



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การออกแบบและพัฒนาเซรามิกส์ชีวภาพ
เพื่องานประยุกต์ด้านชีวการแพทย์

โดย ศิวพร มีจุ สมิต

ธันวาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การออกแบบและพัฒนาเซรามิกส์ชีวภาพ
เพื่องานประยุกต์ด้านชีวการแพทย์

ศิวพร มีจุ สมิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และผู้วิจัยขอขอบคุณ
สำหรับการสนับสนุนงบประมาณหลักสำหรับโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณทุนสนับสนุนการใช้
เครื่องมือที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งให้ความอนุเคราะห์การใช้
เครื่องมือบางส่วนที่ในงานวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5280021

ชื่อโครงการ : การออกแบบและพัฒนาเซรามิกส์ชีวภาพเพื่องานประยุกต์ด้านชีวการแพทย์

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ศิวพร มีจุ สมิต มหาวิทยาลัยมหิดล

Email Address : siwaporn.smi@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยของสภาวะความเป็นกรด-ด่างต่ออัตราการปลดปล่อยยาแวนโคมาซิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ โดยระบบเก็บกักยาคือคอมโพสิตนาโนไฮดร็อกซีอะพาไทต์-คอลลาเจน และศึกษาศักยภาพในการใช้เป็นวัสดุชีวภาพแพทย์หากปลูกถ่ายในสภาวะที่มีการจำลองของเหลวในร่างกายมนุษย์ รวมทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้ายออสทีโอเบลัส ยูเอ็มอาร์-106 ของหนู ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทำการทดสอบแซ่คอมโพสิตนาโนไฮดร็อกซีอะพาไทต์-คอลลาเจนในสารละลายที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับของเหลวในร่างกายมนุษย์ 1 สัปดาห์ พบว่าเกิดการสร้างผลึกอะพาไทต์ใหม่ ที่บริเวณโครงสร้างรูพรุนของวัสดุคอมโพสิตนาโน ผลการบรรจุยาแวนโคมาซินพบว่าสามารถบรรจุยาในคอมโพสิตนาโนไฮดร็อกซีอะพาไทต์-คอลลาเจน โดยมีค่าประสิทธิภาพการบรรจุที่ 77.82 % และพบว่าอัตราการปลดปล่อยยาแวนโคมาซินจากคอมโพสิตนาโนนี้ ขึ้นกับค่าสภาวะความเป็นกรด-ด่าง จากผลการทดลองทางจลนพลศาสตร์ แสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะค่าพีเอช เท่ากับ 7.4 คอมโพสิตนาโนไฮดร็อกซีอะพาไทต์-คอลลาเจนปลดปล่อยยาแวนโคมาซิน 80 % ของปริมาณยาที่บรรจุ ในช่วงเวลา 25 ชั่วโมง และภายใต้สภาวะค่าพีเอช เท่ากับ 6.5 และ 4 จะใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้แสดงถึงปัจจัยการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ผลการทดสอบการยึดติดของเซลล์และการขยายจำนวนของเซลล์ ยืนยันว่าคอมโพสิตนาโนไฮดร็อกซีอะพาไทต์-คอลลาเจนมีศักยภาพด้านวัสดุชีวภาพทางการแพทย์ และสามารถใช้เป็นระบบส่งยาได้ภายใต้สภาวะการควบคุมที่เหมาะสม สำหรับการประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยซึ่งอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนจากอาการติดเชื้อ

คำหลัก : คอมโพสิตนาโนไฮดร็อกซีอะพาไทต์-คอลลาเจน ระบบส่งยาควบคุม ยาแวนโคมาซิน

Abstract

Project Code : TRG5280021

Project Title : Design and development of bioceramics for biomedical applications

Investigator : Siwaporn Meejoo Smith

Email Address : siwaporn.smi@mahidol.ac.th

Project Period : 2 years

This work aims to study the effects of pH on the release of antibiotics, vancomycin (VCM), from hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite. Potential application as implant materials of HApCol was investigated in simulated body fluid (SBF) and cultured with rat osteoblast-like UMR-106 cells. Bioactivity studies showed that mineralization of new apatitic crystals had formed mainly near the edge pore of the HApCol composite after soaking the composite in a SBF solution for one week. VCM was successful loading into HApCol composite, with loading efficiencies of 77.82%. Controlled release of VCM from the composite is critically pH dependent. The release kinetics indicates 80% accumulative release of VCM from the HApCol composite for pH 7.4 after 25 hours; while only 2-3 hours is required to reach 80% accumulative release for pH 6.5 and 4.0. More details about the burst effect are discussed. It has been confirmed that the drug-loaded HApCol composite is also bioactive by *in vitro* cell adhesion and proliferation tests. Thus, this multi-functional of HApCol nanocomposite has the potential to enhance cell attachment and to provide controlled drug delivery for bone implants. Precaution of using this drug-loaded biomaterial in patients with complications has been suggested.

Keywords : Hydroxyapatite/Collagen, Controlled drug release, Vancomycin

1. บทนำ

การสูญเสียกระดูกเนื่องจากอุบัติเหตุหรือโรคส่งผลให้เกิดการพัฒนาทางด้านวัสดุชีวภาพสำหรับปลูกถ่ายในร่างกายมนุษย์ เนื่องจากปัญหาทางสุขภาพดังกล่าวเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของชีวิต ทำให้เกิดความต้องการสร้างวัสดุปลูกฝังที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุเหมือนกับเนื้อเยื่อกระดูกที่จะสามารถสร้างพันธะทางเคมีกับกระดูกในธรรมชาติได้โดยตรง โดยมีการพิจารณาใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) เป็นตัวเลือกแรกๆ ที่จะใช้แทนเนื้อเยื่อแข็งเพราะ 80% ของแร่ธาตุอินทรีย์ในกระดูกของมนุษย์มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ HAp นอกจากนี้ HAp ยังสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น เป็นตัวส่งยา ส่งยา ยีนส์ ตัวเร่งปฏิกิริยา และ เซนเซอร์ นอกจากนี้ HAp ที่สังเคราะห์ขึ้นและสารผสม HAp ได้แสดงให้เห็นว่าเป็นวัสดุที่เข้ากันได้ทางชีวภาพกับกระดูก (biocompatible) และ สลายตัวได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ที่สามารถใช้แก้ไขจุดบกพร่องในกระดูกได้ โดยได้มีการพยายามใช้สารผสมเซรามิคในการจำลองกระดูกเป็นเวลาหลายสิบปีมาแล้ว มีการพัฒนาวัสดุพอลิเมอร์ เช่น พอลิแลคติก એસิด (PLA) และโคพอลิเมอร์ของ PLA กับ พอลิไกลโคลิก એસิด (PGA) หรือกับ ไคโตซาน (chitosan) และเส้นใยคอลลาเจนเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์ดังกล่าวเข้าไปกับ HAp เพื่อสังเคราะห์วัสดุคล้ายกระดูกที่ใช้ในกระดูกเทียม

คอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักทางอินทรีย์ของเนื้อเยื่อมนุษย์โดยทั่วไป เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน เส้นเอ็น เยื่อ และกระดูก โดยผิวหน้าของเนื้อเยื่อกระดูก คือสารผสมระหว่าง HAp และ คอลลาเจน (HApCol) จะยึดติดกับเส้นใยเล็กๆซึ่งจะช่วยให้การเกิดชั้นอะพาไทต์ใหม่ที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของ HApCol แม้ว่า HAp มีสมบัติ biocompatible และ biodegradable ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่หลังจากปลูกฝังในร่างกาย แต่สภาวะแวดล้อมด้วยกรดสามารถทำให้เกิดการสลายตัวและสูญเสียความแข็งแรงได้ ส่งผลให้เกิดการอักเสบขึ้นรุนแรงในระหว่างที่สารผสม HAp สลายตัวในการทดลองแบบ *in vivo* ได้ การอักเสบมักจะเกิดขึ้นโดยทั่วไปเมื่อมีวัตถุแปลกปลอมในร่างกาย โดยส่วนใหญ่ของการรักษาโรคทางกระดูกหรือกระดูกหักด้วยการผ่าตัดและปลูกถ่ายกระดูกหรืออวัยวะเทียม มักพบอาการหลังการผ่าตัด เช่น อาการเจ็บปวดและการติดเชื้อต่างๆ ส่งผลให้กระดูกและอวัยวะเทียมหลุดออกจากกัน ปัญหาการติดเชื้อบริเวณที่มีการปลูกฝังอวัยวะเทียมมักเกิดขึ้นเสมอ และเป็นปัญหาหนึ่งที่ยุ่งยากและท้าทายในการสร้างกระดูกใหม่ ในระหว่างการฟื้นตัวจากการปลูกถ่ายกระดูก ผู้ป่วยมักจะได้รับการปฏิบัติเพื่อยับยั้งการติดเชื้อเนื่องจากแบคทีเรียบริเวณที่กระดูกหักที่มีทางติดต่อกับผิวหนังด้านนอก รวมทั้งการให้ยาป้องกันการอักเสบเพื่อให้ฟื้นตัวได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตาม การส่งยาไปยังบริเวณที่เกิดการติดเชื้อมักเกิดขึ้นช้าและไร้ประสิทธิภาพ และระดับของการติดเชื้อบริเวณปลูกฝังอวัยวะขึ้นกับการขาดแคลนภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยซึ่งจะมีมากขึ้นกับภาวะแทรกซ้อนของแต่ละบุคคลอีกด้วย ยกตัวอย่าง เช่น ผู้ป่วยมะเร็งกระดูกชนิดออสทีโอซาร์โคมา (osteosarcoma) เป็น

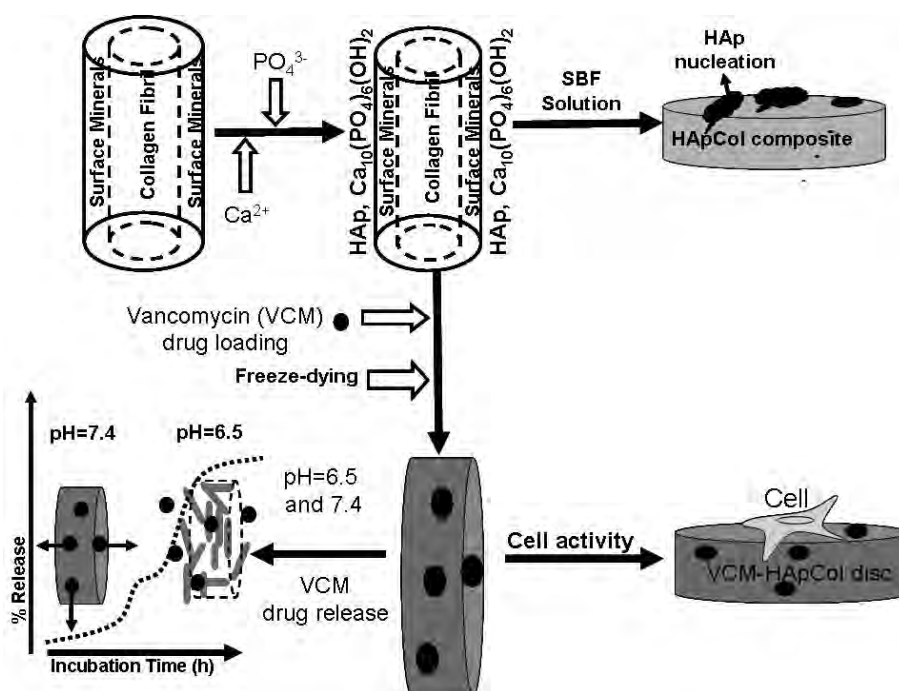
มะเร็งชนิดเป็นก้อนมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเมื่อเทียบกับผู้ป่วยธรรมดา มากกว่า 5-20 เท่าเมื่อผู้ป่วย ผ่าตัดเปลี่ยนกระดูก ดังนั้นการใช้วัสดุปลูกฝังร่วมกับการใส่ยาที่ออกฤทธิ์ทางยาที่แน่นอน เช่น ป้องกัน การอักเสบ ด้านเชื้อแบคทีเรียโดยตรงลงในแมทริกซ์ (matrices) ของสารผสม (composite) ที่ปลูกฝังใน ร่างกายได้จะเป็นสิ่งที่ดีมาก นอกจากนี้การให้ยาต้องสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามสภาวะแทรกซ้อนของ ผู้ป่วยแต่ละคนได้ ดังนั้นจึงต้องมีการค้นพบวัสดุปลูกฝังใหม่ที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม (pH และอุณหภูมิ) และสามารถปลดปล่อยยาในจำนวนที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาที่มีการรักษา

ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้มีการสังเคราะห์คอมโพสิต HApCol ด้วยกระบวนการ self organization ของ ประจุที่ตรงข้ามกันบนเส้นใยคอลลาเจนและผิวหน้าของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ และศึกษา ขนาดผลึก สัณฐานวิทยา โครงสร้างทางผลึกของสารผสม และการเกิดผลึกใหม่ทางชีวภาพของคอมโพสิ ต HApCol หลังจากแช่สารผสมในของเหลวจำลองในร่างกายที่เตรียมขึ้น (SBF) นอกจากนี้ยังได้ ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการสังเกตอันตรกิริยาระหว่างเซลล์และผิวหน้าของวัสดุที่สังเคราะห์ ขึ้น โดยใช้ HApCol เป็นวัสดุปลูกเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้าย osteoblast ของหนู โดยใช้เวลา 14 วัน และเพื่อนำวัสดุชีวภาพที่สังเคราะห์ได้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาแบบไม่จำเพาะ จึงมีการบรรจุ ยาลงในวัสดุดังกล่าวเพื่อใช้เป็นตัวส่งจ่ายยาไปรักษาเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อได้ โดยเพื่อที่จะได้มา ซึ่งตัวส่งจ่ายยาในอุดมคติ วัสดุชีวภาพต้องมีโครงสร้างเป็นรูพรุนในระดับจุลภาค ที่สามารถให้โมเลกุล ของยาเข้ามาอยู่ในโครงสร้างของวัสดุชีวภาพดังกล่าวได้ และการยึดเหนี่ยวกันระหว่างโมเลกุลสาร ออกฤทธิ์ทางยากับโครงสร้างของสารผสมควรเป็นพันธะไฮโดรเจนระหว่าง หมู่อะมิโน คาร์บอกซิล หรือ ไฮดรอกซิลของสารผสมและโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางยา นอกจากนี้ยังมีการมุ่งศึกษาควบคุม การปลดปล่อยยาแวนโคมาซิน (VCM) จากสารผสม HApCol โดย VCM เป็นยาปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพวกแกรมบวก ตามสมมติฐานของคณะผู้วิจัยที่ว่าจลนพลศาสตร์การ ปลดปล่อยยา VCM จากเมทริกซ์ของ HApCol อาจขึ้นกับสภาวะแวดล้อมแถวเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ โดย รายงานก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า เซลล์มะเร็งจะมีสภาพเป็นกรด โดยมีค่า pH ~ 6 ที่ส่วนภายนอกเซลล์ ในขณะที่ส่วนภายในไลโซโซมมีค่า pH ~ 4.5 ถ้า HApCol ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมของเซลล์และ เปลี่ยนแปลงการปลดปล่อยยา VCM จะต้องพบการปลดปล่อยยา VCM จากคอมโพสิต HApCol สู่ เซลล์มะเร็งโดยมีจลนพลศาสตร์ที่แตกต่างกันหรือแม้จะเทียบกับเซลล์ธรรมดาก็ตาม เพื่อพิสูจน์สมมติ ฐานดังกล่าว จึงมีการศึกษาผลของ pH ในสารตัวกลางต่อจลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยยา VCM จากคอมโพสิต HApCol ผลการทดลองจากการศึกษาชิ้นนี้จะนำมาซึ่งการพัฒนากระบวนการนาโน ชนิดใหม่ที่ทำให้คุณสมบัติโดยสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้และบรรจุยาได้อย่างเป็นที่น่าสนใจ รวมทั้งการปลดปล่อยยาสามารถปรับเปลี่ยนแบบอัตโนมัติโดยขึ้นกับสภาพแวดล้อมทางกระบวนการ ทำงานของอวัยวะต่างๆในร่างกายและสภาวะที่อันตรายเพื่อให้ได้การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น

2. วิธีการทดลอง

2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

คอลลาเจนที่ใช้ในการทดลองนี้สังเคราะห์มาจากผิวหนังของลูกวัว (Sigma, USA) ใช้ CaCl_2 (Fluka) และ K_2HPO_4 (Fischer Scientific, UK) เป็นสารตั้งต้นของ แคลเซียมและ ฟอสเฟต ตามลำดับ ในระหว่างการเตรียมสารต้องควบคุม pH ของสารผสมให้คงที่ $\text{pH} = 9$ ด้วยการเติมสารละลาย NaOH (J.T. Baker, USA) โดยสารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองเป็นเกรด วิเคราะห์และใช้โดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ซ้ำ และใช้น้ำ 3A ที่มีการกำจัดไอออน (3A de-ionized water) ตลอดทั้งการทดลอง ในการทดลองการบรรจุและปลดปล่อยยาใช้ยาแวนโคมาycin (Vancomycin, VCM) (Fluka, Biochemika) เป็นยาปฏิชีวนะ สำหรับขั้นตอนการเตรียมคอมโพสิต HApCol การบรรจุยาและการทดสอบการเข้ากันได้ทางชีวภาพได้แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนผังแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์คอมโพสิต Hydroxyapatite-Collagen (HApCol) และขั้นตอนการบรรจุยา พร้อมทั้งการทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

การเตรียมคอมโพสิต HApCol ซึ่งใช้คอลลาเจนจะทำตัวเป็นแม่แบบทางอินทรีย์สำหรับการสร้างผลึกอพาไทต์ การสร้าง HAp บน matrix คอลลาเจนจะเริ่มต้นด้วยกระบวนการตกตะกอนร่วมของอพาไทต์จากสารละลาย คอมโพสิต HApCol จะเกิดโดยกระบวนการ self organization ระหว่างไอออนบนคอลลาเจนคือ หมู่คาร์บอกซี (COO^-) และหมู่แอมโมเนียม (NH_3^+) และระหว่างไอออน Ca^{2+} และ PO_4^{3-} บนผิวหน้าของไฮดรอกซีอพาไทต์ ผลึกของ HAp

จะวางตัวตามแม่แบบคอลลาเจนผ่านอันตรกิริยาอิเล็กโตรสตาติก (electrostatic interaction) โดยจะมีการรักษาค่า pH ให้คงที่ตลอดทั้งปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย NH_4OH ลำดับต่อไปจะอธิบายขั้นตอนการเตรียมสารผสมโดยละเอียด ขั้นตอนแรก ละลายคอลลาเจนในน้ำที่มีการกำจัดไอออนโดยมีความเข้มข้นของสารละลาย 3g/L แล้วคนสารละลายจนกระทั่งคอลลาเจนละลายจนหมด จากนั้นเติมสารละลาย CaCl_2 (0.4 M) ลงในสารละลายคอลลาเจน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยสารละลายที่ได้จากสภาวะนี้มีชื่อว่า Col-Ca จากนั้นค่อยๆเติมสารละลาย K_2HPO_4 (0.24 M) ลงในสารละลาย Col-Ca (โดยมีอัตราส่วน Ca/P เป็น 1.67) และคนสารละลายต่อไปเรื่อยๆ พร้อมทั้งควบคุมค่า pH ตลอดทั้งปฏิกิริยาที่ ~9 ด้วยการเติมสารละลาย NaOH โดยจะพบตะกอนสีขาวเกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ จากนั้นคนสารละลายที่มีตะกอนดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออนจนค่า pH ของน้ำล้างตะกอนเป็น 7 จากนั้นให้ทำตะกอนแห้งด้วยวิธี Freeze dry

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์สมบัติตัวอย่าง

การวิเคราะห์สมบัติทางโครงสร้างผลึกตัวอย่าง ใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (powder X-ray diffraction, XRD) (Bruker diffractometer, Model D8 Advance) โดยใช้ $\text{CuK}\alpha_1$ radiation ทำการทดลองที่ 40 kV และ 40 mA โดยสแกนในช่วง $2\theta = 20^\circ\text{--}60^\circ$ ความเร็วในการสแกนเป็น 1 ขั้นตอนวินาทีและการเพิ่มแต่ละขั้นที่ 0.037° การวัด IR สเปกตรัมใช้เครื่อง Fourier transform infra-red (FT-IR) spectrophotometer (Spectrum GX, Perkin Elmer) โดยสแกน 16 ครั้งและช่วงเลขคลื่น $370\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$

การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของคอมโพสิตก่อนและหลังการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการบรรจุยาใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron micro-scope, SEM) (JEOL model JSM-6301F) โดยใช้กำลังไฟฟ้า 15 kV ในการบันทึกภาพ SEM การวัดการกระจายของขนาดอนุภาค HApCol ใช้เครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) การเกิดผลึกอพาไทต์หลังจากแช่ HApCol ใน SBF วิเคราะห์ด้วยเทคนิค energy dispersive spectroscopy (EDS) (ISIS 300 (Oxford)) นอกจากนี้ยังได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron micro-scope, TEM) (JEOL model JEM-2010) ศึกษาอนุภาคในระดับนาโนเมตรและบันทึกภาพ electron diffraction pattern ด้วยเทคนิค TEM ของสารผสม HApCol อีกด้วย

2.3 การทดสอบสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แบบ in vitro

ใช้การจำลองของเหลวในร่างกายที่เตรียมขึ้น (simulated body fluid, SBF) ซึ่งเป็นของเหลวที่มีส่วนประกอบของไอออนชนิดเดียวกันกับของเหลวในพลาสมาของมนุษย์ การเตรียม SBF ทำได้โดยใช้ NaCl (136.8 mM) NaHCO₃ (4.2 mM) KCl (3.0 mM) K₂HPO₄ (1.0 mM) MgCl₂·6H₂O (1.5 mM) CaCl₂ (2.5 mM) และ NaSO₄ (0.5 mM) แล้วผสมสารละลายดังกล่าวให้ได้ค่า pH ~7.4 ซึ่งเท่ากับค่า pH ในพลาสมาของมนุษย์ การทดสอบ in vitro ทำได้โดยจุ่มสารตัวอย่างที่อัดเป็นเม็ดลงใน SBF 50 mL ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเปลี่ยน SBF ทุกๆ 3 วัน เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนบวกที่อาจหลุดออกจากสารผสมได้ จากนั้นจึงนำเม็ดสารตัวอย่าง HApCol มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนก่อนจะนำไปวิเคราะห์สมบัติ

แบบ in vivo

ทดลองโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้าย osteoblast ของหนู (rat osteoblast-like UMR-106) (American Type Culture Collection (ATCC) No.CRL-1661) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) และให้อาหารเสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Pasching, Austria) และ 100 U/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) การแพร่พันธุ์ของเซลล์ทำในขวดรูปตัวที (T-flask) 75 cm³ (Corning, NY, USA) ภายใน humidified atmosphere ที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C และ sub culture cell ดังที่อธิบายในระเบียบการของ ATCC ในการทดลอง confluent ของเซลล์ UMR-106 ทำโดยเพาะเซลล์ 1x10⁶ เซลล์/จานเพาะเชื้อ ในจานเพาะเชื้อขนาด 100 mm ที่มีลักษณะเป็นแผ่นแก้วกลม (เส้นผ่านศูนย์กลางยาว~1.3 cm) และวางแผ่น VCM-loaded HApCol (เส้นผ่านศูนย์กลางยาว~1.3 cm) ลงไป จากนั้น incubate ระบบข้างต้นภายใน humidified atmosphere ที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C และเปลี่ยนตัวกลางในการเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน หลังจากเพาะเซลล์เป็นเวลา 14 วัน แผ่นแก้วและแผ่น VCM-loaded HApCol จะนำมาศึกษาการยึดติดของเซลล์ (cell attachment) และ cell mineralization ด้วยเทคนิค SEM โดยชะล้างแผ่นแก้วและแผ่น VCM-loaded HApCol ด้วย 0.1 M บัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่เป็น (pH 7.2) อย่างรวดเร็วจำนวนสองครั้ง แล้ว fix เซลล์ด้วย 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA, USA) ใน 0.1 M บัฟเฟอร์ฟอสเฟตเป็นเวลา 3

