึ้น และพบพันธะ O=C-N เกิดขึ้นใหม่ โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณพันธะเอไมด์สูงที่สุด (23.44-26.17%) รองลงมา คือ การคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดบี (19.98-20.84%) และการคอนจูเกตด้วยสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเซส (12.95-14.91%) ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 ปริมาณกลุ่มพันธะของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิรตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลาย (ก) เจลาตินชนิดเอ (ข) เจลาตินชนิดบี และ (ค) คอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

จากการวิเคราะห์สัดส่วน N/C ของฟิล์มโพรตีนบริสุทธิ์ (เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส) และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายโพรตีน (เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้ทราบว่าพื้นผิวของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาติน (เจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี) ที่ถูกวิเคราะห์ด้วย XPS คือเฉพาะพื้นผิวของเจลาติน (เจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี) ที่ถูกคอนจูเกตบนฟิล์ม PCL กล่าวคือ XPS เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิวตัวอย่างที่ความลึกไม่เกิน 10 นาโนเมตร ดังนั้น การพบสัดส่วนอะตอม N/C ของฟิล์มเจลาตินบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับสัดส่วนอะตอม N/C ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาติน จึงแสดงให้เห็นว่าเจลาตินที่ถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวฟิล์ม PCL มีความหนามากกว่า 10 นาโนเมตร ส่งผลทำให้เครื่อง XPS วิเคราะห์ไม่ถึงพื้นผิวของฟิล์ม PCL ส่วนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีสัดส่วนอะตอม N/C น้อยกว่าสัดส่วนอะตอม N/C ของฟิล์มคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์ จึงแสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของฟิล์ม PCL ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ถูกวิเคราะห์ด้วย XPS เป็นพื้นผิวของทั้งฟิล์ม PCL และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่คอนจูเกต โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่มีความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก มีสัดส่วนอะตอม N/C 0.23-0.27, 0.23-0.24 และ 0.13-0.20 ตามลำดับ และฟิล์มเจลาตินชนิดเอบริสุทธิ์ ฟิล์มเจลาตินชนิดบีบริสุทธิ์ และฟิล์มคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์มีสัดส่วนอะตอม N/C 0.21, 0.22 และ 0.24 ตามลำดับ

สำหรับกรณีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีปริมาณพันธะเอไมด์น้อยกว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี อาจเป็นผลของมวลโมเลกุลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีค่าต่ำกว่ามวลโมเลกุลของเจลาติน (มวลโมเลกุลของเจลาตินประมาณ 125,000 ดาลตัน และมวลโมเลกุลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส 15,000 ดาลตัน) ส่งผลให้ความหนาแน่นของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบนพื้นผิวภายหลังคอนจูเกตน้อยกว่าเจลาติน (ปริมาณพันธะบนพื้นผิวต่ำกว่า) แม้ว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ซึ่งมีความยาวของสายโซ่สั้น สามารถเคลื่อนที่ได้สะดวก และอาจเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL มากกว่าก็ตาม

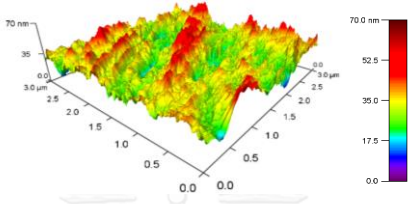
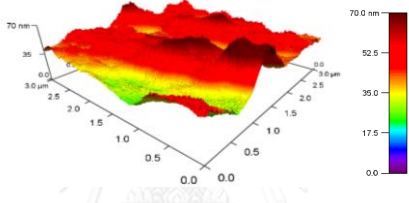
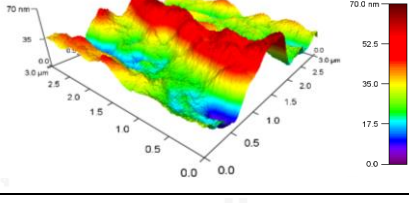
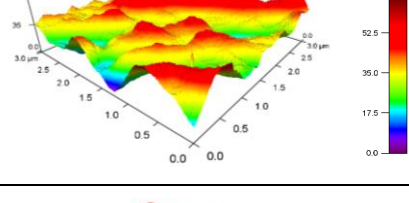
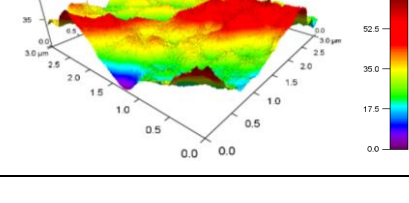
เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโพรตีนต่อความเป็นไปได้ของการคอนจูเกตสารละลายโพรตีนบนพื้นผิวฟิล์ม PCL พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก มีปริมาณพันธะเอไมด์สูงที่สุด โดยมีปริมาณพันธะ 26.17, 20.84 และ 14.91%

ตามลำดับ ทั้งนี้โปรตีนเป็นสาร Amphotric polyelectrolyte หรือ Polyampholyte ซึ่งในโมเลกุลจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นประจุบวก (Cationic group) และส่วนที่เป็นประจุลบ (Anionic groups) ซึ่งส่วนที่เป็นประจุนี้สามารถทำอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interactions) ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (Intra- and intermolecular) ที่อยู่ใกล้เคียงกันได้ [74, 75] สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง หรือมีความหนาแน่นของโมเลกุลมากจะมีโอกาสเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนสูงกว่าสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นต่ำ [74, 76] ดังนั้น สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก จึงมีโอกาสเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลมากกว่าการทำปฏิกิริยาควบคู่กันกับหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว ในทางกลับกัน สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นต่ำ (ความเข้มข้น 0.2% โดยน้ำหนัก) อาจมีความหนาแน่นของโมเลกุลไม่เพียงพอต่อการควบคู่กันกับหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว นอกจากนี้ ปริมาณหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผลิตจากพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที อาจมีปริมาณจำกัดอยู่ค่าหนึ่ง ดังนั้น การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนในขณะที่หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวมีจำกัด จึงไม่ส่งเสริมให้เกิดการควบคู่กันของโปรตีนบนพื้นผิวเพิ่มขึ้น ดังนั้น สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก น่าจะมีความเหมาะสมต่อการควบคู่กันบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที มากที่สุด

4.5.3 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อสัณฐานพื้นผิว

ตารางที่ 4.5 แสดงสัณฐานพื้นผิว และค่า Rms (Root mean square) ของฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการควบคู่กันด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย Atomic force microscopy (AFM) จะเห็นว่าค่า Rms ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และควบคู่กันด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับฟิล์ม PCL ที่ไม่ผ่านการดัดแปรใด ๆ แต่ค่า Rms ของฟิล์มทั้ง 3 กลุ่ม (ฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และการควบคู่กันด้วยสารละลายโปรตีนชนิดต่าง ๆ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และควบคู่กันด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก มีค่า Rms ประมาณ 7.3, 11.6, 11.8, 10.2 และ 11.2 นาโนเมตรตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 สัณฐานพื้นผิว และค่า Rms ของฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย AFM

ตัวอย่าง	สัณฐานพื้นผิว	ค่า Rms (นาโนเมตร)
PCL		7.3 ± 1.0^a
P1min		11.6 ± 1.3^a
P1minGA1%		11.8 ± 2.5^a
P1minGB1%		10.2 ± 2.7^a
P1minCH1%		11.2 ± 2.9^a

(a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

เนื่องจากระบบพลาสมาที่ใช้ในการดัดแปรพื้นผิวฟิล์ม PCL นี้ กำเนิดจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ซึ่งมีพลังงานต่ำ ทำให้ไม่เกิดการทำลายพื้นผิว

ฟิล์ม PCL ในระหว่างการตัดแปรรูป ลักษณะพื้นผิวของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมาจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2012 ของ Prasertsung, I. และคณะ [3] ที่ศึกษาการตัดแปรรูปฟิล์มเจลาตินด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สออกซิเจน ไนโตรเจน และอากาศ โดยพบว่าลักษณะพื้นผิวฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมาของแก๊สทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับฟิล์มเจลาตินที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมา และงานวิจัยในปี 2013 ของ Amornsudthiwat, P. และคณะ [4] พบว่าค่า Rms ของฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สไนโตรเจน ที่ระยะเวลาการตัดแปรรูป 90 วินาที ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมา นอกจากนี้ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีน ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2010 ของ Drevelle, O. และคณะ [77] ที่รายงานว่า การคอนจูเกตโปรตีนบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวอย่างมีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส แสดงให้เห็นว่าการตัดแปรรูปพื้นผิวฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศ และการตัดแปรรูปฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมา รวมทั้งการคอนจูเกตสารละลายโปรตีน โดยใช้คาร์โบไดไฮไมด์ เป็นสารเชื่อมขวาง สามารถปรับปรุงสมบัติทางเคมีของพื้นผิวฟิล์ม PCL ได้โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานพื้นผิวอย่างมีนัยสำคัญ

