

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง

เครื่องมือ และอุปกรณ์ในงานวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.1.1 การบดผสม

1. เครื่องบดแนวตั้ง (Planetary Ball Mill) บริษัท FRITSCH รุ่น 8.6580



รูปที่ 3.1 เครื่องบดแนวตั้ง บริษัท FRITSCH รุ่น 8.6580

2. หม้อบดเซรามิก
3. ลูกบดเซอร์โคเนีย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
4. แม่พิมพ์ขึ้นงานทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร
5. แม่พิมพ์ขึ้นงานทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 30 มิลลิเมตร

3.1.2 การขึ้นรูป

1. เครื่องอัดขึ้นรูปแบบทิศทางเดียว (Uniaxial Pressing Machine) บริษัท ENERPAC รุ่น PUJ1200E
2. เครื่องอัดขึ้นรูปแบบความดันทุกทิศทาง (Cold Isostatic Pressing) บริษัท KOBE STEEL, LTD. รุ่น Dr.CIP



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการขึ้นรูป

(ก) เครื่องอัดขึ้นรูปแบบทิศทางเดียว

(ข) เครื่องอัดขึ้นรูปแบบความดันทุกทิศทาง

3.1.3 การอบประสาน

1. เตาอบประสานอุณหภูมิสูง บริษัท Linn High Therm รุ่น HT 1800Vac
2. เตาอบประสานสุญญากาศ บริษัท SCHMETZ รุ่น I45/1H-1R



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการอบประสาน

(ก) เตาอบประสานอุณหภูมิสูง

(ข) เตาอบประสานสุญญากาศ

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดสอบ

1. เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Laser Diffraction Technique) บริษัท Malvern Instruments Limited รุ่น Mastersizer 2000
2. เครื่องวิเคราะห์ขนาดรูพรุน และการกระจายตัวของรูพรุน (Pore Sizer Distribution) บริษัท Quantachrome รุ่น MasterPore 33



รูปที่ 3.4 เครื่องวิเคราะห์ขนาดรูพรุน และการกระจายตัวของรูพรุน

3. อุปกรณ์วัดขนาดชิ้นงาน ประกอบด้วย เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (Vernier Calipper) บริษัท Mitutoyo รุ่น CD-8" CD
4. เครื่องชั่ง (Digital balance) บริษัท BECTHAI รุ่น 0037-32
5. เครื่องทดสอบแรงกด (Universal Tensile Testing Machine) บริษัท LLOYD Instruments
6. เครื่องทดสอบแรงดัด (Universal Testing Machine) บริษัท Instron รุ่น 55R4502, S/N H3342
7. กล้องจุลทรรศน์ (Light Optical Microscope) บริษัท Nikon รุ่น Eclipse E-200
8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) บริษัท Jeol รุ่น JSM-5800 และรุ่น JSM-6610 LV พร้อมชุดวิเคราะห์ธาตุ (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy; EDS) ยี่ห้อ Oxford รุ่น Inca 350
9. เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ บริษัท Bruker รุ่น D8-advance
10. ผู้ควบคุมบรรยากาศ ของบริษัท PLAS LABS รุ่น 855-AC/EXP
11. เครื่องวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสาร โดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน



รูปที่ 3.5 เครื่องทดสอบแรงกด

3.1.5 วัสดุ และสารเคมี

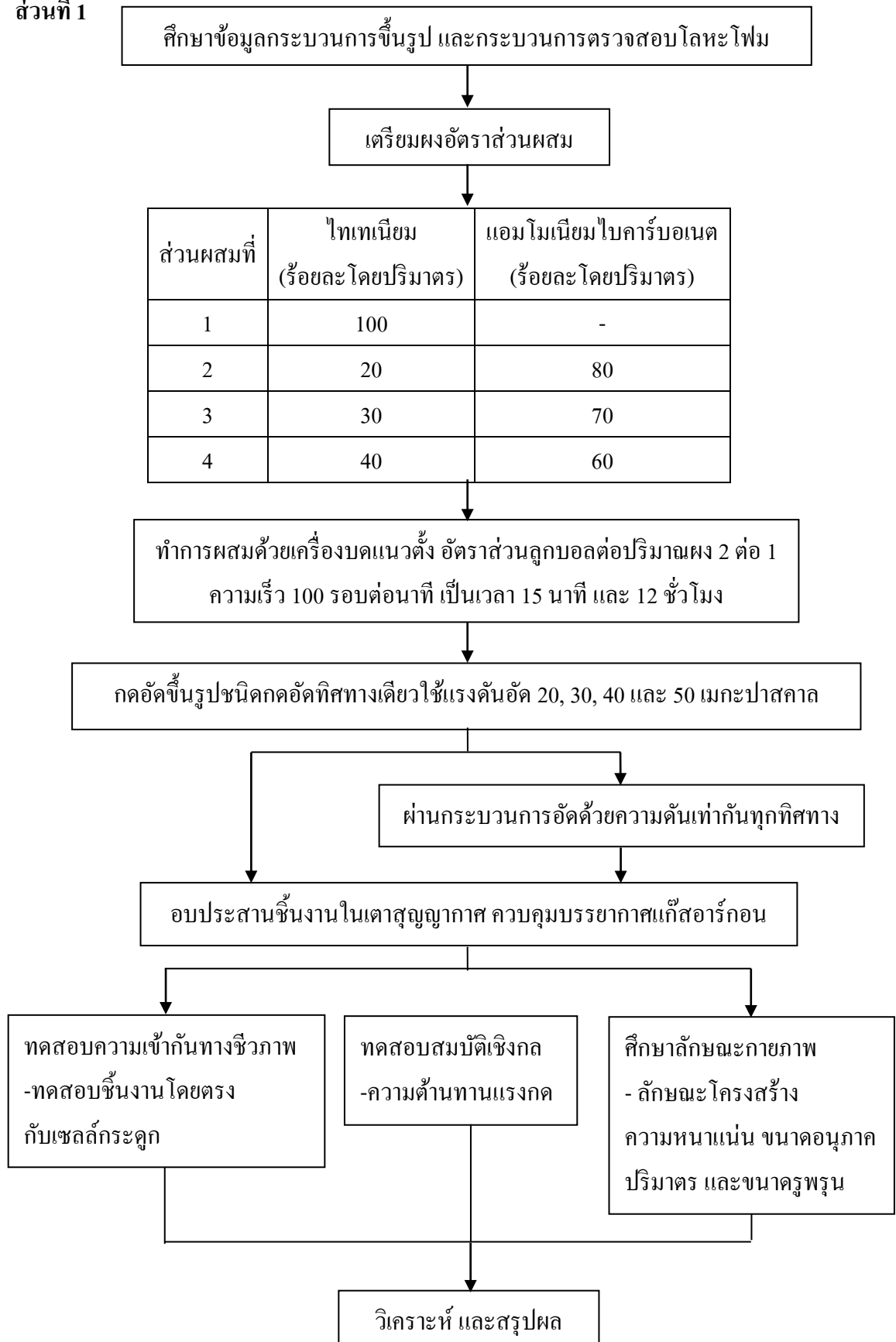
1. อะซิโตน (C_3H_6O)
2. ผงแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (NH_4HCO_3)
3. ผงโลหะไทเทเนียมไฮดรอกไซด์ 99.7 เปอร์เซ็นต์ (TiH) ขนาดอนุภาคน้อยกว่าหรือเท่ากับ 45 ไมโครเมตร
4. ผงไฮดรอกซีเอปาทาइट ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$) ขนาดอนุภาค 5 และ 50-150 ไมโครเมตร
5. ผงแก้วชีวภาพ (Bioglass)
6. ซิงค์สเตียเรต ($Zn(C_{18}H_{35}O_2)_2$)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 แผนผังกระบวนการศึกษาวิจัย