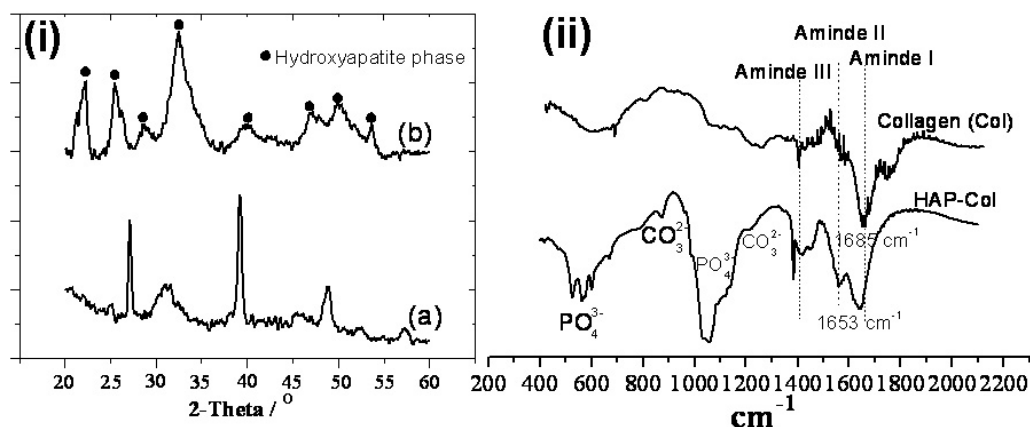
ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสารที่ใช้ fix เซลล์และชะล้างเซลล์ด้วย 0.1 M บัฟเฟอร์ฟอสเฟตและน้ำกลั่นตามลำดับ หลังจากนั้นกำจัดความชื้นแผ่นแก้วและแผ่น VCM-loaded HApCol ด้วยเอทานอลเกรดต่างๆ (50%, 70%, 80%, 90% และ absolute ethanol) จากนั้นนำ แผ่นแก้วและแผ่น VCM-loaded HApCol มาทำให้แห้งสนิทภายใต้ระบบสุญญากาศ และเคลือบด้วยสังกะสีก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์พื้นฐานวิทยาของเซลล์, cell adhesion และ cell proliferation ด้วยเทคนิค SEM

2.4 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการบรรจุและปลดปล่อยยา

บรรจุยา (VCM) ในคอมโพสิต HApCol โดยแช่ผงคอมโพสิตในสารละลาย VCM โดยเตรียมอัตราส่วนของ VCM ต่อตัวทำละลายน้ำ เป็น 50 mg/mL และใช้ผงคอมโพสิต 100 mg จากนั้นคนส่วนผสมดังกล่าวและ incubate ไว้ข้ามคืน จากนั้นนำส่วนผสมข้างต้นมาแยกตะกอนออกด้วยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกยาปฏิชีวนะที่มากเกินไป และทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry โดยตัวอย่างจากขั้นตอนนี้เรียกว่า VCM-loaded HApCol การศึกษาการปลดปล่อยยา VCM จาก matrix HApCol ทำได้โดย วาง VCM-loaded HApCol ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffers, PBS) ปริมาตร 15 mL ที่มี pH เท่ากับ 4.0 6.5 และ 7.4 (Fisher Scientific, UK) การทดลองการปลดปล่อยยาทำในอ่างที่เขย่าได้ (SKAKER, Sk-300) ที่อุณหภูมิ 37 °C และทั้ง VCM-loaded HApCol ไว้ในบัฟเฟอร์ PBS เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดเวลาในแต่ละเวลาการทดลอง นำสารที่ได้มาแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงแล้วนำสารที่ลอยอยู่เหนือตะกอนมาทำการวิเคราะห์ ปริมาณยา VCM ที่ปลดปล่อยออกมาจาก HApCol หาได้จากการวัดค่า absorbance ของสารที่ลอยอยู่เหนือตะกอนที่ความยาวคลื่น 280 nm ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (Jenway, model 6405) โดยหลังจากวัดค่า absorbance ทุกครั้งจะเทสารดังกล่าวคืนลงไปในระบบและถือว่าเวลาที่ใช้ในการวัดไม่มีผลใดๆต่อจลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยยาที่ได้ศึกษา นอกจากนี้ ปริมาณยา VCM ในสารที่ลอยเหนือตะกอนจะหาความเข้มข้นได้โดยใช้ calibration curve ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ VCM กับ ค่า absorbance ; $C_i = 0.1042A_i + 0.00018$; $R^2 = 0.9907$ โดย C_i คือความเข้มข้นของยา VCM และ A_i คือ ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 280 nm นอกจากนี้ยังได้ศึกษาว่า จลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยยา VCM จาก HApCol ขึ้นกับ pH หรือไม่ โดยการทดลองดังกล่าว จะปรับค่า pH ของสารละลาย VCM จาก 7.4 เป็น 6.4 ด้วยสารละลายกรดอะซิติกเจือจางโดยเติมกรดดังกล่าวลงไปหลังจากการทดลองการปลดปล่อยยา 5 ชั่วโมงและปริมาณการปลดปล่อยยา VCM จากคอมโพสิต HApCol จะทำการวัดเป็นทุกๆช่วงเวลา

3. ผลการทดลอง และบทวิจารณ์

ภาพที่ 2(ii) แสดง powder X-ray diffraction pattern ของคอมโพสิต HApCol จาก XRD pattern พบพีกที่กว้างที่ช่วง $2\theta = 30^\circ\text{-}35^\circ$ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า HAp มีเฟสที่มีความเป็นผลึกค่อนข้างต่ำ การมีเฟสที่มีความเป็นผลึกผลึกค่อนข้างต่ำนี้สอดคล้องกับปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของการเกิดอพาไทต์ (HAp) และการเกิดโครงสร้างกระดูกในระบบชีวภาพ กล่าวคือช่วงแรกของการเกิดผลึกจะพบส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous phase) ของเกลือแคลเซียมต่างๆ เช่น $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ และอื่นๆ แทนที่จะพบ HAp แล้วหลังจากเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ (substitution) หรือการรวมตัวกัน (addition) ของอะตอม หรือการดูดซับซ้ำ (reabsorption) และการตกตะกอนใหม่อีกครั้ง (re-precipitation) ที่เกิดขึ้นเป็นเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน เกลือแคลเซียมต่างๆ ที่กล่าวมาในช่วงต้นจะพัฒนาและสร้างผลึกเป็น HAp ในลำดับต่อมา



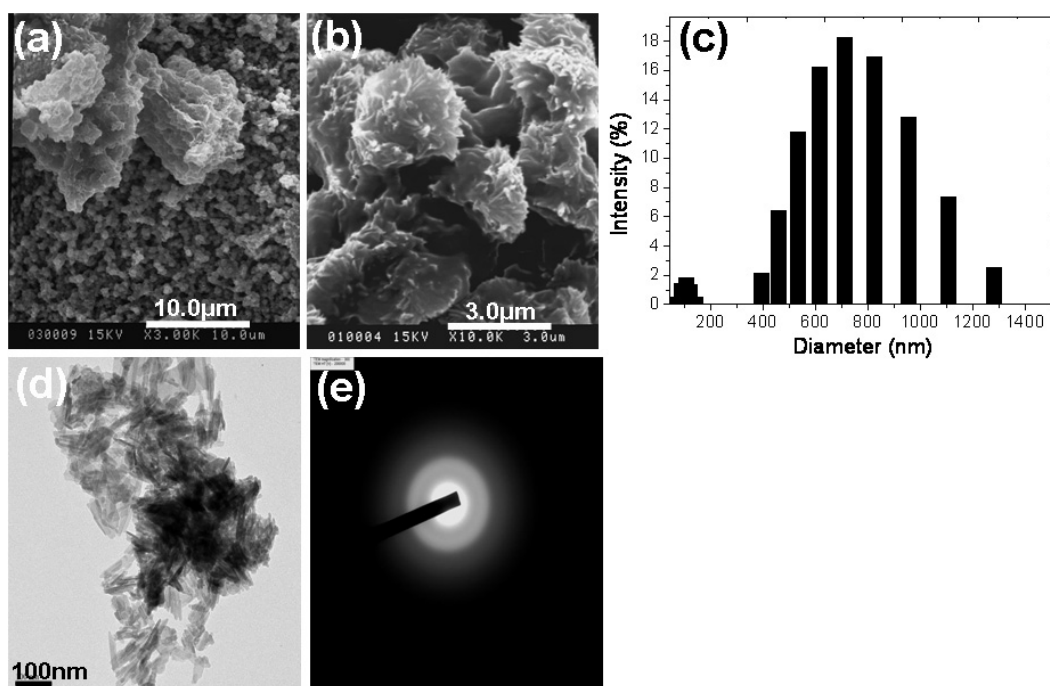
ภาพที่ 2 ผลการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของ (i) of Hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite โดย (a) ก่อนแช่ใน Simulated body fluid (SBF) และ (b) หลังแช่ใน SBF เป็นเวลา 7 วัน ภาพ (ii) แสดง FT-IR spectrum ของ collagen fibrils และคอมโพสิต hydroxyapatite-collagen (HApCol)

โดยพีกที่กว้างที่ได้จาก XRD นี้สามารถนำมาหาค่าขนาดของผลึกโดยประมาณได้ด้วยการคำนวณ โดยใช้ สมการ Scherer's formula, $d = k\lambda/\beta\cos\theta$ ซึ่ง d คือ ค่าเฉลี่ยของขนาดผลึก λ คือ ความยาวคลื่นของรังสีเอ็กซ์ (0.154056), k คือ ค่าคงที่ที่สัมพันธ์กับรูปร่างของผลึกซึ่งมีค่าประมาณค่า crystal unity และ β คือค่า full width at half maximum (FWHM) ของสัญญาณที่มุมเลี้ยวเบนนั้น โดยในการทดลองนี้ใช้ระนาบ (002) ที่ $2\theta = 26^\circ$ ในการคำนวณหาค่าขนาดผลึก พบว่าหลังจากแช่สารตัวอย่างใน SBF จะมีโครงสร้างผลึกในขนาดนาโนเมตร ~ 36 nm เกิดขึ้น นอกจากนี้สัญญาณ XRD ที่ $2\theta = 30^\circ\text{-}35^\circ$ ซึ่งเป็นสัญญาณหลักที่มีใน HAp ค่อนข้างมีสัญญาณต่ำ โดยพบสัญญาณที่

$2\theta = 26^\circ$ และ 39° มีสัญญาณสูงแทน ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ ผลึก HAp ชอบที่จะมีการวางตัวของ ผลึกในทิศทางดังกล่าวเมื่ออยู่ใน matrix คอลลาเจน และผลการทดลอง XRD ของคอลลาเจนบริสุทธิ์ พบสัญญาณลักษณะกว้างที่ $2\theta \sim 10^\circ$ - 20° และไม่พบสัญญาณอื่น บ่งชี้ให้เห็นคอลลาเจนว่าเป็นไม่มีความเป็นผลึก ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ in vitro ของคอมโพสิต HApCol ที่ทดลอง โดยแช่แผ่น HApCol ใน SBF เป็นเวลา 7 วัน ถึงแม้ผลการทดลองจะพบว่าการสร้างส่วนที่เป็นผลึก ของ HAp (รูปที่ 2(a)) แต่ XRD พิกที่ได้ค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับพิกในรายงานที่ใช้อ้างอิง โดยพิก ที่กว้างนี้เกิดจากการสร้างผลึกชนิดพิเศษ HAp แล้วพอกพูนบนผิวหน้าของ HApCol และบ่งบอกว่า ผลึกที่พอกพูนนั้นมีความเป็นผลึกที่ไม่สมบูรณ์หรือผลึกมีขนาดเล็กมาก

ภาพที่ 3(a) และ 3(b) แสดงภาพจากการวิเคราะห์ด้วย SEM พบว่ามีผลึกรวมตัวกันอยู่บน แม่แบบคอลลาเจน ซึ่งทำให้เกิดรูขนาดเล็กในเนื้อสารคอมโพสิต HApCol โดยผลึกนี้มีขนาดในระดับ นาโนเมตรและค่อนข้างจะรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายทรงกลม (ภาพที่ 3(b)) โดยมีรูที่มี ขนาดในระดับจุลภาคคั่นอยู่ระหว่างอนุภาคนั้นด้วย ผิวหน้าของ HApCol มองดูคล้ายทรงกลมโดยมี หลุมขนาดใหญ่ซึ่งเป็นบริเวณที่ HAp ฝังตัวอยู่ใน matrix คอลลาเจน โดยมีรูอยู่ระหว่างอนุภาคทรง กลมนั้นๆ ซึ่งขนาดของรูพูนในวัสดุชีวภาพที่ลักษณะคล้ายตะแกรง (scaffolds) ซึ่งมีบทบาทสำคัญ ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ด้านวัสดุทางการแพทย์ โดยทั่วไป scaffolds ที่มีรูพูนขนาดใหญ่และมีความ เป็นรูพูนสูงมักจะนำมาให้เป็นตัวส่งสารอาหาร, แพร่ก๊าซ และตัวกำจัดของเสียจากการเผาผลาญ อาหาร โดยก่อนหน้านี้มีการรายงานว่า รูพูนที่มีขนาด 1-50 μm มีบทบาทมากสำหรับขั้นตอนการ สร้างหลอดเลือดส่วนใน (vascularization ingrowth) ในขณะที่รูพูนที่มีขนาด 100-300 μm จำเป็น ต่อการสร้างกระดูกใหม่ โดยงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า คอมโพสิต HApCol มีขนาดของรูพูนอยู่ที่ 2-10 μm โดยการมีรูขนาดเล็กๆนี้ เกิดจากการตกตะกอนของผลึกในระดับนาโนเมตรของ HAp บน แม่แบบคอลลาเจน แล้วผลึก HAp เหล่านั้นรวมตัวกันโดยพอกพูนบนรูใน scaffold ของคอลลาเจน และเข้าไปอยู่ในรูขนาดเล็กทำให้ขนาดรูพูนของ HApCol ลดลง ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค ของ HApCol ได้แสดงในภาพที่ 3(c) โดยขนาดอนุภาคของ HApCol ส่วนใหญ่จะมีเส้นผ่าน ศูนย์กลางยาว 400-1200 nm ภาพที่ 3 (d, e) แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TEM และ electron diffraction pattern ของสารตัวอย่าง พบว่า HAp มีขนาดอนุภาคที่มีความยาวประมาณ 50-100 nm และความกว้างประมาณ 10-20 nm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับขนาดผลึกที่พบในกระดูก ผลึกของ HAp ทั้งหมดมีรูปร่างพื้นฐานเหมือนกัน คือ เป็นแผ่นเล็กๆที่บางและยาว แต่มีลักษณะแผ่นที่ไม่เหมือนกัน นัก ภาพที่ 3(e) แสดง electron diffraction pattern มีลักษณะเป็นวงแหวนหลายวงซึ่งเป็นลักษณะ

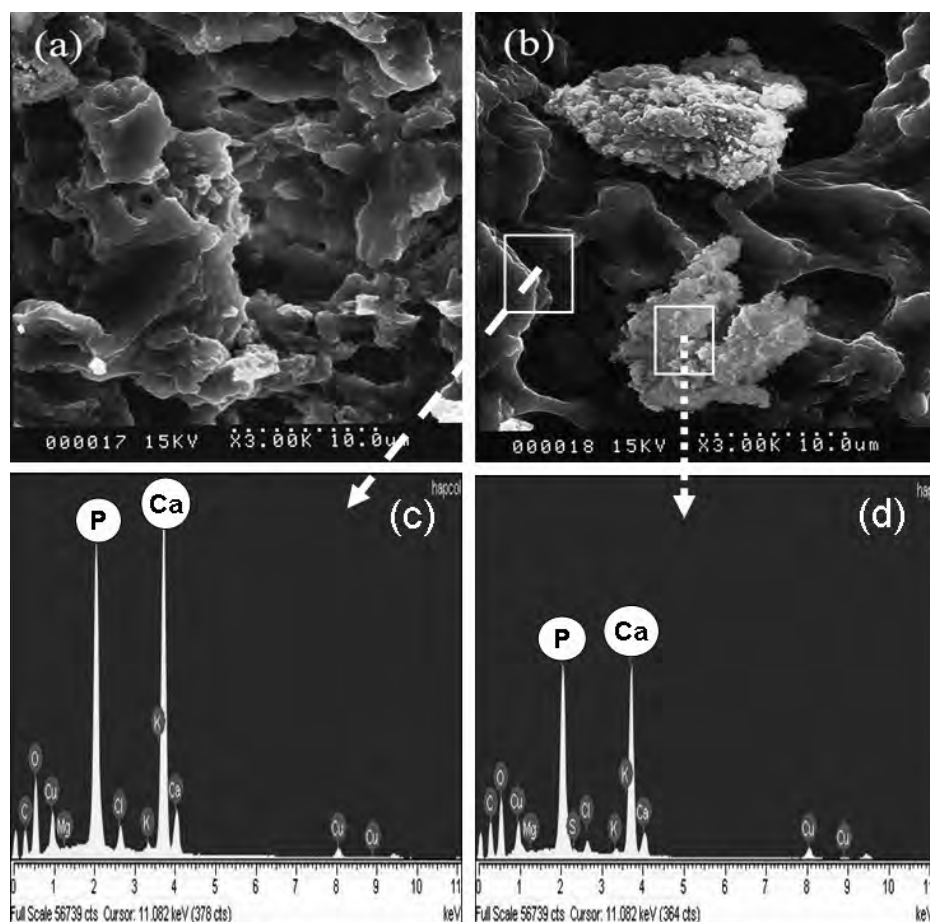
ของตัวอย่างที่มีความเป็นผลึกต่ำ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จาก XRD ที่สัญญาณของสารตัวอย่างที่ได้เป็นสัญญาณฟีดที่กว้าง



ภาพที่ 3 (a)-(b) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM micrograph) ของ HApCol ที่ กำลังขยายต่างกัน (c) แสดง Size distribution ของคอมโพสิต HApCol (d) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM image) ของคอมโพสิต HApCol และ (e) รูปแบบการเลี้ยวเบนอิเล็กตรอน (electron diffraction patterns) ของคอมโพสิต HApCol

จากการสังเกต XRD pattern ของ HApCol มีลักษณะของพีคเหมือนกับพีคที่ได้จากผลึก HAp ซึ่งเกิดจากการสร้างผลึก HAp ขึ้นบนผิวหน้าของ HApCol ซึ่งสามารถสังเกตได้จากผลการวิเคราะห์ด้วย SEM (ภาพที่ 4(b)) ภาพที่ 4(a) และ 4(b) แสดงรูปทรงของ HApCol และอนุภาคที่รวมตัวกันบนผิวหน้าของ HApCol หลังจากแช่ใน SBF เป็นเวลา 7 วัน ตามลำดับ รูปที่ 4(b) แสดงให้เห็นว่ามีผลึกที่รวมตัวกันได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 μm ที่บริเวณผิวหน้าของ HApCol จากผลการวิเคราะห์ด้วย EDS (ภาพที่ 4(c)-(d)) พบการปรากฏของไอออนแคลเซียมและฟอสฟอรัสใน matrix คอลลาเจนและในอนุภาคที่เกาะรวมตัวกันบนผิวหน้าของ HApCol โดยอัตราส่วนน้ำหนักของ Ca/P (ตารางที่ 1) บนผิวหน้า HApCol เป็น 1.71 ในขณะที่อัตราส่วนน้ำหนักของ Ca/P ในอนุภาคดังกล่าวเป็น 1.62 โดยค่าอัตราส่วนน้ำหนักของ Ca/P ค่อนข้างใกล้เคียงกับค่าปริมาณสารสัมพันธ์ของอพาไทต์ที่ได้จากรายงานอ้างอิง จากผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่า

HApCol มีสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถให้กระดูกเติบโตบนผิวหน้าได้ ซึ่งเป็นสมบัติสำคัญที่จะใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้



ภาพที่ 4 SEM micrograph ของคอมโพสิต HApCol อัดเม็ด สำหรับ (a) ก่อนแช่ใน SBF และ (b) หลังแช่ใน SBF เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และ (c)-(d) แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุ (EDS analysis) ในบริเวณต่างกัน

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุ (EDS analysis) ของคอมโพสิต HApCol หลังจากแช่ใน Simulate Body Fluid เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในบริเวณต่างกัน

Area	Weight concentration (%)							Ca/P
	C	O	Mg	P	Cl	K	Ca	
HAP-Col surface	18.36	36.08	0.2	14.75	1.59	0.49	25.2	1.71
Particles on surface	27.71	35.38	0.28	11.47	1.12	0.47	18.53	1.62

ผลการทดลองจากการศึกษาหมู่ฟังก์ชันทางเคมีและอันตรกิริยาทางเคมีระหว่างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ใน HApCol ด้วยเทคนิค IR spectroscopy แสดงใน (ภาพที่ 2(c) และ (d)) ซึ่งคือ IR สเปกตรัมของคอลลาเจนและ HApCol ตามลำดับ โดย IR สเปกตรัมของคอลลาเจนประมาณ 900 cm^{-1} คือสัญญาณของการสั่นแบบ bending ของหมู่ C-H และยังพบสัญญาณที่ 1685 cm^{-1} และ 1510 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของหมู่ amide I (C=O) และ amide II (C-H) ตามลำดับ โดยพบว่าพีคของ amide I มีความสูงมากกว่าสัญญาณของ amide II ซึ่งอาจจะบ่งชี้ให้เห็นว่าหมู่คาร์บอกซิลิกในคอลลาเจน (COO^-) ซึ่งมีประจุเป็นลบเริ่มเกิดเป็นผลึก HAp ซึ่งอาจใช้เป็นหลักฐานที่พิสูจน์ให้เห็นว่ามีการเกิดผลึก HAp ใน matrix คอลลาเจน โดยเหตุการณ์ดังกล่าวคล้ายกับการสร้างผลึก HAp ระหว่างการเกิดกระบวนการ biomineralization ในกระดูกตามธรรมชาติ สำหรับ IR สเปกตรัมของ HApCol พบสัญญาณที่ 1088 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} และ 961 cm^{-1} ซึ่งคือสัญญาณการสั่นแบบ stretching ของ PO_4^{3-} และสัญญาณคู่ที่ 602 cm^{-1} และ 562 cm^{-1} ซึ่งคือสัญญาณการสั่นแบบ bending ของ PO_4^{3-} และเมื่อเทียบ IR สเปกตรัมของสัญญาณดังที่กล่าวมากับสเปกตรัมที่ได้จากรายงานอ้างอิง พบว่าค่าของพีคที่ 1450 cm^{-1} และ 1240 cm^{-1} และสัญญาณคู่ที่ 873 cm^{-1} เป็นลักษณะบ่งชี้โครงสร้างของอพาไทต์ที่มีหมู่คาร์บอกเนตไอออนถูกแทนที่บนตำแหน่งของฟอสเฟต ซึ่งเรียกว่า อพาไทต์แบบ B-type เมื่อเทียบสเปกตรัมทั้งสอง (ภาพที่ 2) พบว่าความสูงของสัญญาณที่เป็นของคอลลาเจนลดลงซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชันที่เกิดปฏิกิริยาลดลงหลังจากคอลลาเจนเกิดอันตรกิริยากับอพาไทต์ เมื่อพิจารณาเฉพาะหมู่ฟังก์ชันของ Ca^{2+} , COO^- , PO_4^{3-} และ NH_3^+ อาจจะได้ข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวระหว่างเกิดการสร้าง HApCol ได้ พบการเลื่อนของสัญญาณการสั่นแบบอสมมาตร stretching ของหมู่คาร์บอกซิล (COO^-) ที่ 1685 cm^{-1} ในคอลลาเจนบริสุทธิ์ (รูปที่ 2(ii)) ไปยังเลขคลื่นที่ต่ำลง (1653 cm^{-1}) ใน HApCol การเลื่อนตำแหน่งไปยังเลขคลื่นที่ต่ำลงนี้ชี้ให้เห็นว่าอันตรกิริยาระหว่างพันธะ C-O ที่เหมือนกันในหมู่ COO^- ลดลงเนื่องจากการสร้างพันธะเคมีใหม่ขึ้นระหว่างไอออน Ca^{2+} บนผิวหน้าของ HAp และ หมู่ $-\text{COO}^-$ ในคอลลาเจน จากผลการวิเคราะห์นี้สามารถสรุปได้ว่าการเกิดผลึก HAp ภายใน matrix คอลลาเจนค่อนข้างขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุที่ผิวหน้าของคอลลาเจนเป็นอย่างมาก ซึ่งวิธีการสังเคราะห์แบบนี้มีการเรียกชื่อว่าการกระบวนการ self organization

