

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์บนไทเทเนียมโดยวิธีชุบเคลือบด้วยไฟฟ้า
Hydroxyapatite coating on Titanium Amploying Electrodeposition Technique

คณะผู้วิจัย

นางสาวเกศินี ศรีรักษาสินธุ์ (หัวหน้าโครงการ)

ดร.นันทน์ ถาวรังกูร

ดร.นคร ศรีสุขุมบวรชัย

นายชูชาติ นิติปัญญาวงศ์

ดร.นภฉัตร ธารีลาภ

ทพ.ญ.อนัญญา พรหมสุทธิ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ.2551 - 2552

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2551 - 2552 สำหรับการดำเนินงานในครั้งนี้ ขอขอบคุณสายวิชาเทคโนโลยีวัสดุ คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) สำหรับข้อเสนอแนะและแนวความคิดที่เป็นประโยชน์ในการทดสอบวัสดุฝังใน ขอขอบคุณบุคลากร เจ้าหน้าที่และผู้ช่วยนักวิจัย ที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่ช่วยสนับสนุนการดำเนินงานในด้านต่างๆ ให้โครงการวิจัยนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ชื่อโครงการ การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์บนไทเทเนียมโดยวิธีชุบเคลือบด้วยไฟฟ้า
Hydroxyapatite coating on Titanium Amplying Electrodeposition
Technique

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี2551-2552..... จำนวนเงิน 1,154,080บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 4 ปี 6 เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 – 31 มีนาคม 2555

คณะผู้วิจัย 1 น.ส.เกศินี ศรีรักษาสินธุ์¹ (หัวหน้าโครงการ)
 2 ดร.นันทน์ ถาวรังกูร²
 3 ดร.นคร ศรีสุขุมบวรชัยกูร²
 4 นายชูชาติ นิติปัญญาวงศ์²
 5 ดร.นภฉัตร ธารีลาภ²
 6 ทพ.ญ.อนัญญา พรหมสุทธิ³

¹ศูนย์ส่งเสริมงานวิจัยและทรัพย์สินทางปัญญา สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

²สายวิชาเทคโนโลยีวัสดุ คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

³คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเตรียมผิวไฮดรอกซีแอปาทิตด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าบนผิวโลหะไทเทเนียม เกรด 2 ซึ่งช่วยให้เซลล์กระดูกสามารถยึดเกาะกับวัสดุฝังในได้ดีขึ้น โดยทำการชุบเคลือบในสารละลายผสมของ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ และ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ที่ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 และศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการชุบเคลือบต่อสัณฐานวิทยา ชนิดของโครงสร้างผลึก ตลอดจนสมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบ จากการศึกษาด้วย XRD พบว่าผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C มีโครงสร้างผลึกชนิดบรูไซต์ (Brushite) และไฮดรอกซีแอปาทิต (Hydroxyapatite) ร่วมกัน และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 และ 60°C กลับพบเพียงโครงสร้างผลึกชนิดไฮดรอกซีแอปาทิตเท่านั้น โดยโครงสร้างชนิดบรูไซต์มีสัณฐานวิทยาลักษณะเป็นแผ่น (Plate) ไฮดรอกซีแอปาทิตมีสัณฐานวิทยาแบบเกล็ด (Flake) และแบบฟองน้ำ ซึ่งเป็นก้อนกลมขนาดเล็ก (Nodular) ส่วนเวลาในการชุบเคลือบไม่ปรากฏว่ามีผลต่อโครงสร้างผลึก อย่างไรก็ตามโครงสร้างชนิดบรูไซต์สามารถเปลี่ยนแปลง (Transform) โครงสร้างผลึกเป็นไฮดรอกซีแอปาทิตได้โดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิตทั้งที่เตรียมได้โดยตรงจากกระบวนการชุบเคลือบและจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีขนาดผลึกประมาณ 16-41 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดผลึกไฮดรอกซีแอปาทิตที่พบในกระดูกมนุษย์ เมื่อทำการทดสอบสมบัติทางชีวภาพพบว่าผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิตที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธีการไม่มีความเป็นพิษ แต่ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิตที่เตรียมได้โดยตรงจากการชุบเคลือบมีปริมาณเซลล์กระดูกและการแผ่ตัวของเซลล์กระดูกรวมทั้งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไฮดรอกซีแอปาทิตในสารละลายที่มีการจำลองสภาวะของเหลวในร่างกายมนุษย์ได้

คำสำคัญ: การเคลือบผิวทางเคมีไฟฟ้า/ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ/ไทเทเนียม/ไฮดรอกซีแอปาทิต

Abstract

In this work, electrodeposition of hydroxyapatite on commercially pure titanium was attempted to promote bone in-growth. Coatings were electrodeposited in mixed solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ with constant current density of 10 mA/cm^2 . The effects of deposition temperature and time on morphology, crystal structure and biocompatibility of coatings were studied. Indicated by XRD technique, coatings formed at temperature of 30 and 40 °C were composed of brushite and hydroxyapatite, whereas those obtained at temperature of 50 and 60 °C only hydroxyapatite was detected. Deposition time did not show any effect on crystal structure of coating. SEM-EDX investigation revealed that plate shape morphology represented brushite structure; while, flake and nodular morphologies corresponded to hydroxyapatite structure. Transformation of brushite to hydroxyapatite could be achieved by soaking in 1 M NaOH at 30 °C for 2 hours. Crystallite sizes of hydroxyapatite produced from this work were 16 - 41 nm which were similar to those found in human bone. Hydroxyapatite coatings formed through either direct electrodeposition or transformation in NaOH were non-toxic. However, the directly-formed hydroxyapatite promoted newly formed hydroxyapatite in Simulated body fluid (SBF) and responded to Osteoblast cell in terms of amount of cell growth and cell adhesion are good.

Keywords: Electrodeposition/Biocompatibility/Titanium/Hydroxyapatite

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ
บทคัดย่อภาษาไทย
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ
สารบัญ
รายการตาราง
รายการรูปประกอบ
รายการสัญลักษณ์

บทที่

1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	 4
2.1 วัสดุทางการแพทย์	4
2.1.1 โลหะฝังใน (Implant metals)	4
2.1.2 สารประกอบไฮดรอกซีแอปาทาइट	6
2.2 กระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยไฟฟ้า	8
2.2.1 การเตรียมผิวรองรับไทเทเนียม	8
2.2.2 หลักการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า	9
2.2.3 การเกิดผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟต	13
2.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจากบรูไซต์เป็นไฮดรอกซีแอปาทาइट	15
2.4 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	15
2.4.1 ผลของตัวแปรที่ใช้ในกระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइट	15
2.4.2 การตอบสนองทางชีวภาพของผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟต	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 ระเบียบและวิธีดำเนินงานวิจัย	21
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	21
3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการชุบเคลือบ	21
3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)	22
3.1.3 สารเคมี	22
3.1.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมผิวรองรับ	22
3.1.3.2 สารเคมีสำหรับชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปไทต์ด้วยไฟฟ้า	22
3.1.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายที่จำลองสภาวะของเหลวในร่างกาย กายมนุษย์	22
3.2 การเตรียมผิวชิ้นงานไทเทเนียมก่อนการชุบเคลือบ	23
3.2.1 การทำความสะอาดผิวชิ้นงานรองรับก่อนการชุบเคลือบ	23
3.2.2 การเตรียมผิวชิ้นงานรองรับก่อนการชุบเคลือบ (Pre-treatment)	23
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	23
3.3.1 การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปไทต์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า	24
3.3.1.1 ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรในการชุบเคลือบต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐาน วิทยาของผิวเคลือบ	24
3.3.1.2 การเปลี่ยนโครงสร้างผลึกให้เป็นไฮดรอกซีแอปไทต์ด้วยสารละลายต่าง (Post treatment)	25
3.3.2 การทดสอบวัสดุทางชีวภาพ	27
3.3.2.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test)	27
3.3.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวเคลือบตัวอย่างในสารละลายที่มีการ จำลองสภาวะของเหลวในร่างกาย (Simulated Body Fluid; SBF)	27
3.3.2.3 การศึกษาการตอบสนองของเซลล์กระดูกต่อผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปไทต์ (Biocompatibility testing)	28
3.4 การวิเคราะห์ผิวเคลือบ	30
3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบด้วยเครื่อง X-Ray Diffraction	30
3.4.2 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยา (Morphology) และองค์ประกอบของผิว เคลือบด้วย SEM-EDX	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4. ผลผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง	32
4.1 ลักษณะทางกายภาพของผิวรองรับและผิวเคลือบ	32
4.2 สมบัติของผิวเคลือบที่เตรียมได้จากกระบวนการชุบเคลือบทางเคมีไฟฟ้า	33
4.2.1 สัณฐานวิทยาและอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของผิวเคลือบ	33
4.2.2 โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบ	36
4.3 สมบัติของผิวเคลือบหลังการแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Post-treatment)	41
4.3.1 สัณฐานวิทยาและอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของผิวเคลือบ (Post-treatment)	41
4.3.2 โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบหลังผ่านกระบวนการ Post-treatment	43
4.4 สมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบที่เตรียมได้	45
4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูก	45
4.4.2 การเปลี่ยนแปลงของผิวเคลือบและการเกิดไฮดรอกซีแอปาทิตหลังการแช่ในสารละลายจำลองของเหลวในร่างกายมนุษย์	46
4.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของผิวเคลือบ	46
4.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังการแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	48
4.4.2.3 โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ	49
4.4.3 ทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกของมนุษย์บนผิวเคลือบ	50
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	52
5.1 สรุปผลการทดลอง	52
5.1.1 กระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทิตด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า	52
5.1.2 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	53

บรรณานุกรม (Bibliography)	55
ภาคผนวก (Appendix)	
ก รอยไหม้บริเวณชิ้นงาน	60
ข ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์	62

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตชนิดต่างๆ	7
4.1	โครงสร้างผลึกสัณฐานวิทยาและขนาดผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทท์ที่ได้จากงานวิจัยนี้	39
4.2	อัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของสัณฐานวิทยาแต่ละชนิดหลังผ่านกระบวนการ Post-treatment	43
4.3	ผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูด้วยวิธี MTT Cytotoxicity Assay	46

รายการรูปภาพ

รูปภาพ	หน้า
2.1 วัสดุฝังในที่ทำจากโลหะ	5
2.2 สันฐานวิทยาของโครงสร้าง $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$ หลังแช่ในสารละลาย NaOH ที่อุณหภูมิ 60°C และอบชิ้นงานที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	9
2.3 แผนภาพการชุบเคลือบผิวแบบใช้ไฟฟ้าในงานวิจัยนี้	10
2.4 แผนภาพความสัมพันธ์การละลายของแคลเซียมฟอสเฟตที่ pH ต่าง ๆ ในระบบของ $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{-PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ ที่อุณหภูมิ 37°C	13
2.5 ลักษณะการโตของผิวเคลือบเมื่ออัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับต่ำและอัตรา การเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับสูง	14
2.6 สันฐานวิทยาของผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักและผิวเคลือบที่พบ เฉพาะโครงสร้างผลึกไฮดรอกซีแอพาไทต์	17
2.7 สันฐานวิทยาของผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite เป็นโครงสร้างหลักอยู่รวม กับ Octacalcium Phosphate หลังจากแช่ในสารละลาย r-SBF ที่เวลาต่างกัน	18
2.8 ภาพถ่ายจาก SEM ของเซลล์กระดูก (MC3T3-E1) ของผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ ผิวเคลือบ FHA ที่ได้จากการเติม NaF ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและผิวไทเทเนียม	19
3.1 ขั้นตอนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วยไฟฟ้าและการวิเคราะห์สมบัติของผิว	26
3.2 ขั้นตอนการทดสอบสมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบ	29
4.1 ลักษณะทางกายภาพของผิวรองรับไทเทเนียมผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตที่ใช้เวลา ในการชุบเคลือบ 30 นาที และผิวเคลือบที่เกิดการหลุดล่อน	32
4.2 สันฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้จากการใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 ที่เวลาและอุณหภูมิต่างกัน	34
4.3 สันฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมจากอุณหภูมิ 60°C ที่เวลา 10 นาที	36
4.4 X-ray diffraction patterns ของผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบที่ความหนา แน่นกระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	37
4.5 X-ray diffraction patterns ของผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบความหนาแน่น กระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 ที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 60°C เมื่อใช้เวลาในการ ชุบเคลือบแตกต่างกัน	38
4.6 สันฐานวิทยาของผิวเคลือบ (รูปที่ 4.2) หลังผ่านกระบวนการทำ Post-treatment ในสารละลาย NaOH 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	42

รายการรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพ	หน้า
4.7 X-ray diffraction patterns ของผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบที่อุณหภูมิ 30 °C ที่เวลา 10 30 และ 60 นาที ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการ Post treatment	44
4.8 น้ำหนักของผิวเคลือบที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C pH7.4 ที่เวลาในการแช่ขึ้นงานแตกต่างกัน	48
4.9 สัณฐานวิทยาและน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปของผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาแตกต่างกัน	49
4.10 X-ray diffraction patterns ของผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักและผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ As-coated ก่อนและหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่ระยะเวลาต่างกัน	50
4.11 การยึดเกาะของเซลล์กระดูก หลังจากเลี้ยงเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบเป็นเวลา 7 วัน	51
5.1 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบที่มีรูพรุน	53
ก.1 ลักษณะผิวชิ้นงานที่มีการใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าต่างกันที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 10 นาที การยึดเกาะอย่างสมบูรณ์ในชุดควบคุม	61

รายการสัญลักษณ์

$\text{\AA}$	=	อังสตรอม
mA/cm^2	=	มิลลิแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
cm^2	=	ตารางเซนติเมตร
kV	=	กิโลโวลต์
θ	=	มุมสะท้อน
λ	=	ความยาวคลื่น
μm	=	ไมโครเมตร
g	=	กรัม

บทที่ 1 บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ในทางการแพทย์นิยมใช้โลหะเพื่องานทางด้านศัลยกรรมออร์โธพีดิกส์ โดยเฉพาะการใช้เป็นวัสดุฝังใน (Implant material) เพื่อทดแทนกระดูกข้อต่อบริเวณที่ร่างกายรับน้ำหนักเช่น ข้อเข่าและข้อสะโพก เมื่ออวัยวะเหล่านี้เกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียหายจากอุบัติเหตุ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้งานเป็น รากฟันเทียมทางทันตกรรมอีกด้วย สำหรับการพิจารณาโลหะที่นำมาใช้งานในร่างกายนั้นควรคำนึงถึงความแข็งแรง (Strength) ความทนต่อการกัดกร่อน (Corrosion resistance) ความทนต่อการขัดสี (Wear resistance) และค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) ที่ควรใกล้เคียงกับกระดูก นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) กับร่างกายเมื่อนำไปใช้งานด้วย [1, 2]

โลหะที่มีการใช้งานทางการแพทย์ได้แก่ เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) โลหะผสมโคบอลต์โครเมียม (Cobalt chromium alloy) และโลหะไทเทเนียมและไทเทเนียมผสม (Titanium and titanium alloy) [3] จากโลหะดังกล่าว เหล็กกล้าไร้สนิมและโลหะผสมโคบอลต์โครเมียมจะเกิดการกัดกร่อนเมื่ออยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน เมื่อเกิดการกัดกร่อนขึ้นแล้วโลหะเหล่านี้จะมีการปลดปล่อยไอออนของโลหะ ได้แก่ โครเมียมไอออน นิกเกิลไอออนและโมลิบดีนัมไอออนเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งไอออนของโลหะเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อที่สัมผัสทำให้เกิดอาการอักเสบและเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็ง[1-4] ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับโลหะที่มีการใช้งานทางการแพทย์แล้วไทเทเนียมเป็นโลหะที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้งาน เนื่องจากมีสมบัติเด่นในด้านความแข็งแรง ความทนต่อการกัดกร่อน และมีค่ามอดูลัสของยังใกล้เคียงกับกระดูกของมนุษย์มากกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมและโลหะผสมโคบอลต์โครเมียม [1, 2, 4, 5] อย่างไรก็ตามโลหะไทเทเนียมที่ฝังในร่างกายนั้นไม่สามารถสร้างพันธะที่แข็งแรงกับกระดูกได้ส่งผลให้เกิดช่องว่างขึ้นในบริเวณรอยต่อระหว่างวัสดุฝังในและเนื้อเยื่อกระดูกหรืออาจมีเนื้อเยื่ออื่นปกคลุมในบริเวณดังกล่าว ส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการรักษา รวมทั้งสร้างความเจ็บปวดให้กับผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีแนวทางในการพัฒนาพื้นผิว (Surface modification) ของโลหะให้มีความหยาบและเป็นรูพรุนเพื่อให้เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งผลดังกล่าวจะช่วยให้เซลล์กระดูกสามารถยึดเกาะกับวัสดุฝังในได้ดีขึ้น [2, 5]

ปัจจุบันมีแนวทางในการปรับปรุงพื้นผิวโลหะฝังในโดยการเคลือบผิว (Surface coating) ด้วยวัสดุที่มีความว่องไวทางชีวภาพ (Bioactive material) เพื่อลดปัญหาดังกล่าว โดยผิวเคลือบที่เลือกใช้นั้นต้องไม่เป็นพิษหรือเกิดปฏิกิริยาต่อต้านใดๆ จากร่างกาย โดยเทคนิคการเคลือบผิววัสดุฝังในเป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับการนิยมนำมาเคลือบได้แก่สารประกอบไฮดรอกซีแอปพาไทท์

(Hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HA) ซึ่งเป็นวัสดุเซรามิกส์ที่มีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกับกระดูกและฟันที่มีอยู่ในธรรมชาติ [1, 2, 4, 5] และมีสมบัติความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ (Biocompatible) เนื่องต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีในร่างกาย และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (Bioinert) อีกทั้งยังสามารถสลายตัวได้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต (Biodegradable) เมื่อมีการเจริญของเนื้อเยื่อหรือกระดูกเข้ามาแทนที่ [3-6] นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุฝังในที่ผ่านการเคลือบสารไฮดรอกซีแอปาทาइटบนผิวชิ้นงาน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับกระดูกรวมทั้งช่วยเพิ่มอายุการใช้งานของวัสดุฝังในได้อีกด้วย [1, 2, 5]

โดยในงานวิจัยนี้ได้เคลือบสารประกอบไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ เคลือบบนชิ้นงานที่มีความซับซ้อน [7] เช่น รากฟันเทียม (Root implant) ได้ และสามารถเคลือบได้ที่อุณหภูมิห้องทำให้ไม่มีผลด้านความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องนอกจากนี้ยังสามารถปรับส่วนผสมทางเคมีในน้ำยาชุบเคลือบเพื่อให้ได้ผิวเคลือบที่มีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสตามต้องการได้

การดำเนินงานวิจัยในเบื้องต้นได้มีการทดลองศึกษาการเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า เบื้องต้นร่วมกับ ปิยนันท์ พันบุรี [8] ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีวัสดุ คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี จากผลการทดลองพบว่าตัวแปรที่ใช้ในกระบวนการชุบเคลือบผิวมีผลต่อโครงสร้างผลึก (Crystal structure) และสัณฐานวิทยา (Morphology) ของผิวเคลือบที่เตรียมได้ จากผลดังกล่าวผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าความแตกต่างของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาอาจส่งผลต่อการนำไปใช้งานในร่างกาย ในงานวิจัยนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของตัวแปรในการเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบอย่างเป็นระบบมากขึ้น และมีการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบที่เตรียมได้ เช่น การศึกษาความเป็นพิษการเปลี่ยนแปลงของผิวเคลือบในด้านการเหนียวทำให้เกิดกระดูกใหม่เมื่อมีการใช้งานในสารละลายจำลองของเหลวในร่างกายมนุษย์ และการตอบสนองต่อเซลล์กระดูก เพื่อให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางวัสดุศาสตร์และทางชีวภาพ และสามารถพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อใช้ในการปรับปรุงวัสดุให้มีความเหมาะสมกับการใช้งานทางการแพทย์อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวแปรในกระบวนการชุบเคลือบผิวทางเคมีไฟฟ้าต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่ได้

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้จากกระบวนการชุบเคลือบทางเคมีไฟฟ้ากับความเป็นพิษของเซลล์กระดูก (Cytotoxicity testing)
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่ได้จากกระบวนการชุบเคลือบผิวทางเคมีไฟฟ้ารวมทั้งการชักนำให้เกิดกระดูก หลังจากผิวเคลือบมีการแช่ในสารละลายที่มีการจำลองสภาวะของเหลวในร่างกายมนุษย์ (Simulated Body Fluid; SBF)
4. เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบ โดยพิจารณาลักษณะของเซลล์ ขนาด รูปร่าง การยึดเกาะรวมถึงปริมาณเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบที่เตรียมได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการชุบเคลือบทางเคมีไฟฟ้าบนผิววัสดุไทเทเนียม เกรด 2 ตามมาตรฐาน ASTM B265 (Commercially Pure Titanium Grade2; cp-Ti Grade2) ขนาด 1×2 ตารางเซนติเมตร ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย แคลเซียมไนเตรท ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.042 โมลาร์ และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ (โดยมีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca/P) ในสารละลาย เท่ากับ 1.67)
2. ศึกษาผลของตัวแปรในการเคลือบได้แก่ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเคลือบต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ
3. ศึกษาผลการตอบสนองของผิวเคลือบเมื่อมีการใช้งานทางการแพทย์ได้แก่ความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูก การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบเมื่อมีการสัมผัสโดยตรงกับสารละลายจำลองสภาวะของเหลวในร่างกายมนุษย์และการตอบสนองกับเซลล์กระดูกเมื่อมีการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

บทที่ 2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า นั้น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเคลือบผิวโลหะฝังในได้ เนื่องจากไฮดรอกซีแอปาทาइटมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกเพราะมีลักษณะเป็นรูพรุน เป็นการเพิ่มการยึดเกาะระหว่างกระดูกและโลหะฝังในให้ดีขึ้น สำหรับการเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการนี้ โครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่ได้ขึ้นอยู่กับตัวแปรที่ใช้ในการชุบเคลือบ เช่น อุณหภูมิของสารละลาย และเวลาที่ใช้ในการเคลือบ ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ เช่น การชักนำให้เกิดกระดูก ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กระดูก การเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกมนุษย์บนพื้นผิววัสดุเมื่อนำไปใช้งานในร่างกาย ซึ่งในบทนี้จะได้กล่าวถึงสมบัติของสารประกอบไฮดรอกซีแอปาทาइटที่ใช้งานทางการแพทย์ รวมทั้งหลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการเกิดผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.1 วัสดุทางการแพทย์

เมื่อกล่าวถึงวัสดุทางการแพทย์นั้นหมายถึง วัสดุที่ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อนำมาใช้งานภายในร่างกายมนุษย์ เช่น เครื่องมือหรืออุปกรณ์ต่างๆ โดยมีจุดประสงค์ในการนำมาใช้งาน เพื่อลดอาการบาดเจ็บ หรือทดแทน เปลี่ยนแปลงส่วนต่างๆ ภายในร่างกาย[4] โดยในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटบนชิ้นงานโลหะไทเทเนียมด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าพร้อมทั้งศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของผิวเคลือบที่เตรียมได้ ดังนั้นจึงขอกำหนดเฉพาะวัสดุชีวภาพ 2 ชนิด คือ โลหะฝังในและสารประกอบไฮดรอกซีแอปาทาइट

2.1.1 โลหะฝังใน (Implant metals)

โลหะมักถูกนำมาใช้งานในการผลิตอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ อย่างแพร่หลาย รวมทั้งนำมาใช้เป็นวัสดุฝังในเช่น รากฟันเทียม (Root implant) [9] ข้อเทียม (Knee implant) [10] และข้อสะโพกเทียม (Hip implant)[11]แสดงดังรูปที่ 2.1เพื่อทดแทนชิ้นส่วนกระดูกที่เกิดความเสียหายจากอุบัติเหตุหรือจากการเจ็บป่วย เนื่องจากโลหะเป็นวัสดุที่มีความแข็งแรง ความคงทนและมีความเหนียวไม่เกิดการแตกหักเสียหายในขณะใช้งานแต่ไม่ใช่โลหะทุกประเภทที่สามารถนำมาใช้งานทางการแพทย์ได้ทั้งหมดโดยโลหะที่สามารถนำมาใช้งานทางการแพทย์ได้นั้นต้องมีสมบัติทนทานต่อการกัดกร่อนได้ดีเมื่ออยู่ภายในร่างกาย

อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการสัมผัสและต้องมียางมอดุลัสใกล้เคียงกับกระดูกเพื่อลดการสลายตัวของกระดูกโดยรอบบริเวณที่มีการสัมผัสกับวัสดุ [2, 4]



รูปที่ 2.1 วัสดุฝังในที่ทำจากโลหะ[9-11]

