

การลดขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนไก่
โดยการฉายรังสีแกมมา

นางสาวพิมพ์สิริ พร้อมวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR WEIGHT REDUCTION OF CHONDROITIN SULFATE FROM
CHICKEN KEEL CARTILAGE BY GAMMA IRRADIATION

Miss Pimsiree Phromwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Nuclear Technology

Department of Nuclear Technology

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

พิมพ์สิทธิ์ พร้อมวงษ์ : การลดขนาดโมเลกุลของคอนดรอยทีนซัลเฟตจากกระดูกอ่อนนอกไก่
 โดยการฉายรังสีแกมมา. (MOLECULAR WEIGHT REDUCTION OF CHONDROITIN
 SULFATE FROM CHICKEN KEEL CARTILAGE BY GAMMA IRRADIATION)
 อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ชยากริต ศิริอุปถัมภ์, 86 หน้า.

ได้ทำการลดขนาดของโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟต (Chondroitin sulfate) ขนาดโมเลกุลใหญ่
 น้ำหนักโมเลกุล (M_v) 78.105 กิโลดอลตันที่สกัดจากกระดูกอ่อนนอกไก่ด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยการฉายรังสี
 แกมมาปริมาณรังสี 317 – 500 กิโลเกรย์ กับคอนดรอยทีนซัลเฟต ในรูปของแข็งที่ความดันและอุณหภูมิ
 ปกติ ได้คอนดรอยทีนซัลเฟตโมเลกุลขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 – 10 กิโลดอลตัน ซึ่งเหมาะสมต่อ
 การดูดซึมในระบบย่อยอาหารของร่างกาย และทำการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นสารคอนดรอยทีนซัลเฟตและหา
 น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง FTIR และ Viscometer ตามลำดับ ค่า $G_{(s)}$ -value ที่ได้จากการคำนวณมี
 ค่าประมาณ 1.8

ภาควิชา.นิวเคลียร์เทคโนโลยี.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.นิวเคลียร์เทคโนโลยี.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.2551.....

5070378121 : MAJOR NUCLEAR TECHNOLOGY

KEYWORDS: CHONDROITIN SULFATE / MOLECULAR WEIGHT REDUCTION / GAMMA IRRADIATION

PIMSIREE PHROMWONG : MOLECULAR WEIGHT REDUCTION OF CHONDROITIN
SULFATE FROM CHICKEN KEEL CARTILAGE BY GAMMA IRRADIATION.

ADVISOR : ASSOC.PROF.CHYAGRIT SIRI-UPATHUM, 86 pp.

Low molecular weight chondroitin sulfate for body absorption was prepared by gamma irradiation-induced degradation of dried high molecular weight chondroitin sulfate 78.105 kDa obtained by papain enzymatic extraction of chicken keel cartilages at room temperature-pressure. Optimum radiation dose to reduce the molecular weight (M_v) to 10 – 20 kDa was in the range of 317 – 500 kGy. Characterization and molecular weight determination of the obtained chondroitin sulfate were done by FTIR and Ubbelohde Viscometer respectively. The overall $G_{(s)}$ -value for chondroitin sulfate calculated from this experiment was about 1.8.

Department: Nuclear Technology.....Student's Signature.....

Field of Study: Nuclear Technology.....Advisor's Signature.....

Academic Year: 2008.....

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีในครั้งนี้ ข้าพเจ้าต้องขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิศวกรรมเทคโนโลยี คณะวิศวกรรมศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัยแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในด้านสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์และทุนสนับสนุนการท้าวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ชยากริต ศิริอุปถัมภ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำหรับความรู้และประสบการณ์ รวมถึงคำแนะนำต่าง ๆ ที่มอบให้ขอขอบพระคุณ รวมถึงคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเทคโนโลยี และอาจารย์ของข้าพเจ้าทุกท่านที่ถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ข้าพเจ้าขอขอบคุณนิสิต ภาควิชาวิศวกรรมเทคโนโลยี ทุกคนที่คอยช่วยเหลือถามไถ่และให้กำลังใจ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า บิดา มารดา ที่อบรมสั่งสอน ให้การศึกษาที่ดีแก่ข้าพเจ้า และน้องที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ข้าพเจ้าเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	2
1.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ คอนดรอยทีนซัลเฟต (Chondroitin sulfate).....	5
2.2 โรคข้อกระดูกอักเสบ (Osteoarthritis).....	8
2.3 กระบวนการลดขนาดโมเลกุล (Depolymerization process).....	14
2.4 กระบวนการลดขนาดของโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยการฉายรังสีแกมมา (Gamma irradiation).....	16
2.5 ปริมาณที่บ่งถึงผลของรังสีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของสาร (G-Value).....	19
2.6 การหาขนาดโมเลกุลของโมเลกุล คอนดรอยทีนซัลเฟต.....	20
2.7 การทดสอบยืนยันและการวัดขนาดโมเลกุลของโมเลกุลของสารพอลิเมอร์.....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	45
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	46

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 ผลการสกัดปาเปนและการทำให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอสด.....	55
4.2 ผลการสกัดคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเอนไซม์ปาเปน.....	55
4.3 ผลการฉายรังสีคอนดรอยทีนซัลเฟต.....	56
4.4 ผลการทดสอบยืนยันคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy.....	56
4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.....	58
4.6 ผลวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล คอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC).....	65
4.7 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Viscosity average molecular weight) ของคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วย Ubbelohde Viscometer.....	65
4.8 ผลการคำนวณหาค่า $G_{(s)}$ -Value.....	68
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	74
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการสกัดปาเปนจากยางมะละกอ.....	55
4.2 ผลการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต.....	55
4.3 การขายรังสีคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ เพื่อลดขนาด โมเลกุล.....	56
4.4 ตำแหน่ง, ลักษณะของสเปกตรัมที่สำคัญ และหมู่ฟังก์ชันที่น่าจะเป็น.....	56
4.5 ผลการวัดค่าความหนืดที่แท้จริง และน้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตที่ได้รับ ปริมาณรังสีแกมมาต่าง ๆ.....	65
4.6 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณรังสีที่คอนดรอยตินซัลเฟตได้รับ.....	68

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุล Chondroitin-4-sulfate.....	4
รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุล Chondroitin-6-sulfate.....	5
รูปที่ 2.3 การจัดเรียงตัวของคอนดรอยตินซัลเฟตในข้อต่อกระดูกอ่อน.....	5
รูปที่ 2.4 กลไกการเก็บกักความชุ่มชื้นของคอนดรอยตินซัลเฟต.....	6
รูปที่ 2.5 ส่วนผิวของข้อกระดูกที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตอยู่.....	7
รูปที่ 2.6 ตำแหน่งต่าง ๆ ของข้อกระดูกภายในร่างกาย.....	10
รูปที่ 2.7 ลักษณะภายในและภายนอกของหัวเข่าปกติ (ขวา) และผู้มีอาการข้อกระดูก อักเสบ (ซ้าย).....	12
รูปที่ 2.8 ภาพถ่ายรังสีเอกซ์ของกระดูกหัวเข่าที่ปกติ (ซ้าย) และมีอาการกระดูกเสื่อม (ขวา)	12
รูปที่ 2.9 ทำกายบริหารเพื่อลดอาการบาดเจ็บเนื่องจากโรคข้อกระดูกอักเสบและเสื่อม.....	13
รูปที่ 2.10 กลไกในการเกิดปฏิกิริยาการฉายรังสีแกมมาในคอนดรอยตินซัลเฟต.....	18
รูปที่ 2.11 การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลตามลำดับของน้ำหนักโมเลกุลชนิดต่าง ๆ.....	22
รูปที่ 2.12 การเปลี่ยนแปลงข้อมูลของเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....	25
รูปที่ 2.13 แผนผังแสดงส่วนประกอบของ Fourier Transform Infrared Spectrometer.....	25
รูปที่ 2.14 เซลล์สำหรับใส่สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง.....	27
รูปที่ 2.15 สเปกตรัมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ของสารมาตรฐาน Chondroitin-4- sulfate (a) และ Chondroitin-6-sulfate (b).....	29
รูปที่ 2.16 การเปลี่ยนแปลงของสารและตัวกลางเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI- TOF MS.....	31
รูปที่ 2.17 แผนภาพแสดงการทำงานพื้นฐานของเทคนิค MALDI-TOF MS.....	32
รูปที่ 2.18 อุปกรณ์ของเครื่อง MALDI-TOF MS.....	33
รูปที่ 2.19 ภาพแสดงลักษณะสเปกตรัมของคอนดรอยตินซัลเฟตจากการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค MALDI-TOF MS.....	34
รูปที่ 2.20 การทำงานของเทคนิค Gel permeation chromatography.....	35