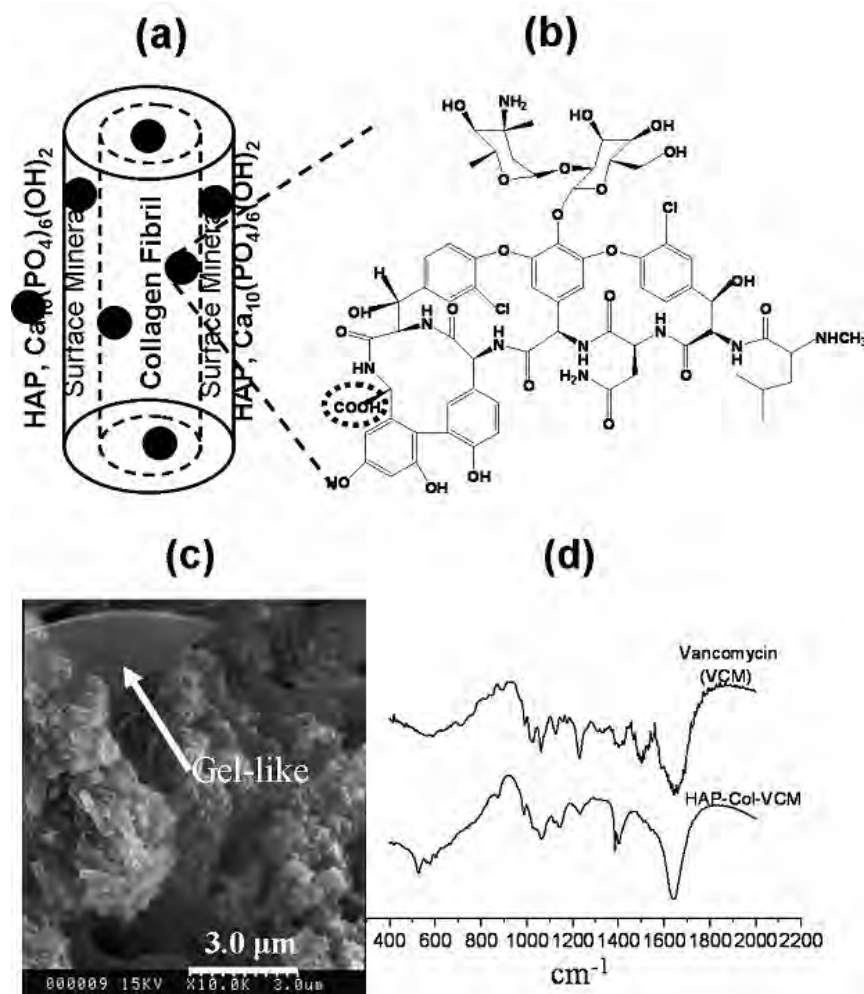
ภาพที่ 5(a) แสดงรูปการรวมตัวกันของยา VCM ภายในโครงสร้างของคอมโพสิต HApCol และโครงสร้างทางเคมีของยา VCM โดย VCM จะมีหมู่คาร์บอกซิล (COO^-) ซึ่งสามารถจับกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ใน HApCol ได้ ทำให้เกิดการปลดปล่อยยา VCM ออกมาจาก matrix HApCol อย่างช้าๆได้ อย่างไรก็ตาม VCM มีโมเลกุลขนาดใหญ่และความเกะกะของโครงสร้างเคมีส่งผลให้เกิดการรวมตัวของ VCM กับ วัสดุชีวภาพที่เป็น matrix ได้อย่างจำกัด สันฐานวิทยาของ HAp ที่มีการบรรจุ

ยา VCM แสดงในภาพ 5(b) พบแผ่นฟิล์มที่มีลักษณะคล้ายเจลบนผิวของสารผสมดังกล่าว ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากการที่มี VCM มากเกินไป (ดังที่ชี้ด้วยลูกศรสีขาว) และรูปดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่ามีชั้นของยา VCM ปกคลุมผิวหน้าของ HApCol อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้เห็นว่า VCM สามารถรวมตัวภายในรูของ HApCol ได้ดี และหลวมลึกๆ ระหว่างอนุภาคทรงกลมที่พบในภาพ 3(b) กลับมีลักษณะคล้ายร่องหลังจากบรรจุยา ทำให้ได้โครงสร้างที่มีผิวหน้าราบเรียบแทนโครงสร้างที่มีผิวหน้าเป็นรูพรุน (ภาพ 5(b)) จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารผสม HApCol มีความสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการส่งจ่ายยาได้เป็นอย่างดี ภาพ 5(C) แสดง IR สเปกตรัมของ VCM บริสุทธิ์ซึ่งพบสัญญาณที่ 1449, 1470, 1494 และ 1639 cm^{-1} เป็นสัญญาณการสั่นของพันธะ C-C ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ใช้อ้างอิง IR สเปกตรัมของ VCM loaded HApCol แสดงในภาพ 5(d) ซึ่งสเปกตรัมดังกล่าวคล้ายกับสเปกตรัมที่ได้จาก VCM บริสุทธิ์ (ภาพ 2(d)) จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าหลังจากที่ VCM รวมตัวกับ HApCol ไม่ส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาทางเคมีใหม่ๆขึ้น

ในการทดลองนี้มีการคำนวณหาปริมาณยาที่บรรจุในสารผสม HApCol และ ประสิทธิภาพในการบรรจุยา (VCM-loading efficiency) คำนวณโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\text{VCM-loading efficiency (\%)} = \frac{100(W_{\text{feed_VCM}} - W_{\text{free_VCM}})}{W_{\text{feed_VCM}}} \quad (1)$$

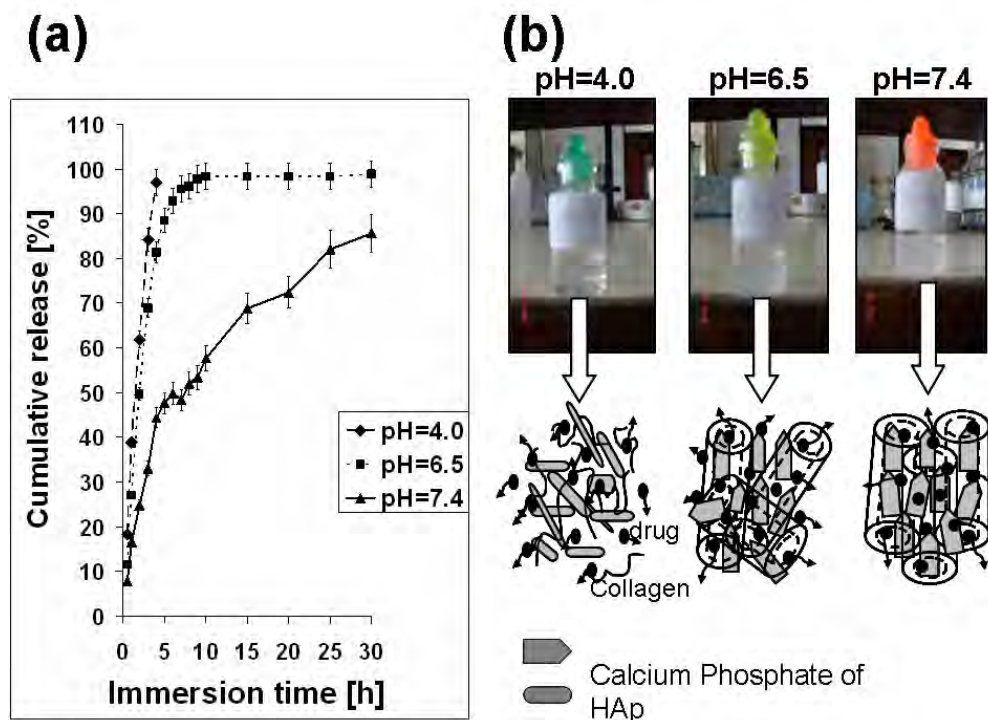
โดย $W_{\text{feed_VCM}}$ คือ ปริมาณยา VCM เริ่มต้นที่มีอยู่หลังจากการบรรจุยา, $W_{\text{free_VCM}}$ คือ ปริมาณยา VCM อิสระที่อยู่ในสารละลายก่อนหลังจากปั่นเหวี่ยงซึ่งคำนวณได้จากกฎของ Beer-Lambert คือ $A = \epsilon c l$ ซึ่ง A คือ ค่า Absorbance, ϵ คือ ค่า molar absorptivity, c คือ ความเข้มข้นของยา VCM และ l คือ ความกว้างของเซลล์ควอทซ์ (1 cm) โดยค่าประสิทธิภาพในการบรรจุยาที่คำนวณได้ มีค่าเป็น 77.82% ($W_{\text{feed_VCM}} = 60 \text{ mg}$) ซึ่งค่าประสิทธิภาพในการบรรจุยาที่ได้มีค่าสูงเนื่องจากการที่สารผสม HApCol มีความเป็นรูพรุนสูง



ภาพที่ 5 (a)-(b) ภาพความเป็นไปได้การอันตรกิริยาระหว่างคอมโพสิต HApCol และยา Vancomycin (VCM) ซึ่งเป็นยาที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (COO^-) แสดงในวงกลมเส้นประ และ (c) แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron micrographs) แสดงกลุ่มก้อนอนุภาคคอมโพสิต HApCol (aggregates) ที่บรรจุยา VCM แล้ว และ (d), FT-IR spectrum ของคอมโพสิต HApCol (aggregates) ที่บรรจุยา VCM แล้ว

การศึกษาจลนพลศาสตร์การปลดปล่อยยา VCM จากคอมโพสิต HApCol ที่ค่า pH ต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ($\text{pH} = 4.0, 6.5$ และ 7.4) ศึกษาลักษณะการปลดปล่อยยา VCM จาก HApCol โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมในสารละลายบัฟเฟอร์กับเวลาดังแสดงในรูปที่ 6(a) โดยการศึกษาการปลดปล่อยยานี้ทำการทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากภาพที่ 6(a) แสดงให้เห็นว่าจลนพลศาสตร์การปลดปล่อยยา VCM จาก HApCol ค่อนข้างขึ้นกับค่า pH เป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม จะสังเกตเห็นว่าการทดลองใน 5 ชั่วโมงแรกจะพบว่ากราฟที่ได้จะมีความชันสูงในแต่ละค่า pH ต่างๆ การที่กราฟมีความชันสูงบ่งชี้ให้เห็นว่าการปลดปล่อยยา VCM เริ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 ชั่วโมงแรก โดยค่าความชันดังกล่าวสามารถ

เรียงลำดับได้ดังนี้ $\text{pH } 4.0 > \text{pH } 6.5 > \text{pH } 7.4$ โดยที่ $\text{pH } 6.5$ และ 7.4 มีค่า initial burst ที่สูงทำให้เกิดการปลดปล่อยยาเสร็จสมบูรณ์หลังจากเพียงแค่ 5 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ

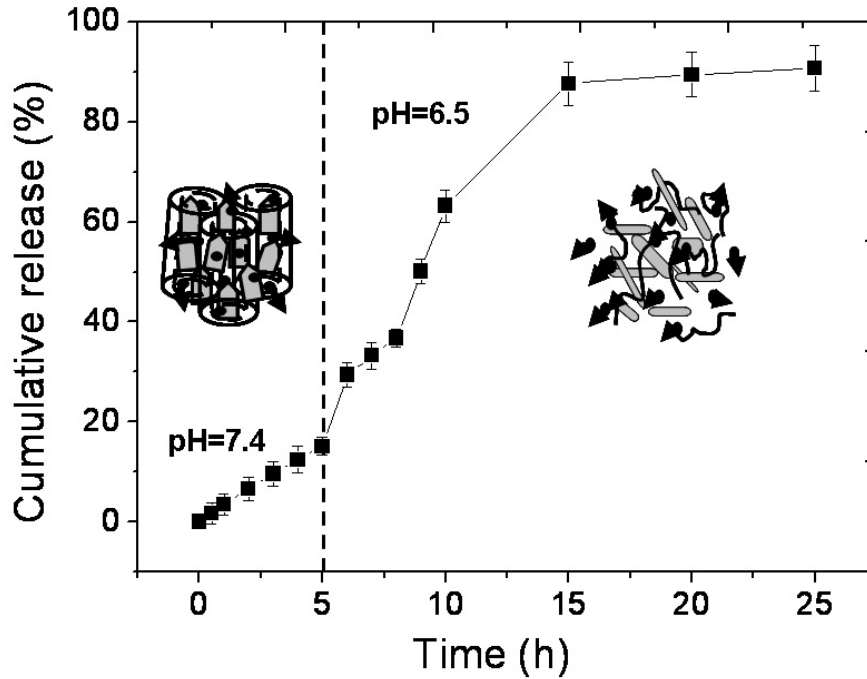


ภาพที่ 6 (a) กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาสะสม (Cumulative percent of VCM released) คอมโพลีเมอร์ HApCol ในช่วงเวลา 30 ชั่วโมง สภาวะ pH เท่ากับ 4.0, 6.5 และ 7.4 โดยใช้บัฟเฟอร์สารละลายฟอสเฟต แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $n=3$ และ (b) ภาพถ่ายของคอมโพลีเมอร์ HApCol หลังการปลดปล่อยยาที่บรรจุไว้ 3 ชั่วโมง พร้อมทั้งแสดงแนวทางที่เป็นไปได้แสดงปัจจัยค่า pH ที่ส่งผลต่อโครงสร้างของคอมโพลีเมอร์ HApCol

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายา VCM ที่บรรจุอยู่ในคอมโพลีเมอร์ HApCol จะถูกชะออกมาหมดเพียงแค่นั้น initial burst ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ค่อยเกิดขึ้นในวัสดุที่มีรูพรุนในระดับจุลภาค อย่างไรก็ตาม เป็นที่รู้กันดีว่าทั้ง คอลลาเจนและ HAp สามารถละลายได้บางส่วนในสภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นผลของการ burst ที่รุนแรงของการปลดปล่อยยา VCM ในสภาวะกรดน่าจะส่งผลให้ HApCol เกิดการสลายตัว และที่ $\text{pH } 7.4$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH ในร่างกาย เกิด initial burst แบบอ่อนๆ (mild) เนื่องจากความเสถียรของสารผสม HApCol ค่อนข้างสูง โดยทั่วไปแล้ววัสดุชีวภาพที่มีรูพรุนในระดับจุลภาคจะกีดกันการปลดปล่อยยา การปลดปล่อยยา VCM ที่ $\text{pH } 7.4$ จึงเกิดช้า เมื่อเกิด initial burst ทำให้ยา VCM น้อยกว่า 50% ที่บรรจุอยู่ใน HApCol ถูกปลดปล่อยออกมาภายในเวลา 1-5 ชั่วโมง และจากรูปแบบของการปลดปล่อยยาแสดงให้เห็นว่า ที่ $\text{pH } 7.4$ ยาที่ปลดปล่อยออกมาแล้วสะสมในสารละลายได้ 80% เกิดขึ้นหลังจาก 25 ชั่วโมง ในขณะที่ $\text{pH } 6.5$ และ 4.0 เหตุการณ์

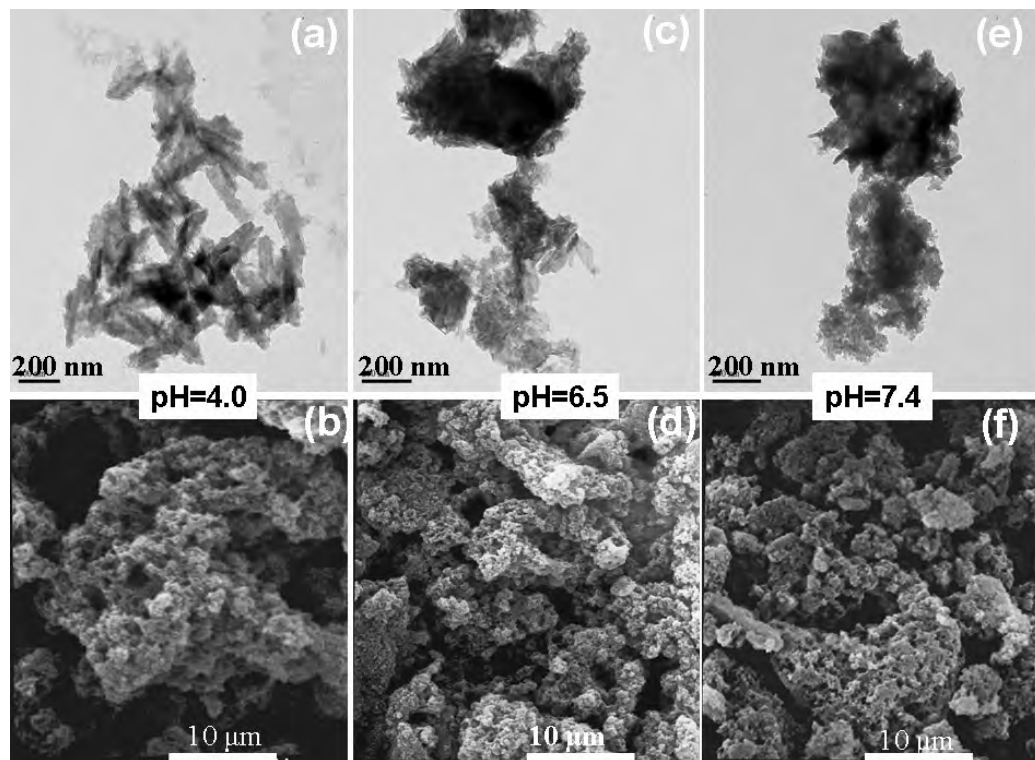
ดังกล่าวจะเกิดขึ้นหลังจากเพียงแค่ 2-3 ชั่วโมงเท่านั้น โดยการปลดปล่อยยาที่พบมี 3 ชั้นในการชะยา VCM จาก HApCol ที่ pH = 7.4 ขั้นตอนแรกจะเป็นการปลดปล่อยยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 5 ชั่วโมงแรก (47%) ขั้นตอนที่สองจะเกิดการปลดปล่อยยาที่ช้าลงในช่วงเวลา 5-10 ชั่วโมง (8%) และขั้นตอนที่สามจะเกิดการปลดปล่อยที่ค่อนข้างเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 10 (17%)

ภาพที่ 7 แสดงผลการศึกษาปัจจัยของค่า pH ต่อจลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยยา VCM จาก HApCol โดยการนำ VCM loaded HApCol แช่ในสารละลายที่ไม่มีบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ใน 5 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจึงปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยกรดอ่อน จากกราฟที่พล็อตระหว่างปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมในสารละลายกับเวลาพบว่ากราฟที่ได้จากช่วง pH 6.5 มีความชันที่เบี่ยงเบนสูงกว่าความชันที่ได้จากช่วง pH 7.4 สะท้อนให้เห็นจลนพลศาสตร์การปลดปล่อยยา VCM จาก HApCol ที่ต่างกัน จากผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่า ค่า pH มีผลต่อการปลดปล่อยยาจาก HApCol ยังคงเสถียรที่ pH 7.4 แต่คอลลาเจนจะเริ่มบวมน้ำและสลายตัวหลังจากแช่ในสารละลายเป็นเวลานาน การบวมน้ำของคอลลาเจนใน HApCol เกิดเนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลได้ถูกทำให้เป็นไอออนอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดแรงผลักทางอิเล็กโตรสถาดิกระหว่างหมู่ที่มีไอออนมากขึ้น การบวมน้ำจึงเกิดมากขึ้น การปลดปล่อยยาที่มากขึ้นหลังจากเวลา 10 ชั่วโมงจึงเกิดเนื่องจากการบวมน้ำนั่นเอง แต่เมื่อ pH ลดลงเป็น 6.5 จึงเริ่มเกิดการละลายของสารผสม HApCol รูปจำลองโครงสร้างของสารผสม HApCol ที่ขึ้นกับค่า pH ได้แสดงในรูปที่ 6(b) จากรูปจำลองแสดงให้เห็นว่า HApCol จะละลายในตัวกลางที่เป็นกรด และการละลายของ HApCol มีบทบาทสำคัญต่อการปลดปล่อยยา การปลดปล่อยยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์และรวดเร็วเรียงลำดับตาม pH ได้ดังนี้ $\text{pH } 4.0 > \text{pH } 6.5 > \text{pH } 7.4$ โดยการปลดปล่อยยา VCM จาก HApCol อย่างสมบูรณ์ที่ pH 7.4 จะใช้เวลานานกว่า pH 4.0 ประมาณ 2 เท่า



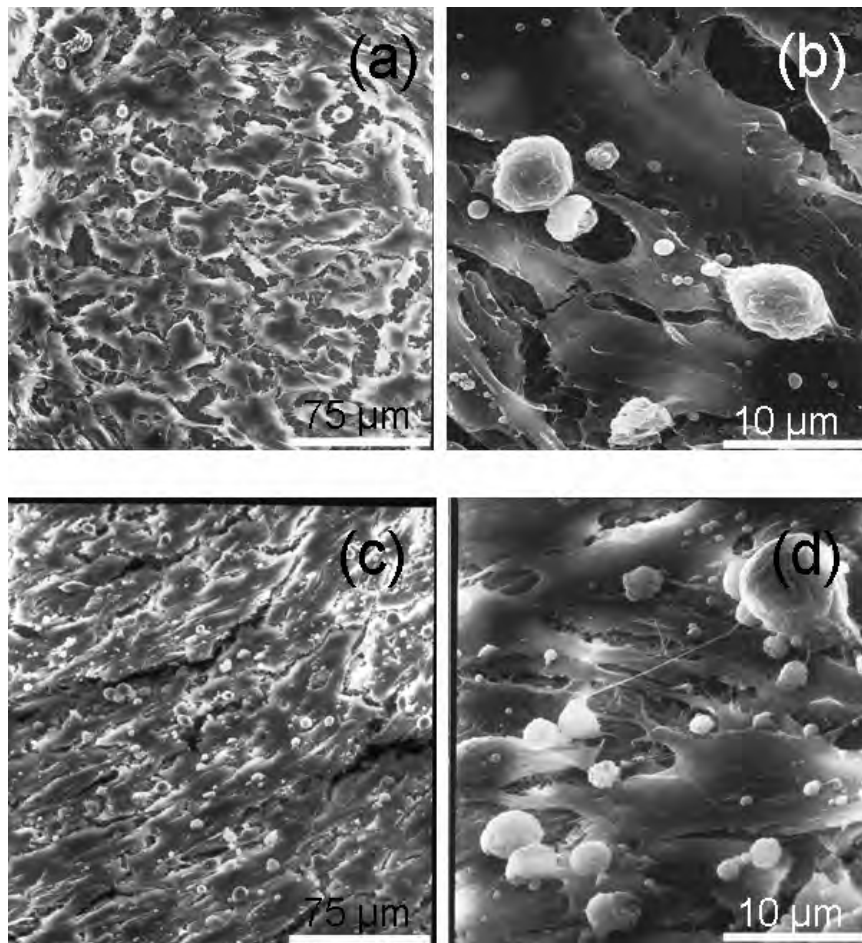
ภาพที่ 7 ปัจจัยของ pH ต่ออัตราการปลดปล่อยยา ค่าเฉลี่ยคิดจาก n=3