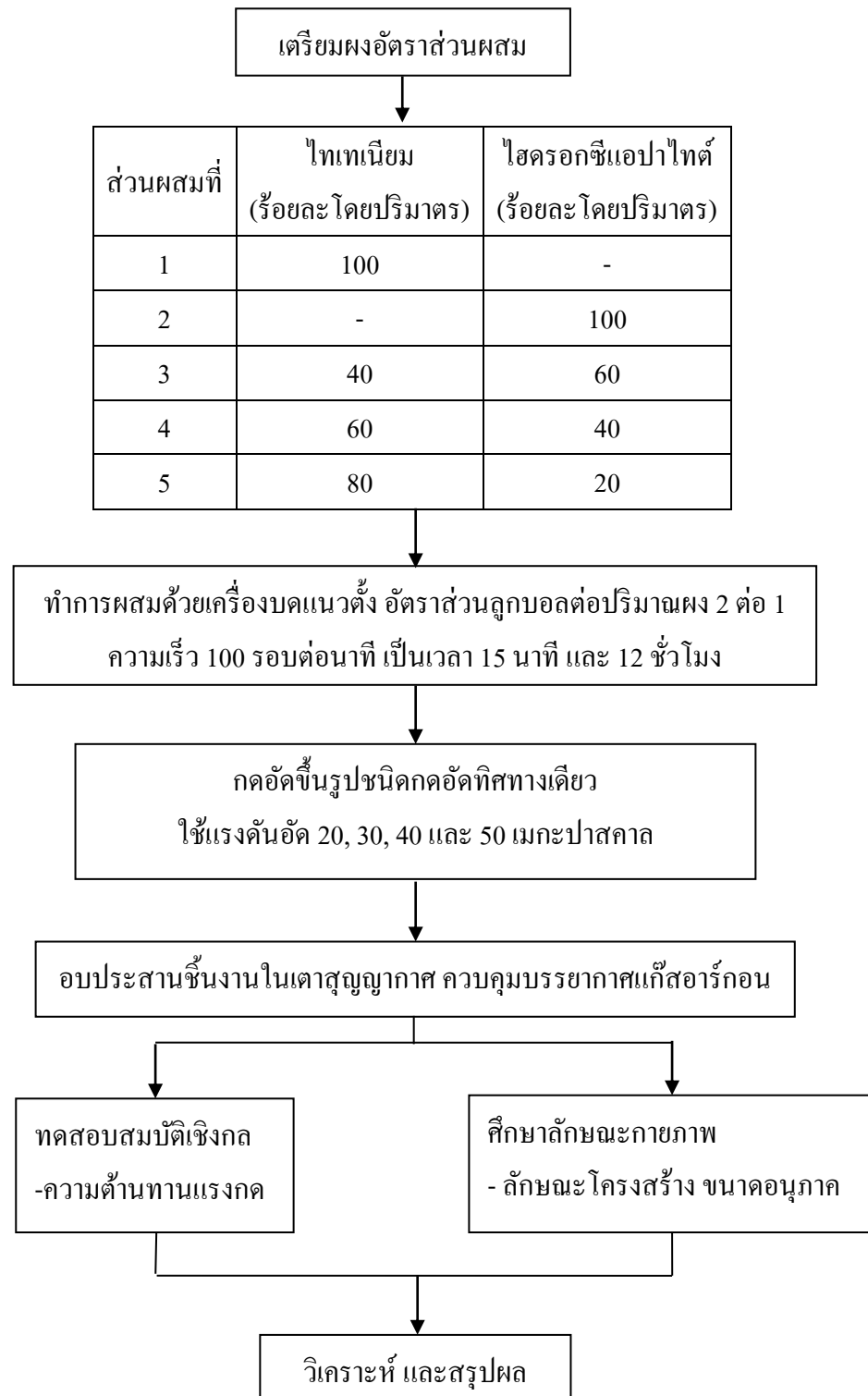
จากขอบเขตของการวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถแบ่งแผนผังการศึกษาวิจัยออกได้เป็น 2 ส่วนด้วยกันดังนี้ ส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษากระบวนการผลิต และสมบัติทางกลของ โครงร่างทดแทนกระดูกที่ทำจากวัสดุไทเทเนียมที่มีความพรุนที่มีอัตราส่วนสารที่ทำให้เกิดความพรุน วิธีขึ้นรูป และแรงดันอัดขึ้นรูปชิ้นงานที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาในส่วนต่อไป โดยในส่วนที่สองเป็นการผลิต โครงร่างทดแทนกระดูกที่ทำจากวัสดุไทเทเนียมผสมไฮดรอกซีแอปพาไทต์ เพื่อเป็นการปรับปรุงสมบัติทางกล และสมบัติความเข้ากันทางชีวภาพ พร้อมทั้งเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับ ส่วนที่หนึ่ง แต่จากผลการทดลองเมื่อทำการผลิตชิ้นงานตามแผนการทดลองในส่วนที่ 2 พบว่าชิ้นงาน ที่ได้มีลักษณะกายภาพไม่ตรงตามต้องการ ดังผลการทดลองที่กล่าวในภาคผนวก ก. จึงได้มีการเพิ่ม การทดลองส่วนที่ 3 เพื่อแก้ไขปัญหาที่พบ โดยการนำผงแก้วชีวภาพผสมลงในส่วนผสมเริ่มต้นการผลิตวัสดุทดแทนกระดูกส่วนที่สอง จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นสามารถอธิบายเป็นแผนผังได้ ดังรูปที่ 3.6-3.8