ภาพ

หน้า

รูปที่ 2.21 ลักษณะของกราฟที่ได้จากวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยเทคนิค GPC.....	36
รูปที่ 2.22 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล.....	37
รูปที่ 2.23 กราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารที่มีการกระจายตัวกว้าง.....	37
รูปที่ 2.24 Ostwald viscometer (ซ้าย) และ Ubbelohde viscometer (ขวา).....	39
รูปที่ 2.25 การวัดความหนืด.....	40
รูปที่ 2.26 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{red} และความเข้มข้น.....	41
รูปที่ 2.27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{inh} และความเข้มข้น.....	42
รูปที่ 3.1 ตะกอนของปาเปนที่สกัดได้ก่อนทำให้บริสุทธิ์.....	47
รูปที่ 3.2 ปาเปนบริสุทธิ์ที่สกัดได้.....	48
รูปที่ 3.3 กระจุกอ่อนนอกโก่แซ่แข็งที่นำมาใช้ในการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต.....	48
รูปที่ 3.4 การตั้งอุปกรณ์ในการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต.....	49
รูปที่ 3.5 สารละลายที่ได้หลังจากการตั้งสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	50
รูปที่ 3.6 การตกตะกอน GAG ทั้งหมดที่ได้จากการสกัดกระจุกอ่อนนอกโก่.....	50
รูปที่ 3.7 สารละลายคอนดรอยตินซัลเฟตที่ได้ก่อนนำไปทำให้แห้ง.....	51
รูปที่ 3.8 ภาพที่ใช้ในการบรรจุสารเพื่อฉายรังสีแกมมา.....	51
รูปที่ 3.9 ตัวอย่างสารคอนดรอยตินซัลเฟตที่ผ่านการฉายรังสีด้วยปริมาณรังสีต่าง ๆ กัน โดยเรียงจากปริมาณรังสีน้อยไปมาก จากซ้ายไปขวา.....	52
รูปที่ 3.10 Ubbelohde Viscometer และตำแหน่งที่ใช้ในการวัดความหนืด.....	54
รูปที่ 4.1 FTIR spectrum ของคอนดรอยตินซัลเฟตที่สกัดได้.....	56
รูปที่ 4.2 Mass spectrum ของการวิเคราะห์คอนดรอยตินซัลเฟตที่ผ่านการฉายรังสีด้วย ปริมาณรังสีต่าง ๆ ด้วยเทคนิค MADI-TOF.....	57
รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณรังสีที่ คอนดรอยตินซัลเฟตได้รับ.....	66
รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log ของน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณรังสีที่ คอนดรอยตินซัลเฟตได้รับ.....	66
รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและค่า Ln ของปริมาณรังสีที่ คอนดรอยตินซัลเฟตได้รับ.....	67

รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่ คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 48164 – 78105 Da ที่ Dose rate 0.692 kGy/hr.....	69
รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่ คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 27401 – 48164 Da ที่ Dose rate 14.286 kGy/hr.....	71
รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่ คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 9366 – 27401 Da ที่ Dose rate 14.286 kGy/hr.....	72
รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด.....	73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้สูงอายุกำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคข้ออักเสบและข้อเสื่อม (Osteoarthritis) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดอาการเจ็บปวดตามข้อต่าง ๆ โดยเฉพาะผู้หญิงที่มีอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไป พบปัญหาข้อเข่าอักเสบค่อนข้างมาก คุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุจึงลดลง สาเหตุสำคัญของโรคนี้ เกิดจากปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟต (Chondroitin sulfate) ในข้อกระดูกที่คอนดรอยตินซัลเฟต เป็นสารที่มีการใช้รักษาข้อและกระดูกอักเสบมากกว่า 20 ปีในประเทศทางทวีปยุโรป แต่ปัจจุบันเริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วไป เนื่องจากผลดีของการรักษาที่น่าพอใจจนเป็นที่ยอมรับ ของวงการแพทย์ สารชนิดนี้ได้รับการยอมรับในอเมริกาว่าเป็นสารที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ สูง จึงมีการผลิตคอนดรอยตินซัลเฟตในรูปของอาหารเสริมออกมาจำหน่ายมากมาย จากผลวิจัย พบว่าคอนดรอยตินซัลเฟตมีอยู่ในกระดูกอ่อนของสัตว์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะพบได้มากในกระดูกอกไก่ กระดูกจระเข้และครีบบลาคูลาม แต่เนื่องจากคอนดรอยตินซัลเฟตที่สกัดออกมาได้นั้นเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ และยังเสื่อมสลายเมื่อผ่านกระบวนการย่อยหรือการประกอบอาหาร ทำให้ร่างกายได้รับปริมาณ คอนดรอยตินซัลเฟตน้อยมาก ดังนั้นหากมีการเพิ่มคอนดรอยตินซัลเฟตขนาดโมเลกุลเล็กเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งสามารถดูดซึมเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ได้โดยตรง จะทำให้ ผลการรักษาอาการโรคข้อกระดูกอักเสบและข้อเสื่อมมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นมาก กระบวนการลดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้กันทั่วไปอันได้แก่ กระบวนการทางเคมี และเอนไซม์นั้น เป็นกระบวนการที่ยุ่งยาก และทำให้มีสารเคมีและเอนไซม์เจือปนกับพอลิเมอร์ซึ่งยากต่อการกำจัด แต่ สำหรับการลดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการทางรังสีนั้นมีข้อดีที่เหนือกว่า กระบวนการที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันหลายประการ โดยกระบวนการทางรังสีนั้นสามารถลดขนาดของโมเลกุลได้โดยไม่ยุ่งยาก อีกทั้งยังได้สารโมเลกุลเล็กที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก เนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีชนิดอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาหาเงื่อนไขและปริมาณการฉายรังสีที่เหมาะสมต่อการลดขนาดของโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอกไก่ เพื่อให้ได้คอนดรอยตินซัลเฟต ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ในระดับที่ร่างกายสามารถดูดซึมเข้าไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อลดขนาดของโมเลกุลคอนดรอยทิน (Chondroitin sulfate) ที่สกัดจากกระดูกอ่อนออกให้มีความยาวโมเลกุลประมาณ 10,000 – 20,000 Da โดยการฉายรังสีแกมมา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1. สกัดคอนดรอยทินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนออกให้มีความบริสุทธิ์
- 1.3.2. หาเงื่อนไขในการลดขนาดโมเลกุลของสารสกัดคอนดรอยทินซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุล ประมาณ 10,000 – 20,000 Da โดยการฉายรังสีแกมมา ได้แก่ ความเข้มข้นของคอนดรอยทินซัลเฟต, ปริมาณรังสี, สารตัวเติม
- 1.3.3. พิสูจน์ลักษณะสมบัติ และขนาดโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตที่ได้
- 1.3.4. หาค่า Gs-value ของคอนดรอยทินซัลเฟต

1.4 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

- 1.4.1. ศึกษาและค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.4.2. สกัดคอนดรอยทินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนออกให้โดยสกัดแยกโปรตีนออกด้วย เอนไซม์ปาเปน พร้อมทั้งทดสอบเพื่อยืนยันผลการสกัดคอนดรอยทินซัลเฟตและน้ำหนักโมเลกุลโดย Gel Permeation Chromatography (GPC)
- 1.4.3. ทดลองหาเงื่อนไขในการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้ให้มีความยาวโมเลกุลประมาณ 10,000-20,000 Da โดยการฉายรังสีแกมมา
- 1.4.4. ทดลองหาค่า G_s-value ของการฉายรังสีแกมมากับโมเลกุลคอนดรอยทินซัลเฟต
- 1.4.5. สรุป วิเคราะห์ผลการทดลองและเขียนวิทยานิพนธ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

เป็นแนวทางสำหรับการใช้รังสีในการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยทินซัลเฟตเพื่อให้ได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กในระดับโมเลกุลสารอาหารที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้งานได้โดยตรง และเป็นแนวทางในการผลิตคอนดรอยทินซัลเฟตในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ (Tonic food) และเครื่องสำอาง

1.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.6.1 รศ.ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู^[1] มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคณะได้ทำการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตจากกระดูกของสัตว์ชนิดต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตพบว่ากระดูกอกไก่ และกระดูกจระเข้เป็นแหล่งที่ดีสำหรับคอนดรอยตินซัลเฟตโดยพบคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด A และ C เป็นปริมาณมาก

1.6.2 Robert J. Miller, Aviva Shiedlin^[2] ได้ทำการทดลองเพื่อหาวิธีการควบคุมการลดขนาดของโมเลกุลพอลิเมอร์โดยใช้การฉายรังสีแกมมา โดยทดลองกับพอลิเมอร์กลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ งานวิจัยนี้ได้ทำการฉายรังสีด้วยปริมาณรังสีต่าง ๆ แล้ววัดขนาดโมเลกุลที่ได้ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีและขนาดโมเลกุล จากกราฟจะได้รับความสัมพันธ์ ซึ่งสามารถใช้ในการหาปริมาณรังสีเพื่อใช้ลดขนาดโมเลกุลให้มีขนาดตามต้องการได้