นอกจากนี้ เพื่อทดสอบความเสถียรของคอมโพสิต HApCol ที่มีการบรรจุยาหลังจากแช่ในสารละลายที่มีค่า pH แตกต่างกันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย SEM และ TEM ภาพที่ 8(a) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของ VCM-loaded HApCol หลังจากแช่กรด พบว่าส่วนใหญ่จะเป็นผลึกของ HAp ในระดับนาโนเมตร และพบว่าการสูญเสียคอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญและผลึกในระดับนาโนเมตรดังกล่าวไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจากผลการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าการละลายของ HApCol ในสภาวะกรด ซึ่งที่สภาวะกรดนี้จะทำให้เกิด initial burst ของการปลดปล่อยยาขึ้นอย่างสูง ผลการวิเคราะห์ด้วย TEM ภาพที่ 8(b)-(c) โดยบริเวณแถบสีดำที่โปร่งแสงจะแสดงภาพของคอลลาเจนที่บวมน้ำ รูปที่ 5(b) แสดงภาพผิวหน้าของ VCM-loaded HApCol ซึ่งจะเห็นอย่างชัดเจนว่ายา (ส่วนที่เป็นสีขาว) จะปกคลุมรอบผิวหน้าสารผสมเป็นอย่างดี เมื่อเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วย SEM ภาพที่ 5(b) กับ ภาพที่ 8(b)-(f) พบว่าปริมาณของยาที่เคลือบบนผิวหน้าเรียงลำดับได้ดังนี้ $\text{pH } 7.4 > \text{pH } 6.5 > \text{pH } 4.0$ นอกจากนี้ยังได้อธิบายความเสถียรของสารผสม HApCol ต่อค่า pH ในแผนผังที่ 6(b) จึงสรุปได้ว่ายาจึงถูกชะออกไปเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด



ภาพที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (แสดงดังภาพบน) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (แสดงดังภาพล่าง) ของ คอมโพสิต HApCol หลังการทดสอบการปลดปล่อยยา VCM ภายใต้สภาวะ ค่า pH ต่างกัน

เพื่อแสดงให้เห็นว่า HApCol ที่บรรจุยาและคอมโพสิต HApCol สามารถนำมาใช้ในร่างกายมนุษย์ได้ จึงได้นำ HApCol ที่บรรจุยามาทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทดลอง cell attachment และ proliferation ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้าย osteoblast ของหนูบนคอมโพสิต HApCol ที่บรรจุยาเทียบกับบนแผ่นแก้ว (ภาพที่ 9) ผลการทดลองจะสังเกตเห็นว่ามีเซลล์กระดูก proliferation อย่างหนาแน่นทั้งบนแผ่นแก้วและ HApCol ที่บรรจุยาหลังจากทิ้งไว้ 14 วัน การปรากฏของฟีโลพอดีย (filopodia) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ attach กับ HApCol ที่บรรจุยาได้เป็นอย่างดี จึงเป็นการบ่งบอกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคอมโพสิต HApCol ที่บรรจุยาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า มี multiple filopodia ขยายออกจากผิวหน้าของเซลล์และเซลล์ข้างเคียงอีกด้วย



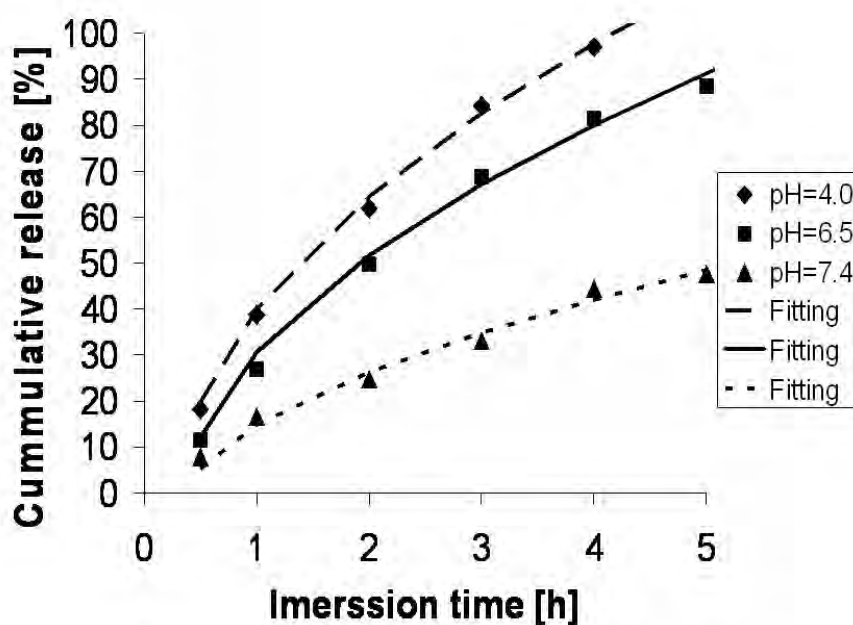
ภาพที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM images) แสดงเซลล์ osteoblasts บน (a)-(b) แผ่นแก้ว และ (c)-(d) บนคอมโพสิต HApCol หลังจากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งสังเกตเห็น Filopodia and mineralizing nodules เกิดขึ้น

จากการใช้หลักการทางคณิตศาสตร์อธิบายจลนพลศาสตร์ของการส่งจ่ายยาโดยใช้ Peppas model

$$\frac{M_t}{M_0} = kt^n \quad (2)$$

ซึ่ง M_t และ M_0 คือ ความเข้มข้นของยาที่ปลดปล่อยออกมาในสารละลายตัวกลางที่เวลา t และความเข้มข้นเริ่มต้นของยาบนผิวหน้าของอนุภาค M_t/M_0 คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของยาที่ปลดปล่อยออกมาซึ่งสัมพันธ์กับค่าคงที่การปลดปล่อยยา k (h^{-1}) สามารถใช้ระบุอัตราการปลดปล่อยยาได้ เวลา (t) ซึ่งยกกำลังแสดงการปลดปล่อยยาแบบยกกำลัง (n) สมการนี้ใช้ศึกษาลักษณะกลไกของการปลดปล่อยยา Peppas model เป็นโมเดลที่เหมาะสมที่จะใช้อธิบายการปลดปล่อยยาที่ละลายในน้ำได้จาก matrix ที่เป็นพอลิเมอร์และสามารถใช้อธิบายวัสดุที่เป็นเซรามิกซึ่งไม่รู้กลไกการเกิดปฏิกิริยาทุกขั้นตอน Peppas model เหมาะในการอธิบายจลนพลศาสตร์การปลดปล่อยยาของระบบนี้ซึ่งการละลายของยาเกิดขึ้นเร็วเมื่อเทียบกับการแพร่ของยา เมื่อเน้นไปที่การปลดปล่อยยาจาก HApCol

ในช่วง initial burst (1-5 ชั่วโมง) การใช้ Peppas model วิเคราะห์การปลดปล่อยยาให้ผลการทดลองที่ดี โดยให้ค่า $R^2 = 0.999, 0.998$ และ 0.990 ที่ pH 4.0, 6.5 และ 7.4 ตามลำดับ ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทดลองจากภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์รูปแบบการปลดปล่อยยา VCM ของคอมโพสิต HApCol ภายใต้สภาวะ pH=4.0, 6.5, 7.4 โดยสมการ Peppas

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาอัตราการปลดปล่อยยา VCM จากคอมโพสิต HApCol ภายใต้ pH ต่างกัน โดยใช้ Peppas' model ($M_t/M_0=kt^n$)

Release matrix	pH	n	k (h^{-1})	R^2	Transport mechanism
HAP-Col	4.0	0.53	53	0.999	Case III
	6.5	0.54	43	0.998	Case III
	7.4	0.58	22	0.989	Case III

และใช้ผลการทดลองนี้คำนวณหาค่า n ได้ค่าเป็น 0.53, 0.54 และ 0.58 สำหรับค่า pH ที่ 4.0, 6.5 และ 7.4 ตามลำดับ พบว่าค่า n ขึ้นกับกลไกการส่งถ่ายและลักษณะรูปร่างของตัวส่งถ่าย โดยค่า n ระหว่าง 0.5-1 หมายความว่ากระบวนการส่งถ่ายนั้นเป็นการส่งถ่ายแบบไม่ปกติสอดคล้องกับ Case

III และการ relaxation ทางโครงสร้างเป็นกระบวนการแพร่ โดยผลการทดลองหาค่าอัตราการปลดปล่อยยา (k) เรียงลำดับได้ดังนี้ $k_{pH\ 4.0} > k_{pH\ 6.5} > k_{pH\ 7.40}$ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยค่าอัตราการปลดปล่อยยาที่ได้จากการคำนวณสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้กล่าวมาในข้างต้น

หนังสืออ้างอิง

1. Sergey VD, Matthias E. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002;41(17):3130-3146.
2. Prashant N.K, Charles S, Dong-Hyun L, Dana O, Daiwon C. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomater.* 2005;1:65-83.
3. Matthew JO, Xingguo C, Sang SJ, Rajendra K, Yi-Yeoun K, Michael JK, Elliot PD, Laurie BG. Bone structure and formation: A new perspective. *Mat. Sci. Eng. R.* 2007;58:77-116.
4. Fu-Zhai C, Yan L, Jun G. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Mat. Sci. Eng. R.* 2007;57:1-27.
5. Barrère F, Mahmood TA, de Groot K, van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Mat. Sci. Eng. R.* 2008; 59:38-71.
6. Yurong C, Ruikang T. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. *J. Mater. Chem.* 2008; 18: 3775-3787.
7. Christopher F, Donggang Y, Ardit K, Adrian V, Samina I, Tlormoz S, David MS, Miguelangelo PC, Grasul C. Chondrogenic derivatives of embryonic stem cells seeded into 3D polycaprolactone scaffolds generated cartilage tissue in vivo. *Tissue. Eng. A.* 2008; 14(8): 1403-1413.
8. Wan-Ju L, Yi JJ, Rocky ST. Cell-nanofiber-based cartilage tissue engineering using improved cell seeding, growth factor, and bioreactor technologies. *Tissue. Eng. A.* 2008; 14(5): 639-648.

9. Jayarama RV, Sharon L, Aw TC, A. Bharath K, Seeram R. Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration. *Artif. Organs.* 2008; 32(5): 388-397.
10. Thanaphum O, Michael LL, Rupak MR, Buddy DR, Martha JS, Cecilia MG. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29:4091-4099.
11. Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-Hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur. Cell. Mater.* 2006; 11: 43-56.
12. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A cellular and Molecular Approach.* 1st ed. Philadelphia. Saunders. 2003. 1088.
13. Michael AR, Thomas AW, Volker S, Elvira D, Ludwig Z, Reinhard S, Volker A. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials.* 2005; 26:2677-2684.
14. Cosijns A, Vervaeke C, Luyten J, Mullens S, Siepmann F, Van Hoorebeke L, Masschaele B, Cnudde V, Remon J.P. Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007;67: 498-506.
15. Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler JM. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin. *Biomaterials.* 2003;24:1265–1270.
16. Dana O, Jinhua L, Mary EW, Todd R, John C, Leaf H, Prashant NK, Charles S. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials.* 2007;28:1267–1279.
17. Takayoshi H, Tomohiro K, Kohsuke M, Takato M, Tomoo M, Kohki E, Kiyotomi K. Magnetically recoverable heterogeneous catalyst: Palladium nanocluster supported on

- hydroxyapatite-encapsulated γ - Fe_2O_3 nanocrystallites for highly efficient dehalogenation with molecular hydrogen. *Green Chem.* 2007;9:1246–1251.
18. Bin W, Jing-Jing Z, Zhuang-Ying P, Xu-Quan T, Huai-Sheng W. A novel hydrogen peroxide sensor based on the direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on silica–hydroxyapatite hybrid film. *Biosen. Bioelectron.* 2009;24:1141-1145.
 19. Christopher F, Donggang Y, Ardit K, Adrian V, Samina I, Hormoz S, David MS, Miguelangelo PC, Rasul CG. Chondrogenic Derivatives of Embryonic Stem Cells Seeded into 3D Polycaprolactone Scaffolds Generated Cartilage Tissue *In Vivo*. *Tissue. Eng. A.* 2008;14(8):1403-1413.
 20. Wan-Ju L, Richard T, Chukwuka O, Assia D, Keith GD, David JH, Rocky ST. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2005; 26: 599-609.
 21. Wan-Ju L, Yi JJ, Rocky ST. Cell–Nanofiber-Based Cartilage Tissue Engineering Using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies. *Tissue. Eng. A.* 2008;14(5):639-648.
 22. Grace EP, Megan AP, Kinam P, Thomas JW. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26:3075-3082.
 23. Cui FZ, Wang Y, Cai Q, Zhang W. Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate. *J. Mater. Chem.* 2008;18:3835-3840.
 24. Masanori K, Toshiyuki I, Soichiro I, Hiroko NM, Yoshihisa K, Kazuo T, Kenichi S, Junzo T. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Compos. Sci. Technol.* 2004;64:819-825.
 25. Masanori K, Soichiro I, Shizuko I, Kenichi S, Junzo T. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 2001;22:1705-1711.

26. David L, John AMR, Jerome AW, Veronica G, Rolfe HC. Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004;68A:19-27.
27. Du C, Cui FZ, Zhang W, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000;50:518-527.
28. Pek YS., Shujun G, Mohamed Arshad MS, Kwong-Joo L, Jackie YY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials.* 2008;29:4300-4305.
29. Murugan R, Ramakrishna S. In situ formation of recombinant humanlike collagen-hydroxyapatite nanohybrid through bionic approach. *Appl. Phys. Lett.* 2006;88:193124.
30. Sang-Hoon R, Jae DL, Junzo T. Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen. *J. Am. Ceram. Soc.* 2000;83(11):2890-2892.
31. Chao-zong L. Biomimetic synthesis of collagen/nano-hydroxyapatite scaffold for tissue engineering. *J. Bionic. Eng. Suppl.* 2008: 001-008.
32. W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke and J.A. Jansen. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2007; 59: 234-248.
33. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J. Control. Release.* 2006;113:102-110.
34. María VR, Francisco B, Montserrat C, Miguel M. Drug confinement and delivery in ceramic implants. *Drug. Metab. Lett.* 2007;1:37-40.
35. Akihiro S, Masahiro H, Aki F, Atsumasa U. Treatment of Infected Hip Arthroplasty With Antibiotic-Impregnated Calcium Hydroxyapatite. *J. Arthroplasty.* 2008; 23(1): 145-150.
36. Madhana S, N. Ramesh B, Sunita PV, K. Ram K, Sampath Kumar TS. Biphasic calcium phosphates for antibiotic release. *Trends. Biomater. Artif. Organs.* 2005;18(2): 213-218.

37. Zbigniew R, Wolfgang F. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2003; 55: 1679-1698.
38. Arnold JK, Gale S, Shannon R, Regis P, Maurice B, Ann H, Michel GB, Benoit S. Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of gram-positive and gram-negative bacteria. *ACS NANO.* 2008;2(9):1777-1788.
39. Dion A, Langman M, Hall G, Filiaggi M. Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. *Biomaterials.* 2005; 26: 7276-7285.
40. Uwe G, Elke V, Frank AM, Jake EB. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J. Control. Release.* 2007;122: 173-180.
41. Erdal C, Zafer O, Lütüye M, Demet Ş, Murat A, Ayca Y, Yildiz Ö. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *Inter. J. Pham.* 2006;317:127-135.
42. Blanca G, Montserrat C, María VR. Time-Delayed Release of Bioencapsulates: A Novel Controlled Delivery Concept for Bone Implant Technologies. *Chem. Mater.* 2008;20:4826-4834.
43. Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 1194–1198.
44. Younsoo B, Shigeto F, Atsushi H, Kazunori K. Design of Environment-Sensitive Supramolecular Assemblies for Intracellular Drug Delivery: Polymeric Micelles that are Responsive to Intracellular pH Change. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003;42:4640 –4643.
45. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials.* 2006;27:2907-2915.
46. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2003;65:188-195.

47. Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J. Struct. Biol.* 2005;149:182-190.
48. Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS.* 1986;206(2):262-266.
49. Zhai Y, Cui FZ. Recombinant human-like collagen directed growth of hydroxyapatite nanocrystals. *J. Cryst. Growth.* 2006;291:202-206.
50. Zhai Y, Cui FZ, Wang Y. Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils. *Curr. Appl. Phys.* 2005;5:429-432.
51. Sopyan I, Mel M, Ramesh S, Khalid KA. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Sci. Technol. Adv. Mat.* 2007;8:116-123.
52. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M. *Nat. Biotech.* 2000 ;18 :959-963.
53. Garland CW, Nibler JW, Shoemaker DP. *Experimentals in physical chemistry.* 7th ed. New york. McGraw-Hill. 2003. p. 273-279.
54. Peppas NA, Paolo C. Analysis of drug release behaviour from swellable polymer carriers using the dimensionality index. *J. Control. Release.* 1997; 45: 35-40.
55. Gbureck U, Vorndran E, Barralet JE. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomater.* 2008; 4(5):1480-1486.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1.1 Assadawoot Srikhaow, Siwaporn Meejoo Smith, Photocatalytic activity of flower-like ZnO derived by a D-glucose assisted sonochemical method, *Research Chemical Intermediates*, DOI 10.1007/s11164-012-0619-5, Published online: 19 June 2012.

1.2 Siwaporn Meejoo Smith, Taweechai Amornsakchai, Prapaporn Jongwattanapisan, Narattaphol Charoenphandhu, Nateetip Krishnamra, I-Ming Tang, Rassmidara Hoonsawatd, Weeraphat Pon-On, Hydroxyapatite-Collagen Nanocomposite: pH Dependence of Vancomycin Release Kinetics and *in vitro* Bioactive Scaffold, *to be submitted to International of Applied Ceramic Technology*

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ ได้แก่มีการสร้างนักวิจัยใหม่ และเครือข่ายงานวิจัยเชื่อมโยงนักวิจัยวิทยาศาสตร์กายภาพและวิทยาศาสตร์ชีวภาพให้ได้ทำงานร่วมกัน

3. อื่นๆ

ได้รับเชิญให้บรรยายผลงานวิจัยในการประชุมโครงการพัฒนานักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช (NRCT-CPS Conference V. Development of Drug Design-based Pharmaceuticals) ในหัวข้อ Towards Bioceramics Bone-implants: Incorporation of Iron, and Vancomycin into Hydroxyapatite nanoparticles ณ โรงแรมระยอง รีสอร์ท ท.เพอ อ. เมือง จ. ระยอง เมื่อวันที่ 4 กันยายน 2553

ภาคผนวก

Photocatalytic activity of flower-like ZnO derived by a D-glucose-assisted sonochemical method

Assadawoot Srikhaow · Siwaporn Meejoo Smith

Received: 11 February 2011 / Accepted: 5 August 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract This work reports the preparation of flower-like ZnO for applications in the catalytic oxidation of methyl orange (MO) in aqueous solution. The wurtzite ZnO samples with flower-like morphologies were obtained via a D-glucose-assisted sonochemical method. Effects of the presence of glucose, sonication times (0, 10, and 20 min) and calcination temperatures (300, 400, and 500 °C) on the morphology of the catalysts were investigated. Results from this work suggest that D-glucose played an important role in the formation of flower-like morphologies and the sonication processes further enhanced the flower-like characteristic ordering. The majority of ZnO samples prepared in this work had rather high photocatalytic activity after 45 min, with MO degradation greater than 85 % of the initial concentration. These results suggest that the photocatalytic activity of ZnO after 45-min reaction time correlates well with the specific surface area, and the number of oxygen vacancies present in the materials. The solubility of flower-like ZnO samples in the dye solution was measured to be 19.2 ppb after 24-h reaction time.

Keywords Sonochemical method · Flower-like ZnO · Photocatalytic activity · Photostability · Photoluminescence

A. Srikhaow
Materials Science and Engineering Program, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd.,
Rajathevi, Bangkok 10400, Thailand
e-mail: qtaroscme@gmail.com

A. Srikhaow · S. M. Smith
Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI
Rd., Rajathevi, Bangkok 10400, Thailand

S. M. Smith (✉)
Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Rajathevi,
Bangkok 10400, Thailand
e-mail: scsmj@mahidol.ac.th

Introduction

Photocatalytic oxidation processes are potentially very attractive for remediation of wastewater, with the goal to remove toxic organic pollutants at ambient temperature and pressure with no requirement for use of caustic chemicals such as ozone and hydrogen peroxide [1]. In principle, electron-hole separation processes can be induced when a photocatalyst absorb efficient photons having energies $h\nu \geq E_g$ (band gap energy). The electron and hole could then react with adsorbed water and further generate highly reactive species such as hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and O_2 -derived species (O_2^- , O_2H , H_2O_2) [2]. These free radicals can promote the oxidative degradation of organic pollutants. Recent works [3–6] have reported on a number of hierarchical nanostructured ZnO materials ($E_g = 3.37$ eV) as high-performance photocatalysts being used for wastewater treatments. In 2009, Tong et al. [7] reported the high photocatalytic activity of nanosheet-assembled quasi-sphere-like ZnO being due to a high concentration of surface defects in the structure. They proposed that the presence of defects at the ZnO surface could reduce the rate of electron-hole recombination as photogenerated electrons were trapped by oxygen vacancies [8], thus enhancing the photocatalytic activity of the material. Similarly, another previous work [6] showed that the photoactivity of a flower-like ZnO nanomaterial is significantly higher than that of a ZnO nanorod-like material. These results suggested correlations between morphologies, structural defects, and photocatalytic activity. In this study, a D-glucose-assisted sonochemical method was employed to prepare flower-like ZnO materials. By varying the sonication time and calcination temperature, different characteristics and photocatalytic activities of the obtained flower-like ZnO were obtained. Under UV–Vis irradiation, the degradation of methyl orange (MO) in aqueous solution catalyzed by the flower-like ZnO was monitored as a function of reaction time.

Experimental

Zinc nitrate hexahydrate (Qręc), sodium hydroxide (Rankem), D-glucose (Univar), acetone (Qręc), ethyl acetate (Merck), methyl orange (Fisher Scientific) were of analytical grade and used without purification. De-ionized water was used throughout the experiments. The preparation method of ZnO in this study was a modification of the method reported by Zhang et al. [9]. In detail, 10 M NaOH(aq) was gradually added into 100 mL of 0.5 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (aq) until the solution became transparent. Then, the total volume of the mixture was adjusted to 300 mL by addition of water. Subsequently, 0.35 g of D-glucose was added to the solution, followed by a 200-mL solution of a H_2O :acetone:ethyl acetate mixture with volume ratio 3:3:2. Next, the pH of the overall solution was adjusted to 9–10 using 20 % v/v HNO_3 , resulting in a white suspension. This suspension was then ultrasonically irradiated (20 kHz, 450 W, 40 % output, and 50 % cycle) for various sonication times (0, 10, and 20 min) using a Branson sonifier (450 W), and after sonication the suspension was kept at room temperature for 12 h. The white precipitate was separated and washed several times with de-ionized water, freeze dried, and then

Table 1 Summary of the physical and catalytic activities of flower-like ZnO samples for the decolorization of MO solution

Sample	Calcination temp./sonication time		I_{PL}	E_g (eV)	S_{BET} (m ² /g)	d (nm)	% X_0	% X_{45}
	°C	Min						
A	300	0	12.3	3.20	15.5	38	3.3 ± 1.1 (3)	91.5 ± 1.8 (3)
B	300	10	5.1	3.23	7.9	35	2.3 ± 1.2 (3)	69.5 ± 2.3 (3)
C	300	20	10.8	3.12	14.7	50	2.4 ± 0.7 (3)	97.5 ± 0.4 (3)
D	400	0	15.1	3.25	11.7	26	7.57 ± 1.1 (3)	96.6 ± 0.6 (3)
E	400	10	5.5	3.08	6.36	39	10.7 ± 0.9 (3)	70.8 ± 3.9 (3)
F	400	20	15.1	3.18	14.51	60	12.7 ± 2.7 (3)	94.1 ± 0.3 (3)
G	500	0	15.0	3.08	8.76	28	9.1 ± 0.7 (3)	65.7 ± 3.7 (3)
H	500	10	16.7	3.18	6.38	35	6.1 ± 1.1 (3)	87.7 ± 1.6 (3)
I	500	20	15.3	3.19	5.98	41	3.4 ± 0.7 (3)	88.9 ± 1.3 (3)

I_{PL} PL intensity at 470 nm, S_{BET} specific surface area, d pore diameter, E_g band gap energy, % X_0 % decolorization of MO 10 ppm before UV–Vis illumination, % X_{45} % decolorization of MO 10 ppm after 45 min of UV–Vis illumination

calcined at either 300, 400, and 500 °C for 3 h in an air atmosphere. The use of different sonication times, in combination with the various calcination temperatures afforded nine ZnO samples denoted as samples A–I, as shown in Fig. 2 and Table 1. Notably, three additional ZnO samples were prepared using the method described above without adding glucose to examine the role of glucose in the preparation method.