ส่วนที่ 1



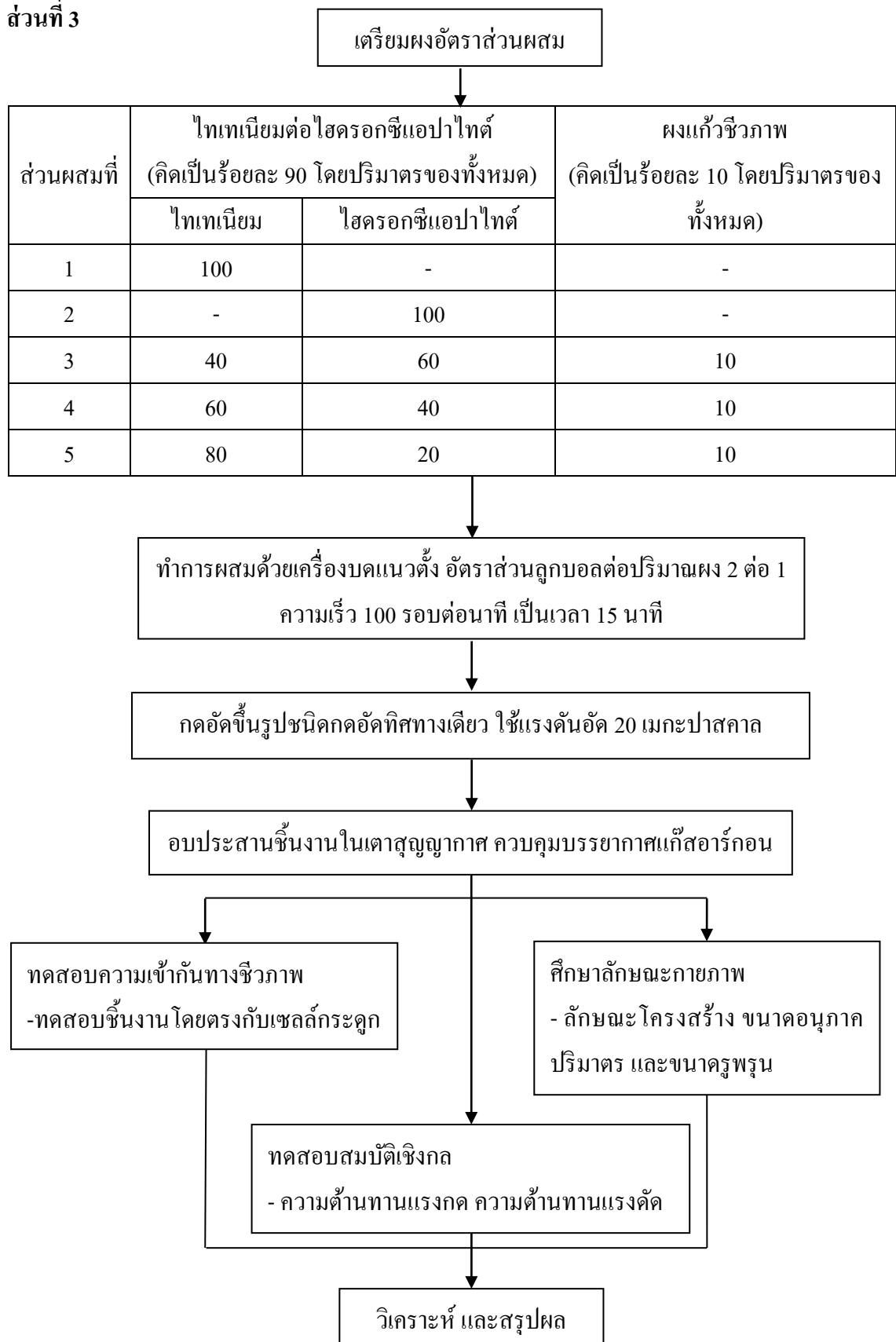
รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยส่วนที่ 1