1.6.3 Luigi De Ambrosi, Walter Recchai, Gianni Ferrari^[3] ได้ศึกษาวิธีการควบคุมการเตรียมสารกลุ่ม Glucoaminoglycans โมเลกุลเล็ก โดยใช้การฉายรังสีแกมมากับสารที่เป็นของแข็งและสารละลาย งานวิจัยนี้ได้ให้รายละเอียดเกี่ยวกับการเตรียมสารตัวอย่าง และสถานะต่าง ๆ ที่ใช้ในการฉายรังสีเพื่อให้ได้โมเลกุลที่มีขนาดระหว่าง 1000 - 35000 Da อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าการลดลงของขนาดโมเลกุลและปริมาณรังสีที่ได้รับมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง

1.6.4 Hidemitsu Uchisawa^[4] และคณะ และ รศ. ดร. วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู^[1] และคณะ ได้ทำการทดลองวัดสเปกตรัมของ Chondroitin-4-sulfate และ Chondroitin-6-sulfate ในสถานะที่เป็นของแข็ง โดยการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy โดยใช้ KBr เป็นตัวประสาน โดยพบว่าสเปกตรัมที่ใช้การทดสอบยืนยันคอนดรอยตินซัลเฟต คือ ที่ตำแหน่ง 854.5, 857 cm^{-1} และ ที่ตำแหน่ง 823.7, 826 cm^{-1} ตามลำดับ

1.6.5 Michiru Ida^[5] และ คณะ ได้ทำการวัดขนาดโมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตขนาดใหญ่ ที่สกัดได้จาก Neural Stem Cell โดยการใช้เทคนิค Gel permeation chromatography (GPC) และเทียบผลที่ได้จากเทคนิค GPC จากกราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน

1.6.6 Kiichiro TANAKA^[6] ทำงานวิจัยเรื่อง Physicochemical Properties of Chondroitin Sulfate ซึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตกับค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$ intrinsic viscosity) โดยพบว่าความสัมพันธ์ของค่าความหนืดที่แท้จริงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.2 M ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาฉลาม สามารถแสดงได้ ดังสมการ $[\eta] = 6.5 \times 10^{-6} M_r^{1.14}$

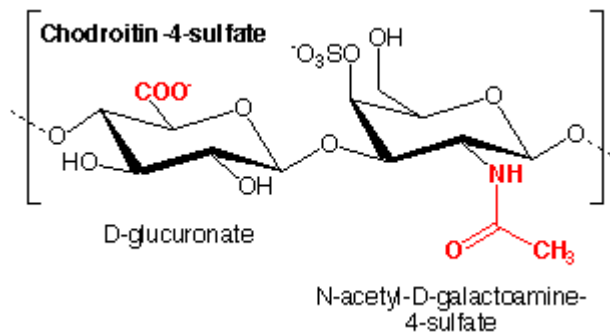
บทที่ 2

แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคอนดรอยทินซัลเฟต (Chondroitin sulfate)^[7]

คอนดรอยทินซัลเฟตหรือที่เรียกว่าคอนดรอยทิน (Chondroitin) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่ง อยู่ในกลุ่มของ heteropolysaccharide ที่เรียกว่า Glucoaminoglycans (GAGs) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ D-glucuronic acid (GlcA) และ N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) เชื่อมกันด้วย glycosidic bond ด้วยโครงสร้างแบบ β -configuration ทำให้มีรูปร่างเป็นสายโซ่ตรง ความยาวของสายโซ่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบคอนดรอยทินซัลเฟตแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามตำแหน่งของ sulfonation ได้ 5 ชนิด คือ Chondroitin sulfate A, B, C, D และ E โดย คอนดรอยทินซัลเฟตที่พบในไขข้อกระดูก และพบในปริมาณมากมี 2 ชนิด ดังนี้

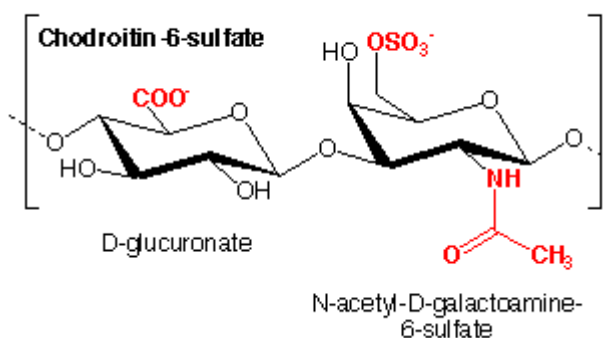
Chondroitin sulfate A มีตำแหน่งของ sulfonation อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุล N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Chondroitin-4-sulfate ลักษณะโมเลกุลของ Chondroitin-4-sulfate เป็นดังนี้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ Chondroitin-4-sulfate

Chondroitin-4-sulfate พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ เช่น กระดูกอ่อน กระดูก กระจกตา ผิวหนัง และผนังหลอดเลือดแดง

Chondroitin sulfate C มีตำแหน่งของ sulfonation อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของโมเลกุล N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Chondroitin-6-sulfate ลักษณะโมเลกุลของ Chondroitin-6-sulfate เป็นดังนี้

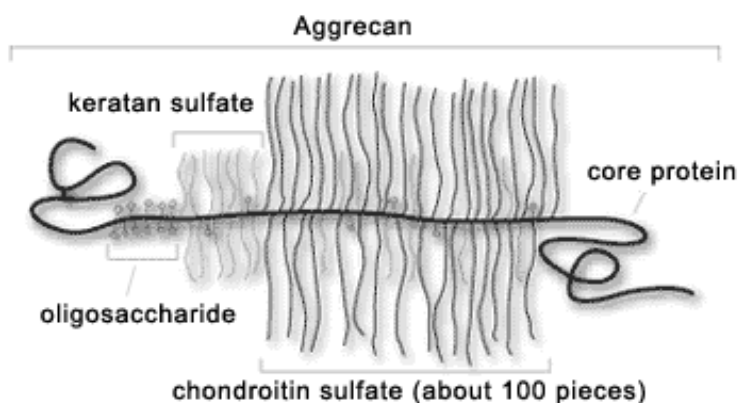


รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของ Chondroitin-6-sulfate

โดยสามารถพบ Chondroitin-6-sulfate ได้ในปลา กระดุกปลาฉลาม และในมนุษย์ ซึ่งในธรรมชาตินั้นจะพบคอนดรอยทีนซัลเฟตในรูปแบบของ isomeric mixtures ของคอนดรอยทีนซัลเฟตทั้งสองชนิดนี้

2.1.1 หน้าที่ของคอนดรอยทีนซัลเฟตในร่างกายของคนและสัตว์^[8, 9, 10]

คอนดรอยทีนซัลเฟตเป็น mucopolysaccharide โดยจะอยู่ในร่างกายด้วยการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน ดังภาพ

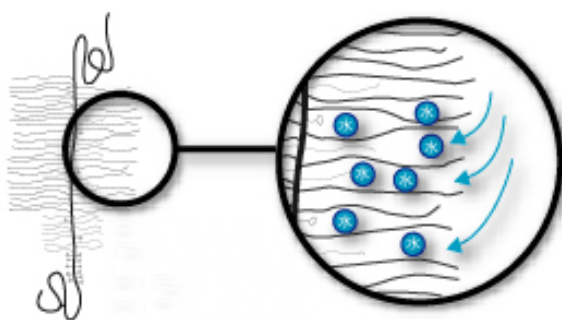


รูปที่ 2.3 การจัดเรียงตัวของคอนดรอยทีนซัลเฟตในข้อต่อกระดูกอ่อน

บริเวณกระดูกอ่อนจะประกอบด้วย collagen, proteoglycan, cartilage cells, glucosamine และน้ำ ซึ่งในส่วนของ proteoglycan จะมี hyaluronic acid, chondroitin และโปรตีน เป็นส่วนประกอบ โดยคอนดรอยทีนซัลเฟตจะสร้างพันธะอยู่กับโมเลกุลของโปรตีนดังภาพ โดยส่วนของคอนดรอยทีนซัลเฟตจะเป็นส่วนที่มีความยาวของโมเลกุลมากที่สุดและอยู่ในตำแหน่ง

ท้ายสุดของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งจะมีคอนดรอยทินซัลเฟตประมาณ 100 โมเลกุลจับอยู่ในแต่ละโมเลกุลของโปรตีน