The crystalline phase of samples studied was identified on a powder X-ray diffraction (Bruker, AXS model D8 advance) with Cu K α radiation, $\lambda = 1.5418$ Å. The microstructure of samples was observed on a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6400 microscope and Hitachi, S-4800), and their surface properties were examined by using the Brunauer–Emmett–Teller method (BET). Optical properties of the samples were investigated by measuring diffuse reflectance spectra on a UV–Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, model Lamda 800), with photoluminescence spectra of colloidal suspensions being conducted on a spectrofluorometer (JASCO, model FP-6200) equipped with a Xenon lamp source, at an excitation wavelength of 325 nm. The band gap energies of ZnO samples were calculated by the Kubelka–Munk method [10]. Photocatalytic activity examination was performed by monitoring the degradation of MO in an aqueous solution. Ten milligrams of each ZnO sample was well dispersed in 10 mL of MO (10 ppm) in an ultrasonic bath for 30 min. Next, the resulting suspensions were kept in the dark for 30 min with stirring to reach absorption–desorption equilibrium. Subsequently, the suspensions were irradiated under UV–Vis light using a tungsten lamp (4 × 300 W OSRAM ULTRA-VITALUX®). The color removal efficiency (% decolorization) of MO was monitored as a function of time by measuring the absorbance of the dye solution at given times during irradiation. To do this, the suspensions were

centrifuged and filtered at specific reaction times (15, 30, and 45 min). Subsequently, UV–Vis absorption spectra of the dye filtrates were recorded on a UV–Vis spectrophotometer. The concentration of unreacted MO in the filtrates was quantified using the absorbance at 464 nm (corresponding to unreacted MO), and a curve fitting method using the Beer–Lambert law. % Decolorization was calculated using the following equation:

$$\% \text{Decolorization} = \left(\frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

where C_0 is the initial concentration of MO and C_t is the concentration of MO after t minutes. Moreover, the photostability of the ZnO catalyst (sample C) was studied by monitoring the generation of Zn^{2+} in the dye solution during the photochemical reaction. The suspension of ZnO catalyst in the dye solution was exposed to UV–Vis radiation after various time intervals (1, 4, and 24 h). The concentration of Zn^{2+} in the dye filtrates was then determined by using a graphite furnace atomic absorption spectrometer (GFAAS, Perkin Elmer AAnalyst 100). A hollow cathode zinc lamp (Perkin Elmer) operated with 10-mA current was employed, with argon flow throughout the heating program, except during the atomization step.

Results and discussion

All ZnO samples prepared in this study contained a single crystalline phase of hexagonal wurtzite ZnO (JCPDF Card File No.36145). Figure 1 shows the morphologies of ZnO prepared without addition of D-glucose after various sonication times. The results from Fig. 1 indicate that a conventional co-precipitation method (sonication time = 0 min) resulted in a formation of ZnO having large particle size (1.5–5.3 μm), whereas sonochemical method (sonication time = 10, 20 min) gave ZnO aggregates with smaller size (1.0–1.5 μm). No flower-like ZnO was obtained by using this non-adding glucose co-precipitation method.

On the other hand, Fig. 2 shows that the co-precipitation method in the presence of D-glucose gave ZnO samples with flower-like morphologies (sample A, D, and E in Fig. 2). However, the D-glucose-assisted sonochemical method gave ZnO samples with more ordered flower-like characteristics (samples B, C, E, F, H and I).

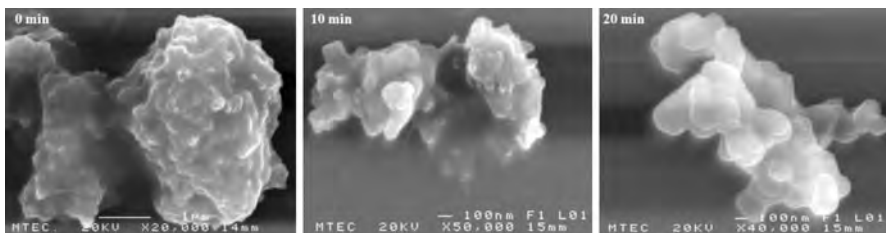


Fig. 1 SEM images of ZnO samples calcined at 500 °C, which were prepared by non-adding D-glucose method with varying sonication times

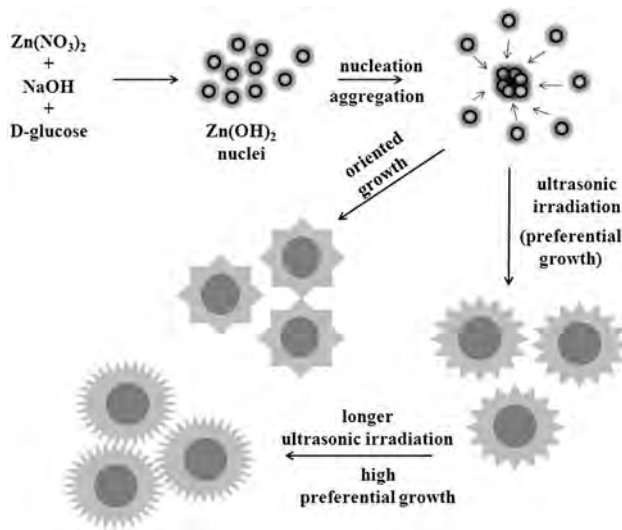


Fig. 2 SEM images of the obtained ZnO samples at varying sonication time (0, 10, 20 min) and calcination temperature (300, 400, and 500 °C)

Notably, by applying sonication, the obtained ZnO samples have a greater resemblance to a bunch of flowers with various double-flowered forms. As a result, one can conclude that D-glucose played an important role in the formation of flower-like morphologies and the sonication processes further enhance the degree of order. The results from this work are in good agreement with a previous report [11] indicating that ultrasonic irradiation could influence crystal growth of inorganic materials in preferential orientations. It has been previously reported that sucrose and glucose were employed as templates to synthesize ZnO hollow spheres [10, 12]. With some similarity to our study, we propose a possible mechanism of the formation of flower-like ZnO, as shown in Fig. 3. Firstly, glucose could undergo a dehydration process resulting in the formation of hydrophilic spheres, in which zinc precursors could embed through coordination, or electrostatic interactions. As nucleation occurs, sonication generates cavitations in the liquid solution, giving high surface energy at the surface of nuclei and influencing the crystal growth of ZnO in more preferential orientations [13]. The proposed mechanism supports the SEM results, such that the products obtained by applying longer sonication times are ZnO samples with high numbers of additional petals, and double flower-like morphologies.

Photoluminescence is one of the tools commonly used to study details of structural defects in semiconducting materials. Notably, it has been reported that defect-free ZnO should give an emission signal ~ 370 nm [15] corresponding to its absorption edge. However, it appeared that the ZnO samples prepared in this work gave several emission signals in the near-UV and visible regions as shown in the PL spectra (Fig. 4 for samples A-I).

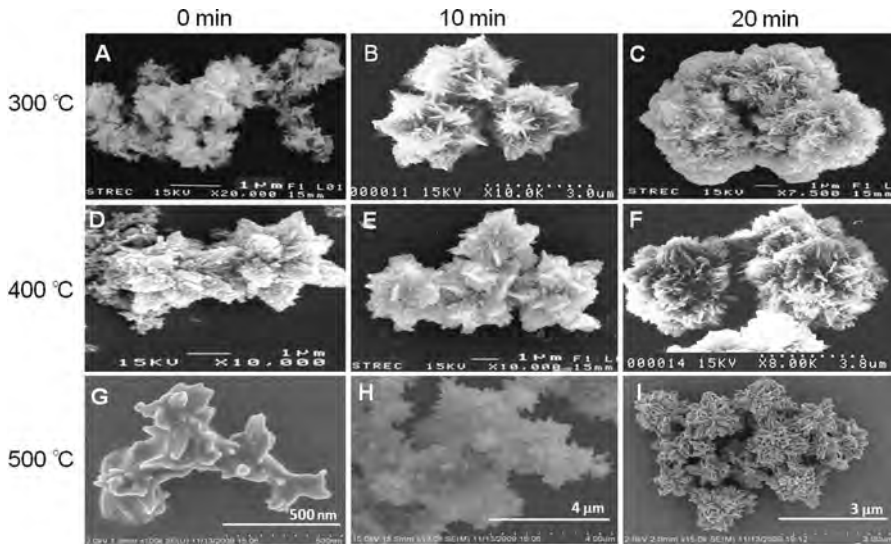


Fig. 3 Schematic illustration of the formation process of flower-like ZnO modified from the proposed mechanism by Li et al. [14]

Figure 4 (bottom right) displays a proposed energy diagram representing energy levels of several types of defects in ZnO structure such as a free exciton (No. 1), interstitial Zn (No. 2), and oxygen vacancy [16]. The near-band-edge UV emission signals at around 380–400 nm might relate to the recombination of electrons in exciton and holes in the valence band of the ZnO materials [12]. These emission signals ranged between 3.06 and 3.22 eV, and tended to be slightly red shifted when longer sonication times were applied, implying that longer sonication times possibly induced the formation of exciton states at lower energies. Furthermore, it has been previously suggested that the emission bands observed at 420 nm may relate to the presence of interstitial Zn sites in the ZnO structure [16]. On the other hand, the PL signal at 470 nm corresponds to the recombination of deep-level emission, in which a photogenerated hole recombines with an electron trapped at an oxygen vacancy [5, 13, 15–17]. Since the intensity of PL signals is proportional to the number of the surface defects in the sample, the intensity of the PL signal at 470 nm (I_{PL} in Table 1) should be proportional to the concentration of oxygen vacancies in the ZnO samples.

Figure 5 (left) shows that, in all cases, the concentration of MO slightly decreased after the suspension of ZnO catalyst in the dye solution was kept in the dark. After 60 min, this corresponded to a % decolorization of 2.3–12.7 (% X_0 in Table 1). At this stage, the decrease in concentration of MO was possibly due to adsorption of MO on the ZnO surface. On the other hand, after the suspension was exposed to UV–Vis radiation, the concentration of MO rapidly decreased. After a 45-min illumination period, the concentration of MO was significantly reduced, giving % decolorization of 65.7–97.5 % (% X_{45} in Table 1). These results suggested that the concentration of MO decreases mainly due to the photooxidation of MO catalyzed by the ZnO samples.

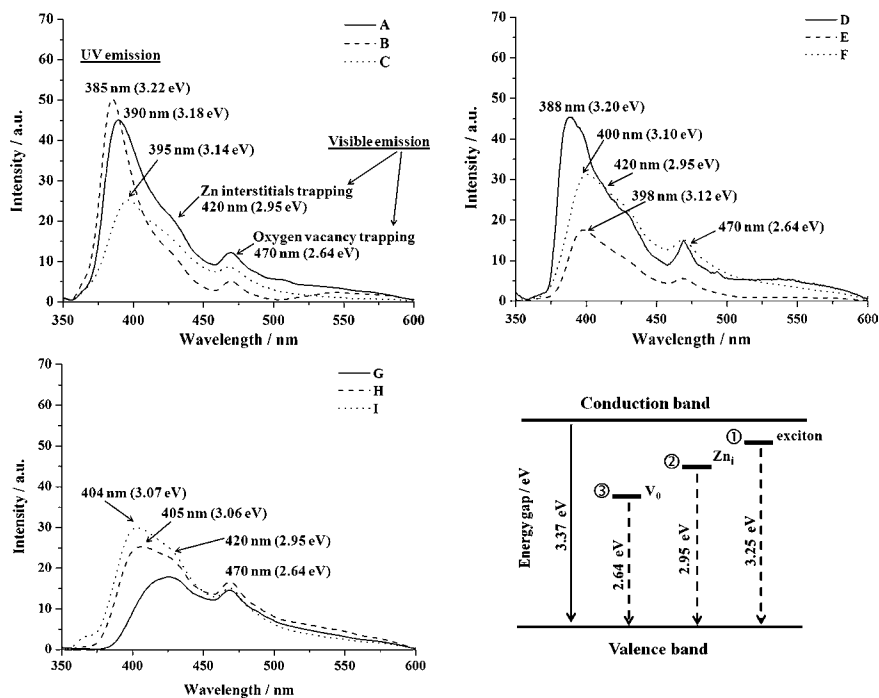


Fig. 4 Room temperature photoluminescence (PL) spectra of the ZnO samples, as well as the proposed energy diagram of defect states in ZnO samples. Event 1 near-band-edge (UV) emission and deep trapping (visible) emission, 2 Zn interstitial trapping (420 nm), and 3 oxygen vacancy trapping (470 nm) and band-edge emission at 3.37 eV (370 nm)

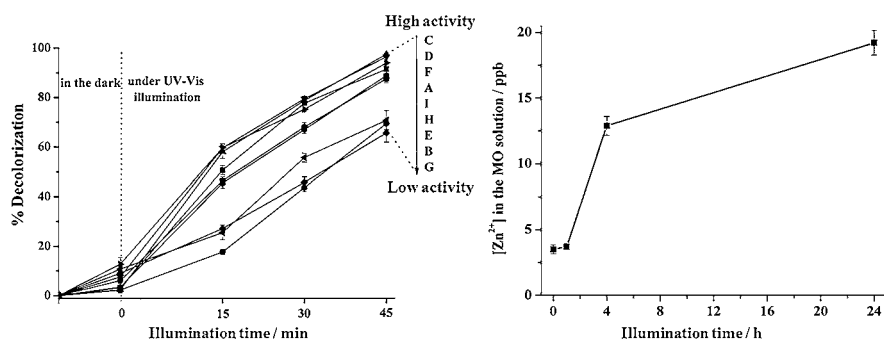


Fig. 5 Left % decolorization of methyl orange (10 ppm) catalyzed by the ZnO samples (1 g/L loading). Right the concentrations of Zn^{2+} in the dye solution resulting from the dissolution of the ZnO (sample C) during the photocatalytic oxidation of MO

Furthermore, the photostability of the ZnO catalyst (sample C) was investigated. From Fig. 5 (right), it was found that at a catalyst loading of 1 g/L, sample C gradually degraded upon photoreaction resulting in the presence of Zn^{2+} ions being detectable in the dye solution. After 24-h reaction time, the concentration of

Zn^{2+} ions reached 19.2 ± 0.9 ppb. In previous work, Wang et al. [18] reported the use of a ZnO nanomaterial with catalyst loading of 0.5 g/L to degrade 10 ppm methylene blue. After 24-h reaction time, they reported a far higher concentration of Zn^{2+} (390 ppb) in the dye solution. In comparison to Wang's ZnO sample, sample C is much more photostable, even at double the catalyst loading level employed by Wang et al. Table 1 summarizes the % decolorization of MO due to the adsorption of MO on the ZnO surface (% X_0), and after 45-min photoreaction (% X_{45}) in addition to the optical and surface properties of the prepared ZnO catalysts.

The surface area and pore diameters of the ZnO samples ranged between 6.0 and 15.5 m^2/g and 26–60 nm, respectively. Notably, at a specific calcination temperature, the ZnO samples prepared with a 20 min sonication time (sample C, F, and I) showed the most ordered flower-like characteristics, and the largest pore diameters. Furthermore, from this work, the specific surface areas of the ZnO samples decreased with increasing calcination temperature, possibly due to a higher degree of crystallinity, and ZnO grain growth at high temperatures. From Table 1, samples A, C, D, and F have relatively high specific surface area (S_{BET} , $> 10 \text{ m}^2/\text{g}$) and high intensities of the PL signal at 470 nm ($I_{\text{PL}} > 10$), and these also showed significantly higher photoactivities. These ZnO samples degraded MO giving % X_{45} greater than 90 %. In contrast, the ZnO samples with either low S_{BET} or low I_{PL} , or both, had relatively low catalytic activities for the photooxidation of MO. At specific calcination temperatures, the longest sonication times provided more ordered flower-like ZnO materials (samples C, F, and I) with the largest pore diameters and relatively high I_{PL} (> 10), indicating the greater number of oxygen vacancies. These ZnO samples degraded MO greater than 88 %. Notably, the photoactivity of sample I is slightly lower than those of C and F, possibly due to its lower specific surface area. Li et al. [14] reported that the high surface area and pore diameters of hierarchical ZnO provide the possibility for the efficient diffusion and transport of degradable organic molecules and hydroxyl radicals in photochemical reactions, leading to an enhancement in the photocatalytic activity of ZnO based materials. Furthermore, it was observed that although samples G, H, and I have relatively high numbers of oxygen vacancies ($I_{\text{PL}} > 15$), they exhibited low photocatalytic activities, possibly due to their low S_{BET} . Thus, the surface area could play a more important role in photodecomposition of MO than the numbers of oxygen vacancies in the material.

Conclusions

Flower-like ZnO samples were successfully prepared by a D-glucose-assisted sonochemical method. From our study, the high specific surface area ZnO samples containing a high number of oxygen vacancies showed great promise as high-performance catalysts for the degradation of MO. From previously reported work, the catalytic activity of ZnO should result from the contribution of overall effects, i.e., optical properties, microstructure, surface properties, and structural defects. However, our results suggested that the specific surface area and number of oxygen vacancies played important roles dictating the photocatalytic activity. Further

investigations on the reusability of ZnO and chemical modification of the used ZnO catalyst to suit broader-based applications are currently underway.

Acknowledgments Financial support from Faculty of Science, Mahidol University, Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Thailand Research Fund (Grant #TRG5280021), and Office of the Higher Education Commission are greatly acknowledged. The authors would like to thank Dr. Atitaya Siripinyanond for her kind assistance on AAS experiments. This study was conducted under a research study framework at Mahidol University.

References

1. A. Aguedach, S. Brosillon, J. Morvan, E.K. Lhadi, *Appl. Catal. B* **57**, 55 (2005)
2. G. Lu, A. Linsebigler, J.T. Yates, *J. Phys. Chem.* **99**, 7626 (1995)
3. Y.Q. Jiang, F.F. Li, R. Sun, Z.X. Xie, L.S. Zheng, *Sci. China Chem.* **53**, 1711 (2010)
4. D. Wang, Y. Zhao, C. Song, *Solid State Sci.* **12**, 776 (2010)
5. H. Li, Y. Ni, J. Hong, *Scr. Materialia* **60**, 524 (2009)
6. Y. Wang, X. Li, N. Wang, X. Quan, Y. Chen, *Sep. Purif. Technol.* **62**, 727 (2008)
7. Y. Tong, J. Cheng, Y. Liu, G.G. Siu, *Scr. Materialia* **60**, 1093 (2009)
8. Y. Zheng, C. Chen, Y. Zhan, X. Lin, Q. Zheng, K. Wei, J. Zhu, Y. Zhu, *Inorg. Chem.* **46**, 6675 (2007)
9. M. Zhang, G. Sheng, J. Fu, T. An, X. Wang, X. Hu, *Mater. Lett.* **59**, 3641 (2005)
10. J. Yu, X. Yu, *Environ. Sci. Technol.* **42**, 4902 (2008)
11. S.H. Jung, E. Oh, K.H. Lee, Y. Yang, C.G. Park, W. Park, S.H. Jeong, *Sonochem. Cryst. Growth Des.* **8**, 265 (2008)
12. Y. Zhang, E.W. Shi, Z.Z. Chen, B. Xiao, *Mater. Lett.* **62**, 1435 (2008)
13. M.H. Huang, Y. Wu, H. Feick, N. Tran, E. Weber, P. Yang, *Adv. Mater.* **13**, 113 (2001)
14. B. Li, Y. Wang, *J. Phys. Chem. C* **114**, 890 (2010)
15. Y. Terai, K. Yoshida, M.H. Kamarudin, Y. Fujiwara, *Phys. Status Solidi C* **8**, 519 (2011)
16. P. Jiang, J.J. Zhou, H.F. Fang, C.Y. Wang, Z.L. Wang, S.S. Xie, *Adv. Funct. Mater.* **17**, 1303 (2007)
17. S.Y. Yu, H.J. Zhang, Z.P. Peng, L.N. Sun, W.D. Shi, *Inorg. Chem.* **46**, 8019 (2007)
18. Y. Wang, R. Shi, J. Lin, Y. Zhu, *Energy Environ. Sci.* **4**, 2922 (2011)

Hydroxyapatite-Collagen Nanocomposite: pH Dependence of Vancomycin Release Kinetics and *in vitro* Bioactive Scaffold

Siwaporn Meejoo Smith^{a*}, Taweechai Amornsakchai^a, Prapaporn Jongwattanapisan^{b,c},
Narattaphol Charoenphandhu^{b,c}, Nateetip Krishnamra^{b,c}, I-Ming Tang^{d,e},
Rassmidara Hoonsawat^{d,f}, Weeraphat Pon-On^e

^aDepartment of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,
Faculty of Science, Mahidol University

^bConsortium for Calcium and Bone Research, Faculty of Science, Mahidol University

^cDepartment of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University

^dThEP Center, Commission of Higher Education, 328 Si Ayuthaya Rd.

^eDepartment of Physics, Faculty of Science, Mahidol University
Bangkok 10400, Thailand.

^fMahidol University International College, Salaya Campus
Mahidol University, Salaya 73720, Thailand

Keywords: Hydroxyapatite/Collagen, Controlled drug release, Vancomycin (VCM).

***Corresponding author:** email address: siwaporn.smi@mahidol.ac.th,

Tel.:662 201 5164; Fax:662 354 7151

Abstract

The objective of this study is to study the effects of pH on the release of antibiotics, vancomycin (VCM), from hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite. Potential application as implant materials of HApCol was investigated in simulated body fluid (SBF) and cultured with rat osteoblast-like UMR-106 cells. Bioactivity studies showed that mineralization of new apatitic crystals had formed mainly near the edge pore of the HApCol composite after soaking the composite in a SBF solution for one week. VCM was successful loading into HApCol composite, with loading efficiencies of 77.82%. Controlled release of VCM from the composite is critically pH dependent. The release kinetics indicates 80% accumulative release of VCM from the HApCol composite for pH 7.4 after 25 hours; while only 2-3 hours is required to reach 80% accumulative release for pH 6.5 and 4.0. More details about the burst effect are discussed. It has been confirmed that the drug-loaded HApCol composite is also bioactive by *in vitro* cell adhesion and proliferation tests. Thus, this multi-functional of HApCol nanocomposite has the potential to enhance cell attachment and to provide controlled drug delivery for bone implants. Precaution of using this drug-loaded biomaterial in patients with complications has been suggested.

1. Introduction

Bone loss due to an accident or disease creates a need for developing biomaterials for implantation because of it is a major health problem affecting quality of life. One needs a material similar to the mineral component of bone tissue in order to achieve a direct chemical bond between natural bones and the implanted material. Hydroxyapatite (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, is the material of first choice in a wide range of applications [1-11] for hard tissue replacement since 80 % of the inorganic mineral in the human bone is chemically similar to HAp [12]. Previously reported, this material can also be exploited in various fields such as drug delivery [13-15], gene delivery [16], catalysis [17], and sensors [18]. Artificial HAp and its hybrid composites have shown great promise as biocompatible and biodegradable materials being required to correct bone defects. For decades, there have been extensive efforts made to use ceramic composites to duplicate bones. Polymeric materials such as poly-lactic acid (PLA) and its copolymers with poly-glycolic acid (PGA) or with natural chitosan polymers [19-22] and collagen fibrils [23-31] are developed by incorporate these polymers with HAp to produce bone like materials to be used for bone implants.

More importantly, collagen is found as a major organic component of several human tissues such as skin, cartilage, tendon, membrane and of course bone. The surface of bone tissue, hydroxyapatite-collagen (HApCol) composite, retains a fibril structure which assists the nucleation of new apatite layers to be occurred on the HApCol surface.