ส่วนที่ 2



รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยส่วนที่ 2

ส่วนที่ 3



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยส่วนที่ 3

3.2.2 การบดผสม

การเตรียมผงอัตราส่วนต่างๆ ทำโดยการบดผสมผงด้วยเครื่องบดแนวตั้ง หมุนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อัตราส่วนน้ำหนักถูกบดต่อน้ำหนักผง 2 ต่อ 1 เป็นระยะเวลา 15 นาที และ 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการบดผสมผสม และทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนผสม โดยการทดลองส่วนที่ 1 ทำการผสมผงแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตอัตราส่วนร้อยละ 0, 60, 70 และ 80 โดยปริมาตร ในการทดลองส่วนที่ 2 และ 3 ทำการผสมผงไฮดรอกซีเอปาทิตขนาด 5 และ 50-150 ไมโครเมตร อัตราส่วนร้อยละ 0, 20, 40, 60 และ 100 โดยปริมาตร โดยในการทดลองส่วนที่ 3 มีการเพิ่มอัตราส่วนผงแก้วชีวภาพอัตราส่วนร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในส่วนผสมข้างต้น เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคผงไฮดรอกซีเอปาทิต และอัตราส่วนผสม พร้อมทั้งศึกษาลักษณะทางกายภาพของผงหลังบดผสม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และวิเคราะห์องค์ประกอบของชิ้นงานด้วยเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ ตรวจสอบขนาดของผงด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค ตรวจสอบการสลายตัวของอนุภาคผงแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตด้วยเครื่องวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน

3.2.3 การอัดขึ้นรูปชิ้นงาน

ทำการอัดขึ้นรูปชิ้นงานลักษณะทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร สูง 10 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปแบบทิสทางเดียว โดยการทดลองส่วนที่ 1 ใช้แรงอัดขึ้นรูปแบบทิสทางเดียวขนาดต่างกัน ได้แก่ 20, 30, 40 และ 50 เมกะปาสกาล และนำไปผ่านกระบวนการอัดด้วยความดันเท่ากันทุกทิศทาง เพื่อศึกษาอิทธิพลของวิธีขึ้นรูป และแรงอัดขึ้นรูปที่ส่งผลต่อสมบัติทางกลความต้านทานแรงกด นำผลการทดลองที่ได้จากส่วนที่ 1 มาพิจารณาเลือกวิธี และแรงอัดที่ที่เหมาะสมที่สุด นำมาใช้ในการทดลองส่วนที่ 2 และ 3 พร้อมทั้งทำการอัดขึ้นรูปชิ้นงานลักษณะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 30 มิลลิเมตร สูง 6 มิลลิเมตร เพื่อใช้สำหรับทดสอบความต้านทานแรงดัด

3.2.4 การอบประสาน

การอบประสานชิ้นงาน ในการทดลองส่วนที่ 1 ทำการอบเพื่อกำจัดสารที่ทำให้เกิดความพรุน (แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต) ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นอบประสานที่อุณหภูมิ 1300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในเตาสภาวะสุญญากาศควบคุมบรรยากาศแก๊สอาร์กอน ในส่วนการทดลองส่วนที่ 2 และ 3 ทำการอบประสานที่อุณหภูมิ 1100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในเตาสภาวะสุญญากาศควบคุมบรรยากาศแก๊สอาร์กอน โดยปล่อยให้ชิ้นงานเย็นตัวในเตา

3.2.5 การตรวจสอบสมบัติของผง

3.2.5.1 การวัดขนาดอนุภาค

การวัดขนาดอนุภาค ใช้เครื่อง Mastersizer 2000 การทำงานของเครื่องนี้จะอาศัยหลักการกระเจิงของแสงที่ไปกระทบอนุภาค แล้วสะท้อนเป็นมุมต่างๆ มาเข้าตัวตรวจจับ (Laser diffraction technique) ซึ่งประมวลผลปริมาณความเข้มของแสงที่มุมต่างๆ ออกมาเป็นค่าของขนาดอนุภาค โดยสถานะที่วิเคราะห์ในการตรวจสอบนี้ใช้วิธีการแบบแห้ง ขนาดลำแสง 10 มิลลิเมตร ค่ากำลังของเลเซอร์ 70.6 ค่าอัตราการป้อนผง (Feed rate) ประมาณร้อยละ 50 ขนาดของอนุภาคที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.02-2,000 ไมโครเมตร ค่าดัชนีหักเหของตัวอย่าง 1.450 จำนวนครั้งในการทดลอง 3 ครั้ง