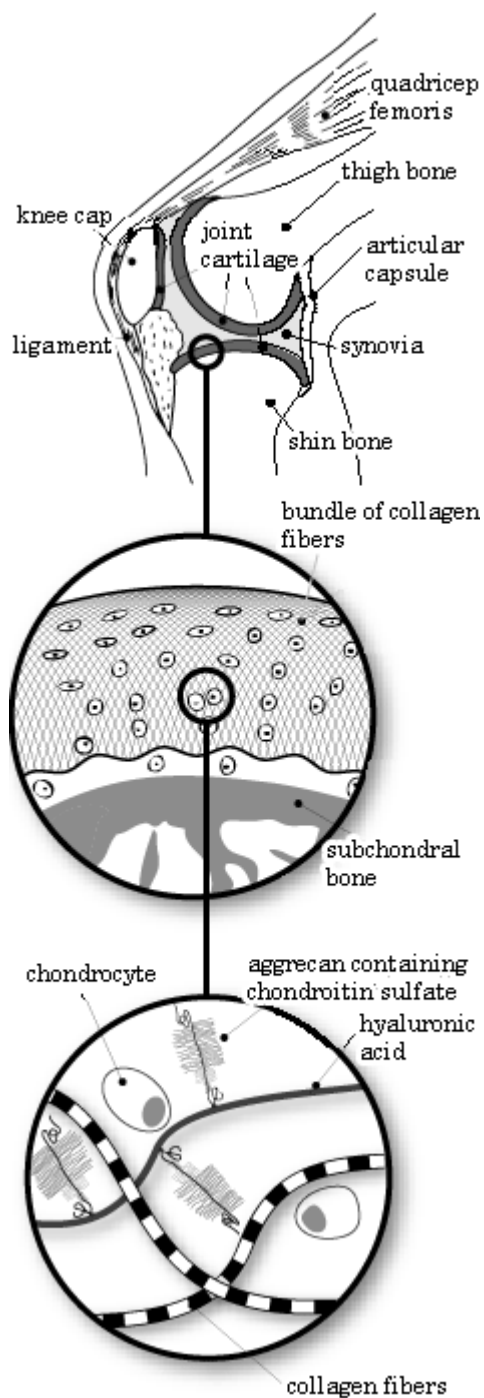
จากการจัดเรียงตัวของคอนดรอยทินซัลเฟตกับโปรตีน ทำให้คอนดรอยทินซัลเฟตสามารถรักษาความชุ่มชื้นได้ โดยการดูดซับโมเลกุลของน้ำไว้ในพื้นที่ว่างระหว่างคอนดรอยทินซัลเฟตแต่ละโมเลกุล ดังนั้นคอนดรอยทินซัลเฟตจึงช่วยในการกระจายสารประกอบต่างๆ ที่ถูกขนส่งด้วยเลือดเช่น ออกซิเจนและสารอาหาร ซึ่งละลายมาในน้ำ ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ ดังนั้นคอนดรอยทินซัลเฟตจึงเป็นแหล่งสะสมสารอาหารสำหรับไขข้อของกระดูกอ่อนซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีหลอดเลือดไปเลี้ยง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งสลายข้อกระดูกอ่อน และทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างข้อกระดูกอ่อนขึ้นมาใหม่อีกด้วย คอนดรอยทินซัลเฟตจึงทำหน้าที่ต่างๆ เหล่านี้และช่วยรักษาให้ข้อกระดูกอ่อนมีการยืดหยุ่นและการคงรูปร่างต่อไปได้ กลไกในการกักเก็บความชุ่มชื้นของคอนดรอยทินซัลเฟตเป็นดังภาพ



รูปที่ 2.4 กลไกการกักเก็บความชุ่มชื้นของคอนดรอยทินซัลเฟต

เนื่องจากคอนดรอยทินซัลเฟตมีประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงมีแรงผลักระหว่างโมเลกุลข้างเคียง จึงทำให้เกิดพื้นที่ว่างให้โมเลกุลของน้ำ และสารอาหารต่าง ๆ เข้าไปอยู่ได้ ดังนั้นคอนดรอยทินซัลเฟตจึงเปรียบเสมือนกับเป็นแหล่งน้ำและสารอาหารของข้อกระดูกนั่นเอง

ข้อกระดูกมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่เกิดจากการรวมตัวของเจล มีความหนาประมาณ 4-6 mm. ปกคลุมอยู่ตามปลายกระดูก มีโครงสร้างเป็นตาข่ายที่เกิดจากเส้นใยของ collagen พันกับ proteoglycans ซึ่งประกอบด้วยคอนดรอยทินซัลเฟตโดยบริเวณนี้จะนุ่มกว่ากระดูก ช่วยให้กระดูกข้อต่อไม่สัมผัสกันโดยตรงและสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างนุ่มนวล ดังนั้นข้อกระดูกจึงทำหน้าที่ในการป้องกันกระดูกและข้อต่อ และคอนดรอยทินซัลเฟตก็ทำหน้าที่ในการป้องกันและรักษาข้อกระดูกนั่นเอง



รูปที่ 2.5 ส่วนผิวของข้อกระดูกที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตอยู่

2.1.2 ประโยชน์และการนำคอนดรอยตินซัลเฟตมาใช้ประโยชน์

มีการนำคอนดรอยตินซัลเฟตมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคและในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ มาเป็นเวลานานกว่า 20 ปี ซึ่งประโยชน์ที่มีการใช้งานกันมากมีดังนี้

1. ใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมในการบรรเทาและรักษาอาการของโรคข้อและกระดูกอักเสบในผู้สูงอายุ
2. ใช้ในการรักษาและป้องกันอาการบวมแดงของแผลที่ผิวหนังและในกระเพาะอาหาร
3. ใช้ในการรักษาโรคข้อสะโพกห่าง (Hip dysphasia) และการเกิดข้ออักเสบที่ข้อศอก ข้อเข่า และข้อไหล่ ของสัตว์พวก สุนัข แมว ม้า
4. ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางต่าง ๆ เช่น ครีมปรับสภาพผม, ครีมบำรุงผิว และ ผลิตภัณฑ์เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว เป็นต้น

เนื่องจากคอนดรอยตินซัลเฟตเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กันทั้งเล็กและใหญ่ อีกทั้งยังเสื่อมสลายเมื่อผ่านกระบวนการย่อยหรือการประกอบอาหารทำให้ร่างกายได้รับปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตน้อยมาก ดังนั้นการเพิ่มคอนดรอยตินซัลเฟตขนาดโมเลกุลเล็กเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งสามารถดูดซึมเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ได้โดยตรงในรูปของอาหารเสริม (Tonic food) จึงเป็นวิธีเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของข้อกระดูกคอนดรอยตินซัลเฟตเป็นอย่างดี

2.2 โรคข้อกระดูกอักเสบ (Osteoarthritis) ^[11, 12]

จากข้อมูลของการประชุมโรคข้อสากล ณ รพ.ราชวิถี ระบุว่า โรคกระดูกและโรคข้อกลายเป็นปัญหาสำคัญของผู้สูงอายุ โดยพบว่ามีผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศกว่า 6 ล้านคน และโรคข้ออักเสบ รูมาตอยด์ และโรคเกาต์ รวมกันเกือบ 7 ล้านคน อีกทั้งยังมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยโรคข้อเสื่อมพบมากในกลุ่มอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป มีถึงร้อยละ 50 รองลงมาคือโรคกระดูกหัก อันเนื่องมาจากกระดูกพรุน โดยผู้หญิงอายุมากกว่า 50 ปี มีถึงร้อยละ 40 และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี อย่างไรก็ตาม กระดูกคนเราจะเริ่มเสื่อมเมื่ออายุ 40 ปีขึ้นไป เนื่องจากแคลเซียมในร่างกายจะเริ่มเสื่อมสลายทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายจะลดลง คาดว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยโรคนี้กว่า 400 ล้านคน ในอีก 20 ปีข้างหน้า จะเพิ่มขึ้นอีกร้อยละ 50 เนื่องจากประชากรโลกมีชีวิตความเป็นอยู่ที่คืออายุยืนยาวขึ้น แต่จากผลการใช้ชีวิตที่สุขสบายมากขึ้น ขาดการออกกำลังกาย ไม่รับประทานผักใบเขียว จะทำให้เกิดโรคข้อกระดูกและโรคข้ออักเสบ รวมทั้งเกิดมาจากอุบัติเหตุจากรถทำให้กระดูกหักกระดูกผิดรูปไป

โรคข้อเสื่อมเป็นความผิดปกติของข้อที่พบได้บ่อยในผู้คนช่วงเข้าสู่วัยกลางคนและพบได้เพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้นเรื่อยๆ ลักษณะของโรคเกิดจากกระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลายลงอย่างช้าๆจนเป็นเหตุให้มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของข้อ ซึ่งได้แก่ มีน้ำสะสมในข้อเพิ่มขึ้น กระดูกงอกผิดปกติ กล้ามเนื้อและเอ็นรอบข้อหย่อนยาน การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดดังกล่าวจะทำให้เคลื่อนไหวข้อได้จำกัดรวมทั้งทำให้เกิดอาการปวดและบวมที่ข้อได้