Nevertheless, although these hybrid materials exhibit biocompatibility, biodegradability, which can induce the nucleation of new bone after implantation, acidic environments could lead to degradation and stiffness loss, which can cause severe inflammatory reactions while the composite decomposed *in vivo*. In general, an inflammatory response from the body arises when a foreign object is in a living body. While most surgical treatments of bone diseases and fractures with bone grafts and prostheses are successful, postoperative problems, such as pain and infections resulting in disengagement between the bone and prostheses. Infections around the implant are common, and remain one of the most challenging complications of bone reconstruction. During recovery from bone implantation, patients are commonly prescribed antibiotics to suppress infections due to bacteria in open fractures as well as anti-inflammatory medication to facilitate recovery. However, delivering medications to the infected area fast and sufficiently is not always possible. The degree of infection around the implant relates to the patients' immune deficiency, which can be varied depending on the individual's complications. For example, patients who suffer from osteosarcoma, solid tumour expose much higher risk (5-20 times) due to infections than normal patients when they have bone replacement surgery [Lancet Oncol 2005, 6, 85-92]. As mentioned above, incorporation of certain pharmaceuticals, e.g. anti-inflammatory or antibiotic medicines directly into the composite matrices being implanted could be major advancement [32-37]. More importantly, adjustment in dosage of medications is required for each patient depending on the concurrent complications. Thus, it could be a breakthrough to have a smart implant, which responds to its local environments (e.g. pH or temperature), and then releases suitable dosage of medications throughout a treatment period.

In this work, HApCol nanocomposite was synthesized via the self organization of opposite charges on collagen fibrils and the hydroxyapatite surface. The particle size, morphology and crystal structure of the composite were investigated, and the bio-mineralization of HApCol composite after soaking in a simulated body fluid (SBF) is studied. In addition, the bioactivity of HApCol has been examined by observing the interactions between cells and the synthesized material surface. HApCol was used as substrate for the growth of rat osteoblast-like UMR-106 cells for 14 days. In order to overcome the non-specific treatment, the synthetic biomaterials have been used as drug carriers to treat infected tissues locally. To obtain an ideal local drug carrier, the microporous structure of biomaterials would give advantages allowing the incorporation of drugs molecules into their structure. Chemical binding between the pharmaceutical molecules and the structure of composite should be expected via hydrogen bonding interactions among amino-, carboxyl- or hydroxyl- groups presence in the composite and pharmaceutical molecules. Next, the controlled release of Vancomycin (VCM) from the HApCol nanocomposite is focused. VCM is a broad-spectrum glycopeptide antibiotic which is active against Gram-positive organisms [38-42]. Our hypothesis is raised that the release kinetics of VCM from the HApCol matrix may depend on the environmental

conditions near the infected tissue. As previously reported, the cancer cells are acidic; pH ~ 6 at the extracellular compartment, whereas pH ~ 4.5 at the intracellular lysosomes [43, 44]. If HApCol could detect the cellular environments, and adjust the dosage of VCM leaching out from the composite, one should expect different release kinetics of VCM from HApCol composite into cancer cells, in comparison to that into normal cells. To prove our hypothesis, the release kinetics of VCM from HApCol composite in different pH media is studied. The results from this study should lead to further development of new nano-particulate system, which provides biocompatibility, satisfactory drug loading, as well as, automatic adjustment of dosage of medications released upon physiological and malignant microenvironments for better treatment efficacy.

2. Materials and Method

Collagen used in this experiment was made from calf skin (Sigma, USA). CaCl_2 (Fluka) and K_2HPO_4 (Fisher Scientific, UK) were used as the precursors of calcium and phosphate, respectively. During preparation, the pH of the mixture was maintained at 9 by adding NH_4OH solution (J.T. Baker, USA). All chemicals were of analytical grade and used without further purification. The water used throughout this work was 3A de-ionized water. For the experiments on the drug loading and drug release, Vancomycin (VCM) (Fluka, Biochemika) was used as a model antibiotic drug. The procedure used to obtain the HApCol composite, drug loading, and biocompatibility test are illustrated in Fig 1.

2.1 Composite preparation

During the formation of the HApCol composites, collagen acts as an organic template for the nucleation of the apatite crystals. The formation of HAp on the collagen matrix was initiated via a co-precipitation process from solution. The HApCol growth occurred through self-organization between ions on collagen, COO^- and NH_3^+ , and those on the hydroxyapatite surface, Ca^{2+} and PO_4^{3-} . HAp crystals align on the collagen template through these electrostatic interactions. Throughout the reaction, pH was controlled by addition of NH_4OH . Firstly, 3 g/L of collagen was dissolved in deionized water and stirred until it was completely dissolved. Next, 10 ml of 0.4 M CaCl_2 aqueous solution is added to the collagen solution, and the mixture was allowed to stand at room temperature for 3 hours. The solution at this stage is called as Col-Ca. Next, 10 ml of 0.24 M K_2HPO_4 aqueous solution is slowly dropped into the Col-Ca solution (the ratio of Ca/P is 1.67). The mixture was continuously stirred for several minutes, and kept at pH ~ 9 throughout the reaction by adding NH_4OH . At this point, a white precipitate formed. The precipitate was continuously stirred for an hour, and then washed with de-ionized water until the supernatant reached pH ~ 7 . The sample was then freeze-dried.

2.2 Characterizations

The crystal structure of the composite powders is determined by powder x-ray diffraction (XRD) (Bruker diffractometer, Model D8 Advance) using the $\text{CuK}\alpha_1$ radiation operating at 40kV and 40 mA. Powder XRD patterns were scanned over the range $2\theta = 20^\circ$ to 60° at a scanning speed of 1 step per second with step increments of 0.037° . IR spectra were measured on a Fourier transform infra-red (FT-IR) spectrophotometer (Spectrum GX, Perkin Elmer) which performed 16 scans over the range $370\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$. A scanning electron microscope (SEM) (JEOL model JSM-6301F) is used to observe the changes in size and morphology of the composite before and after bioactivity test and after drug-loading. An accelerating voltage of 15 kV is used to obtain the SEM images. Particle size distribution measurement of HApCol was measured by Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). The nucleation of apatite crystals after the SBF treatment is analyzed by energy dispersive spectroscopy (EDS) (ISIS 300 (Oxford)). The nanoparticles are also examined by a transmission electron microscope (TEM) (JEOL model JEM-2010). The electron diffraction attachment to the TEM is used to obtain electron diffraction patterns of HApCol composite.

2.3 In vitro biomineralization

The bioactivity of the HApCol composite, was assessed using simulated body fluid (SBF). The biomaterial pellets are soaked in a simulated body fluid (SBF), a fluid with ionic compositions identical to that of human plasma [45, 46]. SBF was prepared using NaCl (136.8 mM), NaHCO_3 (4.2 mM), KCl (3.0 mM), K_2HPO_4 (1.0 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.5 mM), CaCl_2 (2.5 mM) and NaSO_4 (0.5 mM). The solution was mixed to obtain a pH of ~ 7.4 as in human plasma. *In vitro* tests were conducted by immersing pellet samples in 50 ml of SBF sample SBF for one week at 37°C in a static state. The SBF was replaced every three days to avoid any changes in the cationic concentration that may occur due to the resorption of the composite. Subsequently, the HApCol pellet is washed with de-ionized water before further characterization.

2.4 Drug loading and release kinetics

Incorporation of vancomycin (VCM) within HApCol composite was carried out by soaking the composite powder in an aqueous solution of VCM using the ratio of 50mg/ml of VCM solution to 100 mg of the composite. The mixture was stirred and then incubated at room temperature overnight. Centrifugation was carried out to remove excess antibiotics, and water was removed by freeze-drying. At this point, the sample is called VCM-loaded HApCol. The release kinetics of VCM from the HApCol matrix was investigated; the VCM-loaded HApCol was placed in 15 ml of phosphate buffers (PBS), having pH = 4.0, 6.5 and 7.4, (Fisher Scientific, UK). The release experiments were carried out in a shaking bath (SKAKER, Sk-300) at 37°C . The VCM-loaded HApCol were kept in the PBS buffers for 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, and 30 hours.

At the end of each designated time, the centrifugation was performed to obtain a clear supernatant for further analysis. The amount of VCM released from the HApCol was obtained by measuring the absorbance of supernatant at 280 nm on a UV-Vis spectrophotometer (Jenway, model 6405). After each measurement, the supernatant is returned to the system assuming that the measuring time is negligible for the release kinetic study. The VCM content in the supernatant is determined by using a calibration curve representing the relationship between the concentration of VCM and absorbance; $C_i = 0.1042A_i + 0.00018$; $R^2 = 0.9907$, where C_i is the concentration of VCM and A_i is the UV-Vis. absorbance measured at 280 nm. To additionally examine the pH dependence of the release kinetics of VCM from the HApCol, the pH of VCM aqueous solution was adjusted from 7.4 to 6.5 by adding dilute acetic acid solution after 5 hours of a release experiment, and the amount of released VCM from HApCol was determined in function of time.

2.5 Biological test

Rat osteoblast-like UMR-106 cells [American Type Culture Collection (ATCC) No. CRL-1661] were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Pasching, Austria) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cells were propagated in a 75-cm² T-flask (Corning, NY, USA) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C and sub cultured as described in the ATCC protocol. Confluent UMR-106 cells were used for the experiment by seeding cells at 1×10^6 cells/petri dish into 100-mm petri dish where a circular glass (diameter ~1.3 cm) and a VCM-loaded HApCol disc (diameter ~1.3 cm) were placed therein. The above systems were incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Culture medium was replaced every 3 days. At day 14th after seeding, glass and VCM-loaded HApCol discs were examined for cell attachment and mineralization by scanning electron microscopy (SEM). The glass and VCM-loaded HApCol disc were quickly rinsed in cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) twice, and then the cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA, USA) in 0.1 M phosphate buffer for 3 hours. The fixative was removed and cells were rinsed in 0.1M phosphate buffer and distilled water, respectively. Thereafter, the glass and HApCSi20 discs were dehydrated in a graded series of ethanol solution (50%, 70%, 80%, 90% and absolute ethanol). The glass and VCM-loaded HApCol disc were desiccated under vacuum and were coated by copper before examining the cell morphology, cell adhesion and cell proliferation by SEM.

3. Results and discussion

Powder X-ray diffraction pattern of the HApCol composite in Fig. 3(b) shows broad peaks over the 2θ range of 30-35°, which corresponding to HAp implying a poorly

crystallized HAp phase. This is consistent with what happens during the initial stage of bone formation. At the first stage of crystallization, amorphous phases of the calcium salt $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and others [1, 2, 12] were found instead of hydroxyapatite. Through a process of substitution and addition of atoms or reabsorption and re-precipitation over a period of weeks or months, these compounds are further developed and formed into hydroxyapatite crystalline phase. The broad peak from XRD diffraction data can be used to estimate the crystal size in a direction perpendicular to the crystallographic plane based on Scherer's formula, $d = k\lambda/\beta \cos\theta$ [29], where d is the average crystallite size, λ is the wavelength of X-ray radiation (0.154056 nm), k is a constant related to the crystal shape and is approximately equal to unity. β is the full width of the peak at half of the maximum intensity (rad) and θ is the Bragg' angle. The average size of HAp crystal is calculated using the (002) reflection peak ($2\theta=26^\circ$). The sample after soaking in SBF shows a nanosize structure of 36 nm. In addition, XRD peaks over the 2θ range of $30\text{--}35^\circ$, which generally contain principal feature of HAp, are fairly weak and, instead, the intense peaks are at $2\theta = 26^\circ$ and 39° , most likely due to the preferred orientation of HAp crystals on the collagen matrix. Pure collagen does not give significant reflection except broad feature at $2\theta \sim 10\text{--}20^\circ$, indicating an amorphous phase.

SEM images in Fig 2(a) and 2(b) reveal that some crystals deposited onto the collagen template, which formed the void space in the HApCol composite. The precipitated nanocrystals tend to agglomerate and form globular-like structure (Fig 2(b)) with micro pores in between. The composite's surface looks like a sphere with big cavities in which the HAp crystals have embedded in the collagen matrix and there are pores between each globular particle. The pore size in biocomposite scaffolds plays significant role to the suitability of the composite for being used in each application. In general, large pore size and high porosity of scaffolds are required for effective nutrient supply, gas diffusion, and metabolic waste removal. Previous reports show that $1\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$ pores are needed for vascularization ingrowths while $100\text{--}300\text{ }\mu\text{m}$ pore size are needed for bone regeneration [19-21, 51,52]. In this work, the HApCol composite has a pore size in the range of $2\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$. The narrower pore sizes formed due to the precipitation of the HAp nanocrystals on the collagen template. HAp nanocrystals deposited on the collagen scaffold and fill some of the voids leading to a decrease in the pore size of the composite. The distribution in sizes of the HApCol particulates is shown in Fig 2(c). The majority of the HApCol composite are particulates with diameters ranging between $400\text{--}1200\text{ nm}$. TEM results and electron diffraction patterns of the specimen are shown in Fig 2 (d, e). From the result, the HAp nanocrystals have particles size ranging from $50\text{--}100\text{ nm}$ in length and $10\text{--}20\text{ nm}$ in width, similar to those found in bones [47-50]. All hydroxyapatite crystals have the same basic shape, i.e., thin, elongated, but irregularly shape like platelets. The electron diffraction pattern (Fig 2e) exhibits the number of rings indicating a typical feature of poorly crystallized sample, in good agreement with broad signals in powder XRD profile.

. *In vitro* bioactivity test of the HApCol composite was conducted by immersing the pellet of HApCol composite in SBF for seven days. Although the crystalline phase of HAp was observed in Fig. 3(a), the diffraction peaks are fairly broad compared to those reported in the literature [23, 26-31]. This broad pattern derived from the formation of an extra HAp crystalline phase deposited on the composite surface. The broad diffraction peaks may indicate that either the deposited phase does not crystallize perfectly or that the crystals are very small. Note that the XRD pattern of SBF soaked HApCol composite give a typical feature of hydroxyapatite crystalline phase. This is because additional hydroxyapatite crystals formed on the surfaces of composite HApCol, as observed in an SEM image (Fig. 4(b)). The SEM images in Fig 4(a)-(b) reveals irregular pores of the as-prepared HApCol, and the nucleation of agglomerated particles on the ColHAp surface after soaking in the SBF solution for seven days, respectively. Figure 4(b) shows the composite's surface covering with crystal aggregates of about 10 μm in diameter. The EDS results in Fig. 4(c)-(d) have confirmed the containing of both calcium and phosphorus ions embedded in the Col matrix and in the additional deposited particles. As results, the Ca/P weight ratio (Table 1.) at the HApCol surface is 1.71, whereas that at the additional aggregated on the composition surface is 1.62. The ratios of Ca/P are fairly close to that of the stoichiometric apatite reported in literatures [1, 2, 26]. This experiment also show that the HApCol sample is bioactive as bone can grow on its surface, which is important for their use as bone replacement material in biomedical applications.

Chemical functional groups of the HApCol composite and chemical interactions between the organic and inorganic components were examined by IR spectroscopy. IR spectra of collagen and the HApCol composite are shown in Fig. 3(c) and 3(d), respectively. Pure collagen has characteristic bands at about 900 cm^{-1} corresponding to the bending vibration mode of the C-H groups. The absorption peaks detected at around 1685 cm^{-1} and 1510 cm^{-1} are typical of amide I (C=O bond) and amide II (C-H bond) bands [29-31, 48, 49], respectively. The intensity of the amide I peak is higher than that of the amide II peak. This might mean that the negatively charged carboxylic groups (COO^-) of the collagen initiates the HAp nucleation. This could also be evidence that the HAp crystals grew within the collagen matrix. This phenomenon resembles the bionic growth of HAP crystals in natural bone during the biomineralization [23, 48, 49]. The intense bands at 1088 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} and 961 cm^{-1} in the FT-IR spectra of the HApCol composite correspond to the PO_4^{3-} stretching modes, while the doublets at 602 cm^{-1} and 562 cm^{-1} correspond to the PO_4^{3-} bending mode [2, 29, 30]. By carefully comparing the above IR spectrum with those reported earlier [2,30], one can conclude that the shoulder signals around 1450 cm^{-1} and 1240 cm^{-1} and the doublet peaks around 873 cm^{-1} are characteristics of carbonated ions substituted on the phosphate site in an apatitic structure, so called B-type apatite. Comparison of both spectra (Fig 3) indicates a decrease in intensity of absorption peaks corresponding to collagen, which possibly

implied the reduction of active functional groups on the collagen after they interacted with the apatite. Next, the absorption peaks corresponding to Ca^{2+} , COO^- , PO_4^{3-} , and NH_3^+ are focused as they could imply some interactions between those functional groups during the formation of HApCol composite. The asymmetric stretching vibration of a dissociated carboxyl group, $-\text{COO}^-$, observed at 1685 cm^{-1} for pure collagen (Fig 3(ii)), shifts to lower wave number (1653 cm^{-1}) in the HApCol composite. This red shift indicates that the interactions between two equivalent C-O bonds in $-\text{COO}^-$ are weakened because of the formation of a new chemical bond between Ca^{2+} ions on the HAp surface and $-\text{COO}^-$ on collagen [24, 25, 30]. As results, it could be concluded that the nucleation of HAp crystals within the collagen matrix is critically dependent on the charged functional groups at the collagen surface. This synthetic route is subsequently called as self organization process.

Schematic diagram of the incorporation of VCM in the HApCol composite and the chemical structure of VCM are shown in Fig 5(a). VCM contains one carboxyl group (COO^-) which can chelate with calcium ions (Ca^{2+}) of HApCol composite, which may lead to a relatively slow release of VCM from the HApCol matrix. However, VCM is a large molecule and chemical steric forces might be a limiting factor for incorporation of VCM in a biomaterial matrix. The morphology of vancomycin loaded composite is shown in Fig. 5(b). The presence of a gel-like film of VCM film was observed on the composite surface probably due to the presence of excess VCM (as indicated by a white arrow). Figure 5(b) revealed that the surface of composite is completely covered with a VCM later. This is a strong indication that VCM is well-incorporated within pores of the composite. In addition, the deep pockets between each globular particle that were seen in Fig. 2(b) have become groove-like feature after drug loading. Instead of a porous surface structure, the surface appears to be much smoother in Fig. 5(b). As results, one might suggest that this composite has a high capacity for drug delivery applications. IR spectrum in Fig. 5(c) represents absorption bands at 1449 , 1470 , 1494 , and 1639 cm^{-1} corresponding to the C-C bond of pure VCM, in agreement with previous report [42]. VCM loaded HApCol gives an IR spectrum as shown in Fig. 5(d), which is very similar to that of pure VCM as shown in Fig. 3(d). As a result, it maybe concluded that the incorporation of the VCM drug into the HApCol composite does not result in any new chemical interactions.

The amount of the drug being loaded in the HApCol nanoparticles is determined, and the VCM loading efficiency is calculated as follows:

$$\text{VCM-loading efficiency (\%)} = \frac{100(W_{\text{feed_VCM}} - W_{\text{free_VCM}})}{W_{\text{feed_VCM}}} \quad (1)$$

In this formula, $W_{\text{feed_VCM}}$ represent the VCM content initially prepared for drug loading experiment. The free VCM weight ($W_{\text{free_VCM}}$) in the supernatant after centrifugation was determined by Beer- Lambert's law [53], $A = \epsilon cl$, where A is the absorbance, ϵ is the

molar absorptivity, c is the VCM concentration and l is the path length of the quartz cell (1cm). The VCM loading efficiency estimated from an equation (1) is 77.82% ($W_{\text{feed-VCM}} = 60$ mg). The high VCM loading efficiency arises from the high porosity of the HApCol composite.

Release kinetics of VCM from the HApCol composite was examined at varying pH, using phosphate buffer solution (pH = 4.0, 6.5 and 7.4). The release behavior of VCM from the HApCol composite is described by a plot of the cumulative amount of drug released into the buffer solution *versus* time as shown in Fig 6(a). The release study has been carried out continuously over the period of 30 hours. Figure 6(a) reveals that the release kinetics of VCM from the HApCol structure is critically dependent on pH. Nevertheless, it should be pointed out that, during the first five hours of the release experiments, steep slopes are observed for each controlled pH experiment. The steeper slopes imply the faster initial release of VCM from the HApCol within five hours. The initial slopes of the VCM cumulative release are quantified in the order pH 4.0 > pH 6.5 > pH 7.4. At pH 6.5 and pH 7.4, strong initial burst gives rise to the complete release after only five and ten hours, respectively. These results indicated that all loaded VCM easily leached out from the ColHAp composite within the initial burst step, which is unlikely to happen in the case of microporous materials. Nevertheless, it is well known that both collagen and hydroxyapatite partly dissolve upon exposure to an acidic condition. Therefore, the strong bursting effect of the VCM release at acidic condition should be a result of degradation of HApCol structure. Consequently, the initial burst occurs mildly at a physiological condition, pH 7.4, due to the high stability of the composite structure. In general, microporosity of biomaterials retards diffusion of drug. At pH 7.4, the release of VCM is relatively slow, with an initial burst, where less than 50% of the drug loading was released within 1-5 hours. Importantly, the release profile shows 80% accumulative release for pH 7.4 after 25 hours; while only 2-3 hours is required to reach 80% accumulative release for pH 6.5 and 4.0. Three release steps can be observed for the leaching of VCM from HApCol at a pH = 7.4. Fast release occurs during the first five hours (47%), followed by a slow release after 5-10 hours (8%), and a second rapid release after 10 hours (17%). To investigate pH-dependence of the release kinetics of VCM from HApCol matrix (Fig 7), the VCM-loaded composite was initially immersed in a (non-buffered) solution pH 7.4 for five hours, and, thereafter, the pH was adjusted by adding weak acid to obtain pH 6.5. The plot of cumulative release versus time displays a higher derivative (slope) at pH 6.5 interval than that at pH 7.4, reflecting different dissolution kinetics of VCM from the HAPCol matrix. From these observations, it is apparent that the behavior of the drug release from the composite material is sensitive to the pH. At pH 7.4, the hydroxyapatite remains stable but the collagen however begins to swell and degrade after being immersed for a long time. The swelling of the collagen in HApCol composite is due to the carboxyl groups becoming progressively ionized. As the electrostatic repulsion between the ionized groups [37]

becomes larger, the swelling increases. The increase in the release of the drug after ten hour is due to this swelling. When the pH is decreased to 6.5, the dissolution of the HApCol composite begins. Schematic models of pH dependence of the structure of HApCol are given in Fig. 6(b). The models indicate that HApCol is feasibly dissolved in acidic media. Dissolution of HApCol composite plays an important role in drug release. Complete drug release occur rapidly in the order of pH 4.0 > pH 6.5 > pH 7.4. The complete release of VCM from HApCol at pH 7.4 took longer time to reach, approximately twice that at pH 4.0.

Furthermore, SEM and TEM experiments were carried out to clarify the structure stability of the drug-loaded HApCol composite after being exposure under different pH environments for three hours. Figure 9(a) is the microstructure of the acid treated VCM-loaded HApCol composite representing mainly HAp nanocrystal, and a significant loss of the collagen matrix, which supposed to keep the nanocrystals intact as composite. Therefore, this is major evidence suggesting the dissolution of HApCol in acidic environment, which resulted in the high initial burst of drug release. Note that the apparent dark shades in TEM results, in Fig. 9(b)-(c), represent the swelling of collagen matrix. As clearly seen in Fig. 5(b), the surface of VCM-loaded HApCol composite is well covered by the drug (white part). Comparison the SEM image in Fig. 5(b) and those in Fig. 9 (b)-(f) clearly suggests the amount of the drug still remained on the surface in the order of pH 7.4 > pH 6.5 > pH 4.0. The pH dependent stability models of the HApCol composite is described in Scheme 6(b). Thus, the drug component was also washed out under exposure an acid condition.

Mathematical description of drug delivery kinetics can be described using Peppas model [54]:

$$\frac{M_t}{M_0} = kt^n \quad (2)$$

where M_t and M_0 are the concentration of drug released into a medium up to time t and the initial concentration of drug on the particles. M_t/M_0 is the fractional concentration of released drug which is proportional to the release constant k (h^{-1}), indicating the release rate. Time (t) is powered to a release exponent; n . This equation allows release mechanism to be characterized. The Peppas's model is suitable model for describing water-soluble drug release from polymeric matrices and could be applied to porous ceramic materials where mechanism is not entirely known. This model is appropriate to explain the release kinetics of the systems, in which drug dissolution occurs rapidly, in comparing to drug diffusion. Focusing on the release from the HApCol composite in the initial burst (first-five hours), the Peppas's model in equation (2) was used to analyze the drug release and showed excellent fit with R^2 equal to 0.999, 0.998 and 0.990 for pH 4.0, 6.5 and 7.4, respectively. Table 2, shows the experimental fitting data from Fig 10. These results were used to calculate the value of n which was found to be 0.53, 0.54, and 0.58 for pH=4.0, 6.5 and 7.4, respectively. The release exponential n depends on the transport

mechanism and the geometry of the carrier. The value of n being between 0.5 to 1 means that the transport process is anomalous transport corresponding to Case III and the structural relaxation is comparable to diffusion [54, 55]. More importantly, the release rates are quantified in the order $k_{\text{pH}=4.0} > k_{\text{pH}=6.5} > k_{\text{pH}=7.4}$, as reported in Table 2. These calculated rate constants are consistent with the experimental results discussed earlier.