สำหรับโลหะที่นำมาใช้งานในทางการแพทย์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มโลหะมีค่า (Precious metals) และกลุ่มโลหะทั่วไปสำหรับโลหะมีค่าเป็นโลหะที่อยู่ในกลุ่มทอง เงิน และแพลทินัม โลหะเหล่านี้มีความทนทานต่อการกัดกร่อนได้ดี แต่ไม่นิยมนำมาผลิตเป็นวัสดุฝังใน เพราะมีราคาแพง และมีสมบัติทางกลต่ำจึงนิยมนำมาใช้ในทางทันตกรรมเท่านั้น สำหรับโลหะทั่วไปเป็นโลหะที่อยู่ในกลุ่ม นิกเกิลผสมไทเทเนียมเหล็กกล้าไร้สนิมโลหะผสมโคบอลต์โครเมียม โลหะไทเทเนียมและโลหะไทเทเนียมผสมซึ่งโลหะแต่ละประเภทมีสมบัติที่แตกต่างกันรวมถึงการนำไปใช้งานที่แตกต่างกันตามจุดประสงค์ สำหรับโลหะในกลุ่มที่ 2 นี้ มีความแข็งแรงทนทานอีกทั้งมีราคาต่ำกว่าเมื่อเทียบกับโลหะในกลุ่มแรกจึงมีการนำมาใช้งานและพบเห็นได้ง่ายในทางการแพทย์ ทั้งทางด้านทันตกรรม ศัลยกรรมกระดูก ศัลยกรรม ออร์โธพีดิกส์และผลิตเป็นเครื่องมือแพทย์[2, 5] เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโลหะที่มีการใช้งานทั่วไปพบว่าโลหะไทเทเนียมและไทเทเนียมผสมได้รับความนิยมนำมาผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ เช่น รากฟันเทียม ข้อต่อเทียม เนื่องจากมีความแข็งแรงสูง สามารถทนทานต่อการกัดกร่อนจากสภาพแวดล้อมภายในร่างกายได้ดี และที่สำคัญเนื้อเยื่อภายในร่างกายสามารถสร้างพันธะเชื่อมติดกับโลหะไทเทเนียมได้ดีกว่าโลหะชนิดอื่น ทำให้มีความเสถียรบริเวณรอยต่อ (Interface) ของเนื้อเยื่อและอุปกรณ์ทางการแพทย์ได้ดี[2, 5]

อย่างไรก็ตามเมื่อนำโลหะไทเทเนียมไปใช้ในร่างกายยังคงพบปัญหาเนื่องจากไม่สามารถสร้างพันธะที่แข็งแรงกับกระดูกได้ดี เป็นผลให้เกิดการหลวมหรือมีเนื้อเยื่อมาห่อหุ้มแทนที่จะเป็นกระดูกจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการรักษาไม่ดีเท่าที่ควร [2, 5]

จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาปรับปรุงให้โลหะไทเทเนียมสามารถสร้างพันธะที่แข็งแรงกับกระดูกได้ โดยการเคลือบผิวด้วยสารที่มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้กระดูกเข้ามายึดเกาะและสร้างพันธะที่แข็งแรง โดยสารที่นำมาใช้งานในจุดประสงค์นี้จะต้องมีลักษณะเป็นรูพรุน เพื่อให้เหมาะกับการที่เนื้อเยื่อ

กระดูกสามารถเจริญเติบโตและสร้างพันธะที่แข็งแรงกับโลหะฝังในได้ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการหลวมระหว่างเนื้อเยื่อกระดูกและโลหะฝังในบริเวณที่มีการใช้งาน สารที่ได้รับความสนใจและนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ สารประกอบไฮดรอกซีแอปพาไทท์

จากงานวิจัยของ Coathup และคณะ [12] เกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของกระดูกกับโลหะไทเทเนียมที่นำมาทำข้อเทียม โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโลหะไทเทเนียมที่มีผิวขรุขระกับโลหะไทเทเนียมที่ผ่านการเคลือบด้วยสารประกอบไฮดรอกซีแอปพาไทท์ พบว่าโลหะที่เคลือบด้วยสารประกอบไฮดรอกซีแอปพาไทท์มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับกระดูกมากกว่า ทำให้การยึดเกาะระหว่างโลหะฝังในกับกระดูกดีขึ้นและยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของวัสดุอีกทางหนึ่งด้วย

นอกจากนี้ยังมีรายงาน[2, 6, 13]ว่าไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่เตรียมขึ้นได้นั้นมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกับกระดูกและฟันที่มีอยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้เนื้อเยื่อกระดูกในร่างกายเกิดการยึดเกาะหรือช่วยในการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (Bioactive) และยังสามารถสลายตัวเองได้เมื่อเกิดเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมา (Biodegradable) อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อที่มาสัมผัส (Biocompatible) ดังนั้นการเคลือบสารไฮดรอกซีแอปพาไทท์บนผิววัสดุฝังในสามารถช่วยลดปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ โดยในหัวข้อต่อไปจะเป็นการกล่าวถึงสมบัติของไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่ใช้งานทางการแพทย์

2.1.2 สารประกอบไฮดรอกซีแอปพาไทท์

สารประกอบอะพาไทท์จัดเป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยแคลเซียมและฟอสเฟต ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ บรูไซต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟตและไฮดรอกซีแอปพาไทท์ เป็นต้น ซึ่งสารประกอบอะพาไทท์แต่ละชนิดมีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca/P) ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 ดังแสดงในตารางที่ 2.1 สำหรับสารประกอบไฮดรอกซีแอปพาไทท์นั้น มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P เท่ากับ 1.67 เหมือนกับ ไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่เป็นส่วนประกอบของกระดูกในสิ่งมีชีวิต [2, 14]

ตารางที่ 2.1 สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตชนิดต่างๆ [14]

Ca/P	ชื่อ	ตัวย่อ	สูตรเคมี
2.00	Tetracalcium phosphate (Hilgenstockite)	TCP (TTCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
1.67	Hydroxyapatite Amorphous calcium phosphate	HA ACP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ $\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1.50	Tricalcium phosphate	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.3	Octacalcium phosphate	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.00	Dicalcium phosphate dihydrate (Brushite)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.00	Dicalcium phosphate (Montite)	DCP	CaHPO_4
1.00	Calcium pyrophosphate (α, β, γ)	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
0.70	Heptacalcium phosphate (Tromelite)	HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$
0.65	Tetracalcium dihydrogen phosphate	TDHP	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$
0.50	Monocalcium phosphate monohydrate	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.50	Calcium metaphosphate (α, β, γ)	CMP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

สำหรับการสังเคราะห์สารประกอบอะปาทไทต์ทำได้โดยการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับฟอสเฟตไฮดรอกไซด์สภาวะที่เป็นกรดหรือด่าง สารประกอบที่สังเคราะห์ได้นั้นจะมีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P สูงสามารถเกิดได้ในสารละลายต่าง ส่วนสารประกอบที่มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ต่ำ สามารถเกิดได้ในสารละลายกรด ซึ่งการสังเคราะห์สารประกอบไฮดรอกซีอะปาทไทต์ที่มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P สูงนั้น สามารถเตรียมขึ้นได้จากสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกลางหรือด่างเท่านั้น เพราะสารประกอบไฮดรอกซีอะปาทไทต์จะละลายในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด[14]

ไฮดรอกซีอะปาทไทต์ที่อยู่ในรูป $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ถูกนำมาใช้งานทางการแพทย์อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างผลึกเหมือนกับไฮดรอกซีอะปาทไทต์ที่มีในกระดูกของสิ่งมีชีวิต จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้งานเป็นวัสดุทางการแพทย์ แต่ไฮดรอกซีอะปาทไทต์ยังมีข้อเสียเรื่องสมบัติเชิงกลที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับกระดูกมนุษย์จึงไม่นิยมนำมาใช้งานเป็นกระดูกส่วนที่ต้องรับน้ำหนักมากๆ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การใช้งานสารไฮดรอกซีอะปาทไทต์เป็นไปอย่างจำกัด โดยมักใช้ในลักษณะเป็นผงเพื่อ

ซ่อมแซมกระดูกในส่วนที่ไม่ต้องรับน้ำหนักหรือการนำไฮดรอกซีแอปตาไทท์ไปเคลือบลงบนผิวของโลหะ เป็นต้น [15, 16]

นอกจากสารประกอบไฮดรอกซีแอปตาไทท์จะมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนไฮดรอกซีแอปตาไทท์ที่พบในกระดูกสิ่งมีชีวิตแล้ว สมบัติที่สำคัญที่ทำให้ไฮดรอกซีแอปตาไทท์มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้งานเป็นวัสดุทางการแพทย์ ได้แก่

1. ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

ไฮดรอกซีแอปตาไทท์มีความสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อกระดูกในร่างกายได้ ทำให้เนื้อเยื่อกระดูกมีการเจริญเติบโตและผสานเข้ากับไฮดรอกซีแอปตาไทท์ได้ โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย

2. ความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพ (Bioactive)

ไฮดรอกซีแอปตาไทท์เป็นวัสดุที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์กระดูกเข้ามายึดเกาะกับตัวมันได้ เมื่อใช้ไฮดรอกซีแอปตาไทท์เคลือบผิวโลหะฝังใน จึงเป็นการช่วยให้เซลล์กระดูกสามารถยึดเกาะกับโลหะฝังในได้ดีขึ้นด้วย

3. การสลายตัวได้เมื่อมีการใช้งานในระยะหนึ่ง (Biodegradable)

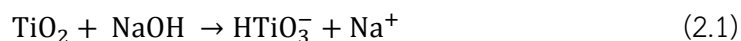
ไฮดรอกซีแอปตาไทท์เป็นวัสดุที่สามารถดูดซับ (Bioresorbable) เนื้อเยื่อหรือเซลล์กระดูกในร่างกายสิ่งมีชีวิตพร้อมทั้งสามารถสลายตัวได้ โดยไฮดรอกซีแอปตาไทท์จะสลายตัวหลังจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์กระดูกเข้ามายึดเกาะจนในที่สุดไฮดรอกซีแอปตาไทท์จะถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อหรือกระดูกเหล่านั้นๆโดยอัตราการสลายตัวของไฮดรอกซีแอปตาไทท์ จะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหรือเซลล์กระดูกที่เกิดขึ้น

2.2 กระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปตาไทท์ด้วยไฟฟ้า

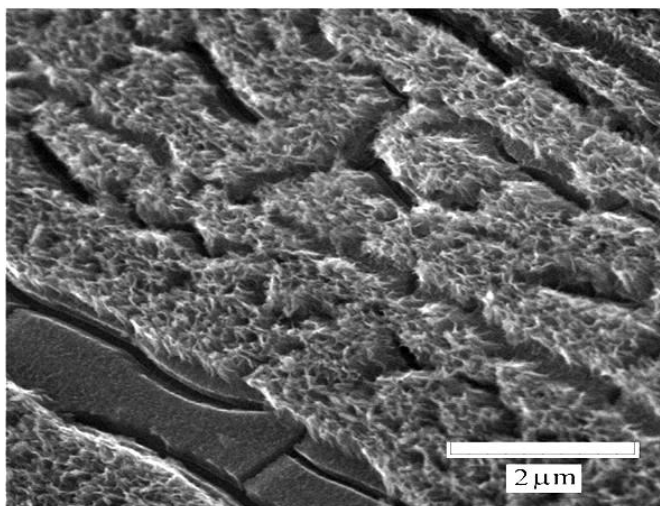
การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปตาไทท์ด้วยกระบวนการชุบเคลือบทางเคมีไฟฟ้า มีรายละเอียดดังนี้

2.2.1 การเตรียมผิวรองรับไทเทเนียม

สำหรับกระบวนการเตรียมผิวขึ้นงานก่อนการชุบเคลือบนั้นถือได้ว่าเป็นสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ [17] พบว่าการแซ่ขึ้นงานไทเทเนียม (ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว) ในสารละลาย NaOH ที่อุณหภูมิสูงก่อนการชุบเคลือบหรือที่เรียกว่ากระบวนการ Pre-treatment ช่วยให้เกิด hydrogel layer บนผิวไทเทเนียมได้ ดังแสดงดังสมการที่ (2.1) [17]



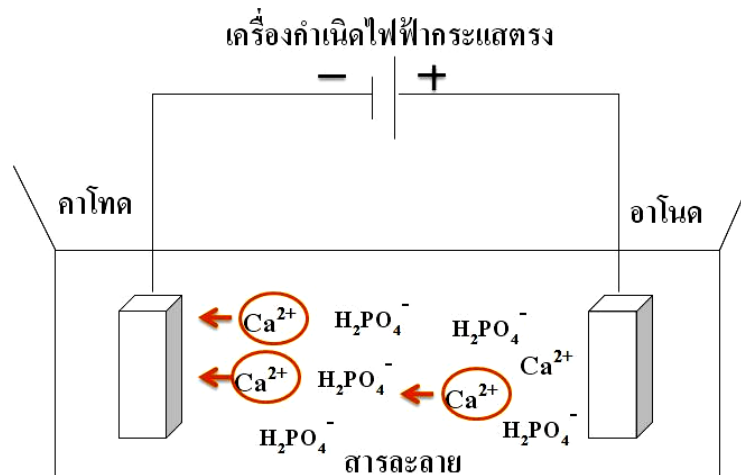
โดยระหว่างการแช่ใน NaOH ส่งผลให้ TiO_2 ที่อยู่บนผิวไทเทเนียมมีการละลายออกเป็นบางส่วนซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นผลมาจาก OH^- ทำปฏิกิริยากับผิวหน้าชั้นงานไทเทเนียมเกิดเป็น HTiO_3^- โดย HTiO_3^- ที่เกิดขึ้นนี้จะช่วยเหนี่ยวนำให้อิออนของ Ca^{2+} ในสารละลายซบเคลือบเคลื่อนที่มาทำปฏิกิริยาบริเวณหน้าผิวรองรับได้มากขึ้น จึงทำให้เกิดไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงาน[18, 19] ว่า ถ้านำผิวชั้นงานที่ผ่านกระบวนการ Pre-treatment มาอบที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลาหนึ่งจะเกิดเป็นสารประกอบ $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$ ซึ่งมีลักษณะเป็นตาข่ายเชื่อมกันเป็นร่างแห ดังแสดงในรูปที่ 2.1 [18] ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้สามารถช่วยเพิ่มความแข็งแรงในการยึดเกาะระหว่างผิวรองรับกับผิวเคลือบได้



รูปที่ 2.2 สัณฐานวิทยาของโครงสร้าง $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$ หลังแช่ในสารละลาย NaOH ที่อุณหภูมิ 60 °C และอบชิ้นงานที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง [18]

2.2.2 หลักการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์ด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การชุบเคลือบผิวด้วยไฟฟ้า (Electrodeposition) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดผิวเคลือบจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) บนชิ้นงานที่ต้องการเคลือบผิวโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า โดยระบบการชุบเคลือบผิวด้วยไฟฟ้าต้องมีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรง (Power supply) สารละลายที่ประกอบด้วยไอออนที่ต้องการชุบเคลือบ (Electrolyte) สายไฟ (Conductor) ขั้วคาโทด (Cathode) และขั้วแอโนด (Anode) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แผนภาพการชุบเคลือบผิวแบบใช้ไฟฟ้าในงานวิจัยนี้

ในการเคลือบผิวโลหะด้วยไฟฟ้าจะต่อขั้วลบของเครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงเข้ากับชิ้นงาน ส่วนโลหะตัวล่อหรือขั้วอโนด เช่น แพลทินัมจะต่อเข้ากับขั้วบวก ซึ่งขั้วชิ้นงานทั้งหมดจะจุ่มในสารละลาย เมื่อมีการจ่ายกระแสไฟให้แก่วัสดุที่ขั้วอโนดจะเกิดการละลายหรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) ดังสมการที่ (2.2) จากนั้น ที่เกิดจากสมการที่ (2.2) และจากสารละลายไปปรับอิเล็กตรอน (e^-) ที่ขั้วคาโทดและเกิดปฏิกิริยารีดักชันเกิดเป็นผิวเคลือบโลหะตามสมการที่ (2.3)

Oxidation Reaction

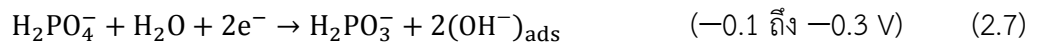


Reduction Reaction



สำหรับการเคลือบผิวเซรามิกส์ด้วยเคมีไฟฟ้านั้นมีหลักการเคลือบคล้ายกับการเคลือบผิวโลหะด้วยไฟฟ้า แต่จะมีรายละเอียดของการเลือกใช้วัสดุและกลไกการเข้าเคลือบที่แตกต่างกัน โดยการเคลือบผิวเซรามิกส์ด้วยเคมีไฟฟ้าบนผิวโลหะนั้น สารละลายจะต้องประกอบด้วยไอออนของเซรามิกส์ที่ต้องการเคลือบ และจะเกิดปฏิกิริยาการเข้าเคลือบด้วยการตกผลึก (Precipitation) บนผิวรองรับ (ต่างจากการชุบเคลือบโลหะที่ต้องมีการถ่ายเทอิเล็กตรอน (Electron transfer) ดังสมการที่ (2.2) และ (2.3)) เมื่อจ่ายกระแสไฟฟ้าไอออนจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วคาโทด ซึ่งกลไกของการเคลือบผิวเซรามิกส์ (ไฮดรอกซีแอปาทาइट) นั้นยังไม่มีที่เข้าใจกันมากนัก แต่ได้มีรายงานการวิจัย [20, 21] เสนอกลไกที่เกิดขึ้นนี้ว่าการเคลือบผิวแคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้านั้นเกี่ยวข้องกับ 3 ปฏิกิริยาหลัก ได้แก่ (1)

ปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า (Electrochemical reaction) (2) ปฏิกิริยากรดต่าง (Acid-base reaction) และ (3) การ precipitation ของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต



โดยเมื่อจ่ายกระแสไฟฟ้า (ศักย์ไฟฟ้า) ให้กับชิ้นงานที่เป็นขั้วคาโทด (ในงานวิจัยนี้ใช้ไทเทเนียม) ซึ่งเป็นการเปี่ยงเบนศักย์ไฟฟ้าของขั้วออกจากสภาวะสมดุลในทิศแคโทดิก (Cathodically polarized) มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าดังสมการที่ (2.4)-(2.9) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะต้องมีศักย์ไฟฟ้าที่ต้องการในการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงอยู่ในวงเล็บหลังสมการ [20, 22]

การเกิดปฏิกิริยาในแต่ละปฏิกิริยานั้นขึ้นกับปริมาณการเปี่ยงเบนขั้วหรือปริมาณศักย์เกินที่ใช้เพื่อให้เกิดการเข้าเคลือบ (Deposition overpotential) เช่นการเกิดปฏิกิริยาในสมการที่ (2.6) ต้องใช้ปริมาณศักย์ไฟฟ้าอยู่ในช่วง 1.5-3.0 V ซึ่งมากกว่าที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่ (2.4) (2.5) (2.7) (2.8) และ (2.9) ซึ่งหากว่าปริมาณ Overpotential ไม่สูงมากพอปฏิกิริยาในสมการที่ (2.6) ก็จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ โดยปริมาณ Overpotential นั้นนอกจากจะขึ้นกับความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าที่จ่ายให้กับระบบแล้วยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสารละลาย ดังแสดงในสมการของ Tafel (สมการที่ (2.10)) [23]

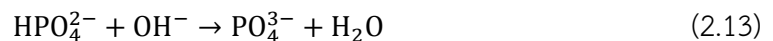
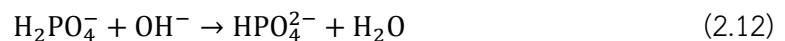
$$\eta_c = \beta_c (\log \frac{i_c}{i_0}) \quad (2.10)$$

η_c	เป็น	ปริมาณศักย์เกิน (Overpotential) (โวลต์)
i_0	เป็น	ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าแลกเปลี่ยน (Exchange current density) (มิลลิแอมแปร์ต่อพื้นที่)
i_c	เป็น	ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า (Current density) ที่ขั้วคาโทด (มิลลิแอมแปร์ต่อพื้นที่)
β_c	เป็น	ค่าคงที่ของครึ่งปฏิกิริยา (Half cell reaction constant) (โวลต์)

โดย
$$\beta_c = \frac{2.3RT}{\alpha nF} \quad (2.11)$$

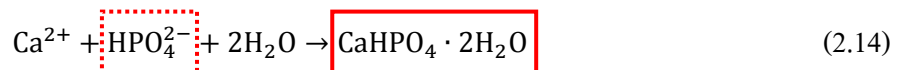
R	เป็น	ค่าคงที่ของก๊าซ (8.314 จูลต่อโมล)
α	เป็น	สัมประสิทธิ์การถ่ายเท (Transfer coefficient)
T	เป็น	อุณหภูมิสัมบูรณ์ (K)
n	เป็น	จำนวนอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา
F	เป็น	ค่าคงที่ฟาราเดย์ (96,491 คูลอมบ์ต่อน้ำหนักสมมูล)

จะเห็นว่า Overpotential ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอุณหภูมิ (T) ในสมการที่ (2.11) โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ทำให้ Overpotential เพิ่มขึ้น โอกาสในการเกิดปฏิกิริยาในสมการที่ (2.4)-(2.7) มีมากขึ้นเป็นผลให้ pH บนผิวชิ้นงานไทเทเนียม (local pH) สูงขึ้น (ผลจาก OH^- ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา) โดยปริมาณ OH^- ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นสารตั้งต้นของ acid-base reaction ดังสมการที่ ((2.12) – (2.13)) [22]

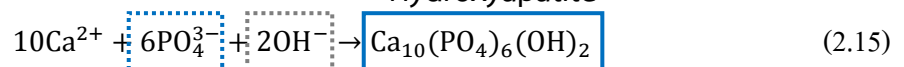


โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น (HPO_4^{2-} และ PO_4^{3-}) จะเป็นตัวกำหนดชนิดของผิวเคลือบตามปฏิกิริยาการ precipitate ดังนี้

Brushite

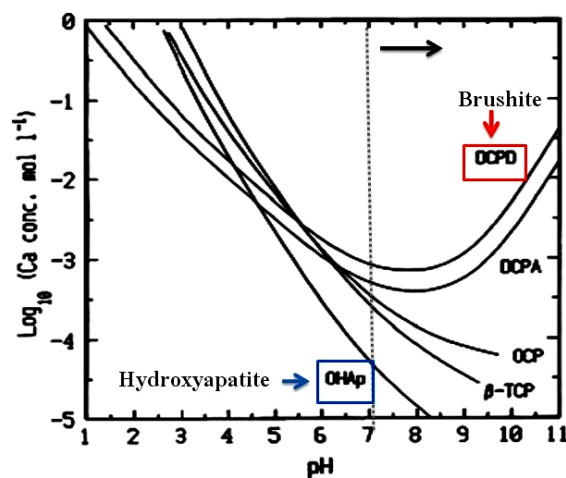


Hydroxyapatite



จะเห็นว่าชนิดของแคลเซียมฟอสเฟตที่เคลือบได้ขึ้นอยู่กับ local pH บนผิวชิ้นงานไทเทเนียม โดยมีการรายงานว่าผิวเคลือบ Brushite จะเกิดขึ้นได้เมื่อมี local pH ประมาณ 4-5 ในขณะที่ผิวเคลือบ ไฮดรอกซีแอพาไทท์จะเกิดขึ้นได้เมื่อมี local pH ประมาณ 7 ขึ้นไป [21]จากสมการที่ (2.13) การเกิด Brushite นั้นต้องการ เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ไฮดรอกซีแอพาไทท์ต้องการ PO_4^{3-} และ OH^- เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยา ดังนั้นหากมี PO_4^{3-} และมากพอ ผิวเคลือบที่ได้จะมีโอกาสเป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้มากกว่า Brushite โดยแหล่งสำคัญของ OH^- ได้มาจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำ (สมการที่ (2.6)) ซึ่งระบบจะต้องมีศักย์เกินมากพอจึงจะได้ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ตามต้องการ

สำหรับการเคลือบผิวแคลเซียมฟอสเฟตด้วยไฟฟ้านั้น นอกจากจะเกิดโครงสร้างผลึกไฮดรอกซีแอพาไทท์บนผิวชิ้นงานแล้วยังสามารถเกิดโครงสร้างผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น Brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD) ซึ่งโครงสร้างผลึกชนิดนี้ไม่สามารถนำไปใช้งานในร่างกายซึ่งมี $\text{pH} \approx 7.4$ ได้ เนื่องจากที่ pH ดังกล่าวโครงสร้าง Brushite มีการละลายออกของแคลเซียมมากกว่า ไฮดรอกซีแอพาไทท์ [24-27] ดังแสดงในแผนภูมิการละลายของแคลเซียมฟอสเฟตที่ pH ต่างๆ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แผนภาพความสัมพันธ์การละลายของแคลเซียมฟอสเฟตที่ pH ต่าง ๆ ในระบบของ $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{--H}_3\text{--PO}_4\text{--H}_2\text{O}$ ที่อุณหภูมิ 37°C [24]

ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำ Brushite ไปใช้ในสารละลายที่มีสภาวะเป็นกลางหรือด่าง เช่น สารละลาย NaOH หรือ KOH ที่ pH 10 เพื่อให้มีการเปลี่ยน (Transform) โครงสร้างผลึกจาก Brushite ไปเป็น ไฮดรอกซีแอพาไทท์ [7, 27] ซึ่งเรียกกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างผลึกนี้ว่า Post-treatment ก่อนนำไปใช้งาน

2.2.3 การเกิดผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟต

จากรายงานวิจัย [21, 28, 29] พบว่าการเกิดผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตในกระบวนการชุบเคลือบทางเคมีไฟฟ้าเป็นผลมาจากการ precipitate ของแคลเซียมฟอสเฟตจากสารละลาย สันฐานวิทยาที่เกิดขึ้นบนผิวรองรับนั้นเป็นผลมาจากการเกิดนิวเคลียส (Nucleation) และการโต (Growth) ของผลึกแคลเซียมฟอสเฟต สำหรับกระบวนการเกิดนิวเคลียสของผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตนั้นยังไม่มีเป็นที่

เข้าใจกันมากนัก แต่ได้มีรายงานวิจัย[28-30] ที่เสนอกลไกในการเกิดผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตโดยอาศัยกลไกเดียวกับการเกิดผิวเคลือบของโลหะ [31] ดังสมการที่ (2.16) และ (2.17) [28, 30]