โรคข้อเสื่อมพบบ่อยในตำแหน่งของข้อที่ต้องรับน้ำหนักมากเช่น ข้อเข่า ข้อสะโพก ข้อต่อกระดูกสันหลัง เป็นต้น ข้อเข่าและข้อสะโพกเสื่อมมักทำให้เกิดความรำคาญเนื่องจากจะทำให้มีอาการปวดหรือไม่สบายข้อเมื่อต้องยืนหรือเดิน ในขณะที่ข้อต่อกระดูกสันหลังเสื่อมจะเป็นเหตุให้ปวดหลังและปวดต้นคอหรือคอแข็งตึงได้ แม้ว่าข้อเสื่อมจะพบในข้อที่ต้องรับน้ำหนัก แต่ก็สามารถพบที่ข้อต่างๆทั่วร่างกายได้โดยเฉพาะข้อที่เคยได้รับการบาดเจ็บ มีการติดเชื้อ หรือเคยมีข้ออักเสบนำมาก่อน สำหรับผู้ป่วยข้อนิ้วมือเสื่อมจะมีอาการปวด ชา หรือแข็งตึงขยับนิ้วลำบาก และตรวจพบก้อนหรือปุ่มกระดูกโตขึ้นที่บริเวณข้อนิ้วมือด้วย ส่วนใหญ่อาการปวดของโรคข้อเสื่อมมักเกิดในระหว่างที่มีการใช้งานของข้อและจะดีขึ้นเมื่อได้พัก อาจมีอาการฝืดตึงข้อช่วงสั้นๆไม่นานเกินกว่าครึ่งชั่วโมงในช่วงเช้าหลังตื่นนอนหรือภายหลังอยู่ในอิริยาบถทำไต่ท่าหนึ่งนานๆเช่น หลังจากขับรถ เป็นต้น สำหรับผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่มีอาการรุนแรงมากก็อาจมีอาการปวดข้ออย่างมากและรุนแรงเมื่อใช้งาน รวมทั้งขาดความมั่นคงหรือเสถียรภาพของข้อได้

2.2.1 กลไกการเกิดข้อกระดูกอักเสบและโรคข้อกระดูกเสื่อม

โรคข้อเสื่อมมีสาเหตุมาจากอายุที่มากขึ้นและการใช้งานข้อกระดูกที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะเมื่ออายุมากขึ้น ประสิทธิภาพของเอนไซม์คอนดรอยทินซัลเฟตจะลดน้อยลง ทำให้ปริมาณคอนดรอยทินซัลเฟตในกระดูกอ่อนลดลง ทำให้กระดูกอ่อน (cartilage bone) ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นเบาะรองรับน้ำหนัก และมีการสูญเสียคุณสมบัติของน้ำหล่อเลี้ยง เมื่อมีการเคลื่อนไหวของกระดูกก็จะเกิดการเสียดสีและเกิดการสึกหรอของกระดูกอ่อน เมื่อเกิดข้อเสื่อมมากขึ้นกระดูกอ่อนจะมีขนาดบางลง ผิวจะขรุขระ จะมีการงอกของกระดูกขึ้นมาที่เรียกว่า osteophytes เมื่อมีการอักเสบเยื่อหุ้มข้อก็จะสร้างน้ำหล่อเลี้ยงข้อเพิ่มขึ้นทำให้ข้อมีขนาดใหญ่ เอ็นรอบข้อจะมีขนาดใหญ่ขึ้น กล้ามเนื้อจะลีบลง การเปลี่ยนแปลงของข้อจะเป็นไปอย่างช้าๆโดยที่ผู้ป่วยไม่ทราบ ในรายที่เป็นรุนแรงกระดูกอ่อนจะบางมาก ปลายกระดูกจะมาชนกัน เวลาขยับข้อจะเกิดเสียงเสียดสีในข้อทำให้เกิดอาการบวมแดงและปวดหรือที่เรียกว่าข้อกระดูกอักเสบ

ตามปกติภายในข้อประกอบไปด้วยเยื่อข้อ น้ำไขข้อ และกระดูกอ่อนผิวข้อ กระดูกอ่อนผิวข้อจะทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวดูดซับแรงกดภายในข้อและป้องกันมิให้กระดูกที่อยู่ภายในข้อกระดูกอ่อนกระแทกกับกระดูกอีกฝั่ง หากกระดูกอ่อนผิวข้อเหล่านี้ถูกทำลายไม่ว่าด้วยสาเหตุใดก็ตาม น้ำหนักหรือแรงกดที่กระทำกับข้อก็จะส่งผลให้กระดูกได้ต่อกระดูกอ่อนผิวข้อสัมผัสกัน กล้ามเนื้อและเอ็นรอบข้อถูกยึดเป็นเหตุให้เกิดอาการปวดตามมา ในปัจจุบันยังไม่ทราบว่าอะไรเป็นสาเหตุทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย แต่ปัจจัยที่น่าจะมีส่วนร่วมทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลายได้แก่

1. น้ำหนักตัว การที่มีน้ำหนักตัวมากจะส่งผลให้เกิดแรงกดภายในข้อที่รับน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามไปด้วย
 2. กิจกรรมบางอย่างที่ส่งผลให้ข้อต้องรับแรงกดมากเกินไปเช่น การนั่งคุกเข่า หรือนั่งพับเพียบ
 3. ปัจจัยทางพันธุกรรมโดยเฉพาะในครอบครัวที่มีประวัติข้อและกระดูกอ่อนผิวข้ออ่อนแอ
 4. อายุ ผู้สูงอายุมีโอกาสพบโรคข้อเสื่อมมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อสรุปชัดเจนเนื่องจากผู้สูงอายุบางรายก็ไม่พบโรคข้อเสื่อม
- ภายในร่างกายของเรานั้นมีตำแหน่งของข้อกระดูกที่สามารถเกิดการอักเสบหรือเสื่อมของข้อกระดูกได้หลายตำแหน่ง อยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่งต่าง ๆ ที่สามารถเกิดโรคได้แสดงดังภาพ



รูปที่ 2.6 ตำแหน่งต่าง ๆ ของข้อกระดูกภายในร่างกาย

2.2.2 กลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรคข้อกระดูกอักเสบและข้อกระดูกเสื่อม

โรคข้อเสื่อมสามารถพบได้ทุกวัย แต่พบได้มากในผู้สูงอายุ สำหรับผู้ป่วยที่มีโรคข้อเรื้อรัง เช่นโรครูมาตอยด์ โรคเกาต์ หรือผู้ที่ได้รับอุบัติเหตุที่ข้อ ก็อาจจะเกิดโรคข้อเสื่อมได้ในขณะที่อายุยังไม่มาก จากการศึกษาพบว่าผู้ที่อายุมากกว่า 70 ปี ตรวจพบลักษณะข้อเสื่อมจากภาพถ่ายรังสีได้ร้อยละ 70 แต่มีเพียงครึ่งหนึ่งเท่านั้นที่มีอาการผิดปกติ โรคข้อกระดูกอักเสบและข้อกระดูกเสื่อมพบในผู้หญิงได้มากกว่าผู้ชายเนื่องจากความแข็งแรงของกระดูกและกล้ามเนื้อน้อยกว่าผู้ชาย โดยเฉพาะข้อเข่าเสื่อมและข้อนิ้วมือเสื่อม

2.2.3 ปัจจัยที่ทำให้เกิดข้อเสื่อม

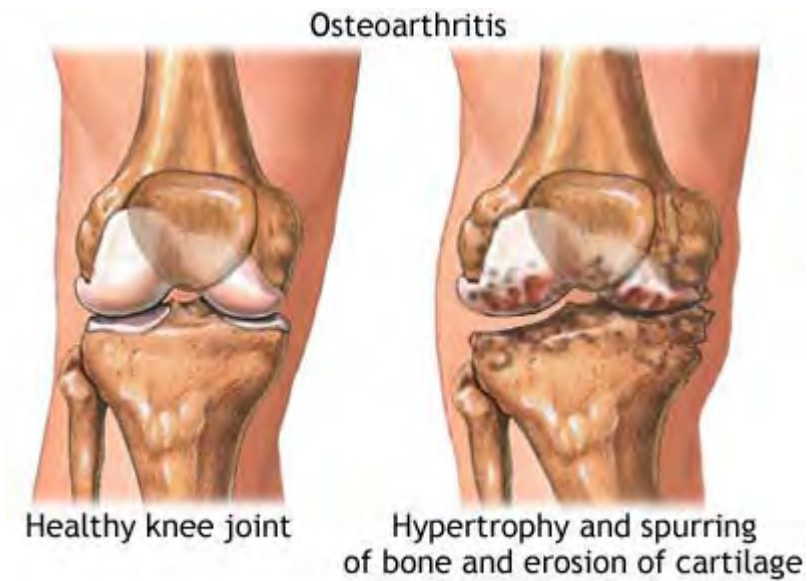
1. อายุ อายุมากมีโอกาสเป็นมากเนื่องจากอายุการใช้งานมาก
2. เพศหญิงจะเป็นโรคข้อเสื่อมมากกว่าผู้ชาย 2 เท่า
3. น้ำหนัก ยิ่งน้ำหนักตัวมากข้อเข่าจะเสื่อมเร็ว
4. การใช้ข้อเข่า ผู้ที่นั่งยองๆ นั่งขัดขัดสมาธิ หรือนั่งพับเพียบนานๆ จะพบข้อเข่าเสื่อมเร็ว
5. การได้รับบาดเจ็บบริเวณข้อ ผู้ที่ได้รับอุบัติเหตุที่ข้อเข่าและแขนไม่ว่าจะกระดูกข้อแตกหรือเอ็นฉีก จะเกิดข้อเสื่อมได้
6. ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อและกระดูก ผู้ที่ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอและได้รับแคลเซียมในปริมาณที่พอเพียงจะชะลอการเสื่อมของข้อตามส่วนต่าง ๆ