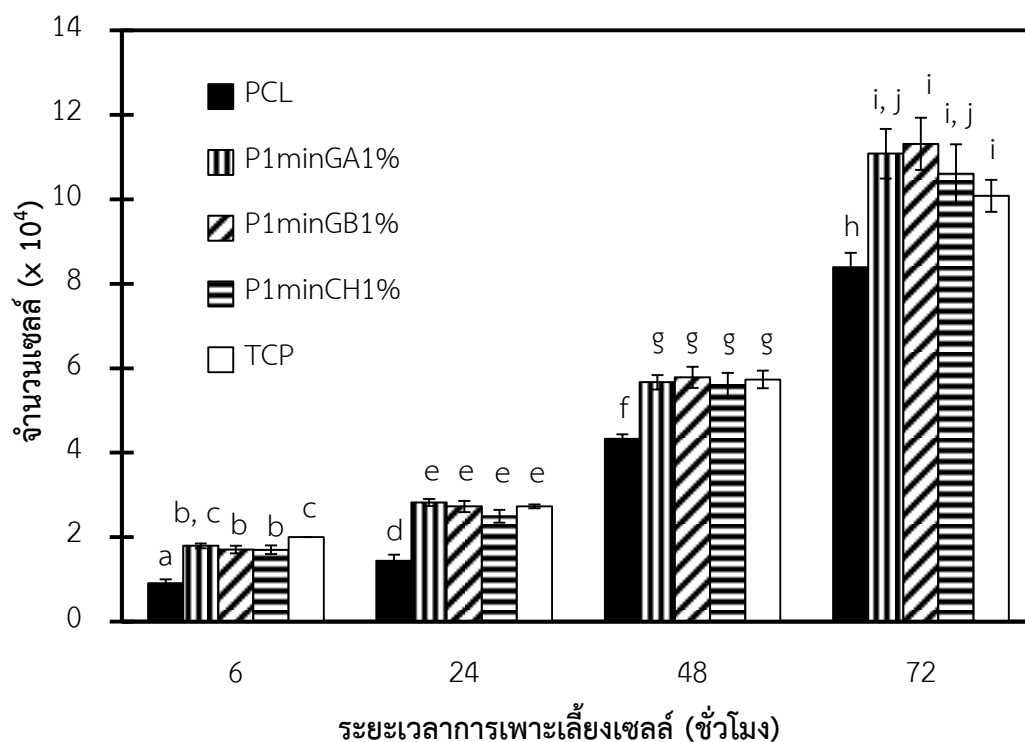
ตารางที่ 4.6 ตัวอย่างฟิล์ม PCL สำหรับการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast)

ตัวอย่าง	ค่ามุมสัมผัสน้ำ (องศา)	ค่าความขรุขระ (Rms, นาโนเมตร)	ปริมาณพันธะ (%)			
			C-C	C-N, C-O	O=C-N	O=C-O
PCL	76.50	7.26±1.03	72.29	15.45	0	12.26
P1minGA1%	49.40	11.83±2.50	37.46	29.13	26.17	7.24
P1minGB1%	43.17	10.21±2.65	43.06	33.18	20.84	2.92
P1minCH1%	42.40	11.17±2.89	57.48	25.15	14.91	2.46

4.6 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการตัดแปรรด้วยพลาสมา และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนทั้ง 3 ชนิด พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก มีค่ามุมสัมผัสน้ำน้อย และมีปริมาณพันธะเอไมด์บนพื้นผิวมากที่สุด (แสดงสรุปดังตารางที่ 4.6) โดยปริมาณพันธะเอไมด์ที่พบบนพื้นผิวจะแสดงถึงปริมาณของโปรตีนที่ถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวฟิล์ม PCL ในหัวข้อนี้จึงได้ทำการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) บนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบกับจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิสไตรีน (TCP, positive control)

4.6.1 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อปริมาณการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู



รูปที่ 4.17 ปริมาณเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจน-ไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิสไตรีน (TCP, Positive control) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% (a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของปริมาณเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง, d และ e แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของปริมาณเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง, f และ g แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของปริมาณเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง, h, i และ j แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของปริมาณเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง)

รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาติน

ชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบน TCP และตารางที่ 4.7 แสดงร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ L929 บนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และการคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง เซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL มีจำนวนต่ำที่สุด (~9,000 เซลล์) ซึ่งคิดเป็นร้อยละการยึดเกาะเพียง 45.546 แต่กรณีของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกรณีฟิล์ม PCL และไม่มีแตกต่างอย่างมีความอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกรณี TCP โดยจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีค่าประมาณ 1.79×10^4 , 1.71×10^4 และ 1.70×10^4 เซลล์ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละการยึดเกาะ 89.71, 85.33 และ 85.09 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบนพื้นผิวฟิล์ม PCL สนับสนุนให้เซลล์ยึดเกาะมากขึ้น

สำหรับที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งแสดงถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนพื้นผิว พบว่าจำนวนของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนทั้งสามชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าใกล้เคียงกับจำนวนของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบน TCP โดยจำนวนของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ไม่มีการตัดแปรยังคงมีค่าต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48-72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนพื้นผิวฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส และ TCP ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบน TCP มีแนวโน้มสูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากพื้นผิวของ TCP ขาดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive) ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ ทั้งนี้ รายงานวิจัยในปี 2011 ของ Jyh-Ping, C. และคณะ [6] พบว่าเส้นใยพอลิแลกไทด์ (Poly L-lactide, PLLA) จากกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต ที่ผ่านการคอนจูเกตด้วยเจลาตินที่มีประจุบวก (Cationized gelatin) มีความสามารถในการเพิ่มความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกอ่อนหัวเข่ากระต่าย (Knee articular cartilage of New Zealand rabbit) และสนับสนุนให้เซลล์กระดูกอ่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกอ่อนด้วย และจากรายงานวิจัยในปี 2013 ของ Shaojun, Y. และคณะ [78] ที่ทำการศึกษาการตัดแปรพื้นผิวฟิล์ม PCL ด้วยการใช้สารละลาย 1, 6-hexanediamine และ isopropanol เพื่อสร้างหมู่

ฟังก์ชันเอมีน และตรึงด้วยสารละลายเจลาตินบนพื้นผิว พบว่าเซลล์เยื่อหลอดเลือดสายสะดือมนุษย์ (Human umbilical vein endothelial cell, HUVECs) ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ไม่ผ่านการตรึงเจลาตินจะมีปริมาณการยึดเกาะและเจริญเติบโตต่ำ แต่เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตรึงด้วยเจลาตินมีปริมาณการยึดเกาะและเจริญเติบโตมากขึ้น นอกจากนี้ ในปี 2010 Pok, S.W. และคณะ [79] ยังรายงานว่า การคอนจุกต์เจลาตินบนพื้นผิว PCL ช่วยสนับสนุนให้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ (Human foreskin fibroblast, HFF-1) มีการกระจายตัวบนพื้นผิวดีขึ้น

ตารางที่ 4.7 ร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of attachment), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Multiplication rate, μ) และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ L929 บนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และ คอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโพลิสไตรีน (TCP)

ตัวอย่าง	ร้อยละการยึดเกาะ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ , ชม. ⁻¹)	ระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT, ชม.)
PCL	45.46 ^a	27.53×10^{-3} ^c	36.53 ^{d,e}
P1minGA1%	89.71 ^b	27.83×10^{-3} ^c	36.05 ^d
P1minGB1%	85.33 ^b	27.88×10^{-3} ^c	35.93 ^d
P1minCH1%	85.09 ^b	26.48×10^{-3} ^c	37.88 ^{d,e}
TCP	100 ^b	23.50×10^{-3} ^c	42.57 ^e

(a และ b แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง, c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, d และ e แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ)

4.6.2 อิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนต่อโครงสร้างพื้นฐานและพื้นที่การแผ่ของเซลล์ผิวหนังหนู