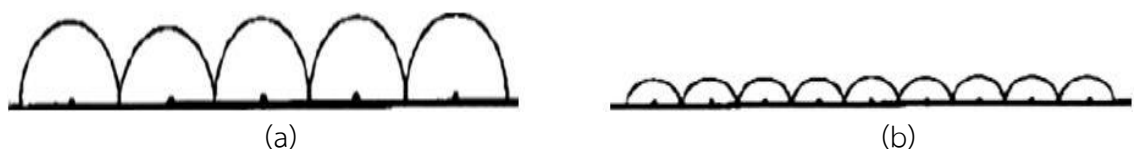
$$N = N_0 [1 - \exp(-At)] \quad (2.16)$$

N	เป็น	จำนวนนิวเคลียสที่เกิด (โต) จาก Embryo
N_0	เป็น	จำนวน Nucleation sites หรือ Embryo
t	เป็น	เวลา (วินาที)
A	เป็น	อัตราการเกิดนิวเคลียส (Nucleation rate) ซึ่งมีความสัมพันธ์ตามสมการ (2.17) [31]

$$A = K_1 i_0 \exp\left(-\frac{K_2}{\eta^2}\right) \quad (2.17)$$

K_1, K_2	เป็น	ค่าคงที่อิสระของศักย์เกิน (Overpotential-independent constants)
i_0	เป็น	ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าแลกเปลี่ยน (Exchange current density)
η	เป็น	ปริมาณศักย์เกิน (Overpotential) (โวลต์)

จากสมการ (2.16) หากอัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับสูง จะมีปริมาณนิวเคลียสของแคลเซียม-ฟอสเฟตเกิดขึ้นบนผิวรองรับพร้อมกันกระจายทั่วชิ้นงาน เป็นผลมาจากการมีศักย์เกินมาก [31] (จากสมการที่ (2.17)) นิวเคลียสที่เกิดขึ้นจะโตพร้อมกันจนเกิดการชนกัน ทำให้ได้สัณฐานวิทยาที่มีขนาดเล็กละเอียด แต่หากปริมาณศักย์เกินมีน้อยส่งผลให้อัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับต่ำ มีพื้นที่ให้นิวเคลียสโตได้อย่างเต็มที่ สัณฐานวิทยาที่ได้จึงมีขนาดใหญ่ ซึ่งการโตของผิวเคลือบทั้งสองลักษณะที่กล่าวไปข้างต้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะการโตของผิวเคลือบเมื่อ (a) อัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับต่ำและ (b) อัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับสูง [31]

2.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจากบรูไซต์เป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์

ได้มีรายงาน[24, 26, 32] พบว่าเมื่อแช่ผิวเคลือบ Brushite ในสารละลายที่มี pH สูงกว่า 5 จะเกิดการละลายออกของ และ PO_4^{3-} ได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับไฮดรอกซีแอพาไทท์ เป็นผลให้ความเข้มข้นของไอออนดังกล่าวในบริเวณผิวรองรับเพิ่มขึ้น ซึ่งไอออนที่เกิดขึ้นนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับ OH^- บริเวณผิวหน้าชิ้นงานและเกิดการ precipitate ของโครงสร้างที่มีความเสถียรกว่าเช่นไฮดรอกซีแอพาไทท์ (ตามสมการ(2.15)) เป็นผลให้พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้น

จากการศึกษาของ ปิยนันท์ [8] พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจาก Brushite เป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้โดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shih [33] และ Abdel-Aal [34] และได้มีรายงาน [25, 27] เพิ่มเติมว่าหากนำชิ้นงานที่มีแคลเซียมฟอสเฟตชนิด Monetice และ Brushite ที่มีสัณฐานวิทยาแบบแผ่น (plate) แช่ในสารละลาย NaOH เป็นเวลาตั้งแต่ 2-48 ชั่วโมง จะสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้โดยสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังการเปลี่ยนโครงสร้างขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NaOH โดยเมื่อใช้ NaOH ความเข้มข้นสูงกว่า 20% โดยน้ำหนัก สัณฐานวิทยามีการเปลี่ยนแปลงโดยมีขนาดเล็กและละเอียดมากขึ้น แต่ถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ NaOH ต่ำกว่า 20% โดยน้ำหนัก จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก Brushite เป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเกิดขึ้นนอกจากนี้ยังสามารถพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจาก Brushite เป็นโครงสร้างไฮดรอกซีแอพาไทท์หลังแช่ในสารละลาย SBF ที่มี pH 7.4 [26] อีกด้วย

2.4 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในหัวข้อนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาทางวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของตัวแปรที่ใช้ในกระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองทางชีวภาพของผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟต เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการดำเนินงานวิจัยชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์ต่อไป โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 ผลของตัวแปรที่ใช้ในกระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์

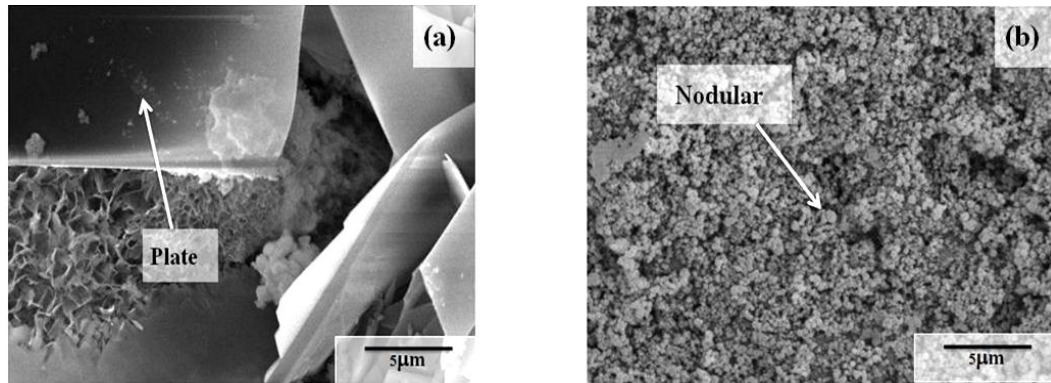
ตัวแปรในกระบวนการเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์ด้วยไฟฟ้า ได้แก่ ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า[8, 34, 35] pH ของสารละลาย [7, 8, 21, 35, 36] อุณหภูมิของสารละลาย [8, 15, 35] และเวลาที่ใช้ใน

การเคลือบ[8, 15] ล้วนมีผลต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้ ซึ่งผลดังกล่าวอาจส่งผลต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพเมื่อนำผิวเคลือบไปใช้งาน จึงมีการศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรที่ใช้ในการเคลือบโดยมีรายละเอียดดังนี้

การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์จากสารละลายแคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 25-30 °C) โดยใช้ความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าอยู่ในช่วง 0.375-10 mA/cm²[8, 34, 35] ได้ผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดต่างๆ เช่น Brushite และ Octacalcium phosphate (Ca₈H₂(PO₄)₆5H₂O; OCP) [7, 21, 36]ซึ่งโครงสร้างผลึกเหล่านี้มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ต่างไปจาก 1.67 และมีลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นแบบแผ่นที่มีขนาดใหญ่และเปราะ ไม่เหมาะนำมาใช้งานในร่างกาย [21, 35, 36]การเกิดผิวเคลือบนี้เป็นผลมาจาก local pH มีค่าไม่เกิน 7 จึงทำให้แคลเซียมฟอสเฟตชนิดนี้ซึ่งมีความเสถียรในช่วงกรดสามารถเกิดการ precipitate ได้ง่ายกว่าไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่ต้องการสภาวะที่มี local pH สูงกว่า 7 [20, 21] จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า local pH เป็นตัวแปรสำคัญในการกำหนดชนิดของแคลเซียมฟอสเฟตบนผิวรองรับ

pH ของสารละลายที่ใช้ขณะชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์มักใช้อยู่ในช่วง pH 4 – 6 [7, 8, 21, 35, 36] โดยพบว่า pH ของสารละลายที่ใช้ขณะชุบเคลือบมีผลต่อโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่เกิดขึ้นบนชิ้นงานเช่นเดียวกับการความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า จากงานวิจัยของ Shirkanzadeh และคณะ[36] พบว่าการเคลือบผิวด้วยสารละลายในการชุบเคลือบที่ pH 4.2 ผิวเคลือบที่ได้มีโครงสร้างผลึกเป็น OCP (Ca/P = 1.3) แต่เมื่อเพิ่ม pH ของสารละลายขณะชุบเคลือบสูงขึ้นเป็น 6 ในสภาวะการชุบเคลือบเดียวกันผิวเคลือบที่ได้มีโครงสร้างผลึกเป็นไฮดรอกซีแอพาไทต์ (Ca/P = 1.67) โดยไม่เกิดโครงสร้างผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดอื่น เช่น OCP เนื่องจาก pH ของสารละลายที่ใช้ชุบเคลือบที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อ hydroxyl ion (OH^-) บนผิวไทเทเนียม เป็นผลให้ local pH มีค่าสูงขึ้น ทำให้เกิดการเข้าเคลือบของไฮดรอกซีแอพาไทต์บนผิวชิ้นงานได้โดยตรง

ตัวแปรที่มีผลต่อโครงสร้างผลึกและลักษณะสัณฐานวิทยานอกจากความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าและ pH ของสารละลายที่ใช้ชุบเคลือบแล้วยังมีตัวแปรอื่นอีก ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเคลือบ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [8, 15, 35] พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการเคลือบไม่สูงมากนัก (25-40 °C) ผิวเคลือบที่ได้มีโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวเกิดการเข้าเคลือบของแคลเซียมฟอสเฟตชนิด Brushite บนผิวชิ้นงานรองรับ แต่เมื่อชุบเคลือบที่อุณหภูมิสูงขึ้น (มากกว่า 40 °C) สามารถเกิดการเข้าเคลือบของไฮดรอกซีแอพาไทต์บนผิวเคลือบได้โดยตรง และผลของอุณหภูมิยังส่งผลต่อความแตกต่างของสัณฐานวิทยาที่เตรียมได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 สัณฐานวิทยาของ(a) ผิวเคลือบที่มีBrushite เป็นโครงสร้างหลัก
(b) ผิวเคลือบที่พบเฉพาะโครงสร้างผลึกไฮดรอกซีแอพาไทท์ [8]

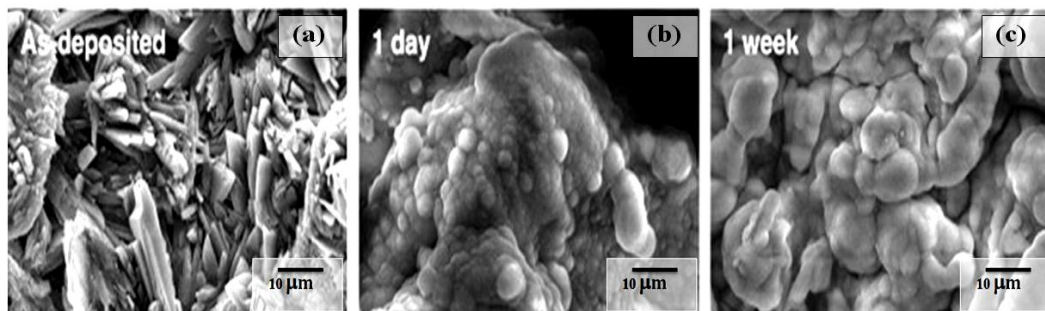
นอกจากนี้งานวิจัยของ Zhao [15] และ ปิยนันท์ พันบุรี [8] พบว่าการเพิ่มเวลาในการชุบเคลือบ ตั้งแต่ 10-60 นาที ส่งผลต่อสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ ทำให้ผิวเคลือบที่ได้มีลักษณะที่แตกต่างกัน จาก รายงานของ Kannan และคณะ [37] ยังพบว่าเมื่อใช้เวลาในการชุบเคลือบนานกว่า 60 นาที ผิวเคลือบ ที่ได้มีลักษณะไม่สม่ำเสมอและเกิดการหลุดลอกแตกหักของผิวเคลือบได้ง่าย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้เวลาในการเคลือบนานที่สุดที่ 60 นาที เพื่อลดการหลุดลอกและการแตกหักของผิวเคลือบ

นอกจากการศึกษาตัวแปรต่างๆ ในกระบวนการเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบแล้ว ยังต้องคำนึงถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุที่เตรียมได้ ได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในร่างกาย การตอบสนองของเซลล์กระดูกโดยตรงบนผิวเคลือบ (ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ การเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบ) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.4.2 การตอบสนองทางชีวภาพของผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟต

ในการผลิตวัสดุฝังในทางการแพทย์ต้องมีส่วนที่เกี่ยวข้องกับร่างกายมนุษย์ ดังนั้นในการผลิตวัสดุฝังในทางการแพทย์หรือการนำไปใช้งานจริงในร่างกาย จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบวัสดุในทางชีวภาพ ได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ รวมถึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของวัสดุในสารละลายจำลองสภาวะในร่างกายมนุษย์ ซึ่งกระบวนการผลิตวัสดุ องค์ประกอบและสมบัติของวัสดุ โดยเฉพาะผิวหน้าที่มีการสัมผัสโดยตรงกับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ ล้วนมีผลต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบวัสดุที่ผลิตขึ้นได้ก่อนนำไปใช้งานจริง ซึ่งจะช่วยในการทำนายผลที่จะเกิดขึ้นเมื่อนำมาทดสอบในสัตว์ทดลองหรือใช้งานในร่างกายมนุษย์ [4]

จากกระบวนการเคลือบผิวทางเคมีไฟฟ้าดังที่กล่าวไปตอนต้นนั้น สามารถเกิดแคลเซียมฟอสเฟตชนิดอื่น เช่น Brushite หรือ OCP ได้ ซึ่งแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจะเกิดการละลายได้ง่ายในสภาวะที่มี pH สูงกว่า 7 (ในร่างกายมี pH ประมาณ 7.4) จากงานวิจัยของ Kuo และคณะ [26] ได้นำผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึกและกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 1-30 วัน พบว่า น้ำหนักของผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึก Brushite เพียงชนิดเดียว มีน้ำหนักลดลงอย่างมากซึ่งแตกต่างจากผิวเคลือบที่มีโครงสร้างไฮดรอกซีแอพาไทต์เพียงชนิดเดียวในผิวเคลือบ แต่หลังจากผ่านไป 7 วัน ผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึก Brushite เพียงชนิดเดียวกลับมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นแต่พบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชิ้นงานที่มีโครงสร้างไฮดรอกซีแอพาไทต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Rakngarm และคณะ [24] ทำการศึกษาผิวเคลือบมี Brushite เป็นโครงสร้างหลักอยู่รวมกับ Octacalcium Phosphate เมื่อแช่ในสารละลาย r-SBF พบว่าหลังจากแช่ผิวเคลือบเป็นเวลา 1 วัน ผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite เป็นโครงสร้างหลักอยู่รวมกับ Octacalcium Phosphate มีการละลายออกอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 2.7) โดยปริมาณของ Brushite จะลดลงตามระยะเวลาในการแช่และพบว่าเกิดไฮดรอกซีแอพาไทต์ขึ้นแทนหลังจากแช่นานกว่า 72 ชั่วโมง

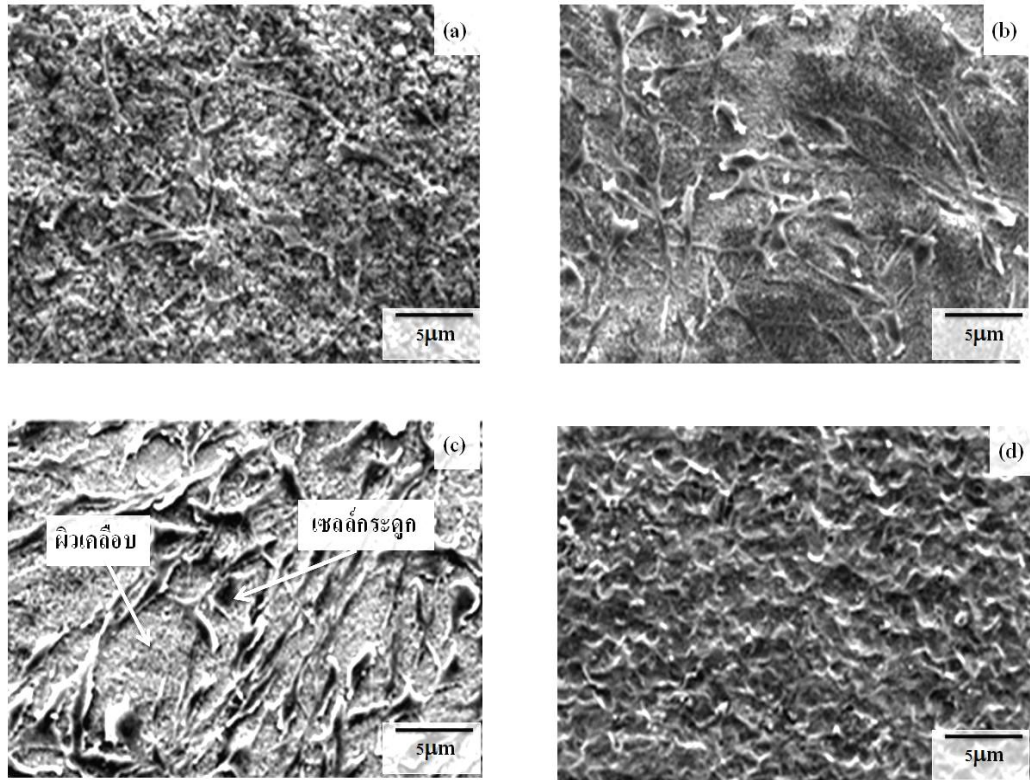


รูปที่ 2.7 สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite เป็นโครงสร้างหลักอยู่รวมกับ Octacalcium Phosphate หลังจากแช่ในสารละลาย r-SBF ที่เวลาต่างกัน

(a) สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบก่อนแช่ (b) สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังจากแช่เป็นเวลา 1 วัน และ (c) สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังจากแช่เป็นเวลา 7 วัน [24]

Wang และคณะ [38] ศึกษาผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่ได้จากการเติม NaF ลงในสารละลายชุบเคลือบที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วนำไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (MC3T3-EL Osteoblast-cell line) ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่าผิวเคลือบที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ในระยะเริ่มต้นลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กระดูกกับผิวรองรับไทเทเนียม ผิวเคลือบ ไฮดรอกซีแอพาไทต์และผิวเคลือบฟลูออไรด์ไฮดรอกซีแอพาไทต์ (Fluoridated Hydroxyapatite ; FHA) ซึ่งเป็นผิวเคลือบที่ได้จากสารละลายที่มีการเติม NaF ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก แต่หลังจากผ่านไป 7

วัน ผิวเคลือบ FHA มีปริมาณของเซลล์กระดูกเข้ามายึดเกาะมากกว่าผิวเคลือบไฮดรอกซีอะ-ปาไทท์และผิวรองรับไทเทเนียม ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ภาพถ่ายจาก SEM ของเซลล์กระดูก (MC3T3-E1)

(a) ผิวเคลือบไฮดรอกซีอะปาไทท์ (b) ผิวเคลือบ FHA ที่ได้จากการเติม NaF ความเข้มข้น 0.004 โมลาร์ (c) ผิวเคลือบ FHA ที่ได้จากการเติม NaF ความเข้มข้น 0.012 โมลาร์และ (d) ผิวชั้นงานไทเทเนียมบริสุทธิ์ [38]

นอกจากนี้ Specchia และคณะ [39] ได้ศึกษาปริมาณรูพรุนของไฮดรอกซีอะปาไทท์ที่สังเคราะห์ได้ โดยมีการศึกษาผลของปริมาณรูพรุนที่มีอยู่ในผิว ต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ พบว่าไฮดรอกซีอะ-ปาไทท์ที่มีปริมาณรูพรุนประมาณ 40 % มีปริมาณเซลล์กระดูกเข้าไปยึดเกาะบนผิวได้มากที่สุด (จากการศึกษาปริมาณรูพรุน 20 40 และ 60%)

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาสำหรับการเคลือบผิวไฮดรอกซีอะปาไทท์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า จะเห็นได้ว่าตัวแปรต่างๆ ในกระบวนการชุบเคลือบ ได้แก่ ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า pH ของสารละลาย อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเคลือบล้วนส่งผลต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ ซึ่งคุณลักษณะของผิวเคลือบนี้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพเมื่อนำไปใช้งานในร่างกาย

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของตัวแปรที่ใช้ในการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วย กระบวนการทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งมีการกำหนดตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยได้แก่ อุณหภูมิของสารละลาย และเวลาในการชุบเคลือบ โดยมีการศึกษาที่ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 10 mA/cm^2 ตลอด การศึกษา เนื่องจากพบว่าที่ความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าง่ายกว่ามีโอกาสเกิดผิวเคลือบ ไฮดรอกซี แอพาไทต์ได้มากกว่าการชุบเคลือบที่ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าต่ำ[8, 21, 34, 35] แต่หากใช้ความ หนาแน่นกระแสไฟฟ้าสูงเกินไปอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเช่น เกิดก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น เป็นผล ให้ประสิทธิภาพการเคลือบลดลง และผิวเคลือบที่ได้มีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดใหญ่[19] ซึ่งไม่เหมาะสม กับการนำไปใช้งาน และในงานวิจัยนี้ไม่มีการปรับ pH ของสารละลายให้สูงกว่า pH4.1 (เป็น pH เริ่มต้นที่ได้จากการเตรียมสารละลาย) เนื่องจากหากปรับ pH ให้สูงขึ้น จะทำให้สารละลายเกิดการ ตกตะกอนและไม่สามารถทำการชุบเคลือบได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเฉพาะผลของอุณหภูมิ ของสารละลายและเวลาในการชุบเคลือบเท่านั้น

บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยสำหรับการเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาไทต์บนโลหะไทเทเนียม มีการดำเนินงานออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาไทต์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า โดยการศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ได้แก่ เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการชุบเคลือบต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ สำหรับการทดลองในส่วนที่ 2 นำผิวเคลือบที่เตรียมได้จากส่วนแรกไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบเมื่อมีการแช่ในสารละลาย SBF และการตอบสนองของเซลล์กระดูกต่อผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาไทต์ที่เตรียมได้ โดยรายละเอียดวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือวิเคราะห์รวมทั้งวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยแยกเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการชุบเคลือบ

1. เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรง (D.C Power Supply) ขนาด 30 โวลต์ 5 แอมแปร์ยี่ห้อ MASTECH รุ่น HY 3005
2. ชิ้นงานสำหรับใช้เป็นผิวรองรับ (Substrate) หรือขั้วคาโทด (Cathode) ใช้แผ่นไทเทเนียม เกรดสอง ตามมาตรฐาน ASTM B265 (Commercially Pure Titanium Grade2; cp-Ti Grade2) ขนาด 1×2 ตารางเซนติเมตร
3. ขั้วแอโนด (Anode) ใช้ลวดแพลทินัม (Platinum) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร
4. ดิจิตอลมัลติมิเตอร์ (Digital multimeter) บริษัท Kyoritsu รุ่น KEW1011
5. เครื่องให้ความร้อนและกวนสารละลาย (Hotplate and magnetic stirrer) บริษัท Heidolph รุ่น MR Hei-Standard
6. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) บริษัท Mettler Toledo รุ่น S20 SevenEasy pH Meter
7. แท่นวางอุปกรณ์สำหรับชุบเคลือบ (Lab jack)
8. ภาชนะดูดความชื้น (Desiccator)
9. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น เครื่องแก้ว เครื่องชั่งสาร ขวดวัดปริมาตร กระจกตวง เทอร์โมมิเตอร์

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

1. ภาชนะพลาสติกที่ทำจากโพลีเอทิลีน (เพื่อป้องกันการ Precipitation ของไฮดรอกซีแอพาไทต์ ขณะทำการเตรียมสารละลาย)
2. ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) บริษัท Memmert เพื่อควบคุมอุณหภูมิของสารละลาย SBF ขณะแช่ ชิ้นงานทดสอบให้คงที่ตลอดการทดลอง (อุณหภูมิคงที่ที่ 37°C)

3.1.3 สารเคมี

เป็นสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ใช้สำหรับเตรียมผิวรองรับ การชุบเคลือบ และสารละลายที่จำลองสภาวะของเหลวในร่างกายมนุษย์ โดยมีรายละเอียดของสารละลายดังนี้

3.1.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมผิวรองรับ

ประกอบด้วย

1. อะซิโตน (CH_3COCH_3)
2. เมทานอล (CH_3OH)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.3.2 สารเคมีสำหรับชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วยไฟฟ้า

ประกอบด้วย

1. แคลเซียมไนเตรท ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
2. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)

3.1.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายที่จำลองสภาวะของเหลวในร่างกายมนุษย์

ประกอบด้วย

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
2. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)
3. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
4. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

7. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)
8. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
9. ทริสไฮดรอกซิลเมทิล-อะมีโนมีเทน (Tris (hydroxylmethyl-Aminomethane))

3.2 การเตรียมผิวชิ้นงานไทเทเนียมก่อนการชุบเคลือบ

การเตรียมผิวชิ้นงานไทเทเนียมก่อนการชุบเคลือบ มีรายละเอียดของวิธีการเตรียมดังนี้

3.2.1 การทำความสะอาดผิวชิ้นงานรองรับก่อนการชุบเคลือบ

สำหรับชิ้นงานไทเทเนียมที่ใช้เป็นผิวรองรับนั้นมักมีสิ่งสกปรกหรือคราบไขมันติดอยู่บริเวณผิวซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการชุบเคลือบและการยึดเกาะระหว่างผิวเคลือบและผิวชิ้นงานรองรับ ดังนั้นก่อนนำมาชุบเคลือบควรทำความสะอาดผิวชิ้นงานก่อนทุกครั้ง เพื่อกำจัดคราบไขมัน น้ำมันและสิ่งสกปรกต่างๆ ที่อาจติดอยู่บนผิวเคลือบ โดยในงานวิจัยนี้มีขั้นตอนการทำความสะอาดดังนี้