2.2.4 อาการของโรคข้อกระดูกอักเสบและเสื่อม

ตำแหน่งที่มีการเกิดอาการข้อกระดูกอักเสบและเสื่อมได้มากที่สุดคือ ข้อต่อหัวเข่า ซึ่งอาการโดยทั่วไปที่พบจะมีการอักเสบ บวม แดง ทำให้ลักษณะของข้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเห็นได้ดังภาพ โดยการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้จากภายนอกนั้นเป็นผลเนื่องจากการงอกของกระดูกนั่นเอง

อาการที่สำคัญได้แก่

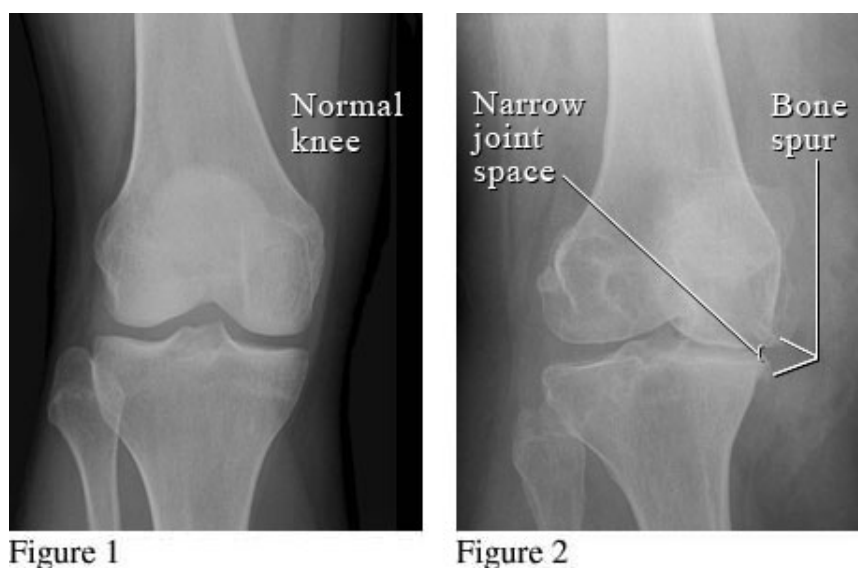
1. อาการปวดข้อ เป็นอาการที่สำคัญเริ่มแรกจะปวดเมื่อยตึงทั้งด้านหน้าและด้านหลังของข้อกระดูก เมื่อเป็นมากขึ้นจะปวดบริเวณกระดูกเมื่อมีการเคลื่อนไหว ลูกนั่งหรือเดินขึ้นบันไดไม่คล่องเหมือนเดิม
2. มีเสียงในข้อ เมื่อเคลื่อนไหวผู้ป่วยจะรู้สึกมีเสียงในข้อและปวด
3. อาการบวม ถ้าข้อมีการอักเสบก็จะเกิดข้อบวม
4. ข้อเข่าโก่งงอ อาจจะโก่งด้านนอกหรือโก่งด้านใน ทำให้ขาสั้นลงเดินลำบากและมีอาการปวดเวลาเดิน
5. ข้อยึดติด ผู้ป่วยจะไม่สามารถเหยียดหรืองอขา แขนได้สุดเหมือนเดิมเนื่องจากมีการยึดติดภายในข้อ



รูปที่ 2.7 ลักษณะภายในและภายนอกของหัวเข่าปกติ (ขวา)
และผู้มีอาการข้อกระดูกอักเสบ (ซ้าย)

2.2.5 การวินิจฉัยโรคข้อกระดูกอักเสบและข้อกระดูกเสื่อม^[13]

ผู้ที่สงสัยว่าน่าจะเป็นโรคข้อเสื่อมคือผู้ที่มีอาการปวดข้อในขณะที่มีการใช้งาน แพทย์จะยืนยันการวินิจฉัยโดยการตรวจร่างกายพบปุ่มกระดูกบริเวณข้อ ข้อบวมขึ้น มีเสียงดังในข้อเมื่อมีการเคลื่อนไหวข้อ กด้ามเนื้อรอบข้อตึบหรืออ่อนแรง และข้อขาดความมั่นคง โดยภาพถ่ายรังสีที่ผิดปกติจะช่วยยืนยันการวินิจฉัยได้แม่นยำขึ้น อย่างไรก็ตามบางรายมีความจำเป็นต้องตรวจเลือดเพิ่มเติมเพื่อวินิจฉัยแยกว่าไม่ได้เป็นโรคอื่นๆ ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากอาการของโรคข้อกระดูกอักเสบและเสื่อมสามารถเห็นได้จากการถ่ายภาพรังสีเอกซ์



รูปที่ 2.8 ภาพถ่ายรังสีเอกซ์ของกระดูกหัวเข่าที่ปกติ (ซ้าย) และมีอาการกระดูกเสื่อม (ขวา)

2.2.6 การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคของผู้สูงอายุ หากเป็นแล้วจะไม่สามารถรักษาให้เหมือนเดิม ดังนั้นการรักษาข้อเสื่อมจึงมีจุดประสงค์เพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวด ป้องกันข้อติด ป้องกันข้อโก่งงอ เป็นต้น เป้าหมายของการรักษาคือ ลดอาการปวดและรักษาการทำงานของข้อให้สามารถใช้งานได้ตามปกติ การรักษาจึงไม่เพียงแค່ให้ยาเพื่อบรรเทาอาการปวดเท่านั้นแต่จะต้องรักษาด้วยการทำกายภาพบำบัดร่วมด้วย สำหรับผู้ที่เป็โรคข้อเสื่อมรุนแรง การรักษาด้วยการผ่าตัดจะมีบทบาทสำคัญเพื่อทำให้การทำงานของข้อดีขึ้นได้

การรักษาแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี

1. การทำกายภาพบำบัด
2. การรักษาโดยการใ้ยา
3. การรักษาโดยการผ่าตัด

2.2.6.1 การรักษาโดยการทำกายภาพบำบัด

การรักษาที่มีหลักฐานชัดเจนว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อมได้แก่ การออกกำลังกายโดยเฉพาะการบริหารกล้ามเนื้อรอบข้อ การใช้อุปกรณ์ช่วยพยุง และการใช้ความร้อนสำหรับการบำบัดด้วยการทำสปา การนวด หรือการฝังเข็มนั้น พบว่าช่วยบรรเทาอาการปวดในระยะสั้นๆ แต่ยังไม่มึหลักฐานพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อม



รูปที่ 2.9 ทำกายบริหารเพื่อลดอาการปวดเจ็บเนื่องจากโรคข้อกระดูกอักเสบและเสื่อม

2.2.6.2 การรักษาโดยการฉายยา

ในปัจจุบันมียาที่ใช้รักษาโรคข้อเสื่อมหลายรูปแบบ ทั้งชนิดทาภายนอก ฉีดเข้าข้อและรับประทาน ยาทาภายนอกได้แก่ เจลที่ทำจากส่วนผสมของพริก หรือ Capsaicin gel รับประทาน ได้แก่ ยาต้านการอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่ยาสเตียรอยด์ ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดและลดอาการข้อบวม สำหรับอาการปวดที่รุนแรงอาจต้องพึ่งยาบรรเทาอาการปวดกลุ่มอนุพันธ์ของมอร์ฟีน สำหรับการฉีดยาสเตียรอยด์หรือน้ำไขข้อเทียม (hyaluronic acid) นั้นจะมีประโยชน์ในโรคข้อเสื่อมบางชนิดและในผู้ป่วยบางรายเท่านั้น

2.2.6.3 การรักษาโดยการผ่าตัด

แพทย์จะพิจารณาผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียมในผู้ป่วยที่มีการทำลายของข้ออย่างมากหรือมีการสูญเสียการทำงานของข้อแล้วเท่านั้น สำหรับอาหารเสริมที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อมซึ่งมีอยู่หลายประเภทนั้น ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานเพียงพอที่จะแสดงถึงประสิทธิภาพ และความปลอดภัยในระยะยาว จากการศึกษาโดยสถาบันวิจัยสุขภาพแห่งชาติ (National Institute of Health) พบว่าการให้คอนดรอยตินซัลเฟตหรือ glucosamine sulfate มีส่วนช่วยรักษาโรคข้อเสื่อมในผู้ที่มีปัญหาปวดข้อปานกลางถึงรุนแรง แต่ยังไม่มีความแน่ชัดถึงความปลอดภัยและปฏิกริยากับยาอื่น ดังนั้นผู้ที่ต้องการใช้สารดังกล่าวร่วมกับยาที่เคยรับประทานอยู่เดิมควรปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกรก่อน

2.2.7 การดูแลตนเองเมื่อเป็นโรคข้อกระดูกอักเสบและข้อกระดูกเสื่อม

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่รักษาไม่หายขาด แต่ผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อมสามารถปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมขึ้นได้ เช่น การปรับเตียงให้สูงขึ้น เปลี่ยนจากส้วมชนิดนั่งยองๆเป็นชักโครกแทน เป็นต้น นอกจากนี้ยังควรหลีกเลี่ยงการทำให้ข้อบาดเจ็บซ้ำๆหรือการกระทบกระแทกต่อข้อ การออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอจะมีส่วนช่วยทำให้กล้ามเนื้อรอบข้อแข็งแรงขึ้น การออกกำลังกายเพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงของกล้ามเนื้อต้นขาจะมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดข้อเข่าเสื่อมได้ นอกจากนี้ผู้ที่มีการลดน้ำหนักลงจะช่วยลดอาการปวดและชะลอการทำลายข้อลงได้

2.3 กระบวนการลดขนาดโมเลกุล (Depolymerization process) ^[2, 3]

กระบวนการลดขนาดโมเลกุลของสารพอลิเมอร์มีหลายวิธีดังนี้

กระบวนการทางเคมี (Chemical Process) วิธีการที่ใช้ได้แก่

- การทำปฏิกริยากับ oxidizing agents เช่น hydrogen peroxide, nitrous acid, sodium peroxide, potassium permanganate และ อนุพันธ์ของ pyridine
- การ de/re-esterification

- การ de/re-amination

- Sulphuration

กระบวนการทางเอนไซม์ (Enzymatic Process) ได้แก่การใช้เอนไซม์ในประเภทต่าง ๆ

เช่น

- การใช้ purified enzymes

- การใช้ crude enzymes

กระบวนการทางรังสี (Radiation Process) วิธีการที่ใช้ได้แก่

- การฉายรังสีแกมมา (Gamma irradiation)

- การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet ray irradiation)

กระบวนการทางเคมี และเอนไซม์เป็นกระบวนการลดขนาดโมเลกุลของคอนครอยทีน ซัลเฟตที่ใช้กันทั่วไปสำหรับในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ซึ่งทั้งสองวิธีนี้มีข้อจำกัดและข้อเสียดังนี้

- ไม่สามารถควบคุมการแตกออกของโมเลกุลและการรักษาให้โครงสร้างที่มี ความสำคัญคงอยู่ได้
- ทำให้ได้โมเลกุลขนาดต่าง ๆ มากมาย
- ทำให้เกิดการรวมตัวของอนุพันธ์ที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ในกระบวนการผลิตได้ใหม่ ซึ่งยากต่อการแยกออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลที่ต้องการ
- ขั้นตอนการทำยุ่งยากเนื่องจากต้องมีการเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปที่เหมาะสม และต้องมีขั้นตอนในการทำสารให้บริสุทธิ์จากสารละลายและเอนไซม์ที่ใช้ใน กระบวนการ
- ค่าใช้จ่ายจากสารละลายต่าง ๆ

ปัจจุบันจึงมีการให้ความสนใจกับการใช้กระบวนการทางรังสีมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีเดิมที่ใช้กันอยู่ ดังนี้

- ไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่าง โดยสามารถใช้สารตัวอย่างที่มีสถานะเป็น ของแข็งได้
- ใช้ได้กับพอลิเมอร์หลากหลายชนิด
- สามารถลดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์และควบคุมให้มีขนาดตามที่ต้องการได้
- การฉายรังสีสามารถทำกับสารตัวอย่างได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้สารละลายหรือ เอนไซม์

- ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการทำสารให้เย็น เนื่องจากทำการฉายกับสารที่มีสถานะเป็นของแข็งโดยตรงจึงไม่มีสารละลายที่จะดูดความร้อนไว้ และไม่มีขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์เนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์อื่นปนในกับสาร
- ไม่มีขั้นตอนอื่น ๆ ที่จะมีผลต่อโครงสร้างของพอลิเมอร์เข้ามาเกี่ยวข้อง
- ไม่มีค่าใช้จ่ายจากสารเคมีและเอนไซม์ต่าง ๆ

คอนดรอยตินซัลเฟตที่พบในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 50,000 - 100,000 Da ซึ่งมีขนาดใหญ่เกินไปไม่สามารถดูดซึมเข้าร่างกายได้โดยตรง ดังนั้นจึงต้องลดขนาดโมเลกุลลงให้เป็นประมาณ 16,900 Da จึงจะดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดี^[7]

2.4 กระบวนการลดขนาดของโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยการฉายรังสีแกมมา (Gamma irradiation)^[14]

2.4.1 ผลเบื้องต้นที่เกิดในพอลิเมอร์ที่ถูกฉายรังสี

ปกติเมื่อมีการดูดกลืนพลังงานรังสีโดยสสารทั่วไปจะเกิดอันตรกิริยาขึ้นทั้งในนิวเคลียสและอิเล็กตรอนในวงโคจร แต่ถ้าพลังงานรังสีนั้นมีค่าต่ำกว่า 10 MeV แล้ว อันตรกิริยาที่เกิดในนิวเคลียสจะมีน้อยมากและคิดว่าไม่เกิดขึ้นได้โดยเฉพาะกับโมเลกุลสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุที่มีอะตอมขนาดเล็ก เช่น H, C, N, O, S เป็นต้น

เมื่อรังสีแกมมาหรือรังสีเอกซ์เกิดอันตรกิริยากับอิเล็กตรอนในวงโคจรจะมีกระบวนการ 3 เกิดขึ้นคือ ผลจากโฟโตอิเล็กตริก กระบวนการกระเจิงแบบคอมพ์ตันและการเกิดคู่ของอิเล็กตรอนบวกและลบ การจะเกิดรูปแบบใดมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับพลังงานของรังสีนั้นและเลขอะตอม (ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนในวงโคจร) ของตัวกลางที่รังสีผ่าน ในทุก ๆ รูปแบบที่เกิดจะได้อิเล็กตรอนทุติยภูมิที่มาจากอะตอมของตัวกลางเสมอ อิเล็กตรอนทุติยภูมิที่ได้จะมีพลังงานมากพอที่จะก่อให้เกิดโมเลกุลข้างเคียงเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นไอออน อิเล็กตรอนและโมเลกุลในภาวะถูกกระตุ้น (excited molecule) ต่อไปได้ในสารอินทรีย์ยังเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุภาคต่าง ๆ เหล่านี้ทั้งหมดจะเป็นอนุภาคหรือหมู่ที่ว่องไว (active species) และชักนำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีต่อไปเป็นลูกโซ่จนกว่าจะรวมกันเองกลายเป็นโมเลกุลเดิมหรือโมเลกุลใหม่ที่เสถียร พอลิเมอร์ที่อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นจะเกิดได้ทั้งจากปฏิกิริยาโดยตรงกับรังสีและจากการรวมตัวของอนุมูลอิสระของพอลิเมอร์กับอิเล็กตรอนที่เกิดจากการไอออไนซ์ ผลที่ได้ซึ่งเป็นโมเลกุลเสถียรในภาวะถูกกระตุ้นสูงจะแตกตัว (dissociate) โดยเกิดสายโซ่ขาดได้อนุมูลอิสระของพอลิเมอร์ 2 สายที่มีโมเลกุลเล็กลง หรือแยก

ออกเป็นอนุโมลอิสระอัลคิล และอนุโมลอิสระไฮโดรเจน โดยผลที่ได้อาจจะทำให้เกิดการดีสพรอพพอร์ชันเป็นโมเลกุลที่เล็กลง 2 สาย หรือรวมตัวกลายเป็นพอลิเมอร์โมเลกุลเดิมที่สะเทิน