Next, to emphasize that the drug-loaded HApCol will be accepted in human body as well as the composite, the bioactivity test should be carried out for the drug-loaded material. Cell attachment and proliferation experiments were investigated to observe possible growth of rat osteoblast-cells on the VCM-loaded HApCol substrate, comparing with glass substrate (See Fig 8). Notably, the density of bone cells proliferated on both glass and substrate was quite high after 14 days. The presence of filopodia gives strong evidence showing that the cells are well attached with the VCM-loaded HApCol substrate, and hence, this implies the bioactivity of VCM-loaded HApCol. Multiple filopodia extended from the cell surface to the substrate and neighboring cells.

5. Conclusion

In this work, the HApCol bone-like composite was synthesized via self organization through electrostatic interactions among positively and negatively charged functional groups on both HAp and Col components. Antibiotics (VCM) loaded HApCol composite was also prepared for drug release investigation. Drug release behaviors are critically depending upon the pH of medium. The high release rate of the large volume of VCM released from the HApCol composite suggests that the undesirable burst effect will occur when the composite is placed next to defective cells (*i.e.* cancer cells). The higher rate of release in acidic environment results from abrupt morphological changes caused by the dissolution of HApCol composite. Assays in SBF and cell attachment have confirmed the bioactivity of HApCol composite and VCM-loaded HApCol composites, respectively. The results in this work suggest that the biocomposite material prepared here holds promise as candidate for drug delivery. Incorporation of antibiotics in the implants will aid recovery, but anticipation and careful adjustment of drug dosage is needed as the initial burst and overdose may harm patients who have other complications.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (Grant #TRG5280021), Thailand Center of Excellence in Physics (ThEP), and the Commission on Higher education. Instrumentals were supported by Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Mahidol University. SEM measurements were made with the assistance of Jirawadee Thanatnit, Center of Nano-imaging (CNI), Faculty of Science, Mahidol University.

References

- [1] Sergey VD, Matthias E. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002;41(17):3130-3146.
- [2] Prashant N.K, Charles S, Dong-Hyun L, Dana O, Daiwon C. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomater.* 2005;1:65-83.
- [3] Matthew JO, Xingguo C, Sang SJ, Rajendra K, Yi-Yeoun K, Michael JK, Elliot PD, Laurie BG. Bone structure and formation: A new perspective. *Mat. Sci. Eng. R.* 2007;58:77-116.
- [4] Fu-Zhai C, Yan L, Jun G. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Mat. Sci. Eng. R.* 2007;57:1-27.
- [5] Barrère F, Mahmood TA, de Groot K, van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Mat. Sci. Eng. R.* 2008; 59:38-71.
- [6] Yurong C, Ruikang T. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. *J. Mater. Chem.* 2008; 18: 3775-3787.
- [7] Christopher F, Donggang Y, Ardit K, Adrian V, Samina I, Tlormoz S, David MS, Miguelangelo PC, Grasul C. Chondrogenic derivatives of embryonic stem cells seeded into 3D polycaprolactone scaffolds generated cartilage tissue in vivo. *Tissue. Eng. A.* 2008; 14(8): 1403-1413.
- [8] Wan-Ju L, Yi JJ, Rocky ST. Cell-nanofiber-based cartilage tissue engineering using improved cell seeding, growth factor, and bioreactor technologies. *Tissue. Eng. A.* 2008; 14(5): 639-648.
- [9] Jayarama RV, Sharon L, Aw TC, A. Bharath K, Seeram R. Nanobioengineered electronspun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration. *Artif. Organs.* 2008; 32(5): 388-397.
- [10] Thanaphum O, Michael LL, Rupak MR, Buddy DR, Martha JS, Cecilia MG. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29:4091-4099.
- [11] Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-Hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur. Cell. Mater.* 2006; 11: 43-56.
- [12] Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A cellular and Molecular Approach.* 1st ed. Philadelphia. Saunders. 2003. 1088.
- [13] Michael AR, Thomas AW, Volker S, Elvira D, Ludwig Z, Reinhard S, Volker A. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials.* 2005; 26:2677-2684.
- [14] Cosijns A, Vervaet C, Luyten J, Mullens S, Siepmann F, Van Hoorebeke L, Masschaele B, Cnudde V, Remon J.P. Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007;67: 498-506.

- [15] Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler JM. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin. *Biomaterials*. 2003;24:1265–1270.
- [16] Dana O, Jinhua L, Mary EW, Todd R, John C, Leaf H, Prashant NK, Charles S. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007;28:1267–1279.
- [17] Takayoshi H, Tomohiro K, Kohsuke M, Takato M, Tomoo M, Kohki E, Kiyotomi K. Magnetically recoverable heterogeneous catalyst: Palladium nanocluster supported on hydroxyapatite-encapsulated γ -Fe₂O₃ nanocrystallites for highly efficient dehalogenation with molecular hydrogen. *Green Chem*. 2007;9:1246–1251.
- [18] Bin W, Jing-Jing Z, Zhuang-Ying P, Xu-Quan T, Huai-Sheng W. A novel hydrogen peroxide sensor based on the direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on silica–hydroxyapatite hybrid film. *Biosens. Bioelectron*. 2009;24:1141–1145.
- [19] Christopher F, Donggang Y, Ardit K, Adrian V, Samina I, Hormoz S, David MS, Miguelangelo PC, Rasul CG. Chondrogenic Derivatives of Embryonic Stem Cells Seeded into 3D Polycaprolactone Scaffolds Generated Cartilage Tissue *In Vivo*. *Tissue. Eng. A*. 2008;14(8):1403–1413.
- [20] Wan-Ju L, Richard T, Chukwuka O, Assia D, Keith GD, David JH, Rocky ST. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2005; 26: 599–609.
- [21] Wan-Ju L, Yi JJ, Rocky ST. Cell–Nanofiber-Based Cartilage Tissue Engineering Using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies. *Tissue. Eng. A*. 2008;14(5):639–648.
- [22] Grace EP, Megan AP, Kinam P, Thomas JW. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26:3075–3082.
- [23] Cui FZ, Wang Y, Cai Q, Zhang W. Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate. *J. Mater. Chem*. 2008;18:3835–3840.
- [24] Masanori K, Toshiyuki I, Soichiro I, Hiroko NM, Yoshihisa K, Kazuo T, Kenichi S, Junzo T. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Compos. Sci. Technol*. 2004;64:819–825.
- [25] Masanori K, Soichiro I, Shizuko I, Kenichi S, Junzo T. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 2001;22:1705–1711.

- [26] David L, John AMR, Jerome AW, Veronica G, Rolfe HC. Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004;68A:19-27.
- [27] Du C, Cui FZ, Zhang W, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000;50:518-527.
- [28] Pek YS., Shujun G, Mohamed Arshad MS, Kwong-Joo L, Jackie YY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials.* 2008;29:4300-4305.
- [29] Murugan R, Ramakrishna S. In situ formation of recombinant humanlike collagen-hydroxyapatite nanohybrid through bionic approach. *Appl. Phys. Lett.* 2006;88:193124.
- [30] Sang-Hoon R, Jae DL, Junzo T. Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen. *J. Am. Ceram. Soc.* 2000;83(11):2890-2892.
- [31] Chao-zong L. Biomimetic synthesis of collagen/nano-hydroxyapatite scaffold for tissue engineering. *J. Bionic. Eng. Suppl.* 2008: 001-008.
- [32] W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke and J.A. Jansen. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2007; 59: 234-248.
- [33] Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J. Control. Release.* 2006;113:102-110.
- [34] María VR, Francisco B, Montserrat C, Miguel M. Drug confinement and delivery in ceramic implants. *Drug. Metab. Lett.* 2007;1:37-40.
- [35] Akihiro S, Masahiro H, Aki F, Atsumasa U. Treatment of Infected Hip Arthroplasty With Antibiotic-Impregnated Calcium Hydroxyapatite. *J. Arthroplasty.* 2008; 23(1): 145-150.
- [36] Madhana S, N. Ramesh B, Sunita PV, K. Ram K, Sampath Kumar TS. Biphasic calcium phosphates for antibiotic release. *Trends. Biomater. Artif. Organs.* 2005;18(2): 213-218.
- [37] Zbigniew R, Wolfgang F. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2003; 55: 1679-1698.
- [38] Arnold JK, Gale S, Shannon R, Regis P, Maurice B, Ann H, Michel GB, Benoit S. Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of gram-positive and gram-negative bacteria. *ACS NANO.* 2008;2(9):1777-1788.
- [39] Dion A, Langman M, Hall G, Filiaggi M. Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. *Biomaterials.* 2005; 26: 7276-7285.
- [40] Uwe G, Elke V, Frank AM, Jake EB. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J. Control. Release.* 2007;122: 173-180.

- [41] Erdal C, Zafer O, Lütfiye M, Demet Ş, Murat A, Ayca Y, Yildiz Ö. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *Inter. J. Pham.* 2006;317:127-135.
- [42] Blanca G, Montserrat C, María VR. Time-Delayed Release of Bioencapsulates: A Novel Controlled Delivery Concept for Bone Implant Technologies. *Chem. Mater.* 2008;20:4826-4834.
- [43] Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 1194–1198.
- [44] Younsoo B, Shigeto F, Atsushi H, Kazunori K. Design of Environment-Sensitive Supramolecular Assemblies for Intracellular Drug Delivery: Polymeric Micelles that are Responsive to Intracellular pH Change. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003;42:4640–4643.
- [45] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials.* 2006;27:2907-2915.
- [46] Oyane A, Kim HM, Furuya T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2003;65:188-195.
- [47] Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J. Struct. Biol.* 2005;149:182-190.
- [48] Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS.* 1986;206(2):262-266.
- [49] Zhai Y, Cui FZ. Recombinant human-like collagen directed growth of hydroxyapatite nanocrystals. *J. Cryst. Growth.* 2006;291:202-206.
- [50] Zhai Y, Cui FZ, Wang Y. Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils. *Curr. Appl. Phys.* 2005;5:429-432.
- [51] Sopyan I, Mel M, Ramesh S, Khalid KA. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Sci. Technol. Adv. Mat.* 2007;8:116-123.
- [52] Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M. *Nat. Biotech.* 2000 ;18 :959-963.
- [53] Garland CW, Nibler JW, Shoemaker DP. *Experimentals in physical chemistry.* 7th ed. New york. McGraw-Hill. 2003. p. 273-279.
- [54] Peppas NA, Paolo C. Analysis of drug release behaviour from swellable polymer carriers using the dimensionality index. *J. Control. Release.* 1997; 45: 35-40.
- [55] Gbureck U, Vorndran E, Barralet JE. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomater.* 2008; 4(5):1480-1486.

Table 1. EDS result of the elements analysis of HApCol composite after soaking for 7 days in SBF solution.

Materials	Weight concentration (%)							Ca/P
	C	O	Mg	P	Cl	K	Ca	
HAP-Col surface	18.36	36.08	0.2	14.75	1.59	0.49	25.2	1.71
Particles on surface	27.71	35.38	0.28	11.47	1.12	0.47	18.53	1.62

Table 2. Release characteristic parameters of VCM from the HApCol composite.

Peppas' model $M_t/M_0=kt^n$					
Release matrix	pH	n	k (h ⁻¹)	R ²	Transport mechanism
HAP-Col	4.0	0.53	53	0.999	Case III
	6.5	0.54	43	0.998	Case III
	7.4	0.58	22	0.989	Case III

Figure Captions

Figure 1. Flow chart for the synthesis of Hydroxyapatite-Collagen (HApCol) nanocomposite particles containing Vancomycin (VCM) drug and cell bioactivity.

Figure 2. SEM micrograph of HApCol for low (a) and high magnification (b) and size distribution of HApCol particles (c). TEM image of the HApCol composite (d) and electron diffraction patterns of HApCol composite (e).

Figure 3. The XRD pattern (i) of hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite before (a), and after soaking in SBF for one week (b). ●=hydroxyapatite phase. (ii) FT-IR spectrum of collagen fibrils and hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite.

Figure 4. SEM micrograph of HApCol pellet before (a) and after soaking in SBF for one week (b). EDS analysis of the sample at the HApCol surface (c) and at the particle on surface (d).

Figure 5. Model of hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite with vancomycin (VCM) drug (a), molecular structure of VCM containing one carboxyl group (COO^-) represented by a dashed circle (b). Scanning electron micrographs (SEM) of aggregated HApCol nanocomposite particles containing VCM drug (c), FT-IR spectrum of VCM and HAP-Col-VCM composite (d).

Figure 6. Cumulative percent of vancomycin (VCM) released versus immersion time for the hydroxyapatite-collagen (HApCol) particles at pH value 4.0, 6.5 and 7.4 (phosphate buffer) and the result expressed as mean $\pm$ SD; n=3 (a) and (b) photograph image of HApCol colloid particles after 3 hours release of VCM and schematic diagram depicting the concept of pH induced changes to HApCol nanocomposite.

Figure 7. pH-controlled release of VCM drug from HApCol pellet (means $\pm$ -standard deviation, n=3).

Figure 8. SEM images of osteoblasts on (a,b) glass, and (c,d) hydroxyapatite-collagen (HApCol) nanocomposite after 14 days of culture. Filopodia and mineralizing nodules are seen.

Figure 9. TEM and SEM images show the morphology of HApCol nanocomposite with VCM drug after immersion for 3 hours. (a, b) pH=4.0, (c, d) pH=6.5, and (e, f) pH=7.4.

Figure 10. Fitting of the early release data to Eqn. (2) of text with the VCM drug release profile from HApCol nanocomposite particles at pH=4.0, 6.5, and 7.4.

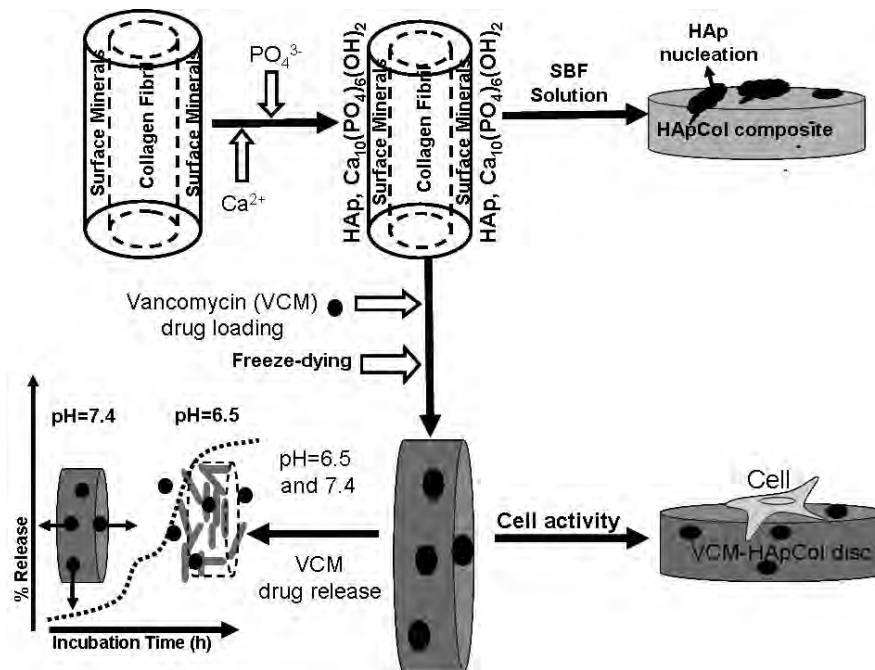


Figure 1.

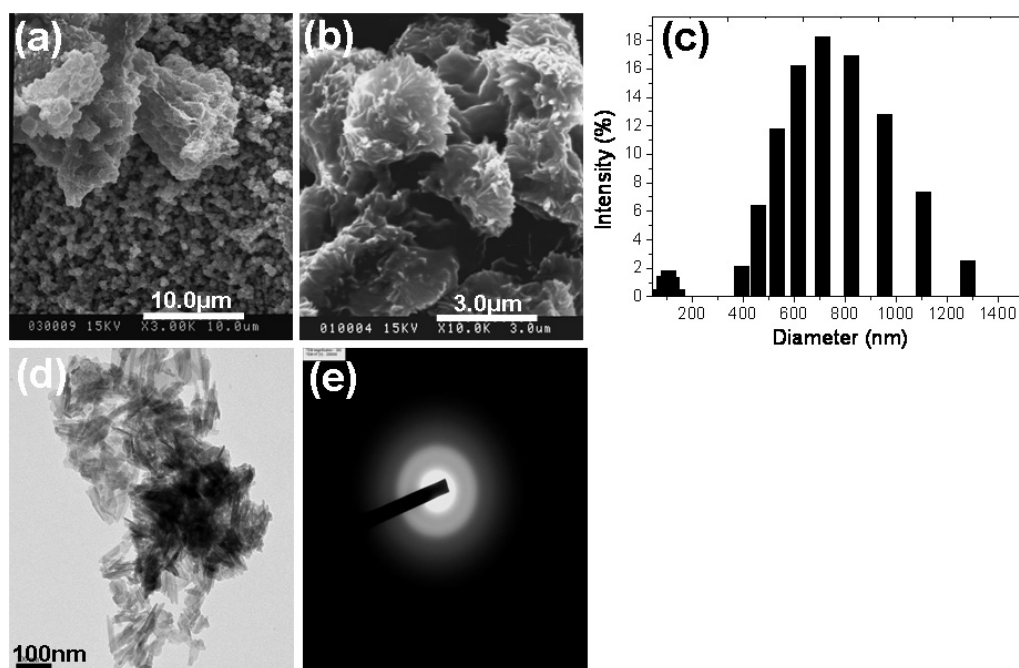


Figure 2.

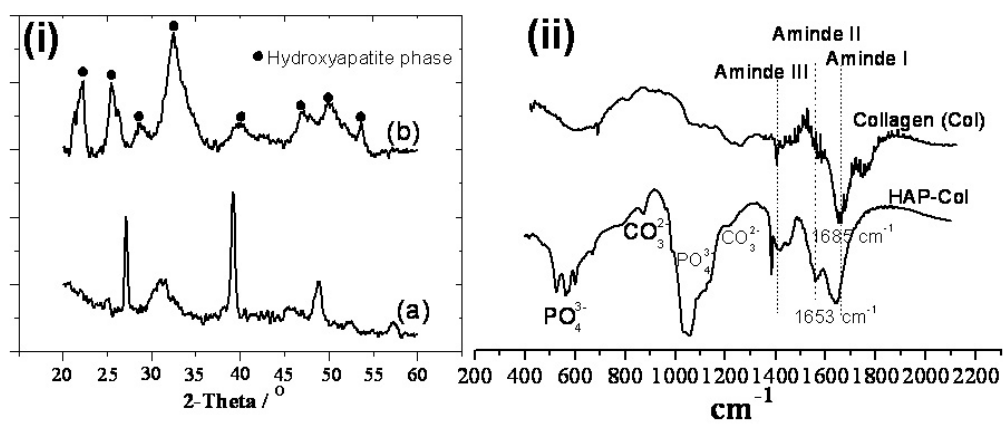


Figure 3.

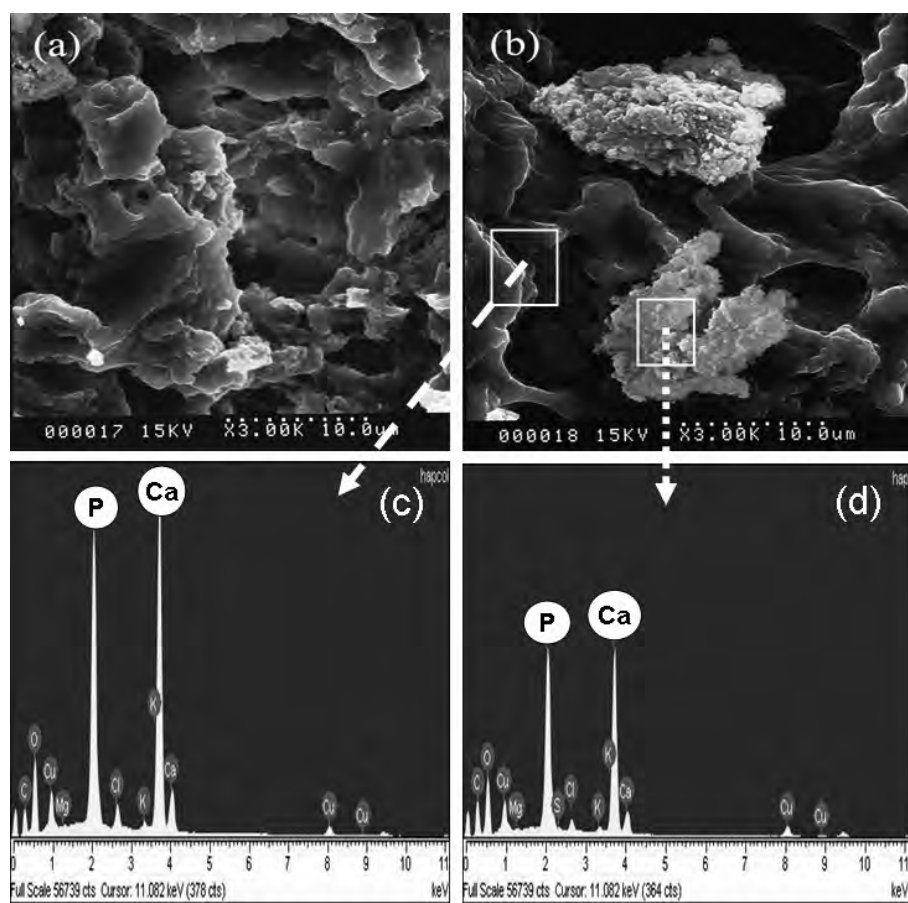


Figure 4.