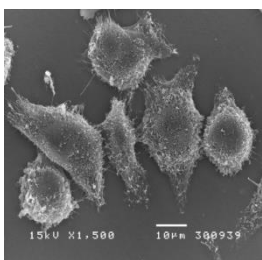
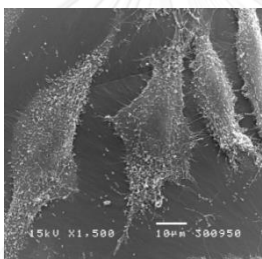
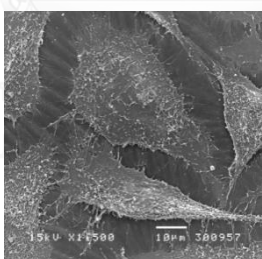
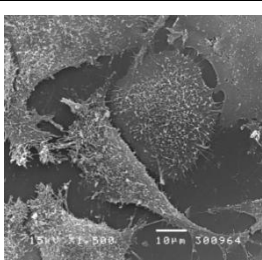
โครงสร้างพื้นฐาน และพื้นที่การแผ่ของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิวฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.8 จากตารางแสดงให้เห็นว่าเซลล์ L929 ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวฟิล์ม PCL มีลักษณะกลม ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ของเซลล์ 332.9 ± 83.6 ตารางไมโครเมตร สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2010 ของ Olivier, D. และคณะ [77] ที่พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนเมา (Murine calvarial preosteoblasts, MC3T3-E1) ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ไม่ผ่านการคอนจูเกตด้วยโปรตีนมีลักษณะกลมและปริมาณการยึดเกาะน้อย ขณะที่เซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีลักษณะยาวและแผ่ขยาย ซึ่งแสดงถึงการแผ่ตัวของเซลล์บนพื้นผิว โดยพื้นที่การแผ่ของเซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบีมีค่ามากที่สุด และมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 1726.9 ± 578.5 และ 1708.0 ± 531.7 ตารางไมโครเมตร ตามลำดับ ส่วนพื้นที่การแผ่ของเซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซส มีค่ามากกว่ากรณีฟิล์ม PCL แต่น้อยกว่ากรณีฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี คือ มีค่า 847.2 ± 319.2 ตารางไมโครเมตร โดยพื้นที่การแผ่ของเซลล์ L929 บนพื้นผิวฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสสอดคล้องกับผลของปริมาณอะตอมไนโตรเจน และพันธะเอไมด์บนพื้นผิว กล่าวคือ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซส มีปริมาณอะตอมของไนโตรเจน และพันธะเอไมด์ ซึ่งแสดงถึงโปรตีนบนพื้นผิวต่ำกว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี

การเพิ่มขึ้นของปริมาณการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการแผ่ของเซลล์ L929 บนพื้นผิวของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสเป็นผลจากการการคอนจูเกตโปรตีนบนพื้นผิว กล่าวคือ เจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสเป็นโปรตีนที่สกัดจากคอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในสารเคลือบเซลล์ (Extra cellular matrix, ECM) โดยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสจะมีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine, Arg) ไกลซีน (Glycine, Gly) และกรดแอสพาทิก (Aspartic acid, Asp) (หรือเรียกโดยย่อว่า RGD) เป็นองค์ประกอบย่อย ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อพฤติกรรมของเซลล์ กล่าวคือ ลำดับกรดอะมิโน RGD เป็นหน่วย

ย่อยที่สุดที่อินทิกริน (Integrin) ของเซลล์สามารถจดจำและสร้างพันธะด้วยได้ ลำดับกรดอะมิโน RGD จึงมีความสำคัญต่ออันตรกิริยาเริ่มต้นระหว่างเซลล์กับวัสดุ (Cell interaction with material substrate) [78, 80, 81] และการกระตุ้นการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กับสารเคลือบเซลล์ ซึ่งจะควบคุมพฤติกรรมของการยึดเกาะ เจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อ (Differentiation) การย่อยสลาย (Apoptosis) การเอาตัวรอด (Survival) และการเคลื่อนที่ (Migration) ของเซลล์บนวัสดุ [80, 82] ดังนั้น การคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ซึ่งมีกรดอะมิโนลำดับ RGD เป็นองค์ประกอบจึงเป็นการจำลองสภาวะพื้นผิวให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติ (สารเคลือบเซลล์) ส่งผลให้เซลล์มีการยึดเกาะ แฝงตัว และเจริญเติบโตสูงขึ้น



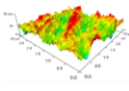
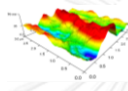
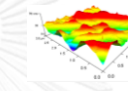
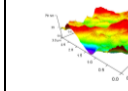
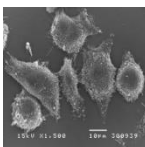
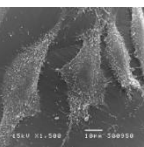
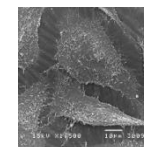
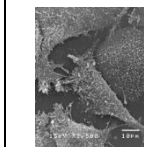
ตารางที่ 4.8 โครงสร้างสัณฐานและพื้นที่การแผ่ของเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิรตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	สัณฐานของเซลล์ L929	พื้นที่การแผ่ของเซลล์ (ตารางไมโครเมตร)
PCL		332.9 ± 83.6^a
P1minGA1%		1726.9 ± 578.5^b
P1minGB1%		1708.0 ± 531.7^b
P1minCH1%		847.2 ± 319.2^c

(a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

ตารางที่ 4.9 แสดงการสรุประดับทิศทางกายภาพ เคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ L929 ของฟิล์ม PCL, ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก จากตารางพบว่าฟิล์ม PCL ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและออกซิเจน และไม่มีพันธะเอไมด์เป็นองค์ประกอบ แต่ภายหลังการดัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนทั้งสามชนิด พื้นผิวของฟิล์มตรวจพบอะตอมของคาร์บอน ออกซิเจนและไนโตรเจน และพบพันธะเอไมด์บนพื้นผิวด้วย ซึ่งการตรวจพบอะตอมของไนโตรเจน และพันธะเอไมด์บนพื้นผิวชี้ให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามชนิดถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL โดยมีพลาสมาอากาศที่ผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ สร้างหมู่ฟังก์ชัน (เอมีน หรือคาร์บอกซิล) บนพื้นผิวฟิล์ม PCL สำหรับการคอนจูเกตกับหมู่ฟังก์ชัน (คาร์บอกซิล หรือเอมีน) ในสายโซ่ของโปรตีน ด้วยสารคาร์โบไดอิมิด ซึ่งการคอนจูเกตสารเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบนพื้นผิวฟิล์ม PCL นี้ส่งผลให้พื้นผิวของฟิล์ม PCL มีความชอบน้ำเพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณพื้นผิวอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก มีปริมาณเซลล์ยึดเกาะ และพื้นที่ของเซลล์สูงกว่าบนฟิล์ม PCL อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากพื้นผิวของฟิล์ม PCL มีความไม่ชอบน้ำ และขาดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ สำหรับกรณีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยโปรตีนทั้งสามชนิด พบว่าฟิล์ม PCL ที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอมีนพื้นที่ของเซลล์สูงที่สุด และใกล้เคียงกับฟิล์ม PCL ที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดบี และฟิล์ม PCL ที่คอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีพื้นที่เซลล์ต่ำที่สุด สอดคล้องกับปริมาณพันธะเอไมด์ที่ตรวจพบบนพื้นผิว เนื่องจากปริมาณพันธะเอไมด์เป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณของโปรตีนบนพื้นผิว ดังนั้นพื้นผิวที่ตรวจพบปริมาณพันธะเอไมด์มากที่สุดน่าจะมีโปรตีนบนพื้นผิวสูงที่สุด ซึ่งส่งผลโดยตรงให้เซลล์ยึดเกาะ และแผ่ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.9 สรุปสมบัติทางกายภาพ เคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ L929 ของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก

ตัวอย่าง	PCL	P1minGA1%	P1minGB1%	P1minCH1%	TCP
C/O/N	75.03/24.97/0	62.01/22.17/15.82	62.88/22.30/14.82	64.80/22.18/13.02	80.20/18.60/0.09*
พันธะเอไมต์	0	26.17	20.84	14.91	-
มุมสัมผัสพื้นน้ำ (องศา)	76.50	49.40	43.17	42.40	50**
Rms (นาโนเมตร)	7.26±1.03	11.83±2.50	10.21±2.65	11.17±2.89	3.50**
สัณฐานพื้นผิว					N/A
ร้อยละการยึดเกาะ	45.46	89.71	85.33	85.09	100
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($\mu, \times 10^{-3} \text{ ชม.}^{-1}$)	27.53	27.83	27.88	26.48	23.50
ระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT, ชม.)	36.53	36.05	35.93	37.88	42.57
พื้นที่การแผ่ของเซลล์ผิวหนังก้อนบนพื้นผิว (ตารางไมโครเมตร)	332.86±83.57	1726.88±578.50	1708.05±531.66	847.18±319.24	N/A
โครงสร้างสัณฐานของเซลล์ผิวหนังก้อน					N/A