3.2.5.2 การวิเคราะห์เฟส

การวิเคราะห์เฟส หรือการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของวัสดุ ด้วยเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ใช้เทคนิคแบบ Locked coupled วัดมุม 2θ ตั้งแต่ 20 – 100 องศา ทำการวัดทุกๆ 0.02 องศา โดยใช้ความเร็ว 0.4 วินาทีต่อครั้ง มีขนาดของสลิต 1 มิลลิเมตร ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 40 กิโลโวลต์ และกระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์

3.2.5.3 การตรวจสอบรูปร่างของผง

การตรวจสอบลักษณะรูปร่างของผงโลหะก่อนบด และหลังบดรวมทั้งรอยแตกหักจะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น (Initial potential, E_0) 10 กิโลโวลต์ และกระแสไฟฟ้าเริ่มต้น (Initial current, I_0) 24 มิลลิแอมป์ ในการตรวจสอบถ้าเป็นผงไฮดรอกซีเอปาทาइटต้องนำไปเคลือบทอง เนื่องจากเป็นสารในกลุ่มเซรามิกไม่สามารถนำไฟฟ้าได้

3.2.6 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ และทางกล

3.2.6.1 การหาความหนาแน่นของชิ้นงาน

เนื่องจากชิ้นงานที่ผลิตมีความพรุนจึงเลือกใช้วิธีหาความหนาแน่นของชิ้นงาน โดยชั่งน้ำหนัก และคำนวณปริมาตรของชิ้นงานตามลักษณะที่ขึ้นรูป ได้แก่ ทรงกระบอก และทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นตามสมการที่ 3.1

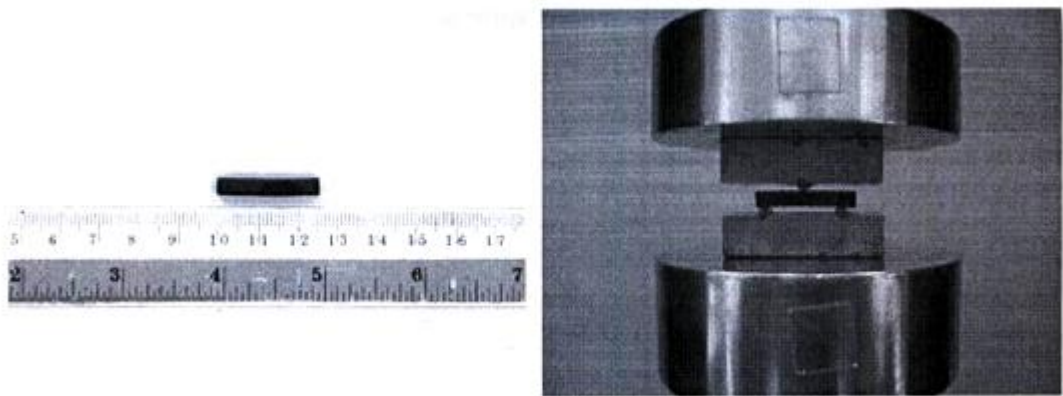
$$\text{ความหนาแน่น} = \frac{\text{น้ำหนักของชิ้นงาน}}{\text{ปริมาตรของชิ้นงาน}} \quad (3.1)$$

3.2.6.2 การทดสอบความต้านทานแรงกด

การเตรียมชิ้นงานทดสอบ ใช้ชิ้นงานทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร สูง 10 มิลลิเมตร ทดสอบความต้านทานแรงกดด้วยเครื่อง Universal tensile testing machine บริษัท LLOYD Instruments ขนาด 10 ตัน ความเร็วหัวทดสอบ 5 มิลลิเมตรต่อนาที ระยะห่างระหว่างจุดรองรับ 20 มิลลิเมตร แรงกดเริ่มต้น 100 นิวตัน

