

**การศึกษาลักษณะเฉพาะของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีการจัดเรียง
ตัวอย่างเป็นระเบียบสำหรับการดูดซับโปรตีนอัลบูมิน**
**CHARACTERISATION OF TITANIUM DIOXIDE NANOTUBE ARRAYS FOR
ADSORPTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN**

อารีญา เอี่ยมมบู* โชคชัย พุทธรักษา วรมน แห่่งหล้า รัชดาวรรณ กมลเพชร
Areeya Aeimbu, Chokchai Puttharuga, Waramon Langlar, Rachatawan Kamolpach*

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Physics, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

**Corresponding author, E-mail: areeya@g.swu.ac.th*

บทคัดย่อ

การดูดซับโปรตีนบนพื้นผิวของแข็งเป็นปรากฏการณ์ที่ซับซ้อน ดังนั้นการเข้าใจถึงพฤติกรรม
การดูดซับของโปรตีนบนของแข็งจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการดูดซับ
โปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ โดยใช้เทคนิค
ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี ผลการทดลองแสดงว่ามีการดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโน
ไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และมีการดูดซับที่สภาวะคงที่ โดยเวลาที่ใช้
ในการดูดซับเพียงแค่ 1 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงการดูดซับของโปรตีนอัลบูมินแบบชั้นเดียว
บนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ

คำสำคัญ: ท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ การดูดซับ โปรตีนอัลบูมิน เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

Abstract

The adsorption of protein onto solid surfaces is a very complex phenomenon. It is very
important to understand the behaviour of protein on the solid surface. The goal of this research
was to study the adsorption of Bovine Serum Albumin (BSA) onto titanium dioxide nanotube
arrays using UV-Visible spectroscopy. The result indicated adsorption of BSA on the titanium
dioxide nanotube arrays. The BSA adsorbed on titanium dioxide nanotube arrays reached steady
value within one hour. Moreover, the result indicated a monolayer of the protein on titanium
dioxide nanotube arrays.

Keywords: Titanium Dioxide Nanotube Arrays, Adsorption, Bovine Serum Albumin, UV-Visible
Spectroscopy

บทนำ

ในปีปัจจุบันไทเทเนียมและโลหะผสมไทเทเนียม (Titanium and Titanium Alloys) เป็นโลหะฝัง (Metallic Implants) ถูกนำไปใช้ในด้านการทันตกรรม (Dentistry) และศัลยกรรมกระดูก (Orthopaedics) เพราะว่าไทเทเนียมมีสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม เข้ากันได้ดีกับร่างกาย (Biocompatibility) และไม่เป็นพิษ (Nontoxic) เนื่องจากไทเทเนียมเป็นวัสดุที่เฉื่อยต่อการตอบสนองทางชีว (Bioinert Material) [1] แต่มีสมบัติการยึดติดกับกระดูกที่อยู่ติดกัน (Osseointegration) ต่ำ นำไปสู่ความล้มเหลวของวัสดุฝังนั้น [2] เพื่อให้เกิดการยึดติดกับกระดูกได้อย่างรวดเร็ว จึงมีการปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของพื้นผิววัสดุเทียม ซึ่งเป็นปัจจัยควบคุมการเริ่มต้นการติดกันระหว่างเนื้อเยื่อรอบวัสดุนั้นกับเซลล์กระดูก เช่น โครงสร้างระดับจุลภาคและความขรุขระ ซึ่งมีผลต่อการเจริญของกระดูกเข้าสู่ผิวของวัสดุฝัง อัตราการยึดติดและการติดแน่นระหว่างวัสดุฝังและกระดูกที่อยู่ติดกัน พื้นผิวที่มีความขรุขระมากจะกระตุ้นการเจริญของกระดูกเข้าสู่ผิวของวัสดุฝัง และเกิดการเชื่อมประสานกันระหว่างพื้นผิวของวัสดุฝังได้ดี อย่างไรก็ตามพื้นผิวที่ขรุขระมากเกินไปมีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดการห่อหุ้มวัสดุฝัง (Peri-Implantitis) และการหลุดของไอออนโลหะ จากงานวิจัยแสดงว่าโครงสร้างพื้นผิวระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตร มีบทบาทอย่างยิ่งต่อการดูดซับ (Adsorption) ของโปรตีน การยึดติดของเซลล์ที่จะเป็นกระดูก (Osteoblastic Cells) รวมถึงอัตราการยึดติดกับกระดูกที่อยู่ติดกัน [3] โปรตีนที่อยู่ในกระแสเลือดมี 3 ชนิด คือ อัลบูมิน (Albumin) โกลบูลิน (Globulin) และไฟบริโนเจน (Fibrinogen) อัลบูมินหรือเซรัมอัลบูมิน (Serum Albumin) คือโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักในกระแสเลือด (Blood Plasma) ของมนุษย์ โดยมีหน้าที่หลักในการจับน้ำ ฮอรโมน วิตามิน

ไขมัน สารอาหารต่างๆ และขนส่งสารต่างๆ ไปกับกระแสเลือด นอกจากนี้หน้าที่หลักของอัลบูมินคือรักษาแรงดันออสโมซิสของเลือด (Colloid Osmotic Pressure) [4] เมื่อนำวัสดุฝังเข้าไปในร่างกายพบว่า โปรตีนที่อยู่ในกระแสเลือดจะดูดซับ (Adsorbed) ที่พื้นผิว และการดูดซับนี้จะมีลักษณะเฉพาะที่ขึ้นกับสมบัติและลักษณะของพื้นผิว โปรตีนจากของเหลวในร่างกาย (Body fluids) จะถูกดูดซับเป็นชั้นของโปรตีนที่พื้นผิวของวัสดุฝังในทันทีที่นำวัสดุฝังเข้าไปในร่างกาย หลังจากนั้นจะเกิดการยึดติด (Attachment) การเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการย้ายที่ของเซลล์ (Migration) [5-6] ดังนั้นการศึกษาพฤติกรรมการดูดซับโปรตีนบนวัสดุทางชีวภาพ (Biomaterials) จึงเป็นที่สนใจอย่างยิ่งในสาขาวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) ซึ่งความรู้และความเข้าใจในปรากฏการณ์นี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำให้โครงสร้างที่พื้นผิวของวัสดุทางชีวภาพมีความเหมาะสม และจะนำไปสู่การพัฒนาในการใช้งานทางเวชศาสตร์ (Biomedicine) ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการปรับสภาพพื้นผิวของไทเทเนียมบริสุทธิ์เชิงพาณิชย์ เกรด 2 (Commercially Pure Titanium Grade 2) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีปฏิกิริยาผิวสัมผัสเฉื่อยและพื้นผิวสัมผัสของวัสดุเรียบ ให้มีผิวแบบสัมผัสควบคุมได้ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาบริเวณผิวสัมผัสและเกิดการประสานกันได้แบบสนิท โดยการทำให้พื้นผิว (Surface) มีลักษณะสัณฐาน (Morphology) เป็นท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ (Titanium Dioxide Nanotube Arrays) ด้วยกระบวนการแอโนไดเซชัน (Anodization Process) จากนั้นศึกษาพฤติกรรม (Behaviour) การดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนพื้นผิวบนท่อนาโน

ไทเทเนียมไดออกไซด์ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี (UV-Visible Spectroscopy)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการเตรียมพื้นผิว

นำแผ่นไทเทเนียมบริสุทธิ์ทางการค้าเกรด 2 (Commercially Pure Titanium Grade 2) ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร (Prolog Titanium Co., Ltd.) ขัดด้วยกระดาษทราย (Buehler) เบอร์ 120 1200 และ 2000 ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นไทเทเนียมมาขัดด้วยผงขัดอะลูมินา (Al_2O_3) (Buehler, Alpha Micropolish II) เบอร์ 5, 1 0.3 และ 0.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ จนผิวหน้าของแผ่นไทเทเนียมมีลักษณะเงาวาวคล้ายกระจก เก็บแผ่นไทเทเนียมที่ผ่านการขัดในตู้ควบคุมความชื้น (Desiccators) เพื่อป้องกันการเกิดออกไซด์

2. การเตรียมท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์บนแผ่นไทเทเนียม

ท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์บนแผ่นไทเทเนียมเตรียมด้วยกระบวนการแอนโนไดเซชัน โดยใช้เซลล์เคมีไฟฟ้าแบบ 2 ขั้ว กำหนดให้แผ่นไทเทเนียมเป็นขั้วแอโนดและแผ่นแกรไฟต์เป็นขั้วแคโทด เจือไนสำหรับกระบวนการแอนโนไดเซชัน ดังนี้ ความต่างศักย์ระหว่างขั้วเท่ากับ 20 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอิเล็กโทรไลต์ผสมของแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (Ammonium fluoride (NH_4F): Carlo Erba) ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก เอธิลีนไกลคอล (Ethylene Glycol (EG): Carlo Erba) ร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก และน้ำไม่มีประจุ (Deionised Water) [7] จากนั้นนำแผ่นไทเทเนียมที่ผ่านการแอนโนไดซ์มาล้างในอ่างล้างความถี่สูง (Ultrasonic Bath) เป็นเวลา 5 นาที และเป่าให้แห้งด้วยลมร้อน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากอากาศ

3. วิเคราะห์ลักษณะสัณฐานพื้นผิวและองค์ประกอบที่พื้นผิว

วิเคราะห์ลักษณะสัณฐานพื้นผิวและองค์ประกอบที่พื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Spectroscopy (FE-SEM)) พร้อมติดตั้งเครื่องวิเคราะห์การกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS) รุ่น JSM 6301F และเครื่องเอกซเรย์โฟโตอิเล็กตรอน (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)

4. การวิเคราะห์พื้นที่ผิวของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์

นำแผ่นไทเทเนียมและแผ่นไทเทเนียมที่ผ่านกระบวนการแอนโนไดเซชันไปวิเคราะห์พื้นที่ผิวด้วยเครื่อง Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption เพื่อวิเคราะห์พื้นที่ผิวจำเพาะของแผ่นไทเทเนียมและท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ซึ่งเป็นการวัดปริมาณแก๊สไนโตรเจนที่ดูดซับบนพื้นผิวของแผ่นไทเทเนียมและท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Physisorption (BET)

5. การศึกษาการมีขั้วของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์

ศึกษามุมสัมผัส (Contact Angle Measurement) โดยหยดน้ำไม่มีขั้ว (Deionised Water) ปริมาตร 10 mL บนแผ่นไทเทเนียมและท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ด้วยเทคนิค Sessile Drop Profile Analysis

6. การสร้างกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนอัลบูมิน

การหาความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินสามารถหาได้โดยการวัดค่าความดูดกลืนแสง (Absorbance) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นในกราฟมาตรฐาน (Calibration

Curve) ขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนอัลบูมิน ดังนี้ เตรียมสารละลายโปรตีนอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma)) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 3 2 1 0.5 0.4 0.3 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายโปรตีนอัลบูมินไปหาความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลนด์ (Blank) ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer และนำสารโปรตีนละลายอัลบูมินที่อนุกรมความเข้มข้นข้างต้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสม เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงสารละลายโปรตีนอัลบูมิน

7. การศึกษาการดูดซับโปรตีน

การหาความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินที่เหลืออยู่ในสารละลายโปรตีน สามารถหาได้โดยการวัดค่าความดูดกลืนแสง (Absorbance) แล้วนำมาคำนวณกับสมการค่ามาตรฐานที่ได้จากกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงสารละลายอัลบูมิน ดังนี้ เตรียมสารละลายโปรตีนอัลบูมินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำปราศจากไอออนที่ pH เท่ากับ 5 และ 7 จากนั้นศึกษาการดูดซับโปรตีนอัลบูมิน โดยแช่แผ่นไทเทเนียมที่ผ่านกระบวนการแอนโนไดเซชันในสารละลายโปรตีนอัลบูมินเป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส)

ผลการวิจัย

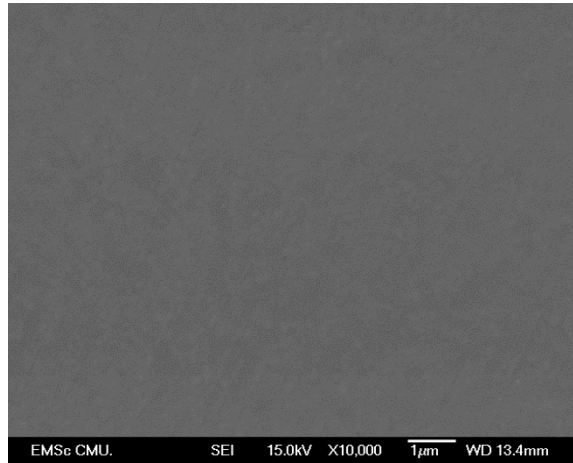
1. ลักษณะพื้นฐานพื้นผิว

ศึกษาลักษณะพื้นฐานของแผ่นไทเทเนียมทางการค้าเกรด 2 ที่ผ่านการขัดด้วยกระดาษทรายขนาดต่างๆ และผงขัดอะลูมินาขนาดต่างๆ จนผิวหน้าของแผ่นไทเทเนียมมีลักษณะเงาวาวคล้ายกระจก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงดังภาพที่ 1 พบว่าลักษณะพื้นฐานของแผ่นไทเทเนียมเรียบและไม่มีรูพรุน

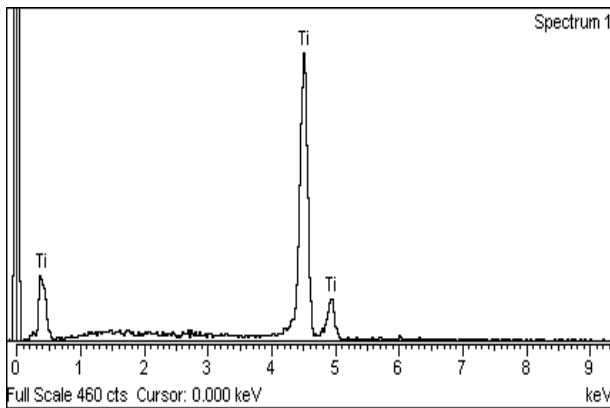
หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่าประกอบธาตุด้วยเทคนิคการกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์ แสดงดังภาพที่ 2 ประกอบด้วยธาตุไทเทเนียม (Ti) มีปริมาณร้อยละ 100 โดยอะตอม

ศึกษาลักษณะพื้นฐานของแผ่นไทเทเนียมที่ผ่านกระบวนการแอนโนไดเซชันที่ความต่างศักย์ 20 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงดังภาพที่ 3 พบว่าพื้นผิวมีลักษณะเป็นท่อที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและกระจายทั่วพื้นผิวแผ่นไทเทเนียม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์เท่ากับ 60.926 นาโนเมตร (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่าประกอบธาตุด้วยเทคนิคการกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์ แสดงดังภาพที่ 5 พบว่าสเปกตรัมการกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์ของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ประกอบด้วยไทเทเนียม ออกซิเจน คาร์บอน และฟลูออไรด์

จากการวัดพื้นที่ผิวจำเพาะของแผ่นไทเทเนียมและท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Physisorption (BET) พบว่าพื้นผิวจำเพาะของแผ่นไทเทเนียมและท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์เท่ากับ 6.44 และ 35.83 m^2/g ตามลำดับ แสดงว่าเมื่อนำแผ่นไทเทเนียมไปปรับสภาพพื้นผิวให้มีลักษณะเป็นท่อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดนาโนเมตรจะมีพื้นที่ผิวจำเพาะเพิ่มขึ้น

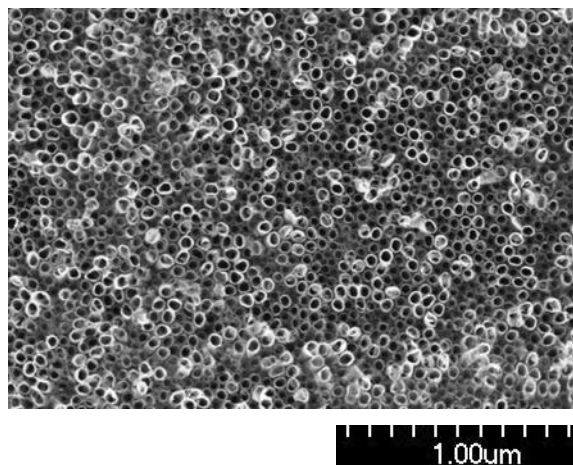


ภาพที่ 1 ภาพถ่าย FE-SEM ลักษณะสัณฐานของพื้นผิวแผ่นไทเทเนียม

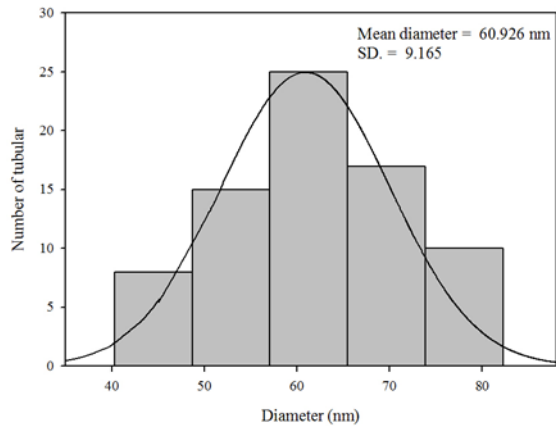


Element	Atomic %
Ti K	100.00
Totals	100.00

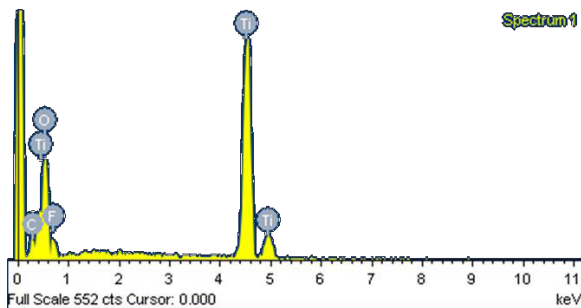
ภาพที่ 2 สเปกตรัมการกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์ (EDS) ของพื้นผิวแผ่นไทเทเนียม



ภาพที่ 3 ภาพถ่าย FE-SEM ลักษณะสัณฐานของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์
เตรียมด้วยกระบวนการแอนโนไดเซชัน



ภาพที่ 4 กราฟฮิสโทแกรมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์เตรียมด้วยกระบวนการแอนโนไดเซชัน และการแจกแจงแบบเกาส์เซียน (Gaussian)

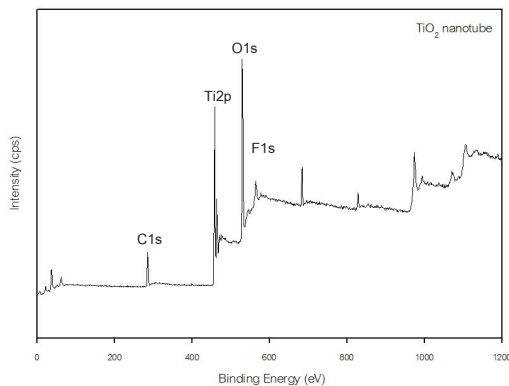


Element	Atomic %
C K	6.20
O K	51.03
F K	11.01
Ti K	31.77
Totals	100.00

ภาพที่ 5 สเปกตรัมการกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์ (EDS) ของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมด้วยกระบวนการแอนโนไดเซชัน

ศึกษาองค์ประกอบที่พื้นผิวของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ซึ่งสังเคราะห์ด้วยกระบวนการแอนโนไดเซชัน โดยใช้เครื่องเอ็กซ์เรย์โฟโตอิเล็กตรอน (XPS) แสดงดังภาพที่ 6

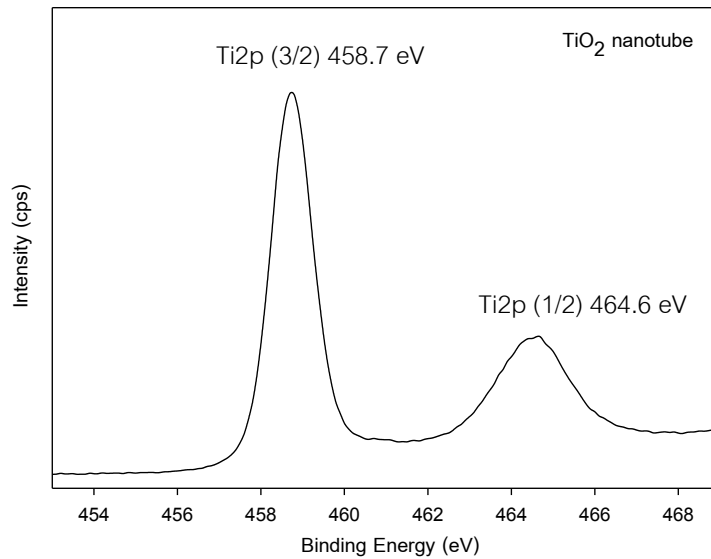
พบพีคของคาร์บอน (C_{1s}) ไทเทเนียม (Ti_{2p}) ออกซิเจน (O_{1s}) และ ฟลูออรีน (F_{1s}) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากสเปกตรัมการกระจายพลังงานของรังสีเอ็กซ์



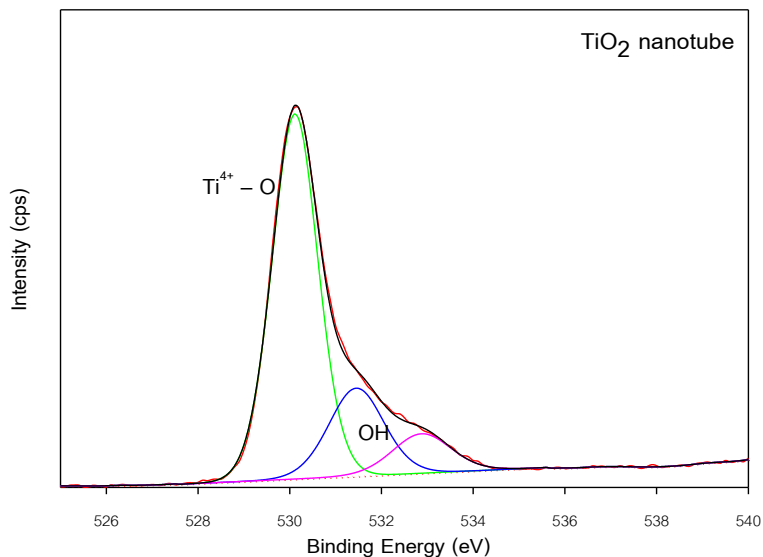
ภาพที่ 6 สเปกตรัม survey ของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ไดออกไซด์ที่เตรียมด้วยกระบวนการแอนโนไดเซชัน

ภาพที่ 7 แสดงสเปกตรัมแบบ Narrow Scan ของไทเทเนียม (Ti) พีคของไทเทเนียม Ti_{2p} ($3/2$) และ Ti_{2p} ($1/2$) ที่ค่าพลังงานยึดเหนี่ยว 458.8 eV และ 464.9 eV ตามลำดับ มีผลต่างของพลังงานยึดเหนี่ยว 5.9 eV โดยที่ระดับแกนพลังงาน (Core Level) ทั้งสองระบุสถานะออกซิเดชันของ Ti^{4+} [8-10] และหากพิจารณาสเปกตรัมแบบ Narrow Scan ของออกซิเจน (O_{1s}) ดังภาพที่ 8 พบว่า

สเปกตรัมของ O_{1s} ไม่สมมาตรเนื่องจากมีออกซิเจนที่มีองค์ประกอบที่ต่างกันอยู่ 3 องค์ประกอบ เมื่อพิจารณาค่าพลังงานยึดเหนี่ยวของ O_{1s} ที่ 530.1 eV ออกซิเจนสร้างพันธะกับ Ti ($Ti^{4+}-O$) [10-11] ในส่วนค่าพลังงานยึดเหนี่ยวของ O_{1s} ที่ 531.5 เป็นส่วนหนึ่งของออกซิเจนที่เกิดจากสิ่งเจือปนในรูปของไฮดรอกซิล (OH) และที่ค่าพลังงานยึดเหนี่ยว 532.9 eV ออกซิเจนในรูปของน้ำ H_2O



ภาพที่ 7 สเปกตรัมธาตุไทเทเนียม Narrow Scan ของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ซึ่งสังเคราะห์ด้วยกระบวนการแอโนไดเซชัน

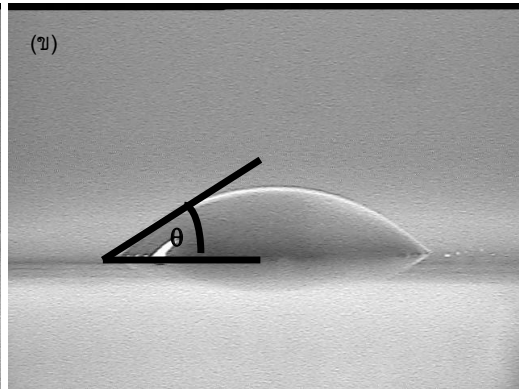
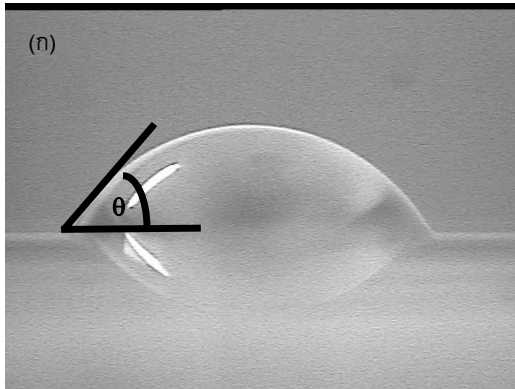


ภาพที่ 8 สเปกตรัมธาต้ออกซิเจน Narrow Scan ของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ซึ่งสังเคราะห์ด้วยกระบวนการแอโนไดเซชัน

2. การศึกษาการมีขีดของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์

ศึกษามุมสัมผัสโดยการหยดหยดน้ำที่ไม่มีประจุลงบนแผ่นไทเทเนียมและท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ผลการทดลองแสดงว่ามุมสัมผัส (θ) เท่ากับ 88

และ 23 องศา แสดงดังภาพที่ 9 (ก) และ (ข) ตามลำดับ ซึ่งมุมสัมผัสที่พื้นผิวของท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบน้อยกว่ากรณีพื้นผิวเรียบ แสดงถึงลักษณะการเป็นรูพรุน (Porous) ของพื้นผิวสอดคล้องกับแบบจำลองของเวเนเซล (Wenzel Model) [12]



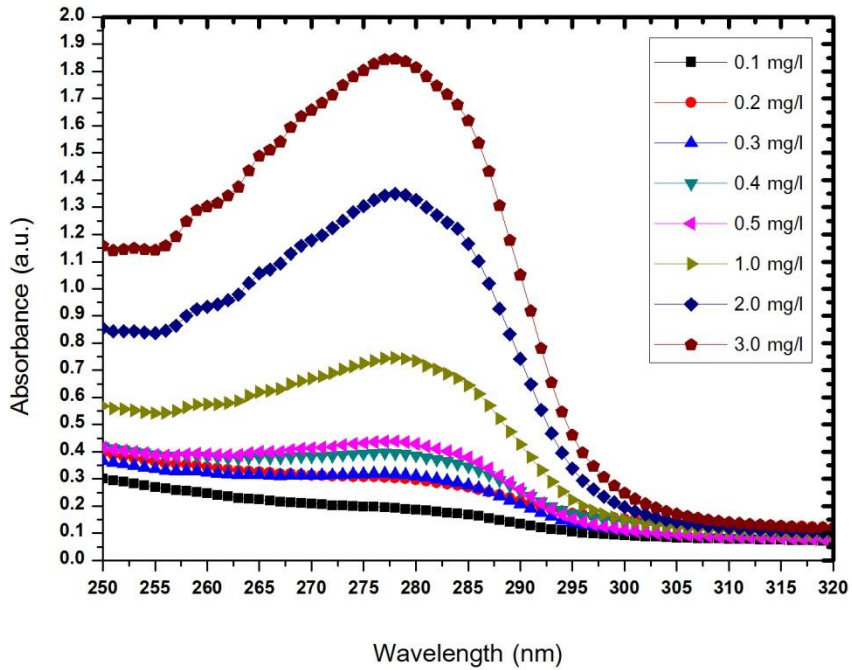
ภาพที่ 9 มุมสัมผัสของหยดน้ำไม่มีประจุ (ก) บนแผ่นไทเทเนียม และ (ข) บนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่จัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ

3. กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนอัลบูมิน

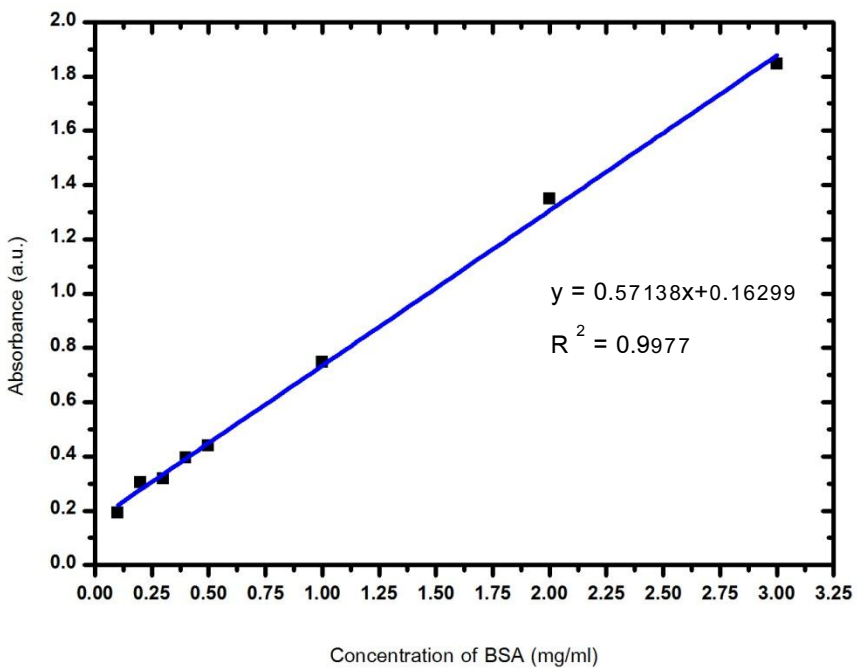
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนอัลบูมินด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี แสดงดังภาพที่ 10 พบว่าความยาวคลื่นที่ทำให้การดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด (Maximum Wavelength (λ_{max})) ของโปรตีนอัลบูมินปรากฏพิกที่ 279 นาโนเมตร [13] ดังนั้นการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนอัลบูมินที่ความเข้มข้น 3 2 1 0.5 0.4 0.3 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 279 นาโนเมตร จากผลการทดลองได้กราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นสารละลายโปรตีนอัลบูมิน ดังภาพที่ 11 ที่แสดงลักษณะของกราฟเป็นกราฟเส้นตรงซึ่งบ่งบอกถึงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนอัลบูมินเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนอัลบูมินมีความสัมพันธ์ดังสมการ

$$y = 0.57138x + 0.16299$$

สมการข้างต้นเป็นสมการเส้นตรง และมีค่า $R^2 = 0.9977$ ซึ่งเป็นค่าที่บอกขอบเขตความแม่นยำสำหรับใช้ในการหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย โดยค่าที่บอกขอบเขตความแม่นยำควรมีค่าใกล้เคียง 1



ภาพที่ 10 สเปกตรัมของ UV-Vis ของโปรตีนอัลบูมินที่ความเข้มข้น 3 2 1 0.5 0.4 0.3 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร



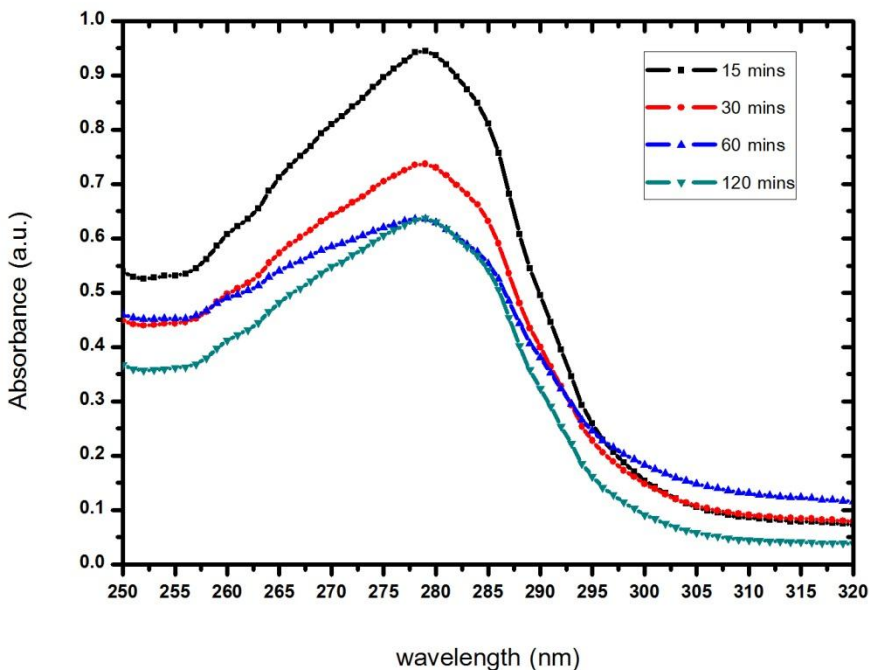
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนอัลบูมินที่ความเข้มข้น 3 2 1 0.5 0.4 0.3 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การศึกษาการดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์

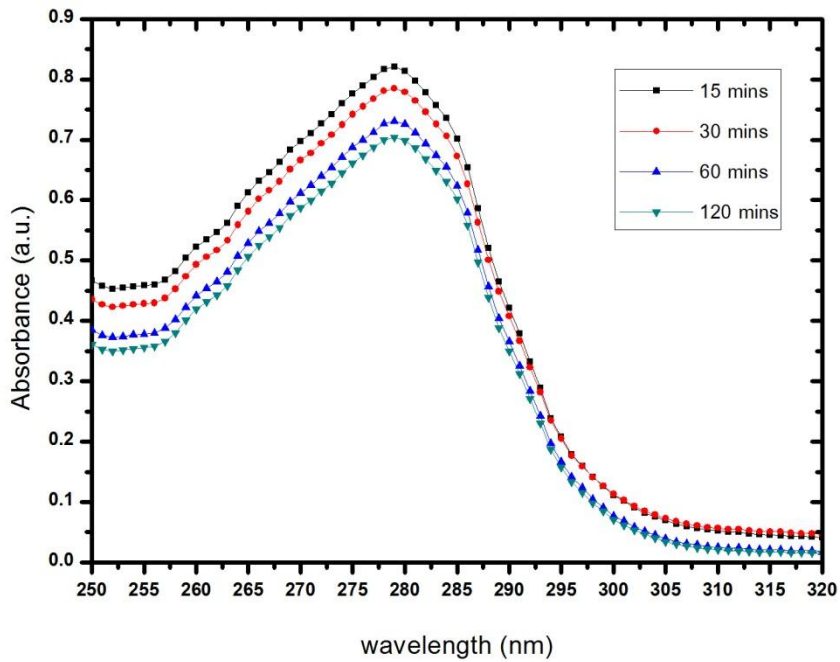
ศึกษาการดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยใช้สารละลายโปรตีนอัลบูมินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 30 60 และ 120 นาที ที่ pH 5 และ 7 ด้วย UV-Visible Spectrometer แสดงดังภาพที่ 12 และ 13 ตามลำดับ พบว่าความยาวคลื่นที่ทำให้การดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดของโปรตีนอัลบูมินปรากฏพิคที่ 279 นาโนเมตร ทั้งสารละลายที่มีค่า pH 5 และ 7 จากสเปกตรัมของ UV-Visible ของโปรตีนอัลบูมินในสารละลายโปรตีนพบว่าเมื่อเวลาในการดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์เพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนอัลบูมินลดลงแสดงถึงปริมาณโปรตีนอัลบูมินในสารละลายลดลงหรือแสดงถึงปริมาณการดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เพิ่มมากขึ้น มากไปกว่านี้ผลการทดลองแสดงว่าเกิดการดูดซับโปรตีน

อัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ตั้งแต่ 15 นาที โดยปริมาณการดูดซับโปรตีนอัลบูมินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ เมื่อเวลาที่ใช้ในการดูดซับเท่ากับ 60 นาที และเกิดการดูดซับของโปรตีนอัลบูมินแบบชั้นเดียว (Monolayer Layer) บนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ (ภาพที่ 14)

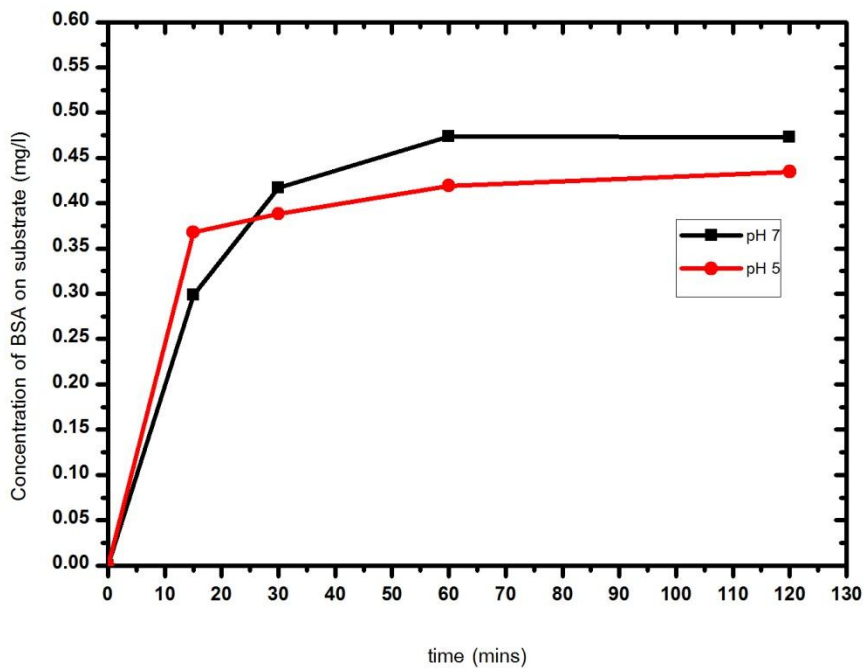
จากผลการทดลองแสดงว่าสารละลายโปรตีนมีค่า pH เท่ากับ 7 นั้นเกิดการดูดซับโปรตีนมากกว่า อาจเนื่องมาจากสารละลายโปรตีนอัลบูมินมีค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point) ที่ pH 5 และความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลงถ้าสารละลายมีค่า pH ต่ำกว่านี้ [14] ไทเทเนียมออกไซด์มีค่าจุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH ประมาณ 4.4 ถึง 6.2 และที่ pH ประมาณ 7 ออกไซด์แสดงสมบัติเป็นไอออนลบ (Oxide's Anionic Character) ซึ่งเป็นผลทำให้พื้นผิวที่เป็นออกไซด์สามารถดึงประจุบวก (Cation) ของโปรตีนได้มากขึ้น [15]



ภาพที่ 12 สเปกตรัมของ UV-Visible ของโปรตีนอัลบูมินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีค่า pH เท่ากับ 7



ภาพที่ 13 สเปกตรัมของ UV-Visible ของโปรตีนอัลบูมินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีค่า pH เท่ากับ 5



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการดูดซับโปรตีนอัลบูมินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่า

1. กระบวนการแอนโตนไดเซชันสามารถปรับเปลี่ยนพื้นผิวโลหะที่เรียบเป็นพื้นผิวที่มีลักษณะสัณฐาน (Surface Architecture) แบบท่อนาโนที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและกระจายทั่วแผ่นโลหะไทเทเนียม

2. พื้นผิวที่มีลักษณะเป็นท่อนาโนมีพื้นที่ผิวจำเพาะมากกว่าพื้นที่ผิวที่มีลักษณะเรียบ

3. จากการศึกษาการดูดซับโปรตีนอัลบูมินบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่จัดเรียงตัว

อย่างเป็นระเบียบ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี แสดงว่าเกิดการดูดซับโปรตีนอัลบูมินในทันทีและเข้าสู่สภาวะคงที่ที่เวลาในการจุ่มแช่ 60 นาที และเกิดการดูดซับของโปรตีนอัลบูมินแบบชั้นเดียวบนท่อนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่จัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 เลขที่สัญญา 103/2555

เอกสารอ้างอิง

- [1] Williams, David F. (2003). Biomaterials and Tissue Engineering in Reconstructive Surgery. *Sādhana*. 28: 563-574.
- [2] Brånemark, P.-I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B.O., Lindstrom, J., Ohlsson, A. (1969). Intra-osseous Anchorage of Dental Prostheses: I. Experimental Studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 3: 81-100.
- [3] Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., Amouriq, Y. (2007). Surface Treatments of Titanium Dental Implants for Rapid Osseointegration. *Dental Materials*. 23: 844-854.
- [4] Nicholson, J.P., Wolmarans, M.R., Park, G.R. (2000). The Role of Albumin in Critical Illness. *British Journal of Anaesthesia*. 85: 599-610.
- [5] Ratner, Buddy D., Hoffman, Allan S., Schoen, Frederick J., Lemons, Jack E. (2013). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3rd ed. Canada: Elsevier Inc.
- [6] Wang, Kefeng., Zhou, Changchun., Hong, Youliang., Zhang, Xingdong. (2012). A Review of Protein Adsorption on Bioceramics. *Interface Focus*. 2: 259-277.
- [7] Thongyoy, Sasitorn; & Aeimbhu, Areeya. (2012). Synthesis of Self-Aligned Titanium dioxide Nanotube Arrays in Ammonium Fluoride-Ethylene Glycol Electrolytes with Different Water Contents. *Advanced Materials Research*. 463-434: 788-792.
- [8] Xiao, Peng., Fang, Honglin., Cao, Guozhong, Zhang, Yunhuai., Zhang, Xiaoxing. (2010). Effect of Ti^{IV} Defects on Electrochemical Properties of Highly-Ordered Titania Nanotube Arrays. *Thin Solid Films*. 518(23): 7152-7155.
- [9] Zhang, Xiaobo., Tian, Hanmin., Wang, Xiangyan., Xue, Guogang., Tian, Zhipeng., Zhang, Jiyuan., Yuan, Shikui., Yu, Tao., Zou, Zhigang. (2013). The Role of Oxygen Vacancy- Ti^{3+} States on TiO_2 Nanotubes Surface in Dye-Sensitized Solar Cells. *Materials Letters*. 100(1): 51-53.

- [10] Antony, Rajini P., Mathews, Tom., Dash, Sitaram., Tyagi, Ashok K., Raj, Baldev. (2012). X-ray Photoelectron Spectroscopic Studies of Anodically Synthesized Self Aligned TiO₂ Nanotube Arrays and the Effect of Electrochemical Parameters on Tube Morphology. *Materials Chemistry Physics*. 132(2-3): 957-966.
- [11] Liang, Hai-Chao; & Li, Xiang-Zhong. (2009). Effects of Structure of Anodic TiO₂ Nanotube Arrays on Photocatalytic Activity for the Degradation of 2,3-Dichlorophenol in Aqueous Solution. *J. Hazard. Mater.* 162(2-3): 1415-1422.
- [12] Mikael, Järn. (2010). Influence of Topography and Surface Chemistry on the Wetting Properties of TiO₂-Based Ceramic Coatings. Åbo Akademi University.
- [13] Wang, Chen., Ouyang, Jun., Ye, De-Kai., Xu, Jing-Juan., Chen, Hong-Yuan., Xia, Xing-Hua. (2012). Rapid Protein Concentration, Efficient Fluorescence Labeling and Purification on a Micro/Nanofluidics Chip. *The Royal Society of Chemistry*. pp. 1-7.
- [14] Kopac, Turkan., Bozgeyik, Kadriye., Yener, Julide. (2008). Effect of pH and Temperature on the Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Titanium Dioxide. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 322: 19-28.
- [15] N.C. Nwokem, C.O. Nwokem, E.E. Ella, A.A. Osunlaja, Y.O. Usman, O.J. Ocholi. (2012). Adsorption of Protein on Titanium Dioxide and Titanium Dioxide Coated Surface. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 296: 836-840.