1. ทำความสะอาดผิวชิ้นงานไทเทเนียมด้วยน้ำยาล้างจาน เพื่อขจัดคราบไขมันหรือน้ำมัน จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด ใช้สาลี่ชุบอะซิโตนเช็ดบริเวณผิวชิ้นงานไทเทเนียมและล้างด้วย DI water และแช่ชิ้นงานไทเทเนียมลงในเมทานอลพร้อมทั้งเป่าชิ้นงานให้แห้งด้วยลมร้อน
2. นำชิ้นงานไทเทเนียมที่ทำความสะอาดแล้วติดกระดาษกาวที่ด้านหลังชิ้นงานก่อนนำไปชุบเคลือบ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดการเข้าเคลือบเฉพาะบริเวณด้านหน้าเท่านั้น

3.2.2 การเตรียมผิวชิ้นงานรองรับก่อนการชุบเคลือบ(Pre-treatment)

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมา [19] พบว่าการแช่โลหะไทเทเนียมในสารละลาย NaOH นั้นสามารถช่วยในการเหนี่ยวนำ Ca^{2+} ที่ใช้ในการเกิดผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการนำชิ้นงานไทเทเนียมที่ทำความสะอาดผิวแล้ว แช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (สารละลายจากหัวข้อที่ 3.3.1) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างชิ้นงานด้วย DI water เป่าด้วยลมร้อนและรอการชุบเคลือบในขั้นตอนต่อไป

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. การศึกษาผลของตัวแปรในการเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์ต่อสัณฐานวิทยาและโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่เตรียมได้โดยมีตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ เวลาและอุณหภูมิของสารละลายที่ใช้ในการชุบเคลือบ โดยใช้ความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA/cm^2
2. การทดสอบวัสดุทางชีวภาพ แบ่งเป็น 3 ส่วนได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบเมื่อมีการแช่ในสารละลาย SBF และการทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกต่อผิวเคลือบที่เตรียมได้

3.3.1 การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการชุบเคลือบต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ โดยการชุบเคลือบในแต่ละสภาวะจะชุบเคลือบชิ้นงานจำนวน 15 ชิ้น ซึ่งระหว่างการชุบเคลือบจะมีการเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 2 ชั่วโมง (ผู้วิจัยได้ทดลองชุบเคลือบชิ้นงานต่อเนื่องในสภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 10 นาทีเป็นจำนวน 30 ชิ้น พบว่าชิ้นงานหลังจากชุบเคลือบผ่านไป 12 ชิ้น หรือใช้เวลาในการชุบเคลือบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สมบัติของผิวเคลือบด้านสัณฐานวิทยามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และ pH ในสารละลายหลังการชุบเคลือบผ่านไป 2 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมที่ pH 4.1 เป็น pH 3.8 โดยสมบัติของชิ้นงานที่เตรียมได้ยังคงเหมือนเดิมดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนสารละลายในการชุบเคลือบทุกๆ 2 ชั่วโมงแต่ไม่มีการปรับ pH ระหว่างการชุบเคลือบ) ซึ่งตัวแปรที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งการทดสอบผิวเคลือบที่เตรียมได้มีรายละเอียดดังนี้

3.3.1.1 ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรในการชุบเคลือบต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ

สำหรับการทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงตัวแปรในการชุบเคลือบผิวต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้ โดยในการทดลองนี้ใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA/cm^2 ตลอดการศึกษาและมีการแปรตัวแปรอื่นๆ ในกระบวนการชุบเคลือบดังนี้

1. เวลาในการชุบเคลือบ

ในงานวิจัยนี้เลือกช่วงเวลาในการชุบเคลือบที่ 10 30 และ 60 นาที เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้น

2. อุณหภูมิของสารละลายในการชุบเคลือบ

ในการชุบเคลือบผิวสามารถชุบเคลือบได้ทั้งที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกทำการชุบเคลือบที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60°C เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เกิดขึ้น

สำหรับตัวแปรในการชุบเคลือบอื่น ได้แก่ ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า และ pH ของสารละลาย จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงในงานวิจัยนี้ เนื่องจากผู้วิจัยได้ทดลองเคลือบผิวโดยใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าที่สูงขึ้น ผลที่ได้พบว่าเกิดรอยไหม้บนผิวรองรับขึ้น (แสดงในภาคผนวก ข) และหาก pH ของสารละลายสูงกว่า 4.1 จะเกิดการตกตะกอนของสารละลายเป็นสีขาวขุ่นทำให้ไม่สามารถนำมาชุบเคลือบต่อไปได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เวลาและอุณหภูมิของสารละลายเท่านั้น

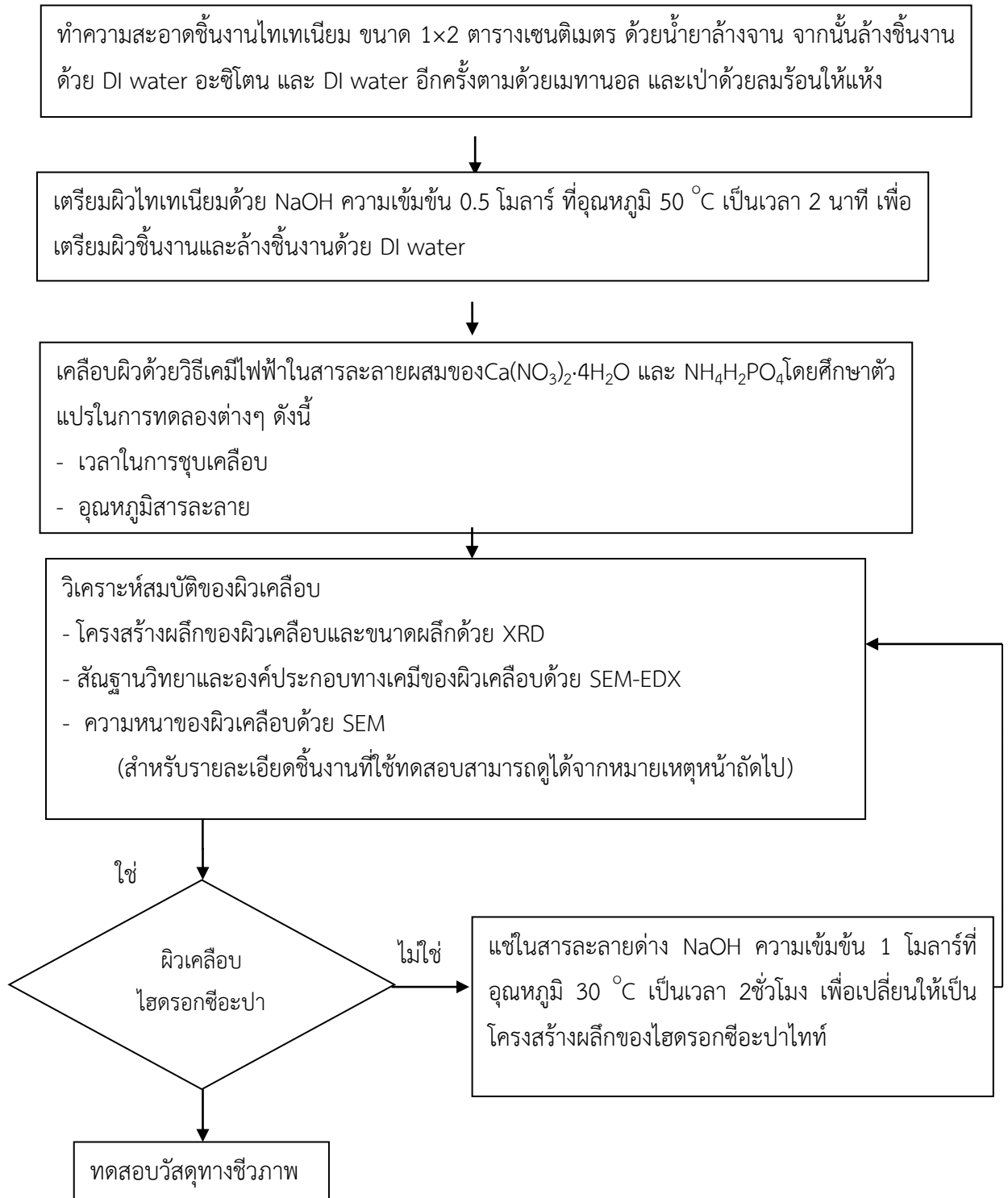
3.3.1.2 การเปลี่ยนโครงสร้างผลึกให้เป็นไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วยสารละลายต่าง (Post treatment)

ในการชุบเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ ผิวเคลือบที่ได้อาจเกิดเป็นสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตชนิดอื่น เช่น Brushite ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในร่างกาย [33] จึงต้องมีการเปลี่ยน (Transform) ให้เป็นไฮดรอกซีแอพาไทต์ก่อน จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมา [8, 33] พบว่าการแช่ผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite ในสารละลายต่าง เช่น NaOH ความเข้มข้น 1-2.5 โมลาร์ สามารถเปลี่ยนโครงสร้าง Brushite เป็นไฮดรอกซีแอพาไทต์ตามได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำผิวเคลือบที่ผ่านกระบวนการชุบเคลือบ (ผิวเคลือบที่ประกอบด้วยโครงสร้างผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตตระกูลอื่นนอกจากไฮดรอกซีแอพาไทต์) แช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง 30°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. หลังจากแช่ชิ้นงานตามเวลาที่ต้องการแล้ว ล้างชิ้นงานด้วย DI water แล้วเป่าให้แห้งด้วยลมร้อน จากนั้นเก็บชิ้นงานในภาชนะดูดความชื้น และนำไปวิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไป

แผนการดำเนินงานวิจัยส่วนที่ 1

การศึกษาตัวแปรในการเคลือบผิวไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยวิธีเคมีไฟฟ้าที่มีผลต่อสัณฐานวิทยาและโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยไฟฟ้าและการวิเคราะห์สมบัติของผิวเคลือบ

3.3.2 การทดสอบวัสดุทางชีวภาพ

การทดลองนี้เป็นการนำผิวเคลือบได้จากวิธีการเตรียมที่ต่างกันจากแผนงานวิจัยส่วนที่ 1 (หัวข้อที่ 3.5.1.1 และ 3.5.1.2) มาทดสอบทางชีวภาพ สามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย

3.3.2.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test)

ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นวิธีการทดสอบในเบื้องต้น (Screening test) ต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุภายในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เพื่อให้แน่ชัดว่าผิวเคลือบที่ผ่านกระบวนการ ชุบเคลือบนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์กระดูกที่นำมาทดสอบ โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค MTT Assay ซึ่งมีการทดสอบที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) สำหรับเทคนิค MTT Assay ที่เลือกนำมาทดสอบนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับผิวเคลือบที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ เนื่องจากสามารถทดสอบกับชิ้นงานขนาด 1×2 ตารางเซนติเมตร ที่เตรียมจากงานวิจัยนี้ได้ (การทดสอบด้วยวิธีอื่นต้องใช้ชิ้นงานเป็นแผ่นกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) รวมทั้งเทคนิค MTT Assay เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูง

สำหรับผิวเคลือบตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT Assay เป็นผิวเคลือบที่มีโครงสร้างไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่เตรียมได้จากกระบวนการชุบเคลือบโดยตรง (ผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 50 °C เวลา 10 นาทีซึ่งในงานวิจัยนี้เรียกว่า “ไฮดรอกซีแอปพาไทท์ As-coated”) และผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่เตรียมได้จากการแช่ในสารละลาย NaOH (นำผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึก Brushite เป็นโครงสร้างหลัก อยู่ร่วมกับไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 30 °C ที่เวลา 10 นาที มาทำ Post-treatment ซึ่งในงานวิจัยนี้เรียกว่า “ไฮดรอกซีแอปพาไทท์ Post-treated”) โดยการเลือกผิวเคลือบดังกล่าวเป็นการเลือกที่คำนึงถึงกระบวนการที่ได้มาซึ่งผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปพาไทท์จากวิธีที่แตกต่างและมีฐานวิทยาศาสตร์ที่ต่างกัน เพื่อตรวจสอบให้แน่ชัดว่าผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปพาไทท์ที่ผลิตได้ไม่ว่าจากสถานะใดหรือจากวิธีการใดจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์กระดูกเมื่อถูกนำไปใช้งานในทางการแพทย์

3.3.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวเคลือบตัวอย่างในสารละลายที่มีการจำลองสถานะของเหลวในร่างกาย (Simulated Body Fluid; SBF)

การศึกษานี้เลือกผิวเคลือบมาทดสอบโดยพิจารณาถึงโครงสร้างผลึกที่ต่างกันของผิวเคลือบ และวิธีการได้มาซึ่งผิวเคลือบ โดยผิวเคลือบที่เลือกมาทำการทดสอบได้แก่ ผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึก Brushite เป็นโครงสร้างหลัก อยู่ร่วมกับไฮดรอกซีแอปพาไทท์ (ผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 30 °C เวลา 10 นาทีซึ่งในงานวิจัยนี้เรียกว่า “ผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักและผิวเคลือบ ไฮดรอกซี-

แอปไทท์ As-coated จากนั้นนำผิวเคลือบตัวอย่างทั้งสองชนิดแช่ลงในสารละลาย SBF ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น น้ำหนักของผิวเคลือบ โครงสร้างผลึก รวมทั้ง สัณฐานวิทยาของชิ้นงานตัวอย่างเมื่อเวลาเปลี่ยนไปโดยมีขั้นตอนในการทดลองดังนี้

1. นำผิวเคลือบตัวอย่างแช่ในสารละลาย SBF ปริมาตร 30 มิลลิลิตรในภาชนะที่ทำจากโพลีเอทิลีน
2. เก็บตัวอย่างชิ้นงานที่แช่ในสารละลาย SBF ในตู้เพาะเชื้อ (Incubator) โดยรักษาอุณหภูมิคงที่ที่ 37 °C และ pH7.4 ตลอดการทดลอง โดยระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ตั้งแต่ 1 ถึง 8 ชั่วโมง
3. เมื่อการทดสอบเสร็จสิ้นล้างชิ้นงานด้วย Ultra pure water ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) จนชิ้นงานแห้งและเก็บชิ้นงานไว้ภายในภาชนะดูดความชื้น เพื่อรอการวิเคราะห์โครงสร้างผลึก สัณฐานวิทยาและน้ำหนักของผิวเคลือบที่ได้ต่อไป

3.3.2.3 การศึกษาการตอบสนองของเซลล์กระดูกต่อผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปไทท์ (Biocompatibility testing)

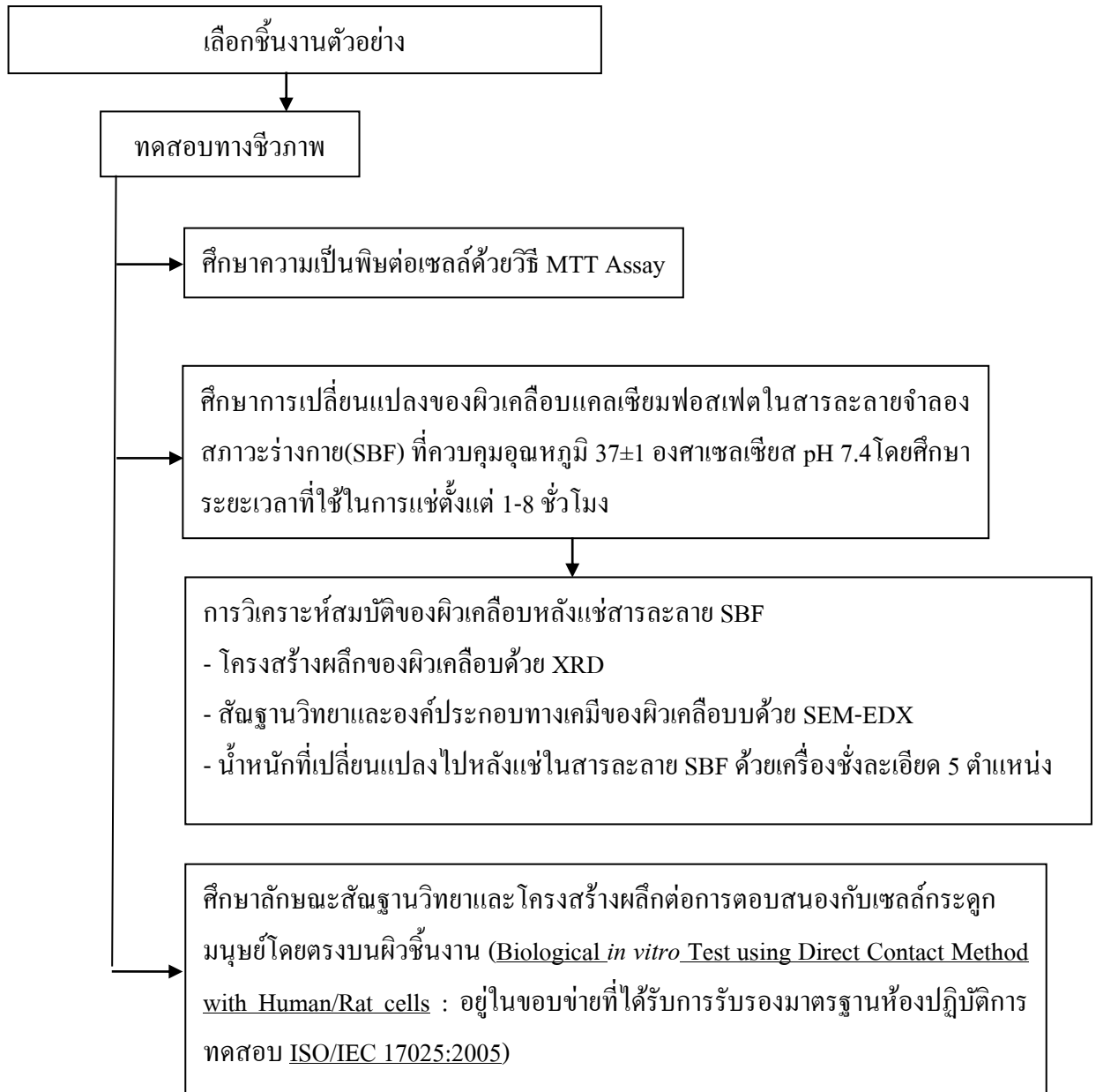
เป็นการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุในร่างกายกับเซลล์กระดูกหรือเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับสมบัติของวัสดุ โดยเฉพาะบริเวณพื้นผิวที่สัมผัสกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ [4] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำเซลล์กระดูก (Human Osteoblast, h-OBs) ที่มาจากการเพาะเลี้ยงทำการทดสอบโดยตรงกับพื้นผิวของวัสดุที่เตรียมได้ โดยในการทดสอบนี้สามารถใช้ศึกษาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กับวัสดุ การเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์บนผิววัสดุ เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธี Biological *in vitro* Test using Direct Contact Method with Human/Rat cells ซึ่งอยู่ในขอบข่ายที่ได้รับการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบ ISO/IEC 17025:2005 โดยศึกษาผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่ใช้ทำการทดสอบเตรียมได้จากแผนงานวิจัยส่วนที่ 1 ได้แก่ ผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก และผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปไทท์ As-coated โดยนำผิวเคลือบตัวอย่างที่เตรียมได้ทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกบนผิวชิ้นงานโดยตรงภายใต้สภาวะและระยะเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อประเมินผลจากการพิจารณาการยึดเกาะและความสมบูรณ์ของเซลล์กระดูกที่นำมาทดสอบ

ชิ้นงานตัวอย่างจะถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบทางชีวภาพ โดยมีการดำเนินการทดลองในการทดสอบทางชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 3.2

แผนการดำเนินงานส่วนที่ 2

การทดสอบวัสดุทางชีวภาพ



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการทดสอบสมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบ

3.4 การวิเคราะห์ผิวเคลือบ

สำหรับในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของตัวแปรในกระบวนการชุบเคลือบต่อสัณฐานวิทยาและโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบในแต่ละขั้นของการทดลอง รวมทั้งโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่เตรียมได้ นอกจากนี้ความหนาของผิวเคลือบที่เตรียมได้ที่สภาวะแตกต่างกันอาจมีผลต่อการนำไปใช้งานในร่างกายได้ด้วยโดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้

3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบด้วยเครื่อง X-Ray Diffraction

การเตรียมชิ้นงานสำหรับวิเคราะห์โครงสร้างผลึก โดยการนำชิ้นงานขนาด 1×2 ตารางเซนติเมตรที่ผ่านกระบวนการเคลือบผิวเป่าลมให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปติดไว้กับที่วางชิ้นงานของเครื่องทดสอบ XRD (Bruker AXS:D8DISCOVER) โดยวิเคราะห์ที่มุม $2\theta = 5 - 60^\circ$ Step size = 0.02° Scan step time = 0.4 sec/step Divergent slit และ Antiscattering slit ขนาด 2 มิลลิเมตร โดย X-ray ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์คือ $\text{CuK}\alpha$ ความยาวคลื่น (λ) = 1.54 Å ผ่านโกลเบลมิลเลอร์ (Göebel mirror) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 40 kV และกระแสไฟฟ้า 40 mA การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกเพื่อให้ทราบถึงชนิดของแคลเซียมฟอสเฟตที่ได้จากการชุบเคลือบนั้น จะพิจารณาเปรียบเทียบกับโครงสร้างผลึกที่วิเคราะห์ได้กับฐานข้อมูลโครงสร้างผลึกมาตรฐานของวัสดุ (Diffraction Standard-International Center for Diffraction Data ; JCPDS-ICDD) และในงานวิจัยนี้นำผลการวิเคราะห์จากเทคนิค XRD มาคำนวณขนาดผลึกแคลเซียมฟอสเฟตด้วย Scherrer's equation ดังแสดงในสมการที่ 3.1 [41]

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3.1)$$

เมื่อ	D	เป็น	ขนาดผลึกของแคลเซียมฟอสเฟต (Å)
	k	เป็น	shape factor มีค่าเท่ากับ 0.9
	λ	เป็น	ความยาวคลื่นของ $\text{CuK}\alpha$ (นาโนเมตร) มีค่าเท่ากับ 1.54056 Å
	θ	เป็น	มุมของการสะท้อน (Diffraction angle)
	β	เป็น	ความกว้างที่ความสูงครึ่งหนึ่งของพีค (FWHM (เรเดียน))

3.4.2 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยา (Morphology) และองค์ประกอบของผิวเคลือบด้วย SEM-EDX

นำชิ้นงานขนาด 1×2 ตารางเซนติเมตร ที่ผ่านกระบวนการเคลือบผิวมาเคลือบด้วยทองเพื่อเพิ่มการนำไฟฟ้า จากนั้นนำไปวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Jeol JSM-5800 และ LEO 1450 VP) และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผิวเคลือบด้วยเทคนิค EDX (EDAX software) เพื่อศึกษาอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัส (Ca/P ratio)

บทที่ 4. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

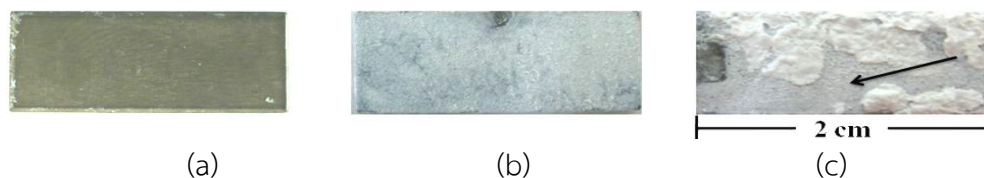
งานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาตัวแปรที่ใช้ในการชุบเคลือบ ได้แก่ เวลาและอุณหภูมิของสารละลายในการชุบเคลือบโดยใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 10 mA/cm^2 ตลอดการวิจัย โดยผิวเคลือบที่ได้จากสภาวะการทดลองต่างกันจะมีโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาต่างกัน และยังส่งผลถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ดังจะกล่าวในบทนี้

4.1 ลักษณะทางกายภาพของผิวรองรับและผิวเคลือบ

ในหัวข้อนี้แสดงลักษณะทางกายภาพของผิวรองรับและผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตที่เตรียมได้จากการชุบเคลือบที่สภาวะแตกต่างกัน โดยผลการทดลองที่ได้มีรายละเอียดดังนี้

ผิวรองรับโลหะไทเทเนียมมีลักษณะผิวเรียบเป็นสีเทา (รูปที่ 4.1 (a)) หลังการชุบเคลือบพบผิวเคลือบมีสีขาวติดอยู่บนผิวไทเทเนียม (รูปที่ 4.1 (b)) และเมื่อเพิ่มเวลาในการเคลือบนานขึ้นจะเห็นผิวเคลือบสีขาวครอบคลุมผิวรองรับได้มากขึ้น แต่เมื่อชุบเคลือบที่เวลานานมากขึ้น (ประมาณ 60 นาที) พบว่าผิวเคลือบมีบางส่วนเกิดการหลุดล่อนออกได้ง่าย ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (c) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ [37]