3.2.6.3 การทดสอบความต้านทานแรงดัด

การทดสอบแรงดัดของชิ้นงานเลือกใช้ระบบ 3-point การเตรียมชิ้นงานทดสอบใช้ชิ้นงานทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 30 มิลลิเมตร สูง 6 มิลลิเมตร ทดสอบความต้านทานแรงดัดด้วยเครื่อง Universal testing machine บริษัท Instron รุ่น 55R4502, S/N H3342 ความเร็วหัวทดสอบ 1 มิลลิเมตรต่อนาที ระยะห่างระหว่างจุดรองรับ 20 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของเพลากลด 2.5 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 ตัวอย่าง และลักษณะการทดสอบ 3-point bending

3.2.7 การศึกษาการตอบสนองของเซลล์กระดูกต่อวัสดุโครงร่างทดแทนกระดูก (Biocompatibility testing) [29]

ทดสอบโดยใช้วิธีทดสอบโดยตรงกับเซลล์กระดูก ซึ่งอยู่ในขอบข่ายที่ได้รับการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบ ISO/IEC 17025:2005 โดยทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูกบนผิวชิ้นงาน โดยตรงภายใต้สภาวะ และระยะเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อประเมินผลจากการพิจารณาการยึดเกาะ และความสมบูรณ์ของเซลล์กระดูกที่นำมาทดสอบ

3.2.7.1 การทดสอบการตอบสนองของเซลล์กระดูก

1. การเตรียมชิ้นงานทดสอบ

ทำการเตรียมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งระบบอัตโนมัติ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที) โดยวางชิ้นงานทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร สูง 5 มิลลิเมตร ลงในจานเพาะเลี้ยง จานละ 1 ชิ้น

2. การเลี้ยงเซลล์กระดูก

นำสารละลายเซลล์ Human Osteoblast (h-OBs) ที่มีความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยง DMEM completed medium เติมลงบนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ และชุดควบคุม ตัวอย่างละ 200 ไมโครลิตร ซึ่งชุดควบคุม ได้แก่

ชุดควบคุม Reagent control ได้แก่ ภาชนะเพาะเลี้ยง

ชุดควบคุม Negative control material ได้แก่ วัสดุ Thermanox (Nunc) cover slips

ชุดควบคุม Positive control material ได้แก่ วัสดุ Polyurethane film containing 0.1 เปอร์เซ็นต์ Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC): RM-A

ตั้งตัวอย่างทดสอบที่มีเซลล์ไว้ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะในตู้บรียากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส, คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ± 5 เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงทุก 3 วัน

3. การทำ Fixation

สารเคมีที่ใช้ 1. 0.2 โมลาร์ Cacodylic acid sodium salt trihydrate ($C_2H_6AsNaO_2 \cdot 3H_2O$)

2. ร้อยละ 25 Glutaraldehyde

3. น้ำกลั่น

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมลงให้ท่วมชิ้นงานที่ต้องการ Fixation แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

4. การทำ Washing

สารเคมีที่ใช้ 1. 0.2 โมลาร์ Cacodylic acid sodium salt trihydrate ($C_2H_6AsNaO_2 \cdot 3H_2O$)

2. 0.5 โมลาร์ Sucrose solution

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันดูด Fixative ออกแล้วเติม Washing solution ลงให้ท่วมชิ้นงานแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

5. การทำ Dehydration

สารเคมีที่ใช้ 1. Absolute ethanol

- เตรียมเอทานอลความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และเอทานอลบริสุทธิ์

- ทำการดูดถ่าย Washing solution ออกแล้วเติมเอทานอลร้อยละ 20 ลงไปแทนที่ไว้ 15 นาที
- ทำการดูดถ่ายเอทานอลร้อยละ 20 ออกแล้วเติมเอทานอลร้อยละ 30 ลงแทนที่ไว้ 15 นาที ทำเช่นนี้จนถึงเอทานอลร้อยละ 70 ที่ไว้ 1.5 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอลบริสุทธิ์ แล้วนำแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนจากนั้นนำไปทำตัวอย่างให้แห้งต่อไป

6. การวิเคราะห์ผล

นำตัวอย่างที่ทำให้แห้งด้วยเครื่อง CPD (Critical Point Dryer) ไปทำการเคลือบทองแล้วจึงนำไปวิเคราะห์การยึกเกาะ และความสมบูรณ์ของเซลล์กระดูกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด