



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☒ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 20/07/2569	เลขที่คำขอ 2603003182
วันยื่นคำขอ	
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ (ระบุในใบต่อแนบท้ายเพิ่มเติม)

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☒ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ
ชื่อ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ที่อยู่ เลขที่ 99 หมู่ 9 ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก
ตำบล/แขวง ท่าโพธิ์ อำเภอ/เขต เมืองพิษณุโลก จังหวัด พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000 ประเทศ ไทย
อีเมล kanyaratp@nu.ac.th
☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☒ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 4 7 7 8 8 1 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)
ในกรณีที่มีการมา สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☒ อีเมลตัวแทน

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)
ชื่อ นางสาวกัญญารัตน์ ประทุมศิริ
ที่อยู่ กองส่งเสริมการบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยนเรศวร 99
ตำบล/แขวง ท่าโพธิ์ อำเภอ/เขต เมืองพิษณุโลก จังหวัด พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000 ประเทศ ไทย
อีเมล kanyaratp@nu.ac.th
เลขประจำตัวประชาชน 3 6 5 9 9 0 0 6 4 3 7 9 7 ☒ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกับผู้ขอ
ชื่อ นายวิชญ์วิศิษฐ์พงศ์ มณีจันทร์
ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 99 หมู่ 9
ตำบล/แขวง ท่าโพธิ์ อำเภอ/เขต เมืองพิษณุโลก จังหวัด พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000 ประเทศ ไทย
อีเมล
เลขประจำตัวประชาชน 1 6 5 0 8 0 0 1 3 2 5 8 3 ☒ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่มีอาจะระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ กลุ่มวิศวกรรม สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัช) ☐ กลุ่มเคมี สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)	สิทธิบัตรการออกแบบ ☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1) ☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2) ☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)	อนุสิทธิบัตร ☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม) ☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)
--	---	--

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบแนบต่อท้าย สป/สผ/001-ก

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีการผลิตวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบของไคโตซาน โฟโบริน สารสกัดจากขี้ผึ้งหางจระเข้ และสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

2. ชื่อ นางสาวศุภรัตน์ สงนรินทร์

ที่อยู่ 99

ต.ท่าโพธิ์ อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก 65000

อีเมล suleeratc@nu.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน 3659900490745

ตัวแทนเลขที่ 2517 โทรศัพท์ 055-968617 โทรสาร

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์

2. ชื่อ ศาสตราจารย์จารุภา วิโยชน์

ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 99 หมู่ 9 ต.ท่าโพธิ์ อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก 65000 ประเทศไทย

สัญชาติ ไทย

เลขประจำตัวประชาชน 3200900781613

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการผลิตวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบของไคโตซาน ไฟโบรอิน สารสกัดจากวุ้น
วุ้นหางจระเข้ และสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) สำหรับงาน
5 วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

สาขาวิชาที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาที่เกี่ยวข้องกับพอลิเมอร์ที่ใช้สำหรับการนำส่งสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการรักษาและชีววัตถุ

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis) เป็นภาวะความผิดปกติของข้อต่อชนิดเรื้อรังที่มีลักษณะเด่นคือการ
10 เสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งเป็นผลจากการบาดเจ็บ การเปลี่ยนแปลงทางชีวกลศาสตร์ (Biomechanics)
และการลดจำนวนหรือการตายของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte apoptosis) กระดูกอ่อนผิวข้อเป็นเนื้อเยื่อที่
ไม่มีหลอดเลือด เส้นประสาท และระบบน้ำเหลือง ส่งผลให้ขาดแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดภายในเนื้อเยื่อและมี
ความสามารถในการซ่อมแซมตนเองต่ำ ในระยะเริ่มต้นของโรคพบการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางชีว
โมเลกุลของ extracellular matrix ร่วมกับการลดลงของความหนาและความสมบูรณ์ของชั้นกระดูกอ่อน ข้อจำกัด
15 ดังกล่าวเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ซึ่ง
มุ่งเน้นการฟื้นฟูโครงสร้างและหน้าที่ของกระดูกอ่อนผิวข้อ เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม
ในอนาคต

หนึ่งในองค์ประกอบสำคัญของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนคือการออกแบบวัสดุโครงร่าง (scaffold)
ที่สามารถรองรับการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน และการคงสภาพการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน รวมถึงทำหน้าที่
20 เป็นตัวกลางในการนำส่งสารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทต่อการสร้างและการคงสภาพของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน วัสดุโครง
ร่างที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ทางคลินิกควรมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) สามารถ
ย่อยสลายได้ภายในร่างกาย (biodegradability) และมีสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่สอดคล้องกับสภาพแวดล้อมของ
กระดูกอ่อนผิวข้อ เช่น ความแข็งแรงเชิงกล ความยืดหยุ่น และอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสม โดยเฉพาะวัสดุใน
รูปแบบไฮโดรเจลซึ่งมีโครงสร้างสามมิติและมีปริมาณน้ำสูงใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนตามธรรมชาติ
25 แม้ว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์บางชนิดจะถูกนำมาใช้เป็นวัสดุโครงร่างในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน แต่ข้อจำกัด
ด้านต้นทุนและการจัดหาวัตถุดิบยังคงเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้ในระดับคลินิกอย่างแพร่หลาย งานวิจัยนี้จึง
มุ่งเน้นการพัฒนาไฮโดรเจลโครงร่างจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตซานซึ่งสกัดจากเปลือกของสัตว์ทะเล และ

ไฟโบรอินที่ได้จากรังไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* โดยเลือกใช้ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซีทิลอยู่ระหว่าง 90-95% น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $10^5 - 10^6$ ดาลตัน ขนาดของอนุภาคประมาณ 200 mesh และมีความหนืดอยู่ในช่วง 300 – 500 cps ร่วมกับไฟโบรอินซึ่งมีคุณสมบัติด้านความแข็งแรงเชิงกลและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การผสมพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดในสัดส่วนที่เหมาะสมร่วมกับการใช้สารก่อครอสลิงก์ระหว่างสายพอลิเมอร์ ช่วยให้

5 สามารถคงคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละวัสดุไว้ได้ พร้อมทั้งลดข้อจำกัดของพอลิเมอร์แต่ละชนิดเมื่อใช้เพียงลำพัง

นอกจากนี้ วัสดุโครงร่างไฮโดรเจลยังได้รับการเสริมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน โดยมีการผสมสารสกัดจาก วุ้นวุ้นหางจระเข้ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบและเอื้อต่อการคงสภาพแวดล้อมระดับเซลล์ที่เหมาะสมต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อีกทั้งเพื่อเพิ่มความปลอดภัยและลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลชีพ วัสดุโครงร่างยัง

10 ได้รับการเสริมสารต้านแบคทีเรียจากธรรมชาติ ได้แก่ สารสกัดจากไมยราบ Mimosa complex ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญคือ orientin ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและมีศักยภาพในการชะลอการเสื่อมของกระดูกอ่อน การผสมพอลิเมอร์และสารชีวโมเลกุลจากธรรมชาติหลายชนิดภายในระบบไฮโดรเจลจึงช่วยเสริมสมบัติของวัสดุโครงร่างให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกอ่อนผิวข้อที่สึกหรอหรือเสียหายในอนาคต ทั้งในด้านประสิทธิภาพทางชีวภาพ ความปลอดภัย และความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ทางคลินิก

15 ลักษณะและความมุ่งหมายของงานประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลประกอบด้วยพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตซานไฟโบรอิน และสารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้ ร่วมกับสารต้านแบคทีเรียจากธรรมชาติ ได้แก่ สารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa pudica extract complex) และสารก่อครอสลิงก์ เพื่อให้ได้วัสดุที่มีคุณสมบัติการเข้ากันได้ทางชีวภาพและสามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกาย การเตรียมวัสดุโครงร่างไฮโดรเจล

20 ดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อภายในห้องสะอาด (cleanroom) โดยใช้ น้ำดีไอไอโอไนซ์ (deionized water, type II, 15 megaohm) เป็นตัวทำละลาย

การประดิษฐ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากรรมวิธีการผลิตวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลเพื่อนำไปใช้ทดแทนเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน วัสดุโครงร่างดังกล่าวประกอบไปด้วยพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตซานจากเปลือกกุ้งและสารสกัดไฟโบรอินจากรังไหม ทำหน้าที่กักเก็บเจโรโปรเทคเตอร์ ได้แก่ สารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้ซึ่งเป็น

25 สารกลุ่มไกลโคโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ นอกจากนี้เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยังได้เพิ่มสารต้านแบคทีเรียจากธรรมชาติ ได้แก่ สารสกัดจากไมยราบ Mimosa complex ที่มีองค์ประกอบสำคัญคือ orientin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยังมีฤทธิ์ต้านกระดูกอ่อนเสื่อมอีกด้วย ซึ่งผลผลิตที่ได้มีความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และย่อยสลายได้เองในร่างกายมนุษย์ (biodegradable) โดยลักษณะของวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่ได้มีความแข็งแรง เมื่อสัมผัสกับน้ำหรือของเหลวทางสรีรวิทยา (physiological fluid) จะมี

สภาพเป็นไฮโดรเจลที่ประกอบไปด้วยรูพรุนและมีโครงร่างเป็นตาข่าย ซึ่งเหมาะสมสำหรับเป็นที่อยู่ของเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อการเจริญเติบโตและการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์กระดูกอ่อน

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- 5 กรรมวิธีการผลิตวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบของไคโตซาน ไฟโบรอิน สารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้ และสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

- 10 วัสดุโครงร่างไฮโดรเจลมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่อไฟโบรอินต่อสารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้เท่ากับ 40 : 36 : 1 ตามลำดับ และมีการเติมสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและสนับสนุนการชะลอการเสื่อมของกระดูกอ่อน เมื่อเตรียมในปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นรวมของพอลิเมอร์และสารชีวโมเลกุลประมาณ 6% w/v โดยมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมสารละลายไคโตซาน

- 15 ทำการเตรียมสารละลายไคโตซานที่มี degree of deacetylation อยู่ระหว่าง 90–95% และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10^5 – 10^6 ดาลตัน โดยเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 4.3% (w/v) ด้วยการละลายผงไคโตซานปริมาณ 0.6 กรัม ในสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 14 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนได้สารละลายพอลิเมอร์ใสและเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 5–6 ด้วยสารละลาย โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% (w/v)

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินที่ผสมสารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้

- 20 ทำการเตรียมสารละลายไฟโบรอินซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 88–98 โดยผสมร่วมกับสารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 4–8 ทั้งนี้ใช้ไฟโบรอินปริมาณ 0.54 กรัม และสารสกัดจากวุ้นวุ้นหางจระเข้ปริมาณ 0.015 กรัม ละลายในน้ำดีไอไอน์ (deionized water, type II, 15 megaohm) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยกวนจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

การเตรียมสารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex)

- 25 ทำการเตรียมสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) โดยนำสารสกัดหยาบจากไมยราบ (Mimosa crude extract) ซึ่งได้จากการหมักผงไมยราบแห้ง (ส่วนเหนือดิน) ด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่สกัด (maceration) และกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนมาบดผสมกับไฮดรอกซีโพรพิล-เบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน (hydroxypropyl- β -cyclodextrin; HP β CD)

ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากไมยราบ (Mimosa crude extract) ต่อ hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) เท่ากับ 1:5 ร่วมกับตัวทำละลายร่วม (co-solvent) คือ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ทำการบดด้วยแรงกลจนส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำให้แห้งในโถดูดความชื้นในสภาวะสุญญากาศ (desiccator) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงหรือจนแห้ง และคัดขนาดอนุภาคโดยผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช (mesh) เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดไม่เกิน 200 ไมโครเมตร

ทำการเตรียมสารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำดีไอออไนซ์ deionized water (type II, 15 megaohm) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยกวนจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร และนำสารละลายที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

การเตรียมสารก่อครอสลิงค์

เตรียมสารก่อครอสลิงค์โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) โดยละลาย Na_2HPO_4 ปริมาณ 0.45 กรัม ในน้ำดีไอออไนซ์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 38–40 โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์รวม

การเตรียมสารละลายพอลิเมอร์

เตรียมวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลโดยนำสารละลายไฟโบรอินที่ผสมสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้มาผสมกับสารละลายไคโตซานที่ปรับค่าพีเอช (pH) แล้ว จากนั้นทำการกวนผสมจนได้สารละลายพอลิเมอร์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกวนผสมอย่างต่อเนื่องจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารก่อครอสลิงค์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไป และทำการกวนผสมด้วยแท่งกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที จนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้เทลงในแม่พิมพ์จาน 24 หลุม (24-well plate) (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งหลุม จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนสารละลายแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze-drying (lyophilization) เพื่อขึ้นรูปเป็นวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลทรงกระบอก วัสดุโครงร่างที่ได้มีความแข็งแรงเชิงกล และเมื่อสัมผัสกับน้ำหรือของเหลวทางสรีรวิทยา (physiological fluid) จะเปลี่ยนสภาพเป็นไฮโดรเจลที่มีโครงสร้างรูพรุนซึ่งเชื่อมต่อกัน โดยมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 70–100 ไมโครเมตร และมีโครงสร้างตาข่ายสามมิติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน รวมถึงการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ II ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (แสดงในรูปที่ 1) วัสดุโครงร่าง

ไฮโดรเจลที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4–8 องศาเซลเซียส ในภาชนะกันความชื้น จนกว่าจะนำไปใช้งาน

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

- รูปที่ 1 แสดงลักษณะของวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลผสมไคโตซาน/ไฟโบรอิน/สารสกัดจากงูเห่าหางจระเข้/สารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) ที่ได้จากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) โดย (ก) ภาพลักษณะภายนอกของวัสดุโครงร่างทรงกระบอก (ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงโครงสร้างรูพรุนที่เชื่อมต่อถึงกัน และ (ค) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของวัสดุเมื่อดูดซึมน้ำหรือของเหลวทางสรีรวิทยา (physiological fluid) แสดงโครงข่ายสามมิติของไฮโดรเจล
- 5
- 10 วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด
- เหมือนกับที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการผลิตวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบของไคโตซาน ไพโบรอิน สารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้ และสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน มีขั้นตอนดังนี้

5 ก. เตรียมสารละลายไคโตซานที่มีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) อยู่ระหว่าง 90–95% และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10^5 – 10^6 ดาลตัน โดยละลายไคโตซานให้มีความเข้มข้น 4.3% (w/v) ในสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนได้สารละลายพอลิเมอร์ใสและเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง 5–6 ด้วยสารละลายโซเดียมโบคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% (w/v)

10 ข. เตรียมสารละลายไพโบรอินที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 88–98 โดยผสมกับสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 4–8 แล้วละลายในน้ำดีไอออนซ์ กวนจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

ค. เตรียมสารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) ทำการเตรียมสารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) ให้มี
15 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายในน้ำดีไอออนซ์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ กวนจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร และเก็บรักษาสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

ง. เตรียมสารก่อครอสลิงก์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) โดยละลาย Na_2HPO_4 ในน้ำดีไอออนซ์ เพื่อให้มีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 38–40 ของน้ำหนักพอลิเมอร์รวม

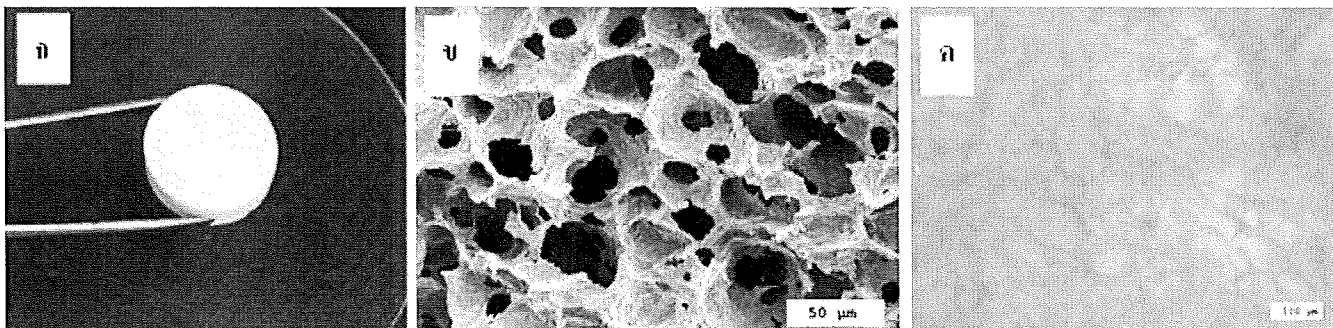
20 จ. เตรียมสารละลายพอลิเมอร์โดยนำสารละลายจากขั้นตอน ข. ผสมกับสารละลายไคโตซานจากขั้นตอน ก. และกวนจนได้สารละลายพอลิเมอร์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) จากขั้นตอน ค. และกวนผสมอย่างต่อเนื่อง แล้วเติมสารก่อครอสลิงก์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) จากขั้นตอน ง. ในปริมาณร้อยละ 38–40 ของน้ำหนักพอลิเมอร์รวม และกวนผสมจนได้สารละลายพอลิเมอร์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน

25 ฉ. เทสารละลายพอลิเมอร์จากขั้นตอน จ. ลงในแม่พิมพ์ แล้วนำไปแช่แข็งจนสารละลายแข็งตัว ก่อนทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying หรือ lyophilization) เพื่อขึ้นรูปเป็นวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่มีโครงสร้างสามมิติ

2. กรรมวิธีตามข้อถ้อยสิทธิข้อ 1 ที่ซึ่ง สารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) เตรียมโดยนำสารสกัดหยาบจากไมยราบ (Mimosa crude extract) ซึ่งได้จากการสกัดผงไมยราบ
30 แห้งส่วนเหนือดินด้วยเอทานอลโดยวิธีการแช่สกัด (maceration) และกำจัดตัวทำละลายออก

จากนั้นนำมาผสมกับไฮดรอกซีโพรพิล-เบตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน (hydroxypropyl- β -cyclodextrin; HP β CD) ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากไมยราบต่อ HP β CD เท่ากับ 1:5

3. กรรมวิธีตามข้อถือสิทธิข้อ 2 ที่ซึ่ง สารสกัดหยาบจากไมยราบและไฮดรอกซีโพรพิล-เบตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน (HP β CD) ถูกบดผสมร่วมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลายร่วม (co-solvent) ด้วยแรงกลจนเป็นเนื้อเดียวกัน และผ่านกระบวนการทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ และคัดขนาดอนุภาค ด้วยตะแกรงขนาด 80 mesh
4. กรรมวิธีตามข้อถือสิทธิข้อ 1-3 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง สารละลายสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ชัน (Mimosa complex) มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. กรรมวิธีตามข้อถือสิทธิข้อ 1 ซึ่งโคโตซาน ไฟโบรอิน และสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักเท่ากับ 40:36:1 ตามลำดับ
6. กรรมวิธีตามข้อถือสิทธิข้อ 1 ที่ซึ่งวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่ได้มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 70–100 ไมโครเมตร



รูปที่ 1

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตวัสดุโครงร่างไฮโดรเจลสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งประกอบด้วยไคโตซาน ไฟโบรอิน สารสกัดจากงูเห่าหางจระเข้ และสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายไคโตซาน การเตรียมสารละลายไฟโบรอินร่วมกับสารสกัดจากงูเห่าหางจระเข้ การเตรียมสารสกัดจากไมยราบที่ผ่านกระบวนการคอมเพล็กซ์ (Mimosa complex) โดยใช้สารสกัดหยาบจากไมยราบร่วมกับไฮดรอกซีโพรพิล-เบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน (HP β CD) และการเติมสารก่อครอสลิงก์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปขึ้นรูปและทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying หรือ lyophilization) เพื่อให้ได้วัสดุโครงร่างไฮโดรเจลที่มีโครงสร้างสามมิติและรูพรุนเชื่อมต่อกัน