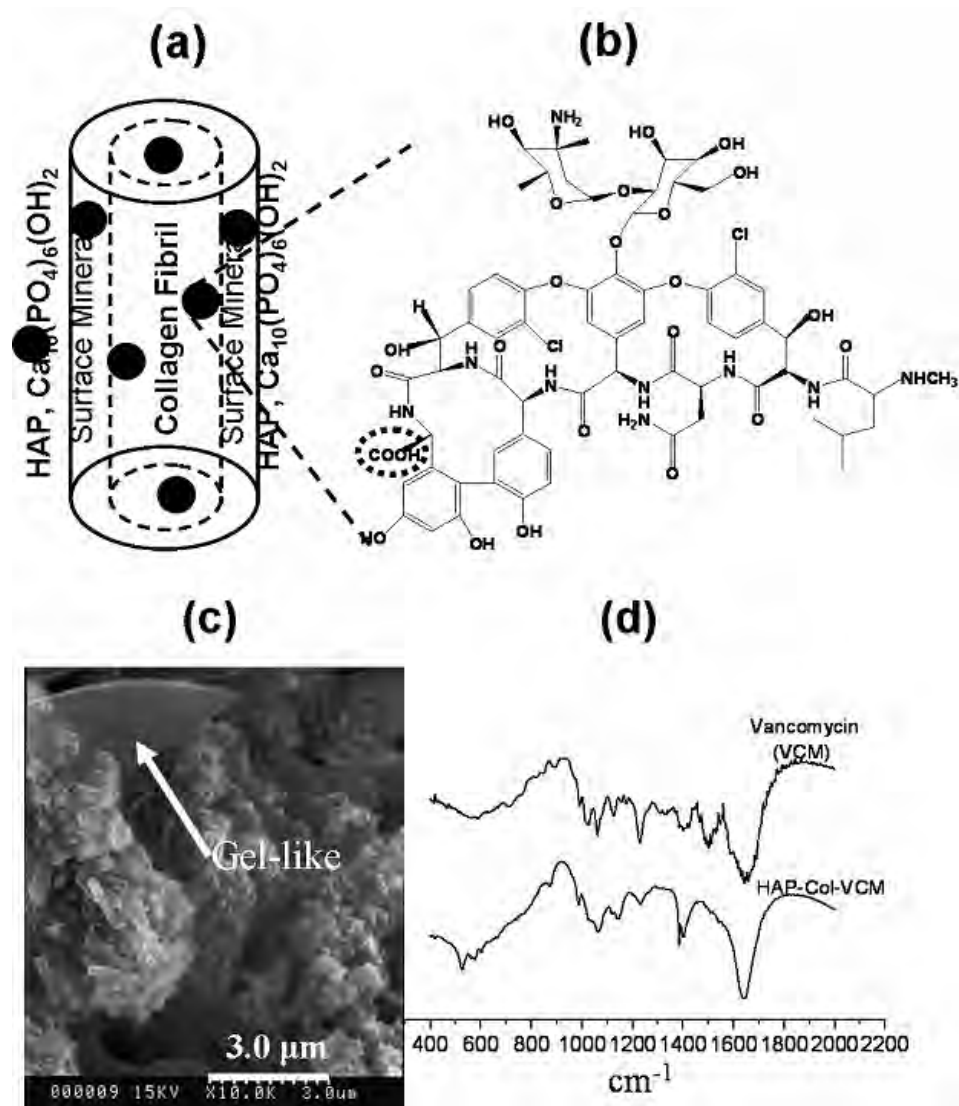
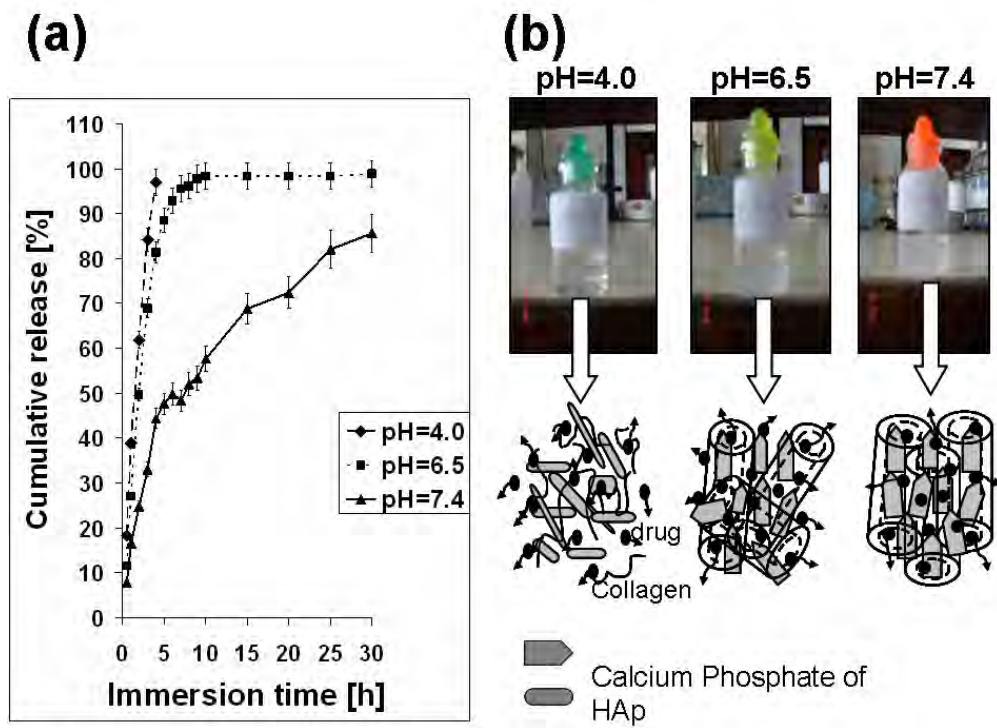


Figure 5.

**Figure 6.**

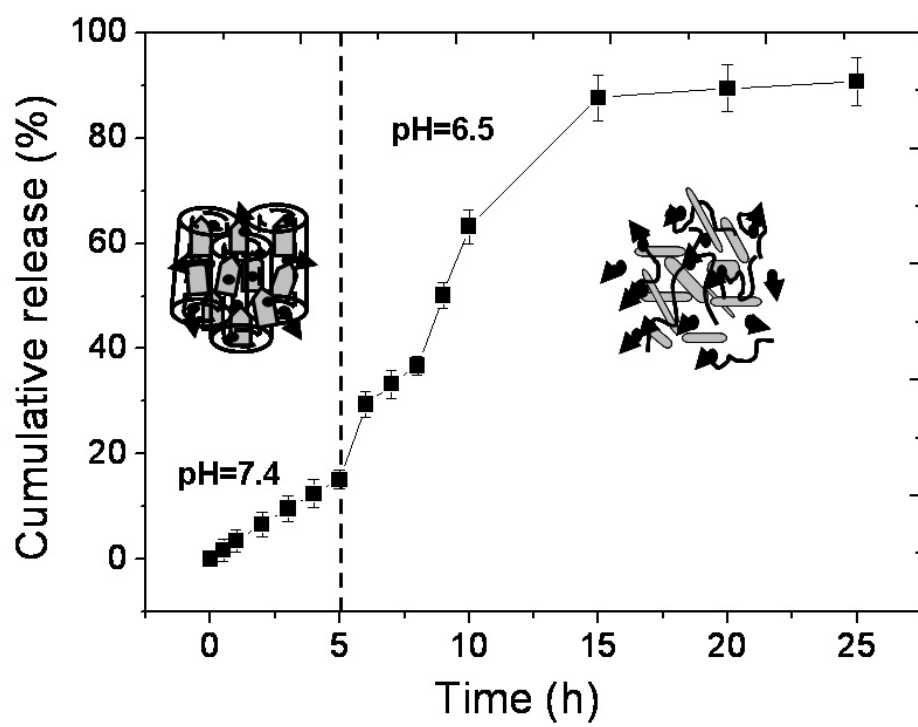


Figure 7.

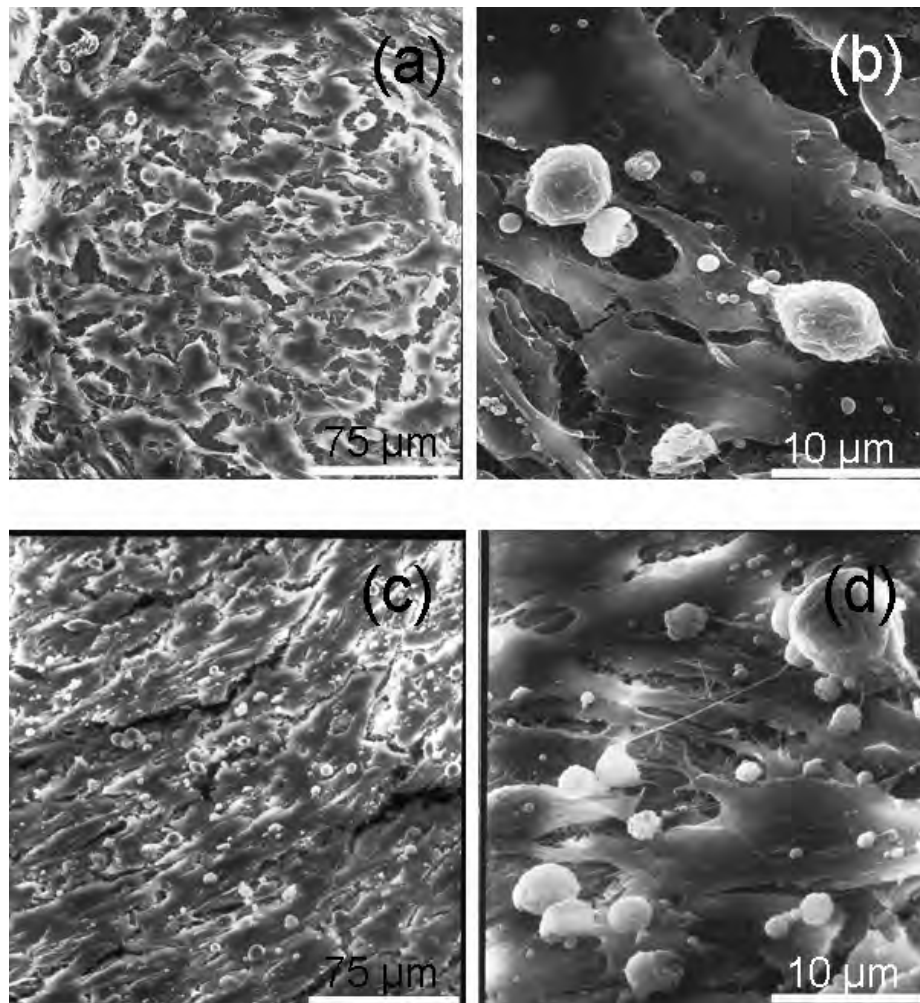


Figure 8.

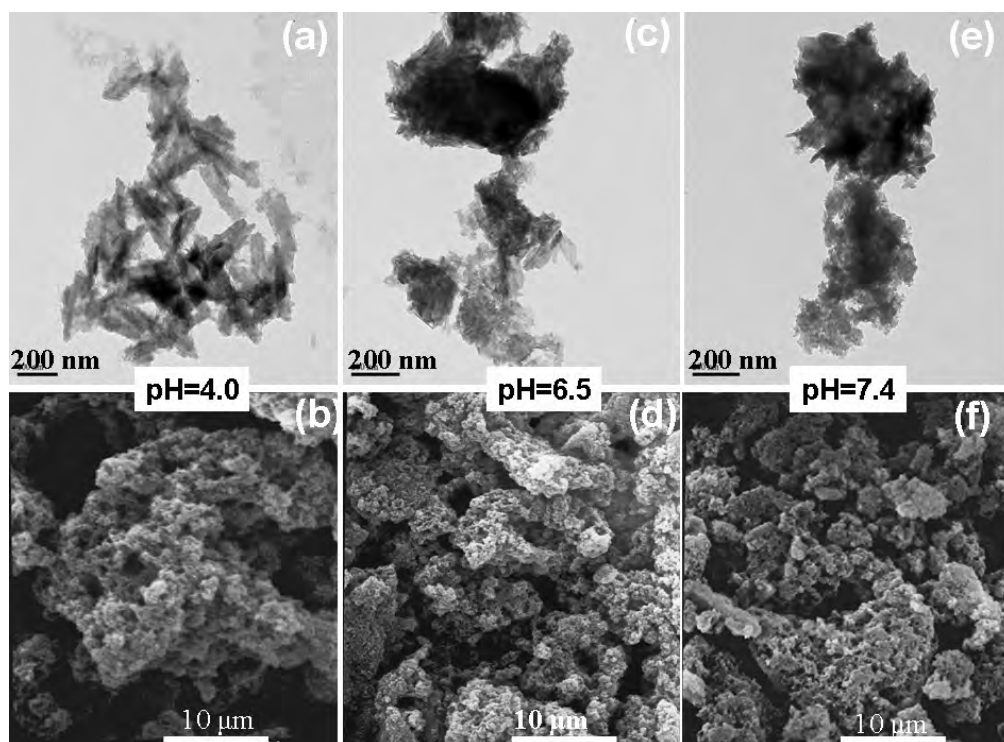


Figure 9.

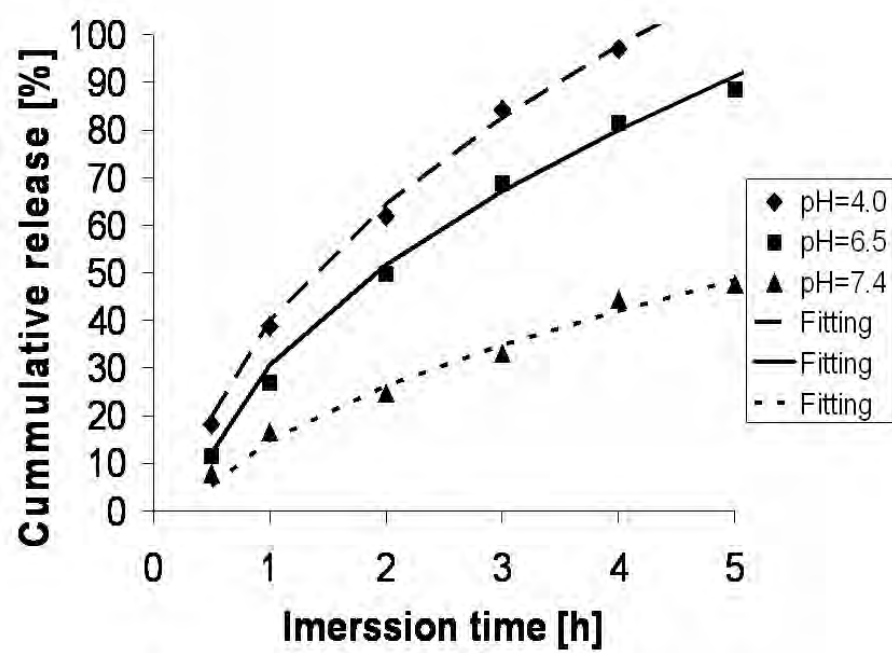


Figure 10.



ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2201-5180 โทรสาร 0-2644-5126

ที่ ศร 0517.095/1517

วันที่ 17 มิถุนายน 2553

เรื่อง ขอเชิญเป็นวิทยากรบรรยายในการประชุมโครงการพัฒนานักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช และ
NRCT-CPS Conference V. Development of Drug Design-based Pharmaceuticals

เรียน ผศ. ดร. ศิวพร มีจุ สมิต
มหาวิทยาลัยมหิดล

- สิ่งที่ส่งมาด้วย
1. ร่างกำหนดการประชุม
 2. แบบฟอร์มใบตอบรับเข้าร่วมประชุม
 3. Template บทคัดย่อ

ตามที่คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ได้ดำริให้มีโครงการพัฒนานักวิจัยไทยทางด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช โดยมีการแบ่งกลุ่มนักวิจัยออกเป็นภาคต่างๆ เพื่อให้มีการดำเนินงานเป็นลักษณะการจัดประชุมเพื่อปรึกษาหารือกันและจัดกิจกรรมทางวิชาการร่วมกันนั้น ในปีงบประมาณ 2553 นี้ คณะกรรมการฯ มีความเห็นชอบให้มีการจัดประชุมทางวิชาการ “โครงการพัฒนานักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช: ภาคกลาง และโครงการพัฒนานักวิจัย 4 ภาค และเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเดินทาง คณะกรรมการฯ มีความเห็นชอบให้มีการจัดประชุมทางวิชาการ NRCT-CPS Conference V. Drug Discovery: Development of Drug Design-based Pharmaceuticals” ขึ้นพร้อมกัน ในวันศุกร์ที่ 3 – วันอาทิตย์ที่ 5 กันยายน 2553 ณ โรงแรมระยอง รีสอร์ท ตำบลเพ อำเภอมะขาม จังหวัดระยอง

คณะกรรมการจัดการประชุม จึงใคร่ขอเรียนเชิญท่านเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง **“Lipid Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Overview ”** ในวันเสาร์ที่ 4 กันยายน 2553 เวลา 10:30 - 11:00 น. ในการประชุมครั้งนี้ ในโอกาสเดียวกันนี้จะได้มีการหารือกำหนดกลยุทธ์ในการพัฒนาการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ตลอดจนรวมกลุ่มกันทำวิจัยระหว่างนักวิจัย 4 ภาค โดยขอความกรุณาให้ท่าน **ส่งบทคัดย่อตามตัวอย่างที่แนบมา และแบบฟอร์มตอบรับการเข้าร่วมประชุม** ส่งมาที่ คุณเยาวรัตน์ เปล่งแสงศรี โทรสารหมายเลข (0) 2644-5126 หรือส่งไฟล์ที่ **email: ying995@hotmail.com** ภายในวันพฤหัสบดีที่ 15 กรกฎาคม 2553 คณะกรรมการจัดการประชุมจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการเดินทาง และค่าใช้จ่ายระหว่างการประชุม โดยคณะกรรมการจัดการประชุมคาดว่าจะสามารถรับผู้เข้าร่วมประชุมได้ไม่เกิน 100 คน

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุเคราะห์ด้วย จักขอบพระคุณยิ่ง

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. มนัส พรหมโคตร)
ประธานคณะกรรมการจัดการประชุม

กำหนดการประชุม
โครงการพัฒนานักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช: ภาคกลาง
และ โครงการพัฒนานักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช 4 ภาค
และ

NRCT-CPS Conference V. Drug Discovery: Development of Drug Design-based Pharmaceuticals

วันศุกร์ที่ 3 - วันอาทิตย์ที่ 5 กันยายน 2553 ณ โรงแรมระยอง รีสอร์ท ตำบลเพ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง

วันพฤหัสบดีที่ 2 กันยายน 2553

13:00 น. ออกเดินทางโดยรถบัส ที่คณะวิทยาศาสตร์ (หน้าตึกเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล

18:00 น. ลงทะเบียน

18:30 น. รับประทานอาหารเย็น

วันศุกร์ที่ 3 กันยายน 2553

ดำเนินรายการโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

ผู้บันทึกการประชุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุตินา คูหากาญจน์ และ ดร. นงนุช สังข์อยู่

08:30-09:30 น. กล่าวรายงาน โดย ศาสตราจารย์ ดร. วิชัย รวีตระกูล

พิธีเปิด โดยประธานกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

โดย ศาสตราจารย์ ดร. มนตรี จุฬาวรรณกุล

09:30-10:20 น. **Nano Science and Nanotechnology and their Applications for Important Chemical Industries in Thailand**

ศาสตราจารย์ ดร. จาริส ลิ้มตระกูล

10:20-10:40 น. อาหารว่าง

ดำเนินรายการโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

ผู้บันทึกการประชุม: ดร. สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา และ ดร. ปาริชาติ นารีบุญ

10:40-11:10 น. **O-01: Nanotechnology for the Development of Pharmaceutical Products**

รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ

11:10-11:40 น. **O-02: Gastroretentive Floating Drug Delivery Systems Based on Gas Formation Technique**

รองศาสตราจารย์ ดร. ศรีสกุล สังข์ทองจีน

11:40-12:10 น. **O-03: Biopolymer as Nano Carriers for Oral Drug Delivery**

รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์

12:10-13:30 น. รับประทานอาหารกลางวัน

ดำเนินรายการโดย รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์

ผู้บันทึกการประชุม: ดร. เสาวนีย์ คำพันธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

13:30-14:00 น. **O-04: Polymer Composite Nanoparticles of 4-CBS Chitosan/PLA as a Controlling Anticancer Drug Delivery System**

รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน

14:00-14:30 น. **O-05: Nanoparticle Formation and Nanoencapsulation by Rapid Expansion of Supercritical Solutions Process**

ดร. อำพร เสน่ห์

14:30-15:00 น. **O-06: Cationic Liposomes: Synthesis and Applications for Drug Delivery**

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

15:00-15:30 น. อาหารว่าง

ดำเนินรายการโดย รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์

ผู้บันทึกการประชุม: ดร. วรากร ลิ้มบุตร และ ดร. อาภรณ์ นุ่มน่วม

15:30-17:30 น.

สรุปภาพรวมโครงการวิจัยแต่ละภาค และ เสนอภาพรวมของโครงการที่ได้รับการสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ

- ภาคกลาง

รองศาสตราจารย์ ดร. อรรพณ ชัยลภากุล (O-07)

- ภาคเหนือ

รองศาสตราจารย์ ดร. จุฑา จักร์มณี

- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

รองศาสตราจารย์ ดร. สมเดช กนกเมธากุล

- ภาคใต้

รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งนภา ศรีชนะ

18:30 น.

รับประทานอาหารเย็น

วันเสาร์ที่ 4 กันยายน 2553

ดำเนินรายการโดย ดร. ชุตินา เจียรพินิจนันท์

ผู้บันทึกการประชุม: ดร. วราวุธ ดิยพงศ์พัฒนา และ ดร. พัทธินทร ชัยสุวรรณ

08:30-09:00 น.

O-08: Recent Advances of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis

รองศาสตราจารย์ ดร. ลีณา สุนทรสุข

09:00-09:30 น.

O-09: Molecular Formula Determination using ESI-qTOF Mass Spectrometry for Natural Product Dereplication

ดร. สุวิชัย จรัสโสมณ

09:30-10:00 น.

O-10: Towards Bioceramic Bone-implants: Incorporation of Iron, and Vancomycin into Hydroxyapatite nanoparticles

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวพร มีจุ สมิต

10:00-10:30 น.

อาหารว่าง

ดำเนินรายการโดย ดร. ชุตินา เจียรพินิจนันท์

ผู้บันทึกการประชุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อทิตยา ศิริภิญโญนันท์ และ ดร. วราภรณ์ ตรีพรหม

10:30-11:00 น.

O-11: Polymeric Drug Delivery Systems for Cancer Chemotherapy

ดร. นรเศรษฐ์ ณ สงขลา

11:00-11:30 น.

O-12: Renal Transporters: Targets of Drug Discovery and Development

ดร. ลัคนาส สุตวิสัย

11:30-12:00 น.

O-13: Enzymatic Approach to the Synthesis and Analysis of Drugs: D-Phenylglycine Aminotransferase as a Paradigm

รองศาสตราจารย์ ดร. อีรศักดิ์ ไรจนธา

12:00 - 13:00 น.

รับประทานอาหารกลางวัน

ดำเนินรายการโดย รองศาสตราจารย์ ดร. สมเดช กนกเมธากุล

ผู้บันทึกการประชุม: ดร. นवलละออ รัตนวิมานวงศ์ และ ดร. กาญจนา อุไรสินธ์

13:00-13:30 น.

O-14: Utilizing Synthetic Multivalent Ligands to Investigate Receptor Signaling

ดร. ชุตินา เจียรพินิจนันท์

13:30-14:00 น.

O-15: Computational Chemistry: Applications to Drug Discovery

รองศาสตราจารย์ ดร. สุภา ทารหนองบัว

14:00–14:30 น.	O-16: Gene Delivery Efficacy of Polyethyleneimine-introduced Chitosan Shell/ Poly(methyl methacrylate) Core Nanoparticles for Rat Mesenchymal Stem Cells <i>ดร. ณัฏฐพร พิมพ์พะ</i>
14:30–15:00 น.	O-17: Amino Acid Transporters: A Novel Target for Anti-cancer Drug Development <i>ดร. อาทิตย์ ไชยร้องเคื้อ</i>
15:00–16:30 น.	การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ และอาหารว่าง
16:30 น.	พักผ่อนตามอัธยาศัย

18:00 น. รับประทานอาหารเย็น

	ดำเนินรายการโดย ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สาทิต พุทธิพิพัฒน์ขจร ผู้บันทึกการประชุม: ดร. ดรณี สุวัชรรัมย์ และ ดร. อริสรา อัสสระชัย
19:00–20:00 น.	เสวนาเรื่อง “การจัดตั้งศูนย์เครื่องมือรวม” และ “การทำวิจัยที่นำไปสู่ความร่วมมือกับภาคอุตสาหกรรม และทำอย่างไรดีกับสิทธิบัตรยาทั้งหมดอายุ”

วันอาทิตย์ที่ 5 กันยายน 2553

	ดำเนินรายการโดย ศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์ ผู้บันทึกการประชุม: ดร. ณัฏฐาณี เขิงขัน และ ดร. วิณา เสียงเพราะ
09:00–11:00 น.	การบรรยายเรื่อง "Value-added Agricultural Products : Palm Oil, Coconut Oil and Rice Bran Oil" โดย คุณมานิตย์ วงษ์สุริย์รัตน์, ดร. ณรงค์ โฉมฉลา และ ดร. ชนาภานต์ พรหมอุทัย
	(อาหารว่างเสรีในห้องประชุม)
	ดำเนินรายการโดย ศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ และ ศ. ดร. มนัส พรหมโคตร ผู้บันทึกการประชุม: ดร. ณัฏฐาณี เขิงขัน และ ดร. วิณา เสียงเพราะ
11:00–12:00 น.	สรุปภาพรวมการประชุม และปิดประชุม

12:00–13:00 น. รับประทานอาหารกลางวัน

13:30 น. เป็นต้นไป	เดินทางกลับโดยสวัสดิภาพ
--------------------	-------------------------