หมายเหตุ

*ปริมาณอะตอมของธาตุคาร์บอน ออกซิเจนและไนโตรเจนของงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิسترินจากงานวิจัยในปี 2004 ของ Theo, G. และคณะ

**ค่ามุมสัมผัสพื้นน้ำ และค่า Rms ของงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิسترินจากงานวิจัยในปี 2013 ของ Adam, S. Z. และคณะ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ถูกดัดแปรด้วยพลาสมา ซึ่งผลิตจากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ของแก๊สอากาศ ที่อัตราการไหล 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีน โดยใช้คาร์โบไดไอโม่ต์เป็นสารเชื่อมขวาง ซึ่งงานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาเป็น 4 ส่วน คือ การศึกษาสมบัติของฟิล์ม PCL, การศึกษาสมบัติทางเคมีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 2 นาที, การศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการดัดแปรด้วยพลาสมาต่อสมบัติของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 15 วินาที ถึง 4 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก และการศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่มีต่อสมบัติของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก

จากการศึกษาสมบัติของฟิล์ม PCL พบว่าฟิล์ม PCL มีอะตอมของคาร์บอน (75.03%) และออกซิเจน (24.97%) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจำแนกเป็นพันธะได้ 3 พันธะ คือ C-C, C-O และ O=C-O คิดเป็น 72.29, 15.45 และ 12.26% ตามลำดับ โดยฟิล์ม PCL มีความสัมพันธ์น้ำ 76.5 องศา และมีค่า Rms 7.3 ± 1.0 นาโนเมตร ภายหลังจากดัดแปรฟิล์ม PCL ด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 2 นาที พบว่าพื้นผิวฟิล์ม PCL ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน (59.30%) ออกซิเจน (38.89%) และไนโตรเจน (1.81%) ซึ่งสามารถจำแนกเป็น 4 กลุ่มพันธะ คือ C-C, C-N และ C-O, O=C-N และ O=C-O คิดเป็น 69.42, 15.97, 3.82 และ 10.79% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพลาสมาอากาศทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบบนฟิล์ม PCL นอกจากนี้ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Derivatization (การวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิจากอะตอมของฟลูออรีนบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 2 นาที และทำปฏิกิริยากับไอของสาร TFBA) ยังพิสูจน์ว่าพลาสมาอากาศสร้างหมู่เอมีนปฐมภูมิ ($-NH_2$) บนพื้นผิวฟิล์ม PCL 1.72% ซึ่งหมู่เอมีนปฐมภูมินี้สามารถทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับหมู่คาร์บอกซิลในสายโซ่ของโปรตีน โดยมีคาร์โบไดไอโม่ต์เป็นสารเชื่อมขวางได้

การศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ 15 วินาที, 30 วินาที, 1 นาที, 2 นาที และ 4 นาที ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจู-

เกิดด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก ต่อค่ามัมสัมผัสน้ำ, ปริมาณหมู่เอมีนปฏุมภูมิตนพื้นผิว และปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกเป็นเวลา 15 วินาที ถึง 4 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีค่ามัมสัมผัสน้ำลดลงอยู่ในช่วง 54.1-61.8 องศา โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีค่ามัมสัมผัสน้ำต่ำที่สุด ปริมาณหมู่เอมีนปฏุมภูมิ หรือหมู่อะมิโนอิสระบนพื้นผิวเกิดขึ้นประมาณ 1.3-2.8 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกเป็นเวลา 15 วินาที ถึง 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณหมู่เอมีนปฏุมภูมิอยู่ในช่วงที่มากที่สุด สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกที่ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีอะตอมของไนโตรเจนเกิดขึ้น 14.46-16.83% และพันธะบนพื้นผิวสามารถจำแนกเป็น 4 กลุ่มพันธะ คือ C-C, C-N และ C-O, O=C-O และ O=C-N โดยมีปริมาณพันธะเอไมด์ (O=C-N) ซึ่งแสดงถึงพันธะเพปไทด์ของโปรตีนที่ถูกคอนจูเกตบนฟิล์ม PCL 13.28-24.06% และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณพันธะเอไมด์สูงที่สุด จากการวิเคราะห์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอมีการปรับปรุงพื้นผิวดีที่สุด จึงเลือกใช้ระยะเวลาการตัดแปร 1 นาที ในการศึกษาต่อไป

การศึกษากิจิพลของวามเข้มข้นของสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก ต่อค่ามัมสัมผัสน้ำ และปริมาณอะตอมและพันธะบนพื้นผิว พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกและคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่ามัมสัมผัสน้ำ, ปริมาณอะตอมไนโตรเจน และพันธะเอไมด์ 46.7-51.7 องศา, 13.52-16.39% และ 23.44-26.17% ตามลำดับ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกและคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดบีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่ามัมสัมผัสน้ำ, ปริมาณอะตอมไนโตรเจน และพันธะเอไมด์ 43.1-43.5 องศา, 14.46-15.57% และ 19.98-20.84% ตามลำดับ และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกและคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่ามัมสัมผัสน้ำ, ปริมาณอะตอมไนโตรเจน และพันธะเอไมด์ 42.4-45.7 องศา, 8.48-11% และ 12.95-14.91% ตามลำดับ โดยฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกและคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 0.2% โดยน้ำหนัก, เจลาตินชนิดบีความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก มีค่ามัมสัมผัสน้ำต่ำที่สุด และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสติกและคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก มีปริมาณพันธะเอไมด์สูงที่สุด จึงเลือกใช้

สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ในการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์บนพื้นผิวฟิล์ม PCL

สำหรับอิทธิพลของชนิดของสารละลายโปรตีนที่ใช้คอนจูเกตบนพื้นผิวของฟิล์ม PCL พบว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีแนวโน้มของค่ามุมสัมผัสน้ำสูงกว่าฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ขณะที่ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอมีปริมาณพันธะเอไมด์สูงสุด รองลงมา คือ ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดบี และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ตามลำดับ โดยค่า Rms ของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนทั้งสามและฟิล์ม PCL ที่ไม่ผ่านการตัดแปรใด ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) พบว่าเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์ม PCL มีจำนวนน้อย ซึ่งคิดเป็นร้อยละการยึดเกาะเพียง 45.5% และพื้นที่ของเซลล์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีค่า 332.9 ± 83.6 ตารางไมโครเมตร แต่เซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีจำนวนเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละการยึดเกาะ 89.7, 85.3 และ 85.1% ตามลำดับ โดยร้อยละการยึดเกาะของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยโปรตีนทั้งสามไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ พื้นที่ของเซลล์ยังเพิ่มขึ้นเป็น 1726.9 ± 578.5 , 1708.0 ± 531.7 และ 847.2 ± 319.2 ตารางไมโครเมตร ตามลำดับ แต่เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีพื้นที่เซลล์ต่ำกว่ากรณีเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีปริมาณพันธะเอไมด์ต่ำที่สุด การเพิ่มขึ้นของร้อยละการยึดเกาะ และพื้นที่การแผ่ของเซลล์บนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีนแสดงให้เห็นว่าการคอนจูเกตเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของคอลลาเจน ช่วยส่งเสริมความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของพื้นผิวฟิล์ม PCL

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับงานวิจัยที่น่าสนใจต่อการพัฒนาในอนาคต ได้แก่

- การหาปริมาณกรดคาร์บอกซิลิกบนพื้นผิวฟิล์มที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ
- การหาปริมาณโปรตีนที่ถูกคอนจูเกตบนพื้นผิวฟิล์มที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา และการคอนจูเกตด้วยสารละลายโปรตีน
- การคอนจูเกตสารละลายโปรตีนชนิดอื่นที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงบนฟิล์ม PCL ที่ผ่านการตัดแปรด้วยพลาสมา



รายการอ้างอิง

1. Lee, H.U., Jeong, Y.S., Jeong, S.Y., Park, S.Y., Bae, J.S., Kim, H.G., *Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly-caprolactone film*. Applied Surface Science, 2008. **254**: p. 5700-5705.
2. Desmet, T., Morent, R., Geyter, N.D., Leys, C., Schacht, E., Dubruel, P., *Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review*. Biomacromolecules, 2009. **10**: p. 2351-2378.
3. Prasertsung, I., Kanokpanont, S., Mongkolnavin, R., Wong, C. S., Panpranot, J., Damrongsakkul, S., *Plasma Enhancement of In Vitro Attachment of Rat Bone-Marrow-Derived Stem Cells on Cross-Linked Gelatin Films*. J Biomater Sci Polym Ed, 2012.
4. Amornsudthiwat, P., Mongkolnavin, R., Kanokpanont, S., Panpranot, J., Wong, C.S., Damrongsakkul, S., *Improvement of early cell adhesion on Thai silk fibroin surface by low energy plasma*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **111**: p. 579-586.
5. Mangindaan, D.C., Chen, C.T., Wang, M.J., *Integrating sol-gel with cold plasmas modified porous polycaprolactone membranes for the drug-release of silver-sulfadiazine and ketoprofen*. Applied Surface Science, 2012. **262**: p. 114-119.
6. Chen, J.P., Su, C.H., *Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 234-43.
7. Zhe, L., Ping, C., Debin, H., Fang, L., Qi, Y., Zhenfeng, D., *Atmospheric air plasma treated PBO fibers: Wettability, adhesion and aging behaviors*. Vacuum, 2013. **92**: p. 13-19.
8. Yu, H.Y., Liu, L. Q., Tang, Z. Q., Yan, M. G., Gu, J. S., Wei, X. W., *Surface modification of polypropylene microporous membrane to improve its*

- antifouling characteristics in an SMBR: Air plasma treatment.* Journal of Membrane Science, 2008. **311**(1-2): p. 216-224.
9. Jacobs, T., Declercq, H., Geyter, N., Cornelissen, R., Dubruel, P., Leys, C., Morent, R., *Improved cell adhesion to flat and porous plasma-treated poly- ϵ -caprolactone samples.* Surface and Coatings Technology, 2013. **232**: p. 447-455.
 10. Jacobs, T., Geyter, N., Morent, R., Desmet, T., Dubruel, P., Leys, C., *Plasma treatment of polycaprolactone at medium pressure.* Surface and Coatings Technology, 2011. **205**: p. S543-S547.
 11. Fang, Z., Liu, Y., Liu, K. Shao, T., Zhang, C., *Surface modifications of polymethylmetacrylate films using atmospheric pressure air dielectric barrier discharge plasma.* Vacuum, 2012. **86**(9): p. 1305-1312.
 12. Choi, Y.R., et al., *Surface modification of biphasic calcium phosphate scaffolds by non-thermal atmospheric pressure nitrogen and air plasma treatment for improving osteoblast attachment and proliferation.* Thin Solid Films, 2013. **547**: p. 235-240.
 13. Prasertsung, I., et al., *Surface modification of dehydrothermal crosslinked gelatin film using a 50Hz oxygen glow discharge.* Surface and Coatings Technology, 2010. **205**: p. S133-S138.
 14. He, F., J. Li, J. Ye, *Improvement of cell response of the poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite scaffold with unidirectional pore structure by the surface immobilization of collagen via plasma treatment.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **103**: p. 209-216.
 15. Roth, J.R., *Industrial plasma engineering.* Chapter 8 : Dark electrical discharges in gases. Vol. 1. 1995, London: Institute of physics publishing.
 16. Roth, J.R., *Industrial plasma engineering* Chapter 4 : Characteristics of plasma. Vol. 1. 1995, London: Institute of physics publishing.
 17. Roth, J.R., *Industrial plasma engineering.* Chapter 14 : Surface interactions in plasma processing. 1995, London: Institute of physics publishing.

18. Roth, J.R., *Industrial plasma engineering* Chapter 19 : Parametric plasma effects on plasma processing. Vol. 1. 1995, London: Institute of physics publishing.
19. Roth, J.R., *Industrial plasma engineering* Chapter 2 : The kinetic theory of gases. Vol. 1. 1995, London: Institute of physics publishing.
20. Chu, P.K., Chen, J.Y., Wang, L.P., Huang, N., *Plasma-surface modification of biomaterials*. Materials Science and Engineering, 2002. **36**: p. 143-206.
21. Mongkolnavin, R., *Introduction to plasma technology*. 2011.
22. Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., *The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century*. Progress in Polymer Science, 2010. **35**: p. 1217–1256.
23. Wikipedia. *Polycaprolactone*. 2014.
24. โสธรวิทย์, ร., เคมีและจุลวิทยาเบื้องต้นของอาหาร. บทที่ 4 : โปรตีน. 2007, กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
25. เตชะพันธุ์, ช., การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์. บทที่ 1 การแยกและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยคุณสมบัติด้านการละลาย. 2012, เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
26. Yasuhiko, T., Yoshito, I., *Protein release from gelatin matrices*. Advanced Drug Delivery Reviews 1998. **31**: p. 287–301.
27. Rickey, Y.Y., *Proteins in Food Processing*. Woodhead publishing limited, 2004.
28. Marianna, T., *Collagen hydrolysates as a new diet supplement*. Food Chemistry and Biotechnology, 2009. **73**: p. 83-92.
29. Robert, L., Robert, L., Joseph, V., *Principles of tissue engineering*. Chapter 16 : In vivo synthesis of tissues and organs. 2007, United States: Elsevier Academic Press.
30. Ferenc, M., *Confectionery and chocolate engineering*. Wiley-Blackwell published, 2010.
31. Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
32. group, W., *Applications*. Weishardt International.

33. Schrieber, R., Gareis, H., *Gelatin handbook*. 2012, United States: Gelatin manufacturers institute of America.
34. *Advice on Foot Care*. Breakdown of the Plantar Fascia 2012.
35. Chaplin, M. *Water structure and science : Gelatin*. 2012.
36. Sineenath, S., *Production of gelatin and gelatin hydrolysate from fish skin for development of healthy drinks*. 2011.
37. Steffen, O., Milan, A., Wilfried, B., Jurgen, S., *Oral Administration of ¹⁴C Labeled Gelatin Hydrolysate Leads to an Accumulation of Radioactivity in Cartilage of Mice (C57/BL)*. *The journal of nutrition*, 1999. **129**: p. 1891-1895.
38. Last, J.A., Baer, J., Millson, C., *Site of hydrolysis of collagen by hot trichloroacetic acid*. *Connective Tissue Research* 1976. **4**(3): p. 149-153.
39. Matthew, G.H., Michael, J.J., Fergal, J.O'B., *The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen GAG scaffolds*. *Biomedical Material*, 2009. **89**: p. 363-369.
40. Hennink, W.E., Nostrum, C.F., *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54**: p. 223-236.
41. Wolfgang, F., *Collagen-biomaterial for drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998. **45**: p. 113-136.
42. Atala, A., Lanza, R.P., *Methods of tissue engineering*. Chapter 43 : Modification of neutral polymers : Collagen-Glycosaminoglycan copolymers. 2002, United States: Academic Press.
43. Goddard, J.M., Hotchkiss, J.H., *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*. *Progress in Polymer Science*, 2007. **32**(7): p. 698-725.
44. Ma, Z., Mao, Z., Gao, C., *Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007. **60**(2): p. 137-157.
45. Sandra, C., Michael, B., Gerard, B., John, D., Gerhard, G., Thomas, H., Robert, H., Otto-Wilhelm, M., Anna, P., Leonard, S., Glyn, S., William, S., *Guidance on Good Cell Culture Practice*. ATLA, 2005. **33**: p. 261-287.

46. Tang, Z.G., Black, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P., Williams, D.F., *Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ε-caprolactone] films*. Biomaterials, 2004. **25**(19): p. 4741-4748.
47. Cristescu, R., Doraiswamy, A., Socol, G., Grigorescu, S., Axente, E., Mihaiescu, D., Moldovan, A., Narayan, R.J., Stamatina, I., Mihaiescu, I.N., Chisholm, B.J., Chrisey, D.B., *Polycaprolactone biopolymer thin films obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation*. Applied Surface Science, 2007. **253**(15): p. 6476-6479.
48. Schueren, L., Schoenmaker, B., Kalaoglu, O.I., Clerck, K., *An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone*. European Polymer Journal, 2011. **47**(6): p. 1256-1263.
49. Cheng, P.R., Kang, P.L., Su, W.Y., Lin F.H., Chena, M.H., *The evaluation of thermal properties and in vitro test of carbodiimide or glutaraldehyde cross-linked gelatin for PC 12 cells culture*. Biomedical Engineering Applications, Basis&Communications, 2005. **17**: p. 101-107.
50. Ratanavaraporn, J., Rangkupan, R., Jeeratawatchai, H., Kanokpanont, S., Damrongsakkul, S., *Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **47**: p. 431-438.
51. Prasertsung, I., Kanokpanont, S., Mongkolnavin, R., Wong, C. S., Panpranot, J., Damrongsakkul, S., Wong, C. S., *Comparison of the behavior of fibroblast and bone marrow-derived mesenchymal stem cell on nitrogen plasma-treated gelatin films*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(7): p. 4475-4479.
52. Gancarz, I., Bryjak, J., Poźniak, G., Tylus, W., *Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma*. European Polymer Journal, 2003. **39**(11): p. 2217-2224.
53. Jingrun, R., Jin, W., Hong, S., Nan, H., *Surface modification of polyethylene terephthalate with albumin and gelatin for improvement of anticoagulation and endothelialization*. Applied Surface Science, 2008. **255**(2): p. 263-266.
54. Paula M.L.P., Ricardo, M.P.S., Rui, A.S., Iva, P., Rui, L.R., *Plasma-induced polymerization as a tool for surface functionalization of polymer scaffolds*

- for bone tissue engineering: an in vitro study*. Acta Biomater, 2010. **6**(9): p. 3704-3712.
55. Yang, J., Bei, J.Z., Wang, S.G., *Enhanced cell affinity of poly(D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 2607-2614.
56. Lobato, E.M.C., *Determination of Surface Free Energies and Aspect Ratio of Talc*. 2004, Finland: Materials Science and Engineering.
57. Yuan, Y., Lee, T.R., *Surface science techniques*. Chapter 1 : Contact angle and wetting properties. United States: Department of Chemistry, University of Houston.
58. Bachmann, J., Ellies, A., Hartge, K.H., *Development and application of a new sessile drop contact angle*. Journal of Hydrology, 2000. **231-232**: p. 66-75.
59. Vandencastele, N., F. Reniers, *Plasma-modified polymer surfaces: Characterization using XPS*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2010. **178-179**: p. 394-408.
60. Dieter, P., Frank, S., *Polymer surface and interfaces*. Chapter 4 X-Ray Photoelectron Spectroscopy. 2008, Germany: Leibniz institute of polymer research Dresden.
61. Lehmann, K., Herklotz, M., Espig, M., Paumer, T., Nitschke, M., Werner, C., Pompe, T., *A new approach to biofunctionalisation and micropatterning of multi-well plates*. Biomaterials, 2010. **31**(33): p. 8802-8809.
62. Johannes, G.A.T., Hermina, F.C.G., Allan, S.H., Jan, F., *Introduction of Functional Groups on Polyethylene Surfaces by a Carbon Dioxide Plasma Treatment* Journal of Applied Polymer Science, 1995. **57**: p. 969-982.
63. Jagst, M.S.E., *Surface Functional Group Characterization Using Chemical Derivatization X-ray Photoelectron Spectroscopy (CD-XPS)*. 2010.
64. Choukourov, A., Kousal, J., Slavínská, D., Biederman, H., Fuoco, E.R., Tepavcevic, S., Saucedo, J., Hanley, L., *Growth of primary and secondary amine films from polyatomic ion deposition*. Vacuum, 2004. **75**(3): p. 195-205.
65. Choukourov, A., Biederman, H., Slavinska, D., Trchova, M., Hollander, A., *The influence of pulse parameters on film composition during pulsed plasma*

- polymerization of diaminocyclohexane*. Surface and Coatings Technology, 2003. **174-175**: p. 863-866.
66. Edwards-Levy, F., Andry, M.C., Levy, M.C., *Determination of free amino group content of serum albumin microcapsules using trinitrobenzenesulfonic acid: effect of variations in polycondensation pH* International Journal of Pharmaceutics, 1993. **96**: p. 85-90.
67. Bobnis, W.A., Ofner, C.M., *The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzene-sulfonic acid*. Anal Biochem, 1992. **207**: p. 129-133.
68. Fantner, G., *Advanced Bioengineering Methods Laboratory*. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne.
69. Rao, J., *Fluorimetric DNA assay for cell growth estimation*. Analytical Biochemistry, 1992. **207**: p. 186-192.
70. Kramida, A., Ralchenko, Y., Reader, J., Team, N.A., *NIST Atomic Spectra Database (ver.5.0)*. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2012.
71. Jedlicka, S.S., Rickus, J.L., Zemlyano, D.Y., *Surface Analysis by X-ray Photoelectron Spectroscopy of Sol-Gel Silica Modified with Covalently Bound Peptides*. J. Phys. Chem. B 2007. **111**: p. 11850-11857.
72. Jia, C., Chen, P., Liu, W., Li, B., Wang, G., *Surface treatment of aramid fiber by air dielectric barrier discharge plasma at atmospheric pressure*. Applied Surface Science, 2011. **257**: p. 4165-4170.
73. Schrieber, R., Gareis, H., *Gelatin handbook*, ed. T.a.i. practice. 2007, England: Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA.
74. Yang, H., Wang, Y., *Effects of concentration on nanostructural images and physical properties of gelatin from channel catfish skins*. Food Hydrocolloids, 2009. **23**(3): p. 577-584.
75. Paulo, D.C., Leonardo, C., Francisco, M., Javier, E., *Molecular configuration of gelatin-water suspensions at low concentration*. Food Hydrocolloids, 2014. **39**: p. 171-179.

76. Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., Sante-Lhoutellier, V., *Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review*. Food Hydrocolloids, 2014.
77. Drevelle, O., Bergeron, E., Senta, H., Lauzon, M. A., Roux, S., Grenier, G., Fauchoux, N., *Effect of functionalized polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts*. Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6468-6476.
78. Yuan, S., Xiong, G., Roguin, A., Hin, S., Choong, C., *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. Chapter 7: Amelioration of blood compatibility and endothelialization of polycaprolactone substrates by surface-initiated atom transfer radical polymerization. 2013, Slovenia: InTech.
79. Pok, S.W., Wallace, K.N., Madihally, S.V., *In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media*. Acta Biomater, 2010. **6**(3): p. 1061-1068.
80. Zhang, H., Lin, C.Y., Hollister, S.J., *The interaction between bone marrow stromal cells and RGD-modified three-dimensional porous polycaprolactone scaffolds*. Biomaterials, 2009. **30**(25): p. 4063-4069.
81. Bolbasov, E.N., Rybachuk, M., Golovkin, A.S., Antonova, L.V., Shesterikov, E.V., Malchikhina, A.I., Novikov, V.A., Anissimov, Y.G., Tverdokhlebov, S.I., *Surface modification of poly(l-lactide) and polycaprolactone bioresorbable polymers using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target*. Materials Letters, 2014. **132**: p. 281-284.
82. Date, Y., Hasegawa, S., Yamada, T., Inoue, Y., Mizutani, H., Nakata, S., Akamatsu, H., *Major amino acids in collagen hydrolysate regulate the differentiation of mouse embryoid bodies*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013. **116**(3): p. 386-390.

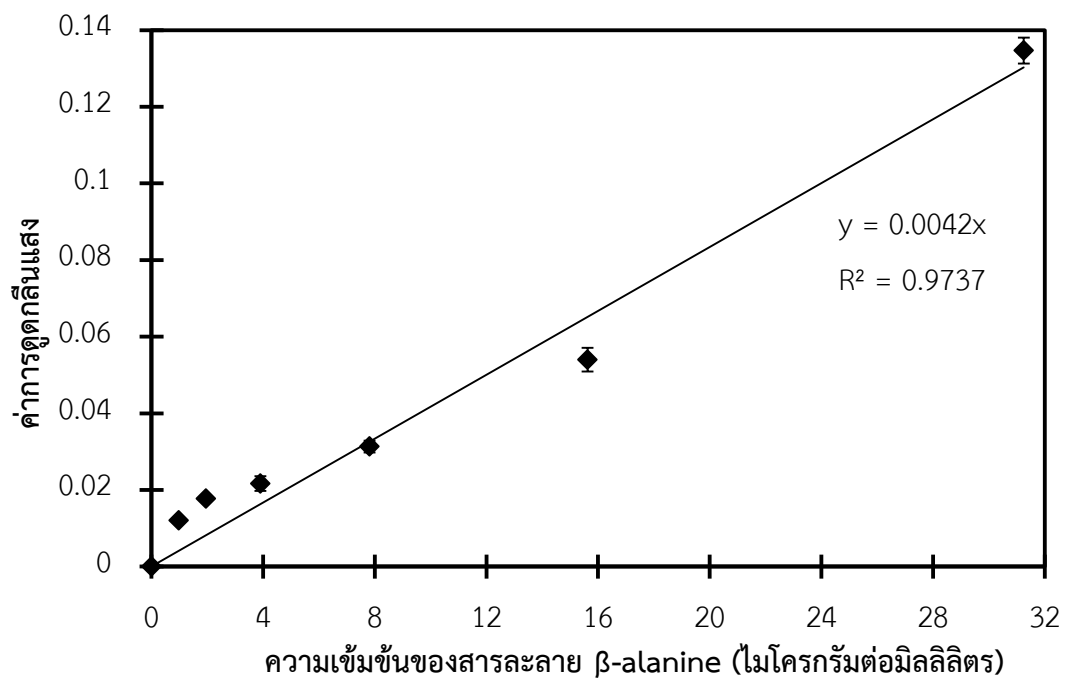


ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.

กราฟมาตรฐานของสาร β -alanine สำหรับวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐุมภูมิด้วยเทคนิค TNBS

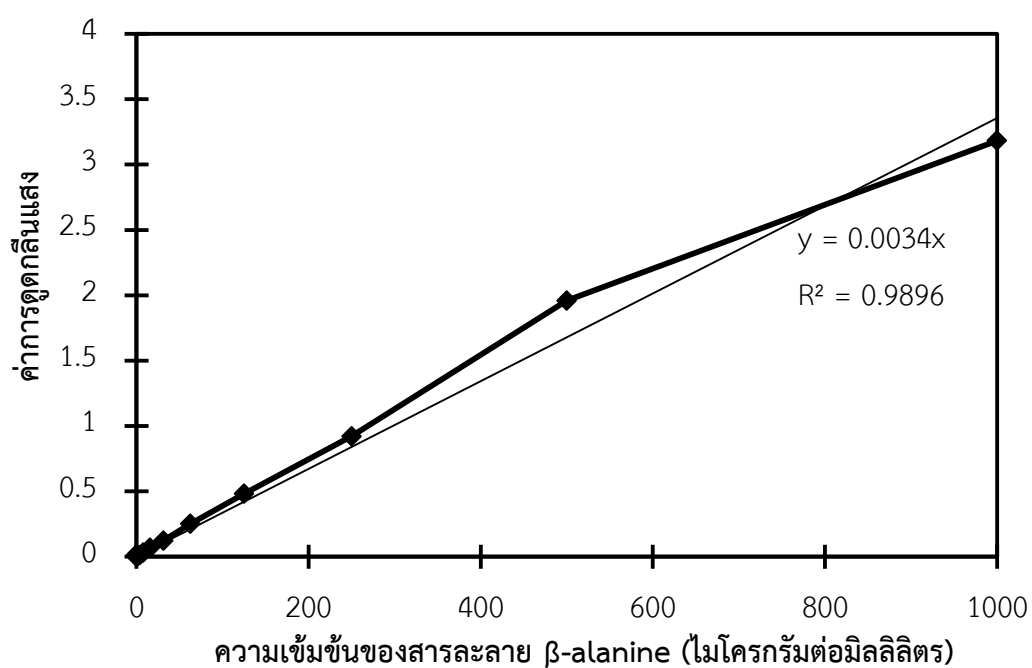


รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -alanine สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐุมภูมิด้วยเทคนิค TNBS

ภาคผนวก ข.

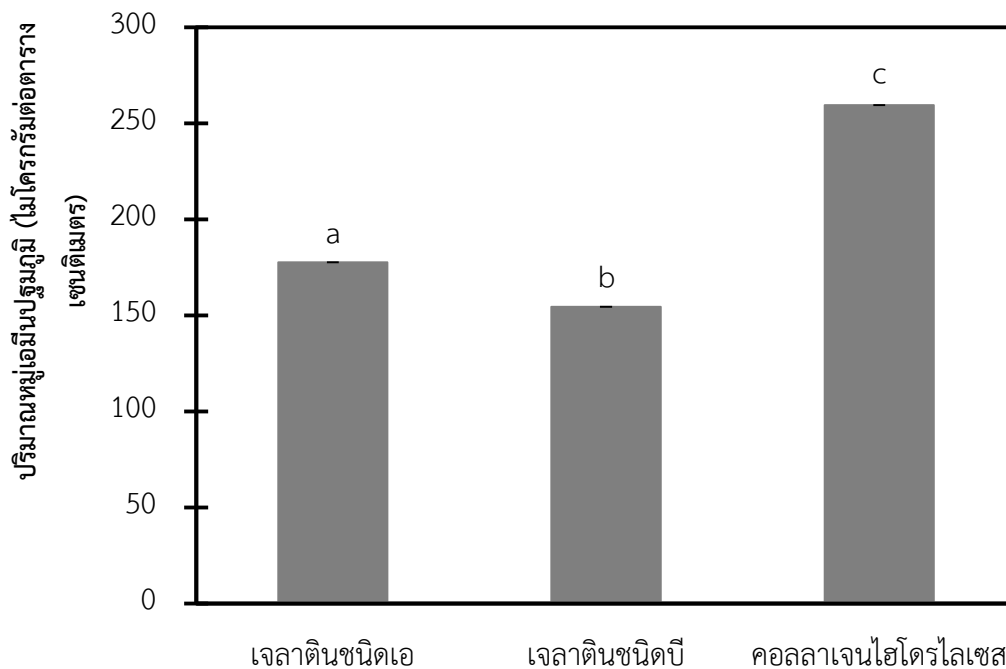
การวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิของฟิล์มเจลาตินเอ เจลาตินบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ด้วยเทคนิค TNBS

กราฟมาตรฐานของสาร β -alanine สำหรับวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิด้วยเทคนิค TNBS



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -alanine สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิด้วยเทคนิค TNBS

ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิของฟิล์มเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์



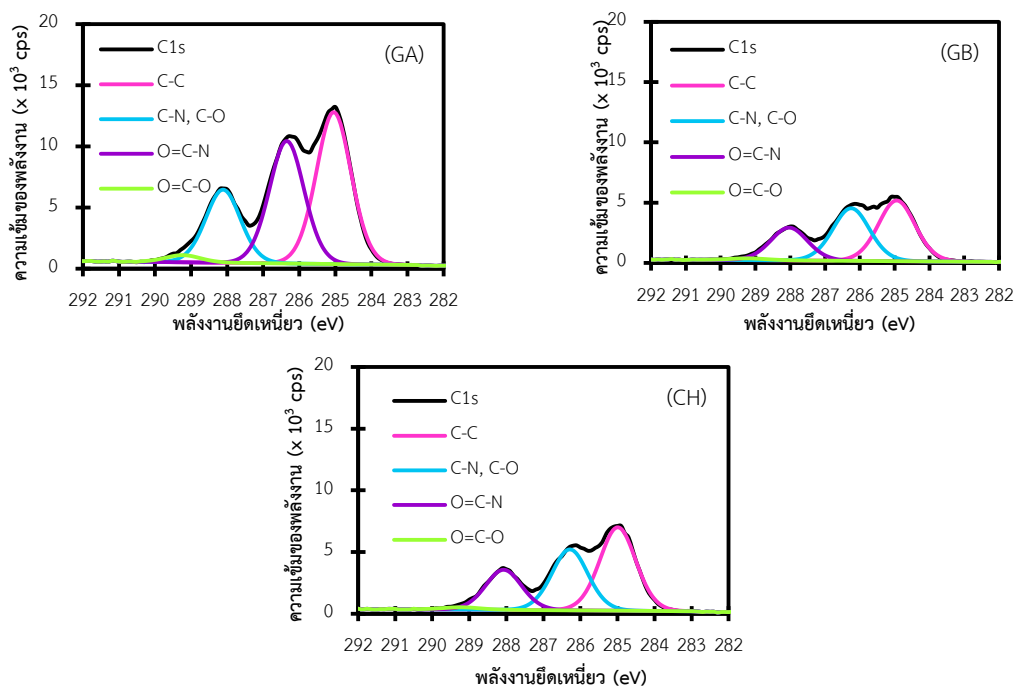
รูปที่ ข.2 ปริมาณหมู่เอมีนปฐมภูมิของฟิล์มเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไล-
เซสบริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TNBS (a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของฟิล์มเจลาตินเอ เจลาตินบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ด้วย X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

ตารางที่ ค.1 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์มเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

ชนิดของโปรตีน		เจลาตินชนิดเอ	เจลาตินชนิดบี	คอลลาเจนไฮโดรไลเซส
ปริมาณอะตอม (%)	C	66.22	66.64	64.29
	O	20.13	18.51	20.49
	N	13.65	14.85	15.22
สัดส่วนอะตอม	O/C	0.30	0.28	0.32
	N/C	0.21	0.22	0.24
ปริมาณพันธะ (%)	C-C	40.00	40.90	43.00
	C-N, C-O	37.40	35.10	33.80
	O=C-N	20.70	22.70	21.60
	O=C-O	1.90	1.30	1.60



รูปที่ ค.1 สเปกตรัม C1s ของฟิล์มเจลลาตินเอบริสุทธ์ (GA), ฟิล์มเจลลาตินชนิดบีบริสุทธ์ (GB) และฟิล์มคอลลาเจนไฮโดรไลเซสบริสุทธ์ (CH) จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ และคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) และการ Deconvolution

ตารางที่ ง.1 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (15 วินาที ถึง 4 นาที) และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

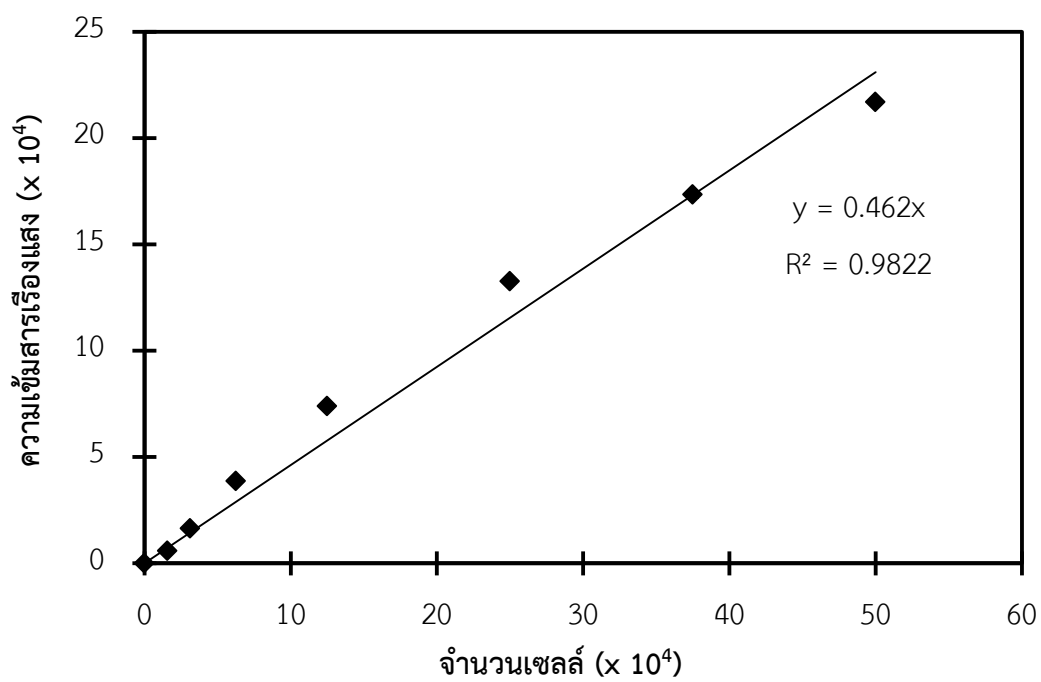
ตัวอย่าง	ปริมาณอะตอม (%)			สัดส่วนอะตอม		ปริมาณพันธะ (%)			
	C	O	N	O/C	N/C	C-C	C-N, C-O	O=C-N	O=C-O
PCL	75.03	24.97	0	0.33	0	72.29	15.45	0	12.26
P15secGA2%	61.32	23.3	15.38	0.38	0.25	44.85	29.96	21.23	3.96
P30secGA2%	61.87	23.67	14.46	0.38	0.23	44.84	30.24	19.77	5.15
P1minGA2%	59.51	24.52	15.97	0.41	0.27	38.07	35.51	24.06	2.36
P2minGA2%	60.37	23.68	15.95	0.39	0.26	41.34	33.4	22.99	2.27
P4minGA2%	59.61	23.56	16.83	0.40	0.28	38.88	36.6	13.28	11.24

ตารางที่ ง.2 ปริมาณอะตอมและพันธะของฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิรตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 2% โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ด้วย XPS และการ Deconvolution

ตัวอย่าง	ปริมาณอะตอม (%)			สัดส่วนอะตอม		ปริมาณพันธะ (%)			
	C	O	N	O/C	N/C	C-C	C-N, C-O	O=C-N	O=C-O
PCL	75.03	24.97	0	0.33	0	72.29	15.45	0	12.26
P1minGA0.2%	59.69	26.79	13.52	0.45	0.22	37.87	33.62	24.14	4.37
P1minGA1%	62.01	22.17	15.82	0.36	0.26	37.46	29.13	26.17	7.24
P1minGA2%	61.54	22.07	16.39	0.36	0.27	39.59	33.01	23.44	3.96
P1minGB0.2%	62.44	23.1	14.46	0.37	0.23	44.85	31.55	19.98	3.62
P1minGB1%	62.88	22.3	14.82	0.35	0.24	43.06	33.18	20.84	2.92
P1minGB2%	64.72	19.71	15.57	0.30	0.24	44.39	32.71	20.58	2.32
P1minCH0.2%	64.3	27.22	8.48	0.42	0.13	51.11	30	12.95	5.94
P1minCH1%	64.8	22.18	13.02	0.34	0.20	57.48	25.15	14.91	2.46
P1minCH2%	65.01	23.99	11	0.37	0.17	58.43	25.47	13.72	2.38

ภาคผนวก จ.

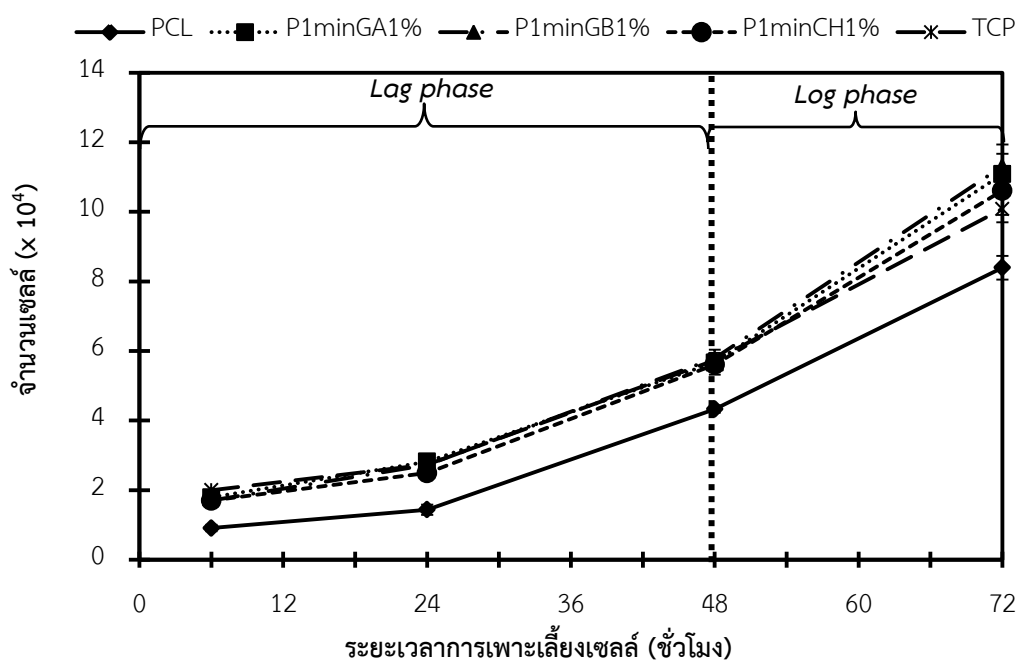
กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ L929 ด้วยการวัดปริมาณ DNA ของเซลล์



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ L929 ด้วยการวัดปริมาณ DNA ของเซลล์

ภาคผนวก ฉ.

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศเป็นเวลา 1 นาที และคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส โดยเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอลิสไตรีน (TCP)



รูปที่ ฉ. 1 การเจริญเติบโตของ L929 บนฟิล์ม PCL และฟิล์ม PCL ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพลาสมาอากาศ จากชุดอุปกรณ์กำเนิดพลาสมาโดยระบบไฟฟ้ากระแสสลับ ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ ที่ระยะเวลา 1 นาที และการคอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินชนิดเอ เจลาตินชนิดบี และคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บน TCP (Positive control) โดยทำการเพาะเลี้ยงบนพื้นผิวในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5%

หมายเหตุ - Lag phase คือ ช่วงที่เซลล์ L929 กำลังปรับตัวเข้าสู่สิ่งแวดล้อมใหม่

- Log phase คือ ช่วงที่เซลล์ L929 มีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงที่สุด ซึ่งช่วงนี้ใช้ในการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และระยะเวลาในการแบ่งตัวเป็นทวีคูณ (PDT)

- สำหรับงานวิจัยนี้ช่วง Log phase คือ ช่วงเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปรมาภรณ์ สหไพบุลย์กิจ เกิดเมื่อวันที่ 20 กันยายน 2531 จังหวัด กรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนบอสโกพิทักษ์ และระดับมัธยมศึกษาที่ โรงเรียนราชินีบูรณะ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปี การศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

ผลงานการประชุมวิชาการ

Sahapaibounkit, P., Mongkolnavin, R. and Damrongsakkul, S. Modification of Polycaprolactone Film with Gelatin through Plasma Functionalization and EDC Crosslinking, Poster Presentation, The IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) World Polymer Congress, Macro 2014, Chiang Mai International Convention and Exhibition Center, Chiang Mai, July 6-11, 2014.