สำหรับปัญหาการหลุดล่อนที่เกิดขึ้นดังกล่าวมักเกิดระหว่างการชุบเคลือบ อาจเป็นผลมาจากการยึดเกาะกันระหว่างผิวเคลือบอย่างหลวมๆ แต่ในงานวิจัยนี้ยังไม่มีการแก้ไขปัญหที่เกิดขึ้น เนื่องจากผลของเวลาในการชุบเคลือบที่ต่างกันส่งผลให้สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่ได้มีความแตกต่าง ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์กระดูกในการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการชุบเคลือบในสภาวะที่เกิดการหลุดล่อนดังกล่าว (ชุบเคลือบที่เวลา 60 นาที) เพื่อให้ทราบว่าผิวเคลือบควรมีสัณฐานวิทยาอย่างไรจึงจะมีการตอบสนองกับเซลล์กระดูกได้ดี



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของชิ้นงาน

- (a) ผิวรองรับไทเทเนียม (b) ผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตที่ใช้เวลาในการชุบเคลือบ 30 นาที
(c) ผิวเคลือบที่เกิดการหลุดล่อน (ลูกศรชี้) เมื่อใช้เวลาชุบเคลือบ 60 นาที

4.2 สมบัติของผิวเคลือบที่เตรียมได้จากกระบวนการชุบเคลือบทางเคมีไฟฟ้า

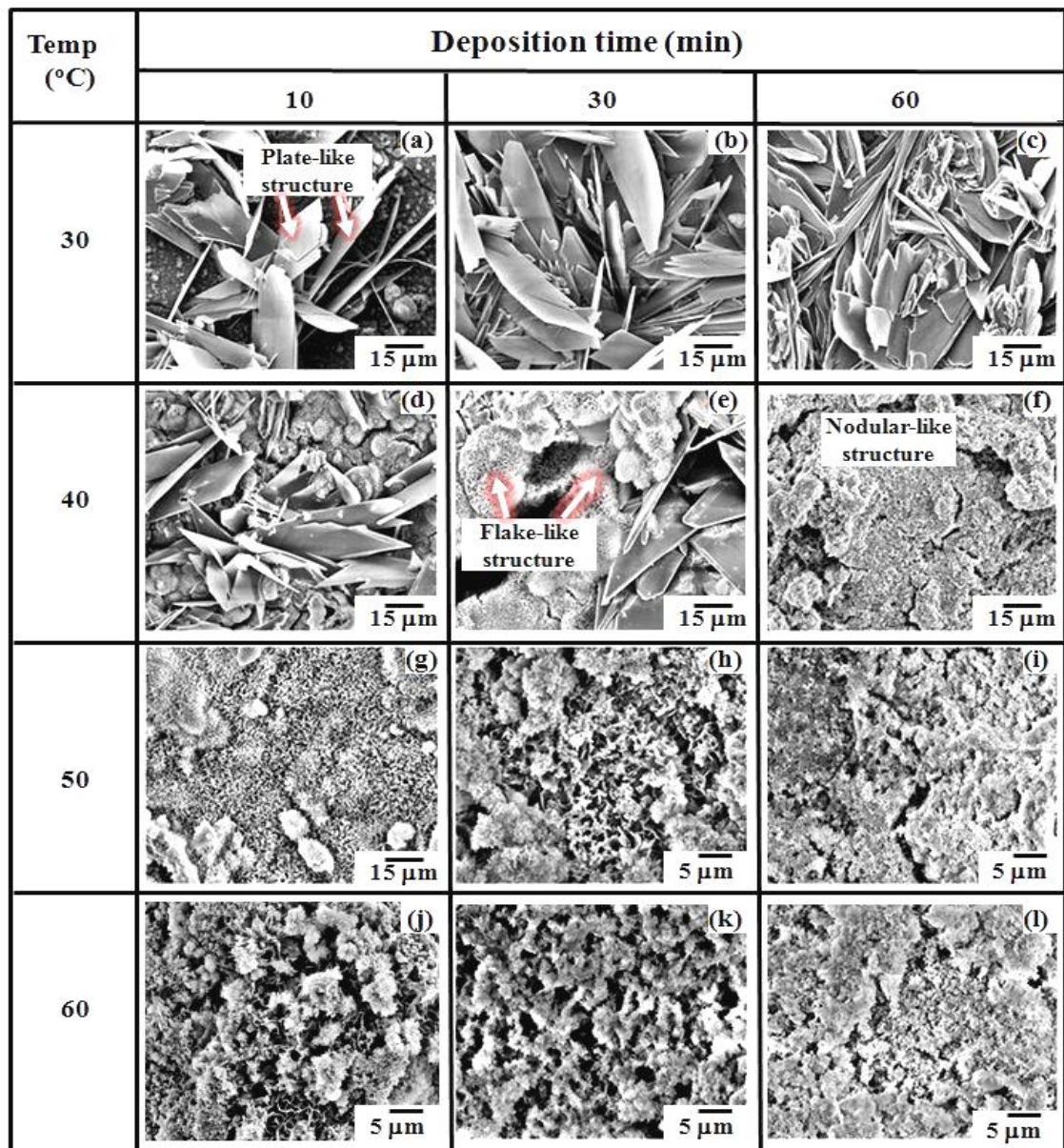
สำหรับในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของตัวแปรในกระบวนการชุบเคลือบต่อสัณฐานวิทยาและโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องมีการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบในแต่ละขั้นตอนของการทดลอง โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่เตรียมได้ รวมทั้งความหนาของผิวเคลือบที่เตรียมได้ที่สภาวะแตกต่างกันโดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้

4.2.1 สัณฐานวิทยาและอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของผิวเคลือบ

สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้เมื่อใช้อุณหภูมิในการชุบเคลือบ 30 40 50 และ 60 °C และเวลาในการชุบเคลือบ 10 30 และ 60 นาที แสดงในรูปที่ 4.2 เมื่อใช้อุณหภูมิในการชุบเคลือบ 30 °C สัณฐานวิทยาที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่น (plate) ซ้อนทับกันอย่างไม่เป็นระเบียบที่เวลาการชุบ 10 นาที (รูปที่ 4.2 (a)) และเมื่อเวลาในการเคลือบมากขึ้นปริมาณของ plate จะมากขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามขนาดของ plate ที่ปรากฏยังคงมีขนาดใกล้เคียงกัน

เมื่ออุณหภูมิในการชุบเคลือบสูงขึ้นเป็น 40 °C พบสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะเป็น plate ร่วมกับเกล็ดขนาดเล็ก (flake) (รูปที่ 4.2 (e)) โดยโครงสร้างของ flake มีทิศทางตั้งฉากกับผิวชิ้นงานรองรับ นอกจากนี้ยังมีสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะเหมือนฟองน้ำ ก้อนกลมขนาดเล็กที่มีรูพรุน (nodular) ปรากฏร่วมอยู่ด้วย (รูปที่ 4.2 (f)) อย่างไรก็ตามสัณฐานวิทยาหลักเป็น plate พบเมื่อใช้เวลาการเคลือบ 10 และ 30 นาทีเท่านั้น เมื่อเพิ่มเวลาในการชุบเคลือบนานขึ้น ปริมาณของ nodular จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนปกคลุม plate และ flake ทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (f)

เมื่ออุณหภูมิในการชุบเคลือบสูงขึ้นเป็น 50 และ 60 °C สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่พบมี 2 ลักษณะอยู่ร่วมกันได้แก่ แบบ flake และแบบ nodular ซึ่งแบบ flake สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิ 50 °C ตั้งแต่เวลาชุบเคลือบ 10 นาที (รูปที่ 4.2 (g)) ส่วนที่เป็น nodular จะปกคลุมและกระจายตัวอยู่บนส่วนที่มีลักษณะเป็น flake อีกชั้นหนึ่ง เมื่อใช้เวลาในการชุบเคลือบนานขึ้น nodular จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและปกคลุมทั่วผิวชิ้นงานรองรับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (i) และ 4.2 (l) สำหรับสัณฐานวิทยาแบบ plate ไม่พบเมื่อเคลือบที่อุณหภูมิ 50-60 °C



รูปที่ 4.2 สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้จากการใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 ที่เวลาและอุณหภูมิต่างกัน

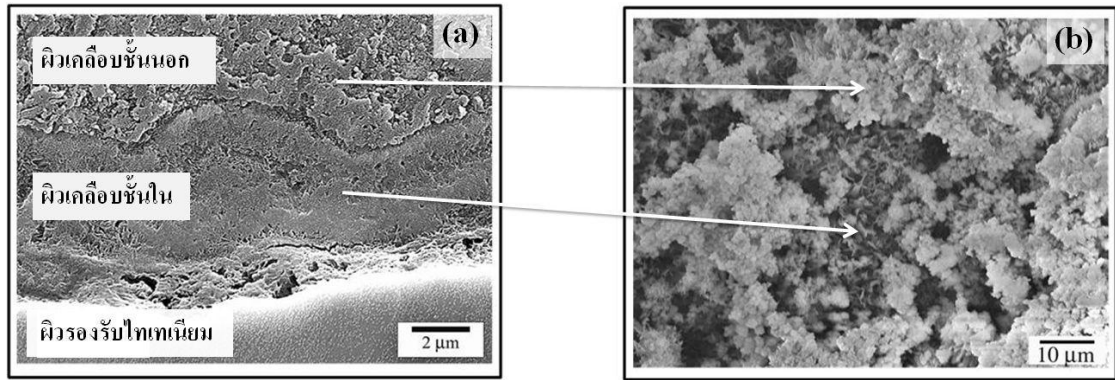
พิจารณาผลของอุณหภูมิในการชุบเคลือบที่ 30 40 50 และ 60 °C เวลา 10 นาที (รูปที่ 4.2 (a) (d) (g) และ (j)) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเคลือบส่งผลให้สัณฐานวิทยาที่ได้มีลักษณะแตกต่างกัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ คือ เมื่อใช้อุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิ 30 และ 40 °C) ผิวเคลือบมีลักษณะเป็น plate แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการชุบเคลือบสูงขึ้น (อุณหภูมิ 50 และ 60 °C) ผิวเคลือบมีลักษณะที่ละเอียดมากขึ้น ซึ่งสัณฐานวิทยาที่มีความละเอียดนี้เริ่มสังเกตพบที่อุณหภูมิในการชุบเคลือบ 40 °C เป็นต้นไป เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลให้ Overpotential สูงขึ้น สามารถเกิดการ precipitate บนผิวรองรับได้อย่างรวดเร็ว เป็นผลให้มีอัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับสูงขึ้น (สมการที่ (2.16)) เมื่อมีการโต

ของผลึกพร้อมกันจึงเกิดการชนกันและไม่สามารถโต (Growth) ต่อไปได้อีก สัณฐานวิทยาที่ได้จึงมีความละเอียดมากขึ้น [31]

เมื่อนำผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 60 °C เวลา 60 นาที มาทำภาคตัดขวาง (Cross-section) พบว่าผิวเคลือบประกอบด้วย 2 ชั้นอย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.3 (a)) โดยส่วนแรกเป็นผิวเคลือบชั้นใน ซึ่งติดกับผิวรองรับมีลักษณะเป็นเกล็ดตั้งฉากมีการยึดเกาะตัวกันอย่างแน่นหนา และมีความหนาประมาณ 4-5 ไมครอน ส่วนที่ 2 เป็นผิวเคลือบชั้นนอก มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ ปกคลุมอยู่ หลังจากเปรียบเทียบกับสัณฐานวิทยาที่บริเวณผิวหน้า (รูปที่ 4.3 (b)) พบว่าผิวเคลือบชั้นใน (รูปที่ 4.3 (a)) เป็นส่วนของโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น flake และส่วนที่เป็นผิวเคลือบชั้นนอกเป็นส่วน ของโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น nodular ซึ่งคาดว่าลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละชั้นอาจมีผลต่อการตอบสนองเมื่อนำไปใช้งานทางการแพทย์

ในงานวิจัยนี้ได้พยายามศึกษาภาคตัดขวางของผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 °C แต่ไม่สามารถวัดความหนาหรือวิเคราะห์ภาคตัดขวางได้ อาจเนื่องจากผิวเคลือบที่ได้บางและมีการยึดเกาะระหว่างกันไม่ดี ทำให้ระหว่างการเตรียมชิ้นงานนั้นผิวเคลือบมีการหลุดออก ทำให้ไม่สามารถแยกบริเวณระหว่างผิวเคลือบกับผิวรองรับได้อย่างชัดเจน จึงไม่มีการนำเสนอในงานวิจัยนี้

จากการสังเกตพบว่า ผิวเคลือบประกอบด้วย 2 ชั้น ได้แก่ ผิวเคลือบชั้นในที่ติดกับผิวรองรับและผิวเคลือบชั้นนอก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของนักวิจัยอื่น [28]แต่ความหนาของผิวเคลือบชั้นในที่พบจากงานวิจัยดังกล่าวมีความหนาประมาณ 500 นาโนเมตร ในขณะที่ความหนาของผิวเคลือบชั้นในที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมครอน ซึ่งความหนาที่มีความแตกต่างกันอาจเกิดเนื่องจากสภาวะในการชุบเคลือบต่างกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าว [28]รายงานว่าผิวเคลือบชั้นในเป็นผิวเคลือบที่มีการยึดเกาะดี แน่นกว่าผิวเคลือบชั้นนอกคล้ายกับที่สังเกตพบในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.3 สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมจากอุณหภูมิ 60 °C ที่เวลา 10 นาที

(a) ภาพตัดขวางของผิวเคลือบเทียบกับ (b) ภาพผิวหน้าของผิวเคลือบ

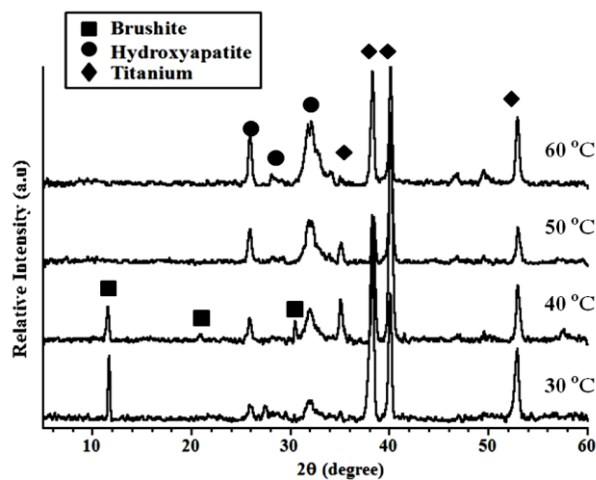
เมื่อนำผิวเคลือบที่เตรียมได้จากกระบวนการชุบเคลือบ (รูปที่ 4.2) มาวิเคราะห์องค์ประกอบของผิวเคลือบด้วยเทคนิค EDX เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca/P) ของสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะแตกต่างกัน พบว่าส่วนที่มีลักษณะเป็น plate มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ประมาณ 0.81- 0.95 ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ที่ใกล้เคียงกับองค์ประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตตระกูล Brushite ที่มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P เท่ากับ 1.00 [14] สำหรับโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น flake และ nodular มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ประมาณ 1.23-1.36 และ 1.20-1.67 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่มีในกระดูกและฟันของมนุษย์ที่เท่ากับ 1.67 [34] ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่าง Ca/P ที่ได้นั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าลักษณะที่เกิดขึ้นเป็นผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่ต้องการ จึงต้องนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XRD อีกครั้งเพื่อตรวจสอบโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบในแต่ละสภาวะการทดลอง

4.2.2 โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบ

โดยผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60 °C เวลา 60 นาทีด้วยเทคนิค XRD (รูปที่ 4.4) พบว่าผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 30 และ 40 °C ประกอบด้วยโครงสร้างผลึกของ Brushite ซึ่งเป็นโครงสร้างหลัก (มุม 2θ เท่ากับ 11.6, 20.9 และ 30.5 (JCPDS-ICDD #090077)) ร่วมกับโครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทต์ (มุม 2θ เท่ากับ 25.8, 29.3 และ 32.0 (JCPDS-ICDD #740566)) แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 และ 60 °C กลับพบเพียงโครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทต์เท่านั้นส่วนโครงสร้างผลึกของ Brushite กลับไม่ปรากฏให้เห็น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมี Brushite ในปริมาณน้อยจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค XRD

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิการชุบเคลือบสูงขึ้นสัดส่วนของไฮดรอกซีแอพาไทท์เมื่อเทียบกับไทเทเนียมมีปริมาณสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากผิวเคลือบมีความหนาเพิ่มขึ้นหรือ มีความหนาแน่นมากขึ้นหรือมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึกได้ดีขึ้น

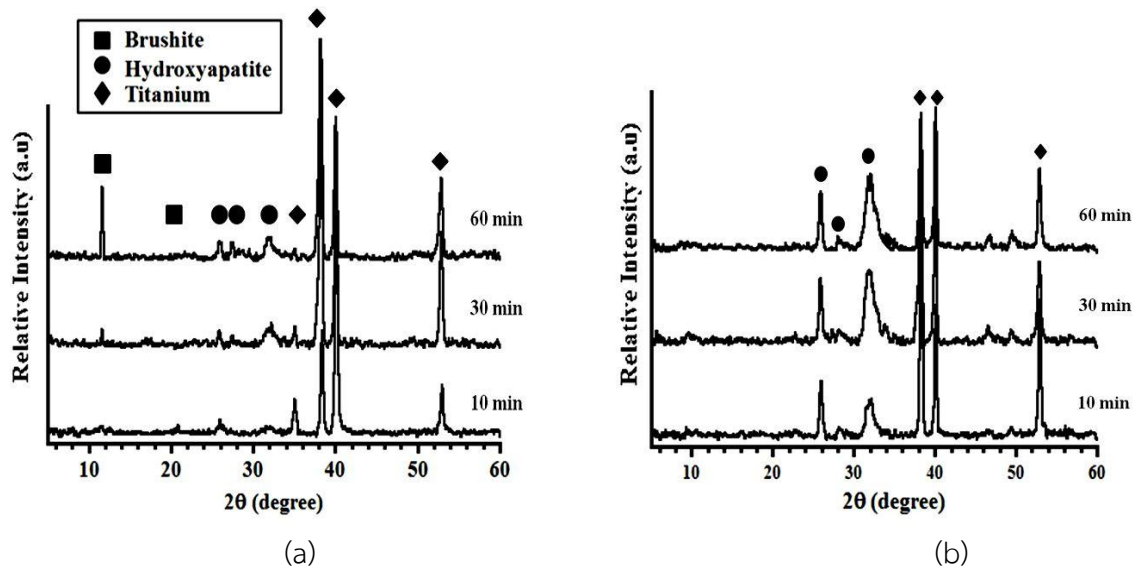
อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์พบว่าผิวเคลือบที่เตรียมได้ในทุกสภาวะพบไทเทเนียมที่เป็นผิวชิ้นงานรองรับปรากฏอยู่ อาจเป็นเพราะผิวเคลือบบางและมีลักษณะเป็นรูพรุน (Porous) จึงทำให้รังสีเอ็กซ์ที่ใช้ในการตรวจสอบไปตกกระทบบนผิวของไทเทเนียมและเกิดการสะท้อนกลับทำให้โครงสร้างผลึกของไทเทเนียมซึ่งเป็นผิวรองรับปรากฏอยู่ด้วย [8]



รูปที่ 4.4 X-ray diffraction patterns ของผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบที่ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อศึกษาผลของเวลาในการชุบเคลือบต่อชนิดของโครงสร้างผลึก (รูปที่ 4.5 (a)) พบว่าผิวเคลือบที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ 30°C เวลาในการชุบเคลือบตั้งแต่ 10 30 และ 60 นาที มีโครงสร้างผลึก Brushite เป็นโครงสร้างหลัก อยู่ร่วมกับไฮดรอกซีแอพาไทท์ ซึ่งโครงสร้างผลึกที่พบนั้นแม้จะเพิ่มเวลาในการเคลือบนานขึ้น แต่กลับไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของโครงสร้างผลึกแต่อย่างใด

ผลการทดลองที่ได้นี้เป็นไปในแนวทางเดียวกับผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 60°C (รูปที่ 4.5 (b)) ที่ยังคงพบไฮดรอกซีแอพาไทท์เพียงชนิดเดียว เมื่อเวลาการชุบเคลือบเปลี่ยนแปลงไป เมื่อพิจารณาปริมาณของ Brushite และ/หรือไฮดรอกซีแอพาไทท์ของผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 30 และ 60°C เทียบกับผิวรองรับไทเทเนียม พบว่า Brushite และ/หรือไฮดรอกซีแอพาไทท์มีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น ในขณะที่ไทเทเนียมมีอัตราส่วนที่ลดลง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของเฟสในผิวเคลือบอาจเป็นผลมาจากผิวเคลือบมีความหนาแน่นมากขึ้น หรือมีความหนาแน่นมากขึ้น หรืออาจมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึกดีขึ้น



รูปที่ 4.5 X-ray diffraction patterns ของฟิล์มเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า 10 mA/cm^2 (a) อุณหภูมิ 30°C (b) อุณหภูมิ 60°C เมื่อใช้เวลาในการชุบเคลือบแตกต่างกัน

จาก X-ray diffraction patterns ที่ได้ สามารถนำมาคำนวณขนาดผลึกของไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยสมการของ Scherrer [41] (สมการที่ 3.1) โดยคำนวณที่มุม 25.88° ในทุกสภาวะการทดลอง พบว่าขนาดผลึกของไฮดรอกซีแอปาทาइटที่ได้ในงานวิจัยนี้มีขนาดประมาณ 16-25 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 โครงสร้างผลึกสัณฐานวิทยาและขนาดผลึกของไฮดรอกซีแอปาไทต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้

Temperature (°C)	Time(min)	Phase of coating	Morphology of coating	HA Crystal size (nm)
30	10	Bs+HA	Plate	-
	30	Bs+HA	Plate	20
	60	Bs+HA	Plate	16
40	10	Bs+HA	Plate, Flake	22
	30	Bs+HA	Plate, Flake	21
	60	Bs+HA	Nodular	22
50	10	HA	Flake	22
	30	HA	Flake, Nodular	21
	60	HA	Nodular	25
60	10	HA	Flake, Nodular	19
	30	HA	Flake, Nodular	19
	60	HA	Nodular	19

หมายเหตุ Bs : โครงสร้างผลึก brushite HA : โครงสร้างผลึกไฮดรอกซีแอปาไทต์

- : ไม่ปรากฏโครงสร้างผลึกแคลเซียมฟอสเฟตชนิดไฮดรอกซีแอปาไทต์

จากการวิเคราะห์ผลของตัวแปรในการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาไทต์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าต่อโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบในงานวิจัยนี้ พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกอย่างชัดเจน โดยที่อุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิ 30 และ 40 °C) พบโครงสร้างผลึก Brushite เป็นโครงสร้างหลักอยู่ร่วมกับไฮดรอกซีแอปาไทต์ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 50 °C โครงสร้างผลึกที่พบเป็นไฮดรอกซีแอปาไทต์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ในขณะที่เวลาในการเคลือบมีผลเพียงการเพิ่มปริมาณของโครงสร้างเดิมที่มีอยู่เท่านั้นแต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของโครงสร้างผลึกหรือเฟสที่พบแต่อย่างใด โดยความแตกต่างของโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบ พบว่าเป็นผลมาจาก pH บนผิวรองรับ (local pH) ซึ่งเป็นผลจากปริมาณ OH^- ที่ได้จากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำ (สมการ 2.6) เป็นหลัก [19, 21, 25] โดยน้ำจะเกิดการแตกตัวได้นั้นจะต้องมีแรงขับ (Driving force) มากพอเพื่อให้เกิดการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล (Polarized) ในปริมาณที่มากพอ โดยแรงขับส่วนใหญ่มาจากการเพิ่มกระแสไฟฟ้าหรือจ่ายศักย์เกินสำหรับการเคลือบ (Deposition Overpotential) ในระบบ [25] สำหรับงานวิจัยนี้มีการให้กระแสไฟฟ้าที่คงที่ตลอดการวิจัย มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายที่ใช้ในการทดลองเท่านั้น โดยผลของอุณหภูมิต่อชนิดของแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปยังไม่มีการศึกษาและเข้าใจกันมากนัก อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการ

ทดลองที่ได้จากงานวิจัยอื่น [8] โดยรายงานก่อนหน้านี้[24] อธิบายว่า Brushite จะเกิดการเข้าเคลือบได้ง่ายกว่าไฮดรอกซีแอพาไทท์ ในสารละลายที่มี pH (local pH) สำหรับการเข้าเคลือบประมาณ 4-5 เท่านั้น [21, 24] สำหรับโครงสร้างผลึกไฮดรอกซีแอพาไทท์นั้นสารละลายจะต้องมี local pH สูงกว่า 7 ขึ้นไป [21] จึงจะเกิดการเข้าเคลือบได้

จากรายงานนี้ พบว่าผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์เกิดที่อุณหภูมิสูง อธิบายได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการชุบเคลือบเป็นการเพิ่มแรงขับเพื่อทำให้เกิดการเบี่ยงเบนออกจากสมดุลได้มากขึ้น เป็นผลให้ปริมาณของศักย์เกินมากพอที่จะทำให้ น้ำแตกตัวได้จึงทำให้ปริมาณ OH^- เพิ่มขึ้น (local pH สูง) เหมาะสมต่อการเกิดไฮดรอกซีแอพาไทท์ นอกจากนี้การเพิ่มอุณหภูมิยังเป็นการเพิ่มการแพร่ (Diffusion) ของ Ca^{2+} มายังบริเวณผิวรองรับอีกด้วย ด้วยตัวแปรทั้ง 2 อย่างจึงทำให้ที่อุณหภูมิสูงสามารถเกิดเป็นผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้มากขึ้น [42]

เมื่อพิจารณาฐานฐานวิทยาของผิวเคลือบที่สภาวะต่างๆ พบว่าผิวเคลือบที่มีลักษณะเป็น plate เป็นผิวเคลือบที่ได้จากอุณหภูมิในการชุบไม่สูงมากนัก (30 และ 40 °C) เนื่องจากอุณหภูมิต่ำส่งผลให้อัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับต่ำ ทำให้มีพื้นที่ในการโตของผลึกได้มาก จึงได้ผลึกที่มีขนาดใหญ่ [31] แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการชุบเคลือบสูงขึ้น (50 และ 60 °C) ฐานฐานวิทยาที่เตรียมได้มีลักษณะแบบ flake และ nodular ที่มีความละเอียดเมื่อเทียบกับฐานฐานวิทยาแบบ plate อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้อัตราการเกิดนิวเคลียสบนผิวรองรับมากขึ้นหรือสามารถเกิดนิวเคลียสได้ทุกบริเวณสูงมาก เมื่อผลึกโตขึ้นจึงเกิดการขัดขวางการโตซึ่งกันและกันเป็นผลให้ฐานฐานวิทยาที่ได้นั้นมีขนาดเล็กและละเอียด

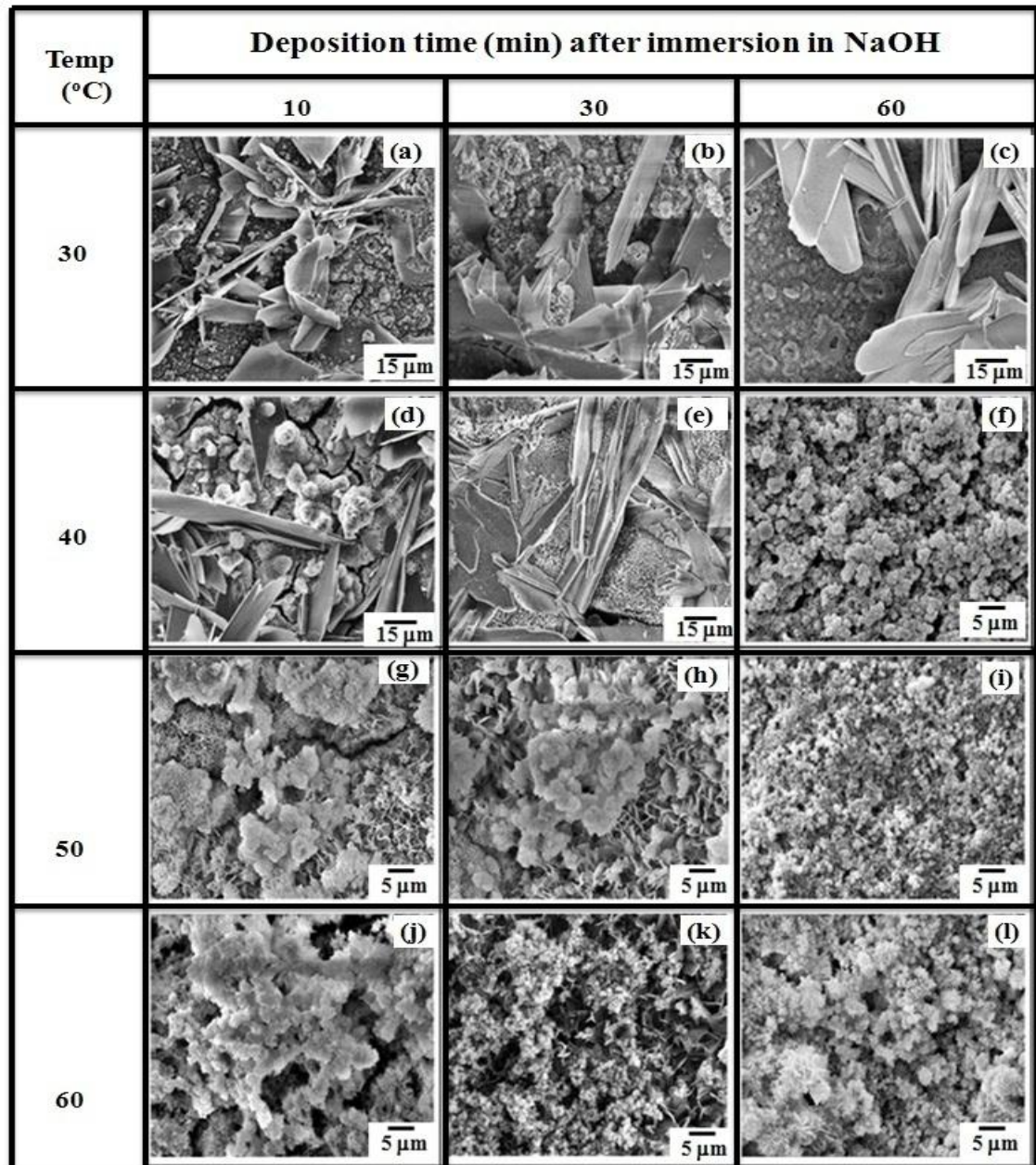
การเคลือบผิวไฮดรอกซีแอพาไทท์ด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า นอกจากจะเกิดโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทท์ตามที่ต้องการแล้วยังสามารถเกิดโครงสร้างของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดอื่นในผิวเคลือบได้อีก เช่น Brushite ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวแปรที่ใช้ในกระบวนการชุบเคลือบ โครงสร้าง Brushite ที่เกิดขึ้นนี้เป็นโครงสร้างที่ไม่บริสุทธิ์และไม่เสถียรที่ pH 6-7 (สภาวะเดียวกับของเหลวในร่างกายมนุษย์) และมีฐานฐานวิทยาลักษณะเป็น plate ขนาดใหญ่ซึ่งเกิดการแตกหักได้ง่ายระหว่างอยู่ในร่างกายจึงไม่เหมาะนำมาใช้งาน [33] จากงานวิจัยที่ผ่านมา [7, 8, 19, 25, 27, 34] พบว่าโครงสร้าง Brushite สามารถเปลี่ยนเป็นโครงสร้างไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้โดยการแช่ในสารละลายต่าง เช่น NaOH เพื่อให้ได้โครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทท์ที่มีความเสถียรมากขึ้นก่อนการนำไปใช้งานซึ่งผลการวิเคราะห์จะแสดงในหัวข้อ 4.3

4.3 สมบัติของผิวเคลือบหลังการแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Post-treatment)

ในหัวข้อนี้จะแสดงผลการนำผิวเคลือบที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ซึ่งพบโครงสร้างผลึกหลักเป็น Brushite มาแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยกระบวนการนี้เรียกว่ากระบวนการ Post-treatment ซึ่งสามารถเปลี่ยนโครงสร้างผลึก Brushite เป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้ และมีการวิเคราะห์สมบัติของผิวเคลือบที่เปลี่ยนไปดังนี้

4.3.1 สัณฐานวิทยาและอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของผิวเคลือบ (Post-treatment)

สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C (รูปที่ (4.2)) หลังจากแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.6 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C สัณฐานวิทยามีลักษณะเป็น plate เช่นเดิม (รูปที่ 4.6 (a)-(e)) แต่ปริมาณ plate ของผิวเคลือบที่ได้จากการเคลือบที่อุณหภูมิ 30 °C (รูปที่ 4.6 (b)-(c)) มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับชิ้นงานก่อนแช่ (รูปที่ 4.2 (b)-(c)) อาจเป็นเพราะผิวเคลือบดังกล่าวประกอบด้วยโครงสร้าง Brushite ที่ไม่เสถียรและสามารถละลายได้ในสารละลายต่าง[14] สำหรับผิวเคลือบที่ได้จากอุณหภูมิ 40 °C เมื่อใช้เวลาชุบเคลือบนานพบว่าปริมาณของ nodular บนผิวชิ้นงานเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะ flake และ nodular ที่ได้จากการชุบเคลือบที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C (รูปที่ 4.6 (g)-(l)) มีปริมาณของ nodular บนพื้นผิวมากขึ้นเมื่อเทียบกับสัณฐานของผิวเคลือบก่อนแช่ที่อุณหภูมิเดียวกัน (รูปที่ 4.2 (g)-(l)) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไฮดรอกซีแอพาไทท์สามารถละลายได้แต่มีอัตราการละลายต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับ Brushite โดยอัตราการละลายของไฮดรอกซีแอพาไทท์ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของรูปร่าง รูพรุน ขนาดผลึก และความบริสุทธิ์[14, 43]และผลจากการละลายบางส่วนทำให้เกิดการ precipitate ของไฮดรอกซีแอพาไทท์เพิ่มขึ้นได้ [14, 26, 43]



รูปที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ (รูปที่ 4.2) หลังผ่านกระบวนการทำ Post-treatment ในสารละลาย NaOH 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของผิวเคลือบหลังจากผ่านการทำ Post-treatment ด้วยการแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดังแสดงผลการวิเคราะห์ใน **Error! Reference source not found.** ว่าอัตราส่วนระหว่าง Ca/P เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของผิวเคลือบก่อนการทำ Post-treatment โดยโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น plate มีอัตราส่วนระหว่าง Ca/P เพิ่มขึ้นจาก 0.81-0.95 เป็น 1.27-1.72 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของไฮดรอกซีแอปพาไทต์ นอกจากนี้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็น flake และ nodular มีอัตราส่วน

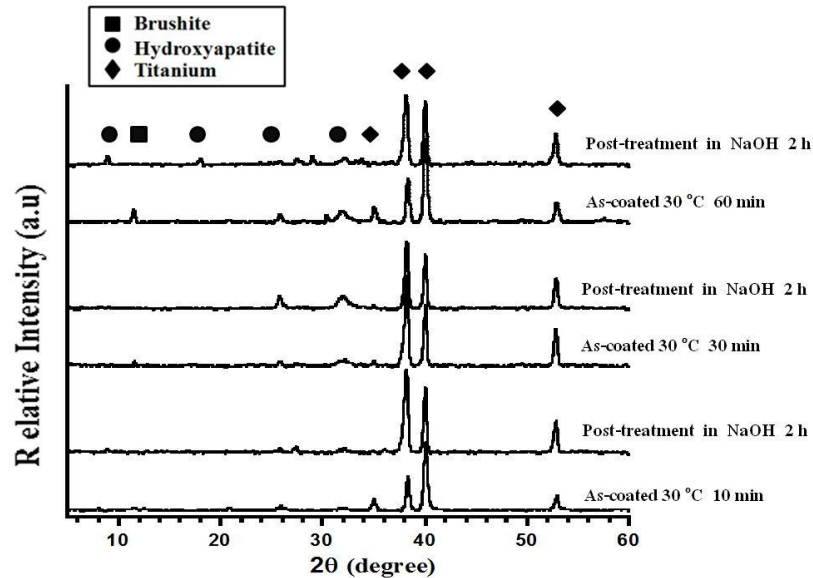
ระหว่าง Ca/P เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน โดยมีการเพิ่มจากเดิม 1.23-1.36 และ 1.20-1.67 เป็น 1.40-1.83 และ 1.42-1.94 ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับอัตราส่วนของไฮดรอกซีแอปาทิต ซึ่งสามารถยืนยันชนิดของโครงสร้างผลึกที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค XRD อีกครั้งหนึ่งดังแสดงในหัวข้อที่ 4.3.2

ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนระหว่าง Ca/P ของสัณฐานวิทยาแต่ละชนิดหลังผ่านกระบวนการ Post-treatment

Morphology phase	Ca/P ratio (As-coated)	Ca/P ratio (Post-treated)
Plate	0.81-0.95	1.27-1.72
Flake	1.23-1.36	1.40-1.83
Nodular	1.20-1.67	1.42-1.94
HA (Theory)	1.67	
Brushite (Theory)	1.00	

4.3.2 โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบหลังผ่านกระบวนการ Post-treatment

งานวิจัยนี้ได้นำผิวเคลือบที่เตรียมได้จากอุณหภูมิ 30 และ 40 °C (ผิวเคลือบมีโครงสร้างผลึก Brushite เป็นโครงสร้างหลักอยู่ร่วมกับไฮดรอกซีแอปาทิต) ไปผ่านกระบวนการ Post-treatment ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XRD พบว่าผิวเคลือบหลังจากผ่านกระบวนการ Post-treatment มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจาก Brushite เป็นไฮดรอกซีแอปาทิตได้



รูปที่ 4.7 X-ray diffraction patterns ของผิวเคลือบที่ได้จากการชุบเคลือบที่อุณหภูมิ 30 °C ที่เวลา 10 30 และ 60 นาที ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการ Post treatment

จากการคำนวณขนาดผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทท์ที่ได้หลังการทำ Post treatment ด้วยสมการ Scherrer (สมการที่ 3.1) พบว่าผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทท์มีขนาดประมาณ 19-41 นาโนเมตร (ผลึกไฮดรอกซีแอพาไทท์ที่ได้จากระบวนการชุบเคลือบโดยตรงมีขนาดประมาณ 16-25 นาโนเมตร)

สำหรับการเปลี่ยนโครงสร้างผลึกจาก Brushite เป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงนั้น เป็นผลมาจากการละลายออก (Dissolution) ของผิวเคลือบพร้อมกับมีการเข้าเคลือบใหม่ (Reprecipitation) บนผิวรองรับอย่างต่อเนื่อง [25, 32] อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมา[25-27] ยังไม่มีการอธิบายถึงกลไกที่เกิดขึ้นนี้อย่างชัดเจน พบเพียงการอธิบายว่าการเปลี่ยนจากโครงสร้างผลึก Brushite เป็นโครงสร้างไฮดรอกซีแอพาไทท์ เพราะ Brushite มีความเสถียรน้อยและเกิดการละลายได้ง่ายเมื่อ pH ของสารละลายมีค่าสูงกว่า 5 [25-27] (ในงานวิจัยนี้ใช้สารละลาย NaOH ที่มี $\text{pH} \approx 10$) เมื่อเกิดการละลายทำให้ความเข้มข้นของไอออน Ca^{2+} และ HPO_4^{2-} บริเวณผิวเคลือบและรอบชิ้นงานมีจำนวนมากและเนื่องจาก pH ของสารละลายที่ใช้ทำ Post-treatment มีค่าสูงจึงส่งผลให้ local pH สูงตามด้วย จากตัวแปรทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ทำให้เกิดการเข้าเคลือบของ ไฮดรอกซีแอพาไทท์บนผิวรองรับได้ทันที ซึ่งโครงสร้างที่เกิดขึ้นใหม่นี้เป็นโครงสร้างที่เสถียรที่ pH ประมาณ 10 [25, 26, 32] จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Furutaka [27] และ Shih [33] ที่พบว่าเมื่อนำผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite แช่ในสารละลาย NaOH สามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้

ผลจากงานวิจัยเมื่อพิจารณาสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ Brushite ที่มีลักษณะเป็น plate หลังการแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ความเข้มข้น 0.4 %) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Furutaka และคณะ [27] ที่พบว่าผิวเคลือบที่มีโครงสร้างผลึก Brushite ที่มีสัณฐานวิทยาลักษณะเป็น plate เมื่อแช่ในสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20% โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 °C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ยังคงพบลักษณะผิวเคลือบที่เป็น plate เกิดขึ้นอยู่ต่างจากผลการทดลองของ Prado และคณะ [25] และ Shih และคณะ [33] ที่พบว่าสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจนหลังแช่ในสารละลาย NaOH ที่อุณหภูมิ 60 °C โดยสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังแช่ในสารละลายที่สภาวะดังกล่าวจะมีขนาดเล็กและละเอียดมากขึ้น อาจเป็นผลมาจากการใช้อุณหภูมิสูง (ประมาณ 60 °C) และระยะเวลาในการแช่ที่นาน (48 ชั่วโมง) กว่าในงานวิจัยนี้ จากผลการทดลองคาดว่าอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายอาจมีผลต่ออัตราการละลายของ Brushite โดยที่อุณหภูมิสูง Brushite จะละลายได้มากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิห้อง) ที่เป็นไปอย่างช้าๆ

4.4 สมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบที่เตรียมได้

ในงานวิจัยนี้ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของผิวเคลือบที่ผ่านการชุบเคลือบด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า โดยมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของผิวเคลือบหากมีการนำไปใช้งานในร่างกายโดยศึกษาในสารละลายจำลองของเหลวในร่างกายมนุษย์ รวมถึงการทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกมนุษย์บนผิวเคลือบที่เตรียมได้ โดยมีรายละเอียดของผลการทดสอบดังนี้

4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูก

ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ในงานวิจัยนี้ได้มาจาก 2 กระบวนการ ได้แก่ ผิวไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่เตรียมได้โดยตรงจากกระบวนการชุบเคลือบ (ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ As-coated) และผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างในสารละลาย NaOH (ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทต์ Post-treated) ผิวเคลือบที่ได้จากกระบวนการต่างกันรวมทั้งสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน อาจส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกายเมื่อนำไปใช้งาน ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบความเป็นพิษของผิวเคลือบที่เตรียมได้ โดยมีการเลือกชิ้นงานที่สภาวะต่างๆ มาทำการทดสอบและผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์กระดุกด้วยวิธี MTT Cytotoxicity Assay

ชิ้นงานที่ใช้ทดสอบ	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (%)	ปฏิกิริยาต่อเซลล์
ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ As-coated (เตรียมที่อุณหภูมิ 50 °C เวลา 10 นาที)	79.3	ไม่เป็นพิษ
ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ As-coated (เตรียมที่อุณหภูมิ 50 °C เวลา 60 นาที)	75.9	ไม่เป็นพิษ
ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ Post-treated (เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 10 นาที)	84.4	ไม่เป็นพิษ
ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ Post-treated (เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 60 นาที)	77.9	ไม่เป็นพิษ

หมายเหตุ ทดสอบที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) (ผลการทดลองเลขที่ HT 0247/53)

จากกระบวนการ พบว่าอัตราการรอดของเซลล์กระดุกมีมากกว่า 70% จึงถือได้ว่าผิวเคลือบไฮดรอกซี-แอปาทาท์ที่ได้จากสองกระบวนการไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ที่เตรียมได้จากทั้ง 2 กระบวนการ เพื่อให้แน่ใจได้ว่าไฮดรอกซีแอปาทาท์ที่เตรียมได้นั้นเมื่อนำไปใช้งานจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่สัมผัส

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงของผิวเคลือบและการเกิดไฮดรอกซีแอปาทาท์หลังการแช่ในสารละลายจำลองของเหลวในร่างกายมนุษย์

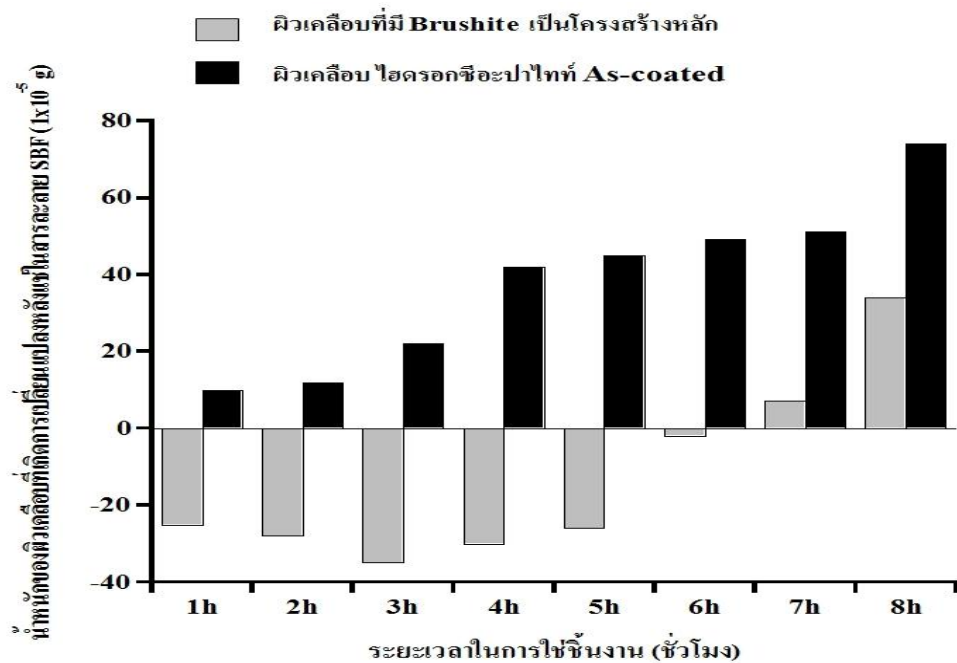
ในหัวข้อนี้เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของผิวเคลือบ เมื่อนำมาใช้ในร่างกาย โดยชิ้นงานตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นชิ้นงานที่เตรียมได้ โดยนำมาแช่ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C pH 7.4 ซึ่งมีระยะเวลาในการแช่ที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งในด้านน้ำหนัก สันฐานวิทยา รวมทั้งโครงสร้างผลึกของผิวเคลือบที่เกิดขึ้น จากผลการทดลองสามารถวิเคราะห์ผลได้ดังนี้

4.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของผิวเคลือบ

จากผิวเคลือบตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก และผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ As-coated จากผลการทดสอบในรูปที่ 4.8 พบว่าน้ำหนักของผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักมีน้ำหนักลดลงอย่างมากตั้งแต่เริ่มแช่ชิ้นงาน แต่หลังแช่ชิ้นงานผ่านไป

ประมาณ 6 ชั่วโมง น้ำหนักของผิวเคลือบกลับเพิ่มขึ้นตามลำดับจากแผนภูมิการละลายของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตดังรูปที่ 4.8 สามารถอธิบายได้ว่า Brushite เป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรน้อยกว่าไฮดรอกซีแอพาไทท์ทำให้เกิดการละลายออกได้ง่าย เมื่ออยู่ในสารละลาย SBF ซึ่งมี $\text{pH} \approx 7.4$ จึงเป็นผลให้น้ำหนักของผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก เมื่อเวลาในการแช่นานขึ้น Brushite ในผิวเคลือบลดลง (เพราะมีการละลายออก) ประกอบกับการ precipitate ของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดที่มีความเสถียรมากกว่าเกิดขึ้น จึงทำให้น้ำหนักของผิวเคลือบเพิ่มขึ้น ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kuo และคณะ [26] ที่พบว่าผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite ซึ่งมีลักษณะเป็น plate ไม่เสถียรในสารละลาย Hank's (เหมือนสารละลาย SBF ที่ใช้ศึกษา) ส่งผลให้น้ำหนักของผิวเคลือบลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ซึ่งต้องใช้ระยะเวลามากกว่า 1 วัน น้ำหนักของผิวเคลือบจึงเพิ่มขึ้น และพบว่าผิวเคลือบใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นโครงสร้างไฮดรอกซีแอพาไทท์

ผลการแช่ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated พบว่าน้ำหนักของผิวเคลือบเพิ่มขึ้น ตั้งแต่เริ่มแช่ขึ้นงานตัวอย่าง อาจเป็นผลมาจากไฮดรอกซีแอพาไทท์เป็นโครงสร้างที่ค่อนข้างเสถียรในสารละลาย SBF จึงไม่เกิดการละลายออกหรือมีการละลายออกน้อย ในขณะที่ precipitation ของแคลเซียมฟอสเฟตที่มีโครงสร้างที่เสถียรก็ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นผลทำให้น้ำหนักของผิวเคลือบที่เตรียมได้นอกจากนี้ น้ำหนักเพิ่มของผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด precipitation ของไฮดรอกซีแอพาไทท์ได้เร็วกว่า ดังนั้นหากนำไปใช้ในร่างกาย ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated ที่ได้จากกระบวนการเคลือบโดยตรงน่าจะมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิด precipitation ของไฮดรอกซีแอพาไทท์ (ในที่นี้หมายถึงกระดูก) ได้ดีมากกว่าผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก



รูปที่ 4.8 น้ำหนักของผิวเคลือบที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C pH7.4 ที่เวลาในการแช่ชิ้นงานแตกต่างกัน

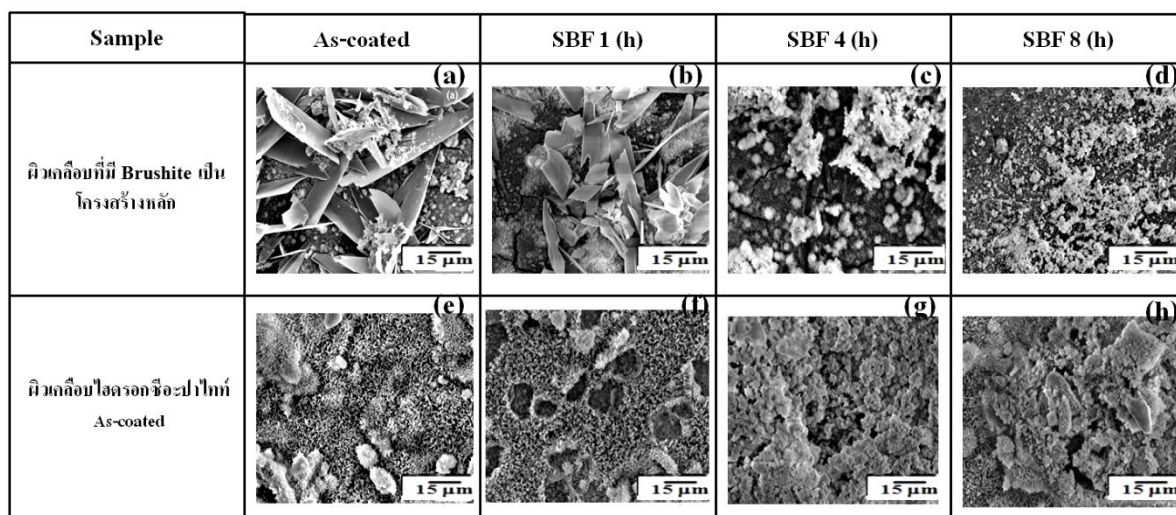
4.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังการแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงในรูปที่ 4.9 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักซึ่งมีสัณฐานวิทยาเป็น plate นั้น หลังจากแช่ในสารละลาย SBF ผ่านไป 1 ชั่วโมง ผิวเคลือบไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาแต่อย่างใด (รูปที่ 4.9 (b)) แต่เมื่อแช่ชิ้นงานผ่านไป 4 ชั่วโมง กลับมีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจน โดยพบเฉพาะ nodular บนผิวชิ้นงานเท่านั้น (รูปที่ 4.9 (c)) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่ชิ้นงานนานขึ้นถึง 8 ชั่วโมง ขนาดของ nodular มีลักษณะกลมและละเอียดมากขึ้น (รูปที่ 4.9 (d))

การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักหลังจากแช่ในสารละลาย SBF นี้เป็นผลมาจากความไม่เสถียรของโครงสร้าง Brushite ที่มีอยู่ในผิวเคลือบ ซึ่งมีการรายงาน [35] ว่าโครงสร้าง Brushite จะไม่มีความเสถียร เมื่ออยู่ในสารละลายที่มี pH สูงกว่า 5 (สารละลาย SBF มี pH 7.4) ด้วยเหตุนี้ผิวเคลือบที่มีโครงสร้าง Brushite จึงเกิดการละลายได้ง่าย ส่งผลให้บริเวณผิวด้านหน้าและรอบชิ้นงานมีไอออนของและ HPO_4^{2-} ปริมาณมาก และเมื่อสภาวะเหมาะสม (local pH $\approx$ 7) จะเกิดการ precipitate ของแคลเซียมฟอสเฟตที่มีความเสถียรจึงทำให้ผิวเคลือบที่มี Brushite

เป็นโครงสร้างหลักมีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาจาก plate ไปเป็น nodular ซึ่งเป็นสัณฐานวิทยาของไฮดรอกซีแอพาไทท์ ที่มีความเสถียรกว่าโครงสร้างเดิมที่เป็น Brushite [25, 26]

เมื่อพิจารณาผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated พบว่า nodular มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาในการแช่ (รูปที่ 4.9 (g)-(h)) โดยผลดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ซึ่งพบว่า ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการแช่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการ precipitation ของแคลเซียมฟอสเฟต (ไฮดรอกซีแอพาไทท์) บนสัณฐานวิทยาเดิมของผิวเคลือบเป็นหลัก สังเกตได้จากปริมาณ nodular ที่มีมากขึ้นจนปกคลุมสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะเป็น flake ทั้งหมด ซึ่งเป็นผลทำให้น้ำหนักของผิวเคลือบเพิ่มขึ้นด้วย

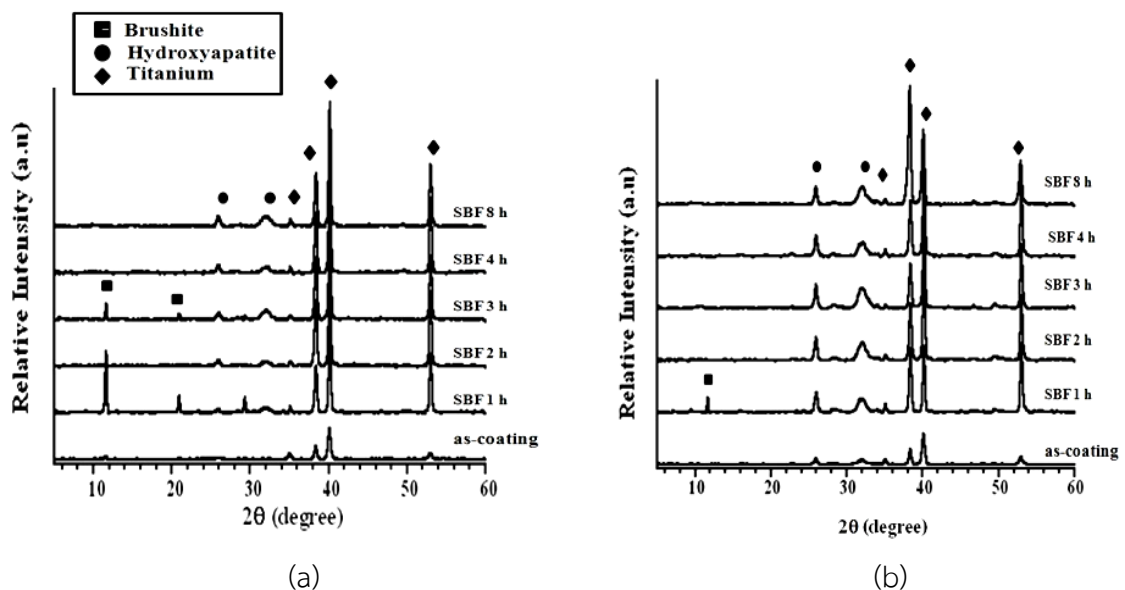


รูปที่ 4.9 สัณฐานวิทยาและน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปของผิวเคลือบแคลเซียมฟอสเฟตหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาแตกต่างกัน

4.4.2.3 โครงสร้างผลึกของผิวเคลือบหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิค XRD ของชิ้นงานที่ผ่านการแช่ในสารละลาย SBF ที่ระยะเวลาต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 4.10 โดยพบว่าผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักพบ Brushite ในผิวชิ้นงานหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ผ่านไป 1 ชั่วโมง (รูปที่ 4.10 (a)) แต่เมื่อแช่ชิ้นงานผ่านไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง Brushite ในผิวชิ้นงานกลับลดลง และเมื่อเวลาการแช่นานขึ้นตั้งแต่ 4 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะไม่พบโครงสร้างผลึกของ Brushite พบเพียงโครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีแอพาไทท์เท่านั้น อาจเป็นเพราะ Brushite มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจพบด้วยเทคนิค XRD ได้

สำหรับผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิต As-coated หลังจากแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบโครงสร้างผลึก Brushite เกิดขึ้น โดย Brushite ที่พบอาจเป็นผลมาจากการ precipitate ใหม่ของโครงสร้าง Brushite ซึ่งสามารถเกิดได้ง่ายกว่าไฮดรอกซีแอปาทิต ในสารละลาย SBF [44](สารละลาย SBF ประกอบด้วย Ca^{2+} และ HPO_4^{2-} (ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของไอออนในการเกิดผิวเคลือบ Brushite ได้) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการแช่ชิ้นงานตั้งแต่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป กลับไม่พบโครงสร้าง Brushite หลังจากแช่ชิ้นงาน จะพบเพียงโครงสร้างไฮดรอกซีแอปาทิตเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเวลานานขึ้น Brushite ที่มีอยู่ในผิวเคลือบเกิดการละลายออก และในสารละลาย SBF ขณะนั้นมีปริมาณ Ca^{2+} มากพอและมีสภาวะที่เหมาะสมที่จะเกิดการ precipitate เป็นไฮดรอกซีแอปาทิตที่ได้ (ในการเกิดไฮดรอกซีแอปาทิตต้องใช้ปริมาณ Ca^{2+} มากกว่าการเกิด Brushite) นอกจากนี้พบว่าผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิต As-coated ปริมาณของไฮดรอกซีแอปาทิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการแช่ชิ้นงาน ผลการทดลองที่ได้นี้ (Error! Reference source not found.) สอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.2.2 โดยพบว่าผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักมีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาจาก plate เป็น nodular (สัณฐานวิทยาของไฮดรอกซีแอปาทิต) หลังแช่ในสารละลาย SBF มากกว่า 3 ชั่วโมง สำหรับผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิต As-coated พบว่ามีปริมาณ nodular มีเพิ่มขึ้นและหนาแน่นขึ้น

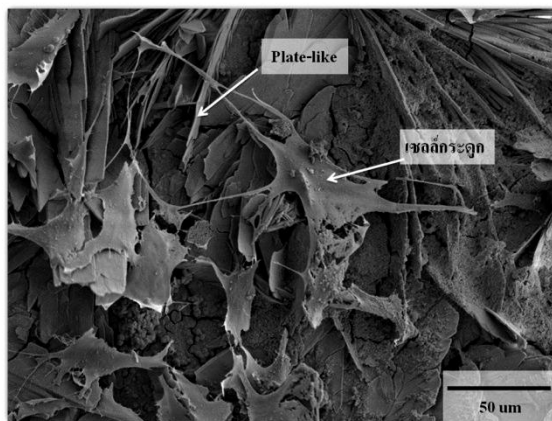


รูปที่ 4.10 X-ray diffraction patterns ของ (a) ผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก (b) ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิต As-coated ก่อนและหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่ระยะเวลาต่างกัน

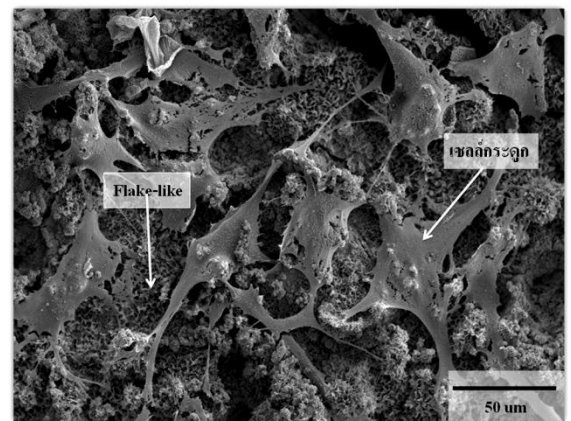
4.4.3 ทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกของมนุษย์บนผิวเคลือบ

นำชิ้นงานตัวอย่างที่มีโครงสร้างผลึกและสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่ ผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก (สัณฐานวิทยาแบบ plate) และผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทิต As-coated (สัณฐาน

วิทยาแบบ flake และ nodular) มาทดสอบการตอบสนองกับเซลล์กระดูก โดยเลี้ยงเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน จากการวิเคราะห์สภาพของเซลล์ด้วย SEM (**Error! Reference source not found.**) พบว่าเซลล์กระดูกสามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้บนผิวเคลือบตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ แต่เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กระดูกกับสัณฐานวิทยาแบบ plate (จากผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก (รูปที่ 4.11 (a)) แสดงให้เห็นว่าเซลล์กระดูกมีการยึดเกาะกับ plate ในแต่ละบริเวณไม่สม่ำเสมอทั่วผิวชิ้นงาน ทำให้เซลล์ต้องพยายามเกาะในแต่ละ plate ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ไม่มีการยึดเกาะเรียบไปกับผิวชิ้นงาน แต่สำหรับผิวที่ได้จากผิวเคลือบผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ As-coated ที่มีลักษณะเป็น flake และ nodular (รูปที่ 4.11 (b)) พบว่าเซลล์กระดูกมีการยึดเกาะบนผิวชิ้นงานค่อนข้างสม่ำเสมอ เซลล์มีการแผ่ตัวไปในระนาบเดียวกับผิวชิ้นงานได้ดีและยังสามารถเชื่อมต่อกันได้ง่าย



(a)



(b)

รูปที่ 4.11 การยึดเกาะของเซลล์กระดูก หลังจากเลี้ยงเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบเป็นเวลา 7 วัน

(a) สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก

(b) สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาท์ As-coated

หมายเหตุ ทดสอบที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (ผลการทดสอบเลขที่ HT 0064/5)

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบตัวอย่าง พบว่าผิวเคลือบที่มีลักษณะเป็น plate มีปริมาณเซลล์บนผิวเคลือบน้อยกว่าผิวเคลือบที่มีสัณฐานวิทยาแบบ flake และ nodular โดยผลการทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ผิวเคลือบที่มีลักษณะแบบใดสามารถตอบสนองต่อเซลล์กระดูกได้ดีกว่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และการนำไปใช้งานบริเวณส่วนต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งจะมีการตอบสนองของเซลล์ที่แตกต่างกัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองในขั้นต่อไป

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเตรียมผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้าบนผิวโลหะโดยศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการชุบเคลือบต่อสัณฐานวิทยา ชนิดของโครงสร้างผลึก ตลอดจนสมบัติทางชีวภาพของผิวเคลือบ สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1 กระบวนการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทาइटด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า

1. อุณหภูมิในการชุบเคลือบมีผลต่อชนิดแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดบนผิวรองรับโดยที่อุณหภูมิต่ำ (30 และ 40 °C): พบแคลเซียมฟอสเฟตชนิด Brushite โครงสร้างหลัก อยู่รวมกับไฮดรอกซีแอปาทาइटที่อุณหภูมิสูง (50 และ 60 °C): พบแคลเซียมฟอสเฟตชนิดไฮดรอกซีแอปาทาइटเท่านั้น
2. เวลาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก แต่ส่งผลต่อปริมาณที่เพิ่มขึ้นของโครงสร้างผลึกชนิดเดิมบนผิวรองรับ
3. ลักษณะสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแคลเซียมฟอสเฟตบนผิวรองรับ ดังนี้
 - ผิวเคลือบ Brushite สัณฐานวิทยาที่ได้มีลักษณะเป็น plate ขนาดใหญ่
 - ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटมีสัณฐานวิทยาแบบ flake และ nodular ที่มีความละเอียดกว่าแบบ plate
4. กระบวนการ Post-treatment ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถเปลี่ยนโครงสร้างผลึกจาก Brushite เป็นไฮดรอกซีแอปาทาइटได้ โดยลักษณะสัณฐานวิทยาไม่มีการเปลี่ยนแปลง
5. ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटที่เตรียมได้จากการชุบเคลือบโดยตรงและผ่านกระบวนการ Post-treatment ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

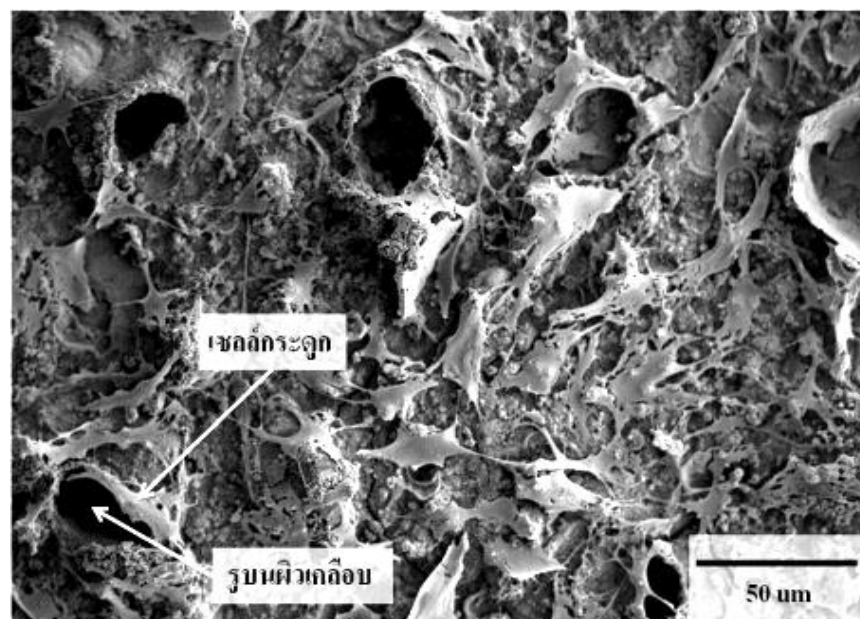
5.1.2 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

1. ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทาइटที่เตรียมได้จากการชุบเคลือบโดยตรงและผ่านกระบวนการ Post-treatment ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์
2. ผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งมีสัณฐานวิทยาแบบ plate ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสารละลาย SBF โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและสัณฐานวิทยาของผิวเคลือบ

3. ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated แสดงสมบัติความเป็น Bioactive ที่ดีในการเหนี่ยวนำให้เกิดไฮดรอกซีแอพาไทท์ (กระดูก) ในสารละลาย SBF ได้ดีกว่าผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลัก
4. ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ As-coated มีสัณฐานวิทยาที่มีความละเอียดเซลล์กระดูกมีการยึดเกาะบนผิวชิ้นงานค่อนข้างสม่ำเสมอ เซลล์มีการแผ่ตัวเชื่อมต่อกับเซลล์ข้างเคียงได้ดี รวมทั้งมีปริมาณของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบมากกว่าผิวเคลือบที่มี Brushite เป็นโครงสร้างหลักที่มีสัณฐานวิทยาแบบเป็นแผ่นขนาดใหญ่ (plate)

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าผิวเคลือบที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นรูพรุนเกิดขึ้น ดังรูปที่ 5.1 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ซึ่งปฏิกิริยาข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นตามสมการที่ 2.5 จากรูปจะเห็นได้ว่าเซลล์กระดูกไม่มีการเข้าไปยึดเกาะด้านใน มีเพียงการเกาะบริเวณปากหลุมเท่านั้น ซึ่งแสดงว่าเซลล์กระดูกมีการตอบสนองต่อผิวเคลือบที่ประกอบด้วยรูขนาดใหญ่ (จากการทดลองนี้ขนาดของรูมีขนาดประมาณ 20-30 ไมครอน) ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงผิวเคลือบให้มีสัณฐานวิทยาที่ปราศจากรูที่เกิดจากก๊าซไฮโดรเจน โดยอาจมีการเติมสารเติมแต่ง (Additive) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อให้ H_2O_2 แตกตัวเป็น OH^- ได้ง่ายขึ้นโดยไม่ต้องใช้ศักย์เกินมากซึ่งจะเป็นการลดการเกิดก๊าซของไฮโดรเจนที่มีผลต่อผิวเคลือบ



รูปที่ 5.1 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบที่มีรูพรุน

ทั้งนี้ผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ที่ได้ ยังมีการยึดเกาะที่ไม่ดีในบางบริเวณทำให้ผิวเคลือบบางส่วนหลุดลอกได้ง่าย ในการเคลือบผิวจึงต้องมีการปรับปรุงการยึดเกาะของผิวเคลือบต่อไป โดยสารเติมแต่งบางตัวจะมีส่วนช่วยในการยึดเกาะกันได้ดีขึ้น เช่น ฟลูออไรด์ เป็นต้น

นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ได้พบว่าปริมาณของเซลล์กระดูกบนผิวเคลือบที่มีสัณฐานวิทยาแบบละเอียดมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับสัณฐานวิทยาแบบ plate ซึ่งถ้าต้องการให้ได้ผิวที่มีลักษณะละเอียดอาจมีการเติมฟลูออไรด์หรือตัวเติมอื่นๆ เพื่อให้สัณฐานวิทยาของผิวเคลือบที่ได้มีลักษณะที่ละเอียดมากขึ้น รวมทั้งควรมีการทดสอบการตอบสนองต่อเซลล์กระดูกของผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ Post-treated เพื่อให้ทราบว่าผิวเคลือบไฮดรอกซีแอพาไทท์ที่ได้มาจากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันซึ่งมีความแตกต่างของสัณฐานวิทยา มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์กระดูกอย่างไร

จากผลการทดสอบการเข้ากันทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่าผิวเคลือบที่เตรียมได้ไม่มีความเป็นพิษ และมีการตอบสนองต่อเซลล์กระดูกในระดับหนึ่ง ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงผลการใช้งานจริง จึงควรนำผิวเคลือบที่เตรียมได้ไปทดลองในสัตว์ (*in vivo*) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวัสดุเพื่อใช้ในร่างกายมนุษย์ต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Geetha, M., Singh, A.K., Asokamani, R., and Gogia, A.K., 2009, "Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants a Review", **Progress in Materials Science**, Vol. 54, No. 3, pp. 397-425.
2. จินตมัย สุวรรณประทีป, สิริพร โตนดแก้ว, มาลินี ประสิทธิ์ศิลป์, 2549, **วิทยาการวัสดุการแพทย์ เล่ม 2**, สำนักพิมพ์ไทยเอฟเฟคส์สตูดิโอหน้า 24-61.
3. สมศักดิ์ คุปต์นิริติชัยกุล, ทวีชัย เตชะพงษ์วรชัย, พิบูลย์ อิทธิระวิวงศ์, 2545, **โลหะที่นำมาใช้ทางออร์โธปิดิกส์ในปัจจุบัน**, เวชศาสตร์ร่วมสมัย แพทย์ศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 1-12
4. Singh, R. and Dahotre, N., 2007, "Corrosion Degradation and Prevention by Surface Modification of Biometallic Materials", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Vol. 18, No. 5, pp. 725-751.
5. กมลรัตน์ ธนพประภัทร์, จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย, วัชรรา โชควิวัฒน์, ปรียวิศร์ ณ อุบล, 2548, **การทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์**, พิมพ์ครั้งที่1, ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค), หน้า 10-75.
6. Aksakal, B. and Hanyaloglu, C., 2008, "Bioceramic Dip-Coating on Ti-6Al-4V and 316L Ss Implant Materials", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Vol. 19, No. 5, pp. 2097-2104.
7. Zhang, Y. and Tao, J., 2006, "Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite Coatings on Titanium", **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, Vol. 16, No. 3, pp. 633-637.
8. ปิยนันท์ พันบุรี, 2552, "Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite on Titanium", วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมโลหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, หน้า 19-33.
9. Anon., 2011, **Metal Based Dental Restorations** [online], Available: <http://www.aesthetic-solutions.com.au/metal>. [20 เมษายน 2554].
10. Anon., 2011, **Sigma Knee System from Johnson and Johnson Dupuy**, [online], Available: <https://www.healthbase.com/hb/pages/fixed-bearing-knee-replacement.jsp>. [20 เมษายน 2554].
11. Anon., 2011, **Hip Replacement Recall Lawsuits Being Prosecuted by Former Orthopedic Company Insider**, [online], Available: <http://www.orthopediclaw.com>. [20 เมษายน 2554].
12. Coathup, M., Bates, P., Cool, P., Walker, P., Blumenthal, N.C., P., Walker, P., Blumenthal, N.C., JP., and Blunn, G., 1999, "Osseo-Mechanical Induction of Extra-

Cortical Plates with Reference to Their Surface Properties and Geometric Designs", **Biomaterials**, Vol. 20 (8), No., pp. 793-800.

13. Oh, I.-H., Nomura, N., Chiba, A., Murayama, Y., Masahashi, N., Lee, B.-T., and Hanada, S., 2005, "Microstructures and Bond Strengths of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings on Porous Titanium Substrates", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Vol. 16, No. 7, pp. 635-640.
14. Aoki, H., 1991, "Science and Medical Applications of Hydroxyapatite", **Tokyo JAAS**, pp. 1-98.
15. Zhao, Z., Zhang, G., and Li, H., 2004, "Preparation of Calcium Phosphate Coating on Pure Titanium Substrate by Electrodeposition Method", **Journal of Central South University of Technology**, Vol. 11, No. 2, pp. 147-151.
16. Narayanan, R., Seshadri, S., Kwon, T., and Kim, K., 2007, "Electrochemical Nano-Grained Calcium Phosphate Coatings on Ti-6Al-4V for Biomaterial Applications", **Scripta Materialia**, Vol. 56, No. 3, pp. 229-232.
17. Liu, X., Chu, P.K., and Ding, C., 2004, "Surface Modification of Titanium, Titanium Alloys, and Related Materials for Biomedical Applications", **Materials Science and Engineering: R: Reports**, Vol. 47, No. 3-4, pp. 49-121.
18. Ciobanu, G., Carja, G., and Ciobanu, O., 2008, "Structural Characterization of Hydroxyapatite Layer Coatings on Titanium Supports", **Surface and Coatings Technology**, Vol. 202, No. 11, pp. 2467-2470.
19. Blackwood, D. and Seah, K., 2009, "Electrochemical Cathodic Deposition of Hydroxyapatite: Improvements in Adhesion and Crystallinity", **Materials Science and Engineering: C**, Vol. 29, No. 4, pp. 1233-1238.
20. Yen, S. and Lin, C., 2003, "Cathodic Reactions of Electrolytic Hydroxyapatite Coating on Pure Titanium", **Materials Chemistry and Physics**, Vol. 77, No. 1, pp. 70-76.
21. Zhang, J., Lin, C., Feng, Z., and Tian, Z., 1998, "Mechanistic Studies of Electrodeposition for Bioceramic Coatings of Calcium Phosphates by an in Situ pH-Microsensor Technique", **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Vol. 452, No. 2, pp. 235-240.
22. Dumeli, N., Benhayoune, H., Rousse-Bertrand, C., Bouthors, S., Perchet, A., Wortham, L., Douglade, J., Laurent-Maquin, D., and Balossier, G., 2005,

- "Characterization of Electrodeposited Calcium Phosphate Coatings by Complementary Scanning Electron Microscopy and Scanning-Transmission Electron Microscopy Associated to X-Ray Microanalysis", **Thin Solid Films**, Vol. 492, No. 1-2, pp. 131-139.
23. Jones, D., 1996, **International Edition Principles and Prevention of Corrosion**, 2nd ed., Singapore, pp. 80-88.
 24. Rakngarm, A. and Mutoh, Y., 2009, "Electrochemical Depositions of Calcium Phosphate Film on Commercial Pure Titanium and Ti-6Al-4V in Two Types of Electrolyte at Room Temperature", **Materials Science and Engineering: C**, Vol. 29, No. 1, pp. 275-283.
 25. Prado da Silva, M., Lima, J., Soares, G., Elias, C., De Andrade, M., Best, S., and Gibson, I., 2001, "Transformation of Monetite to Hydroxyapatite in Bioactive Coatings on Titanium", **Surface and Coatings Technology**, Vol. 137, No. 2-3, pp. 270-276.
 26. Kuo, M. and Yen, S., 2004, "Immersion Characteristics of Electrolytic Calcium Phosphate Coated Ti in Simulated Physiological Fluid", **Journal of Materials Science**, Vol. 39, No. 7, pp. 2357-2363.
 27. Furutaka, K., Monma, H., Okura, T., and Takahashi, S., 2006, "Characteristic Reaction Processes in the System Brushite-NaOH Solution", **ECRS**, Vol. 26, No., pp. 543-547.
 28. Eliaz, N., 2008, "Electrocrystallization of Calcium Phosphate", **Israel Journal of Chemistry**, Vol. 48, No., pp. 156-168.
 29. dos Santos, E.A., Moldovan, M.S., Jacomine, L., Mateescu, M., Werckmann, J., Anselme, K., Mille, P., and Pelletier, H., 2009, "Oriented Hydroxyapatite Single Crystals Produced by the Electrodeposition Method", **Materials Science and Engineering: B**, Vol. 169, No. 1-3, pp. 138-144.
 30. Eliaz, N. and Eliyahu, M., 2007, "Electrochemical Processes of Nucleation and Growth of Hydroxyapatite on Titanium Supported by Real Time Electrochemical Atomic Force Microscopy", **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Vol. 80, No. 3, pp. 621-634.
 31. Popov, K., Djokic, S., and Grgur, B., 2002, **Fundamental Aspects of Electrometallurgy**, Published by Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, pp. 1-299.

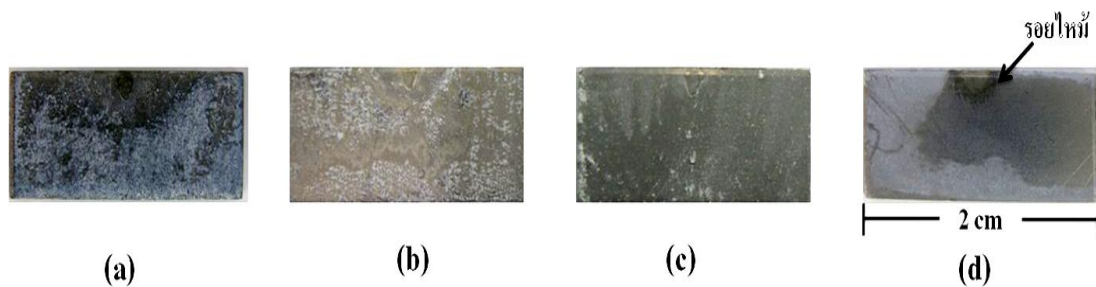
32. Stulajterov , R. and Medveck , L., 2008, "Effect of Calcium Ions on Transformation Brushite to Hydroxyapatite in Aqueous Solutions", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Vol. 316, No. 1-3, pp. 104-109.
33. Shih, W.J., Chen, Y.H., Wang, S.H., Li, W.L., Hon, M.H., and Wang, M.C., 2005, "Effect of Naoh (Aq) Treatment on the Phase Transformation and Morphology of Calcium Phosphate Deposited by an Electrolytic Method", **Journal of Crystal Growth**, Vol. 285, No. 4, pp. 633-641.
34. Abdel-Aal, E., Dietrich, D., Steinhäuser, S., and Wielage, B., 2008, "Electrocrystallization of Nanocrystallite Calcium Phosphate Coatings on Titanium Substrate at Different Current Densities", **Surface and Coatings Technology**, Vol. 202, No. 24, pp. 5895-5900.
35. Kuo, M. and Yen, S., 2002, "The Process of Electrochemical Deposited Hydroxyapatite Coatings on Biomedical Titanium at Room Temperature", **Materials Science and Engineering: C**, Vol. 20, No. 1-2, pp. 153-160.
36. Shirkhazadeh, M., 1998, "Direct Formation of Nanophase Hydroxyapatite on Cathodically Polarized Electrodes", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Vol. 9, No. 2, pp. 67-72.
37. Kannan, S., Balamurugan, A., and Rajeswari, S., 2002, "Development of Calcium Phosphate Coatings on Type 316L Ss and Their in Vitro Response", **Trends Biomater Artif Organs**, Vol. 16, No., p. 8.
38. Wang, J., Chao, Y., Wan, Q., Zhu, Z., and Yu, H., 2009, "Fluoridated Hydroxyapatite Coatings on Titanium Obtained by Electrochemical Deposition", **Acta Biomaterialia**, Vol. 5, No. 5, pp. 1798-1807.
39. Specchia, N., Pagnotta, A., Cappella, M., Tampieri, A., and Greco, F., 2002, "Effect of Hydroxyapatite Porosity on Growth and Differentiation of Human Osteoblast-Like Cells", **Journal of Materials Science**, Vol. 37, No. 3, pp. 577-584.
40. Kokubo, T. and Takadama, H., 2006, "How Useful is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?", **Biomaterials**, Vol. 27, No. 15, pp. 2907-2915.
41. Narayanan, R., Kwon, T.Y., and Kim, K.H., 2008, "Direct Nanocrystalline Hydroxyapatite Formation on Titanium from Ultrasonated Electrochemical Bath at Physiological pH", **Materials Science and Engineering: C**, Vol. 28, No. 8, pp. 1265-1270.

42. Liu, C., Huang, Y., Shen, W., and Cui, J., 2001, "Kinetics of Hydroxyapatite Precipitation at Ph 10 to 11", **Biomaterials**, Vol. 22, No. 4, pp. 301-306, Montero, C., 2008, "Electrochemical Assisted Deposition of Calcium Phosphate Coating for Orthopaedic Applications", Vol. 24, No. 1, pp. 18-22.
43. ชนะวงศ์ สุภาณี, 2547, การเตรียมวัสดุประกอบระหว่างไฮดรอกซีแอปาทาइटพอลิเมอร์ร่วมพอลิเอทิลีนอะดิเปตกับพอลิเอทิลีนเทอเรพทาเลต, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, หน้า 5-35.
44. Chokevivat, W., 2010, **MTT Cytotoxicity Assay**, MTEC Cell Culture Unit, Analytical and Testing Research Unit National Metal and Materials Technology Center, pp. 1-3.
45. Park, J.-H., Lee, D.-Y., Oh, K.-T., Lee, Y.-K., Kim, K.-M., and Kim, K.-N., 2006, "Bioactivity of Calcium Phosphate Coatings Prepared by Electrodeposition in a Modified Simulated Body Fluid", **Materials Letters**, Vol. 60, No. 21-22, pp. 2573-2577.
46. Chokevivat, W., 2011, **Biological in Vitro Test Using Direct Contact Method with Human/Rat Cells**, MTEC Cell Culture Unit, Analytical and Testing Research Unit National Metal and Materials Technology Center, pp. 1-25.

ภาคผนวก ก
รอยไหม้บริเวณชิ้นงาน

ในงานวิจัยนี้ได้มีการทดลองเพิ่มความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าในการชุบเคลือบผิวไฮดรอกซีแอปาทไทต์ ตั้งแต่ 10 20 60 และ 120 mA/cm² ลักษณะผิวเคลือบที่เตรียมได้แสดงดังรูปที่ ข.1 จากผลการทดลองพบว่าที่ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าตั้งแต่ 10–60 mA/cm² ผิวรองรับบริเวณที่ไว้จับชิ้นงานมีลักษณะสีเทาเหมือนผิวไทเทเนียม (รูปที่ ก.1 (a)-(c)) แต่เมื่อเพิ่มความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าเป็น 120 mA/cm² (รูปที่ ก.1 (d)) ผิวรองรับเกิดรอยไหม้สีน้ำตาลขึ้นบริเวณที่ไว้สำหรับจับชิ้นงาน เมื่อเทียบกับผิวรองรับที่มีการใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าต่ำกว่า (รูปที่ ก.1 (a)-(c)) ซึ่งรอยไหม้ที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อนำไปใช้งาน (เนื่องจากเมื่อนำไปใช้งานต้องเนื้อเยื่อหรือของเหลวในร่างกายต้องมีการสัมผัสกับบริเวณรอยไหม้ นี้ อาจมีการปล่อยสารที่มีพิษออกมา ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้) นอกจากนี้จากการสังเกตปริมาณผิวเคลือบที่มีสีขาวบนผิวรองรับ พบว่าปริมาณของผิวเคลือบสีขาว รูปที่ ก.1 (a) มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับชิ้นงานในรูปที่ ก.1 (b)-(d) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าส่งผลต่ออัตราเร็วในการชุบเคลือบบนชิ้นงาน หากมีการใช้ความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้ามากเกินไป จะส่งผลให้ผิวเคลือบมีลักษณะเป็นผงยึดเกาะกันไม่แน่นได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นจึงเลือกความหนาแน่นกระแสที่ใช้ศึกษาครั้งที่ 10 mA/cm² เนื่องจากพบว่าความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าง่ายกว่ามีโอกาสเกิดผิวเคลือบไฮดรอกซีแอปาทไทต์ได้มากกว่าความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าต่ำ [21, 34, 35] และหากใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าสูงเกินไป อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้มาก เช่น เกิดก๊าซไฮโดรเจน ทำให้ประสิทธิภาพการเคลือบลดลง และผิวเคลือบที่ได้มีลักษณะเป็นรูพรุน [19] ซึ่งไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าที่ 10 mA/cm² เท่านั้น



รูปที่ ก.1 ลักษณะผิวชิ้นงานที่มีการใช้ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าต่างกันที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 10 นาที (a) 10 mA/cm² (b) 20 mA/cm² (c) 60 mA/cm² (d) 120 mA/cm² (ลูกศรชี้ คือ รอยชิ้นงานที่เกิดการไหม้)

ภาคผนวก ข.
ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์

16-17 November 2010

Effect of Electrodeposition Time and Temperature on Hydroxyapatite Crystal Structure and Morphology

Weraya Worakitpetakkun¹, Piyanun Punburi²,
Kaysinee Sriraksasin^{3,*}, Napachat Tareelap¹,
Nandh Thavarungkul¹, Choochat Nitipanyawong¹

¹ Division of Materials Technology, School of Energy,
Environment and Materials, King Mongkut's University of
Technology Thonburi, Bangkok 10140, Thailand,

² School of Metallurgical Engineering, Institute of
Engineering, Suranaree University of Technology,
Nakornrachasima 30000, Thailand,

³ Research and Intellectual Property Promotion Center,
King Mongkut's University of Technology Thonburi,
Bangkok 10140, Thailand.

*Corresponding author's e-mail: kaysinee.sri@kmutt.ac.th

Abstract

In an attempt to attain the microstructure, chemical compositions, and morphology which promoted bone ingrowth, Hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) was electrodeposited on commercially pure Titanium (cp-Ti) grade 2 in mixed solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. With constant current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, the effects of electrodeposition time of 10, 30, 60 minutes; and temperatures of 30, 40, 50 and 60 °C on the surface properties of the deposits were investigated. XRD patterns indicated that brushite phase formed at the low-side electrodeposited temperatures of 30 and 40 °C; while HA developed at every temperature mentioned. The phase types obtained at all temperatures did not change with electrodeposition time. Crystal sizes of brushite and HA calculated using Scherrer's equation were found to be 26-45 nm and 15-25 nm, respectively. EDS revealed that the calcium to phosphorus ratio of the electrodeposited HA was similar to that of natural HA. Plate-like shape of brushite and flake-like and nodular-like shapes of HA were observed using SEM. The morphologies of HA were coarsening as electrodeposition time and temperature increased. Evidently, deposits obtained from high temperature and long time period depicted two different layers as shown below. The inner layer was flake-like structure covered with the outer layer of less dense nodular-like structure.

Introduction

Titanium and its alloy are used as biomedical device such as dental and orthopedic implants because of their excellent mechanical properties, corrosion resistance,

bioinert and biocompatibility [1]. However, titanium exhibits poor osteoinductive and bioactive properties resulting in isolation of device from the surrounding bone [2,3]. This problem can be resolved by coating with calcium phosphate or alkaline treatment [3].

Bioceramic Hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) whose chemical compositions and structure are similar to those of natural bone is usually coated on titanium for bioactive purpose [4,5]. The HA-coated device is able to promote bone ingrowth; consequently, strong bond between bone and the device is developed [6,7]. Therefore, it can reduce the patient suffering from re-surgery.

Nowadays, only HA coating produced from plasma spray technique is clinically accepted [7,8]. Owing to the complication of this technique in terms of high temperature used and compositional control difficulty, the researchers struggle to find out an alternative method to obtain HA coating for clinical employment.

Electrodeposition is an interesting method as it can be performed at room temperature and can apply on a complex shape device. The electrodeposition parameters; however, affect on properties of performed coating that is related to clinical usage.

Thus, this work aims at studying the effect of electrodeposition time and temperature on crystal structure and morphology of obtained coating on commercially pure titanium.

Experimental

Commercially pure Titanium grade 2 (cp-Ti grade 2) size $10 \text{ mm} \times 20 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ was used as a substrate. Prior to electrodeposition, it was cleaned with acetone in ultrasonic bath and rinsed with DI water followed by alkaline treatment-soaking in 0.5 M NaOH for 2 minutes at 50 °C.

The electrodeposit system used in this work was a two-electrode system in which substrate was a cathode; whereas, platinum wire was an anode. Electrolyte was a mixed solution of 42 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and 25 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ with pH 4. During electrodeposition period, the electrolyte was magnetic stirred. The coatings were obtained from constant current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 30, 40, 50, and 60 °C for 10, 30 and 60 minutes. The coated samples were then rinsed with DI water and air-dried.

Calcium phosphate coating performed was characterized by X-ray diffractometer (Bruker D8 discover) with $\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$ radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA. The increment angle was 0.02 degree/step with a scanning speed of 0.4 sec/step in the 2θ range of 5 to

60 degree. Crystal size of coating was calculated from XRD pattern using Scherrer's equation [4].

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Eq. 1}$$

Where k is 0.9 (Shape factor), β is the full-width half maximum (FWHM), λ is the wavelength of the X-ray radiation and θ is the diffraction angle.

Coating morphology was examined using Scanning Electron Microscope (JEOL-5800 and LEO-1450 VP). Calcium to phosphorous ratio of coatings was analyzed by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy technique (EDAX software)

Results and Discussion

3.1 Effect of electrodeposition temperature and time on surface morphology of coatings

Figure 1 shows surface morphologies of coatings obtained from different deposition time and temperature. The surface morphologies obtained from low operating temperature, 30 °C, appeared to be plate-like structure as shown in Figure 1(a)-(c). As the deposition time increased, an amount of plate evidently increased. Plate size, however, did not apparently change. When temperature increased to 40 °C, the observed morphologies were flake-like structure together with nodular-like structure (Figure 1 (d)-(f)). Nonetheless, small amount of plate-like structure was also observed at 10 and 30 minutes of electrodeposition time. At higher temperature, 50 and 60 °C, both of flake-like and nodular-like structures were observed. Flake-like structure formed perpendicular to substrate; while nodular-like structure was a fine, loosely formed and round-shape structure covered on flake-like structure. As time and temperature increased, nodular-like structure was more pronounced. This phenomenon was corresponded to cross-section image in Figure 2 at which the inner layer was flake-like structure covered with the outer layer of less dense nodular-like structure.

EDS was used to determine calcium to phosphorous ratio of an individual morphology. Calcium to phosphorus ratio of plate-like was 0.81-0.95 similar to brushite phase whose theoretical calcium to phosphorus ratio is 1.00. Calcium to phosphorus ratio of flake-like and nodular-like structures was 1.23-1.36 and 1.20-1.67 respectively. It was suggested that both of these structures were HA whose theoretical calcium to phosphorus ratio is 1.67. Therefore, the electrodeposition of single phase HA required high electrodeposited temperature commencing at 50 °C. At a certain time, it can be explained that high operating temperature (high driving force) can drive large amount

of calcium ions toward electrode; then, the formation of HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) by consuming ten calcium atoms for precipitation was preferable. In contrast to electrodeposition at low temperature, calcium ions adjacent to electrode were less; hence, the consuming of small amount of calcium (one atom) to form brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was favored.

The effect of deposition time on morphology was not clearly realized. At temperature beginning at 40 °C, when deposition time increased, the nodular-like layer was clearly seen owing to complete coverage on flake-like structure. However, the observed morphology at low temperature was only a high-packed plate-like structure.

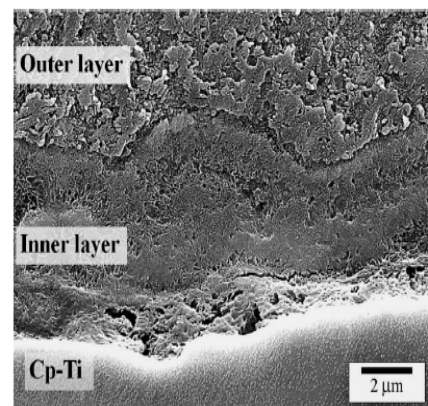


Figure 2 Cross-section image of electrodeposited HA coating obtained with current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 60 °C for 60 minutes.

3.2 Effect of electrodeposition temperature and time on crystal structure of coatings

Figure 3 and 4 show the XRD patterns of the obtained coatings. Phases indicated from the patterns are brushite, HA and titanium substrate. Only calcium phosphate phase, brushite and HA, was considered in this work. The major peak of brushite phase are located at 2θ equal to 11.6, 20.9, 29.2 and 30.5 degree while those of HA are 25.88, 31.77 degree. Figure 3 shows XRD patterns of coatings produced from current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 30, 40, 50, 60 °C for 60 minutes. When the temperature increased, the intensity of HA phase gradually enlarged; while, those of brushite reduced. At other electrodeposition time, the intensity of HA phase also increased if temperature increased (data not shown). It is confirmed that a single phase HA can be formed very well at high temperature commencing at 50°C; whereas brushite was easily formed at lower temperature as explained in Section 3.1. In some circumstances, two-phase formation was possible depending on driving force (e.g. temperature) input.

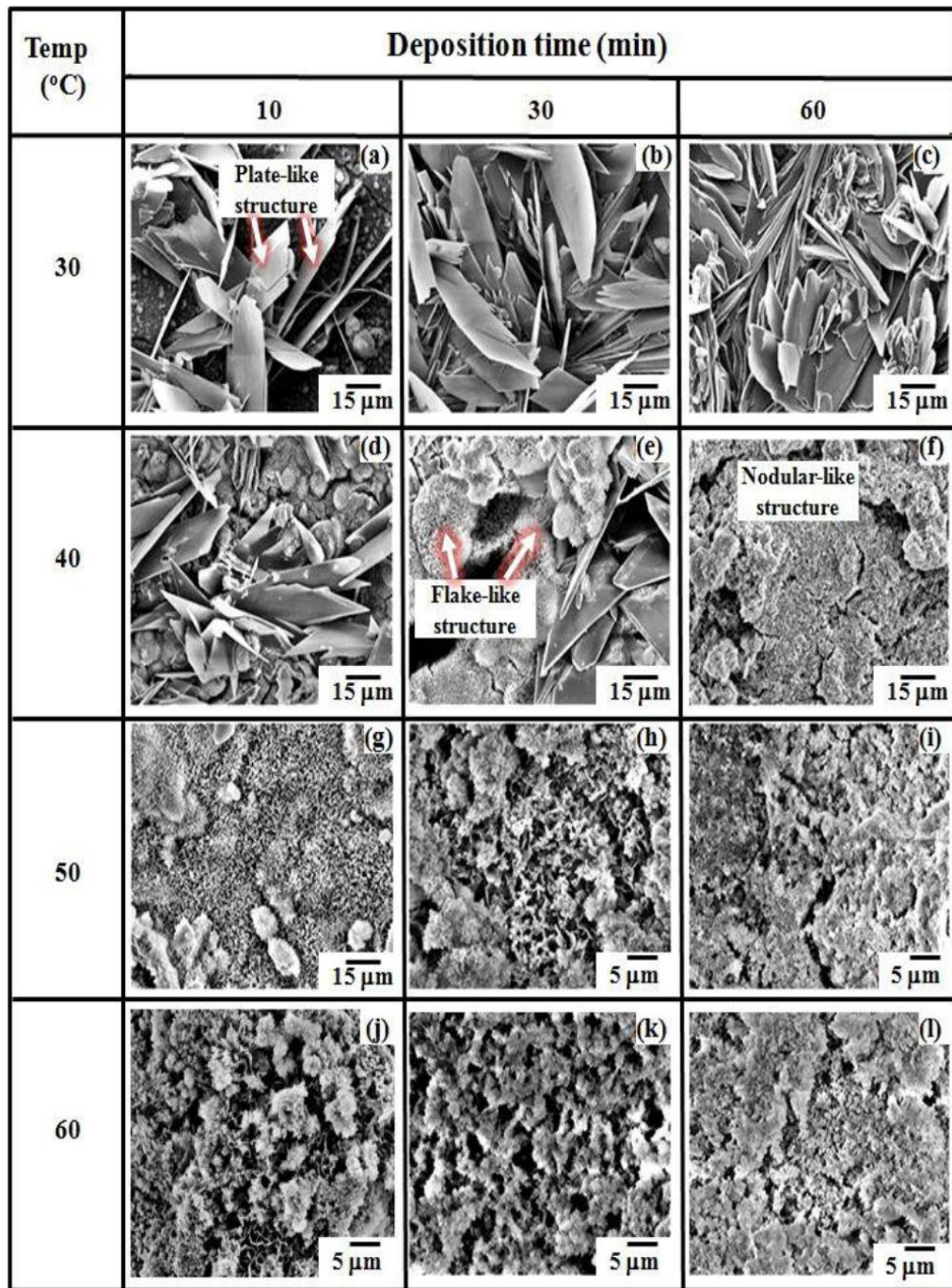


Figure 1 Coatings morphologies obtained with current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 30, 40, 50 and 60 °C for 10, 30 and 60 minutes.

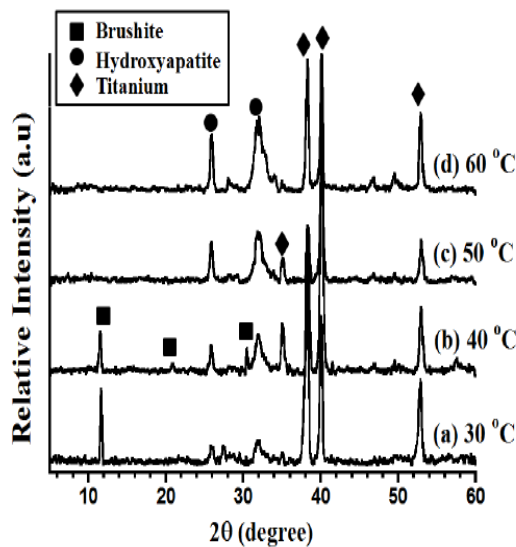


Figure 3 XRD patterns of coatings produced with current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at (a) 30°C , (b) 40°C , (c) 50°C and (d) 60°C for 60 minutes.

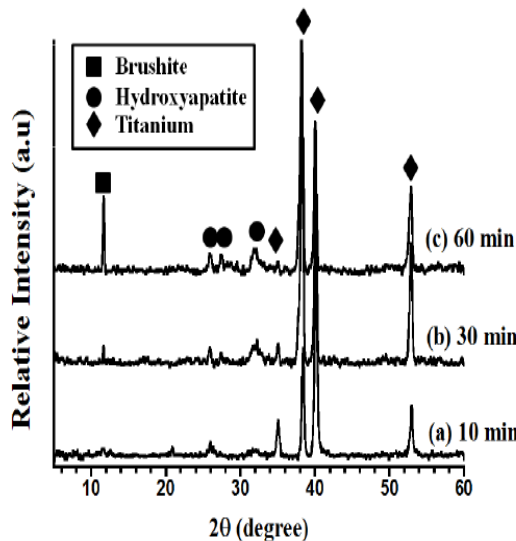


Figure 4 XRD patterns of coatings produced with current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 30°C for (a) 10 minutes, (b) 30 minutes and (c) 60 minutes.

Figure 4 presents XRD patterns of electrodeposited coatings produced from current density of $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 30°C for 10, 30 and 60 minutes. At all ranges of deposition time, indicated phases were both of brushite and HA. Although found phases were similar, the intensity of brushite and HA evidently increased as deposited time increased. Nonetheless, brushite phase peaks were more predominant than those of HA. This was corresponded to the plate-like structure observed in Figure 1(a)-(c). Increasing in intensity of phase content was owing to coating growth.

Crystal sizes of brushite and HA calculated using from Scherrer's equation (Eq.1) were 26-45 nm and 15-25 nm respectively. In general, crystal size of HA in immature and mature bones are 10-50 and 20-50 nm correspondingly. Hence, the HA produced in this work is supposed to have a good recognition with the natural bone in human body.

Conclusion

Electrodeposition technique can be used to coat HA on titanium. Type of phase formation depended on deposition temperature. A single phase HA formation required high temperature at least 50°C ; while brushite phase formation needed lower temperature. Once phase was formed, it could be grown by increasing electrodeposition time. HA obtained from this work was similar to that of natural bone; therefore, it is supposed to be used clinically.

Acknowledgement

The National Research Council of Thailand (NRCT) is acknowledged for financial support.

References

- 1) Geetha M., Singh A.K., Asokamani R., and Gogia A.K. (2009). *Progress in Materials Science*, Vol. 54, page 397-425.
- 2) Rakngarm A. and Mutoh Y. (2009). *Materials Science and Engineering C*, Vol. 29, page 275-283.
- 3) Lopez-Heredia M., Weiss P., and Layrolle P. (2007). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 18, page 381-390.
- 4) Narayanan R., Kwon T.-Y., and Kim K.-H. (2008). *Materials Science and Engineering C*, Vol. 28, page 1265-1270.
- 5) Liu C., Huang Y., Shen W., and Cui J. (2001). *Biomaterials*, Vol. 22, page 301-306.
- 6) Wang J., Chao Y., Wan Q., Zhu Z., and Yu H. (2009). *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, page 1798-1807.
- 7) Zhang Y.y., Tao J., Pang Y.c., Wang W., and Wang T. (2006). *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, Vol. 16, page 633-637.
- 8) Blackwood D.J. and Seah K.H.W. (2009). *Materials Science and Engineering C*, Vol. 29, page 1233-1238.