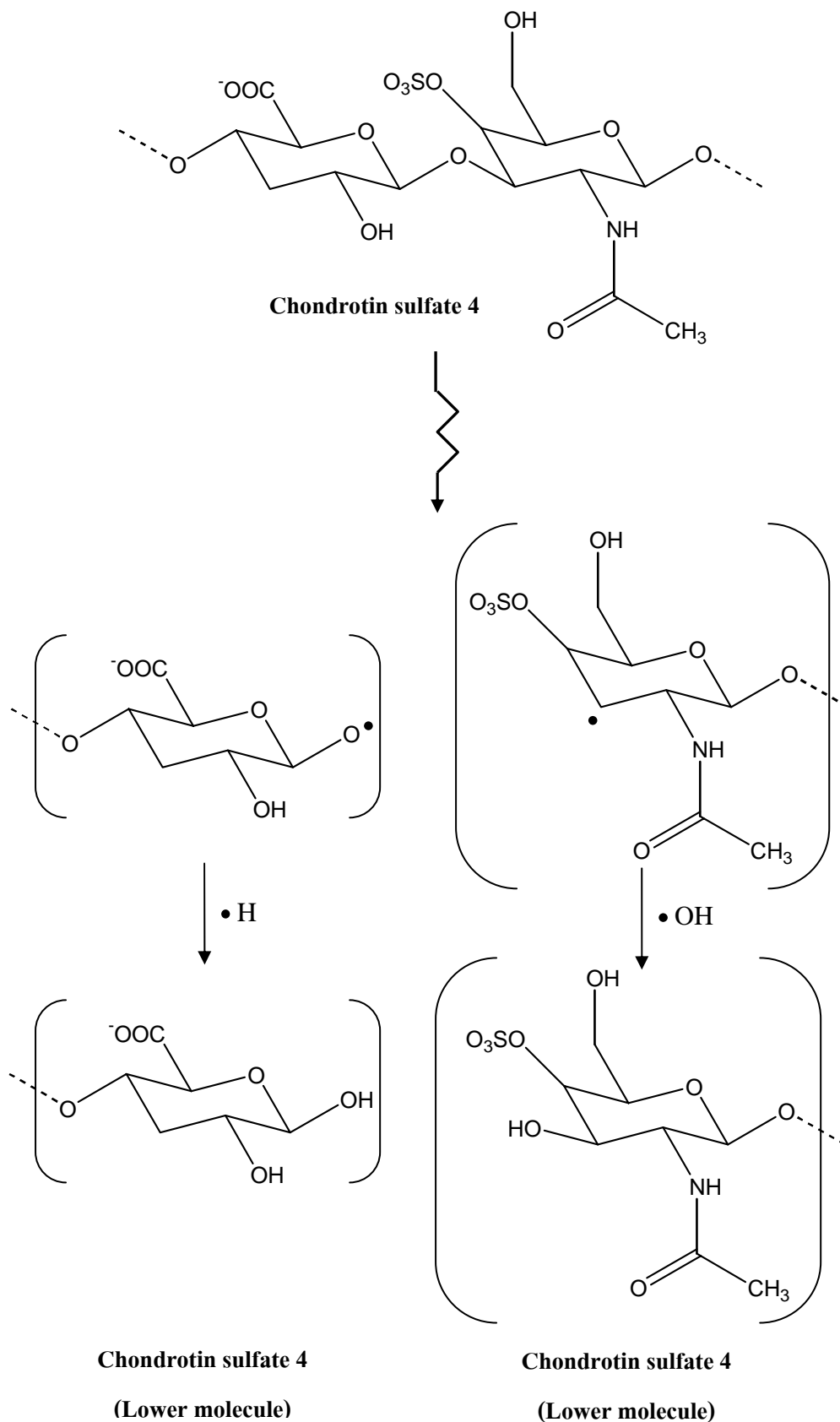
กลไกการเกิดสายโซ่ขาดและเกิดคลอสลิงค์ของโพลีเมอร์โดยรังสีส่วนใหญ่แล้วจะเกิดผ่านกระบวนการที่มีอนุโมลอิสระเป็นตัวชักนำ มีส่วนน้อยที่จะมีการเกิดโดยการชักนำโดยไอออน การที่จะทราบว่ากลไกการเกิดจะเป็นแบบใดจะใช้สารบางชนิดที่จับอนุโมลอิสระได้ดีเติมลงในโพลีเมอร์ ถ้ายังเกิดผลเหมือนเดิมก็แสดงว่ากลไกเป็นแบบชักนำโดยไอออน หรืออาจฉายรังสีที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ ซึ่งอนุโมลอิสระจะไม่เคลื่อนที่ ไม่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาก็ได้

เมื่อทำการฉายรังสีแก่สารพอลิเมอร์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพขึ้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้แก่ การเกิดเชื่อมโยง (Cross-link), การเสื่อมสลาย (Degradation) และการต่อกิ่ง (Grafting) เป็นต้น

สำหรับพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบมีกิ่งก้าน การฉายรังสีจะทำให้ได้พอลิเมอร์นั้น มีขนาดโมเลกุลเล็กลงคอนดรอยทินซัลเฟตเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของGlucoaminoglycan (GAGs) ซึ่งพอลิเมอร์กลุ่มนี้สามารถลดขนาดของโมเลกุลได้ด้วยการฉายรังสี ดังนั้นจึงสามารถลดขนาดโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตได้ด้วยการฉายรังสีเช่นเดียวกัน

เมื่อโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตได้รับรังสีแล้วจะเกิดการดูดกลืนและถ่ายเทพลังงานภายในโมเลกุลก่อนที่จะเกิดการแตกตัวของโมเลกุล โดยทั่วไปแล้วพันธะที่มีความแข็งแรงน้อยที่สุดในโมเลกุลจะเกิดการแตกออกเมื่อได้รับรังสี สำหรับสารประกอบพวก Aldehyde และ Ketone ได้รับรังสีการแตกออกของพันธะระหว่าง C-C จะเกิดน้อยกว่าพันธะ C-O ดังนั้นกลไกในการลดขนาดโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตเมื่อได้รับรังสีที่คาดว่าจะเกิดขึ้นเป็นดังสมการในรูปที่ 2.10

สมการแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา



รูปที่ 2.10 กลไกการเกิดปฏิกิริยาโดยการฉายรังสีแกมมาคือนดรอยทินซัลเฟต

2.5 ปริมาณรังสีที่บ่งถึงผลของรังสีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของสาร (G-Value) ^[14]

ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของสารใดโดยรังสีสามารถทำให้การเปลี่ยนแปลงได้หลายรูปแบบ ได้แก่ เกิดสารใหม่ เกิดอนุมูลอิสระ เกิด Species ใด ๆ หรือการลดลงของสารเดิม การเกิดการเชื่อมโยงของโมเลกุล การแตกของพันธะเคมีใด ๆ การตัดและการเชื่อมโยงของพอลิเมอร์หลังจากฉายรังสีส่งผลต่อคุณสมบัติ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการละลาย สมบัติเชิงกล การวัดสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ สามารถทำได้โดยการติดตามดูการเกิดปฏิกิริยาการตัดและการเชื่อมโยงที่เกิดขึ้นในการฉายรังสีพอลิเมอร์ ในกระบวนการทางรังสี (Radiation Processing) มักใช้ค่า G-Value ซึ่งหมายถึงจำนวนของการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เกิดขึ้นเมื่อมีการดูดกลืนพลังงาน 100 eV ผลของรังสีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบตัดทอนโมเลกุล (G scissor, G_s-value) และแบบเชื่อมโยงโมเลกุล (G crosslink, G_x-value) จึงมีความสำคัญต่อการแสดงถึงความว่องไวของสารพอลิเมอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงด้วยรังสี สำหรับคอนดรอยทินซัลเฟตนั้น เมื่อได้รับปริมาณรังสีแล้วจะทำให้เกิดการตัดทอนโมเลกุลให้มีขนาดเล็กลง ดังนั้นค่า G-Value จึงจำกัดความเป็นค่า G_s-Value (G scissor- Value)

2.5.1 การคำนวณหาค่า G_s-Value

เมื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{M_n}$ กับปริมาณรังสีที่ได้รับ (Adsorbed dose, D) จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ซึ่งแสดงดังสมการ

$$\frac{1}{M_n} = \frac{1}{M_{n,0}} + \frac{G(s) \times D}{100 \times N_A} \quad (1)$$

โดย	$M_{n,0}$	คือ	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนเริ่มต้น
	D	คือ	ปริมาณรังสีที่ได้รับ (Absorbed dose) มีหน่วยเป็นอิเล็กตรอนโวลต์ต่อกรัม
	M_n	คือ	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน
	N_A	คือ	เลขอะโวกาโดร (Avogadro's number)

ดังนั้นเมื่อทราบน้ำหนักโมเลกุลของสารหลังจากการเปลี่ยนแปลงด้วยรังสีก็จะสามารถหาค่า G_s-value ได้ไม่ยาก ค่า G_s-value นี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะของการฉายรังสี ดังนั้นการทราบค่า G_s-value ของคอนดรอยทินซัลเฟตในการทดลองนี้จึงจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการที่จะใช้ในการอ้างอิงและบ่งชี้ถึงความยากง่ายของตัดทอนโมเลกุลของ คอนดรอยทินซัลเฟตด้วยรังสี

2.6 การหาขนาดโมเลกุลของโมเลกุลคอนตรอยทินซัลเฟต

2.6.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ^[14, 15]

จากการที่พอลิเมอร์มีช่วงน้ำหนักโมเลกุลกว้าง คือน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละสายโซ่โมเลกุลไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงหาการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล และหาน้ำหนักโมเลกุลออกมาเป็นค่าเฉลี่ย (Average molecular weight)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ซึ่งจะต้องหาในรูปของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยซึ่งมีอยู่ 2 วิธีก็คือ การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number- average molecular weight) และการหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight –average molecular weight)

2.6.1.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number- average molecular weight)

ถ้าสารพอลิเมอร์หนัก W กรัม ประกอบด้วย

- monomer N_1 มีน้ำหนักโมเลกุล M_1
- dimer N_2 มีน้ำหนักโมเลกุล M_2
- trimer N_3 มีน้ำหนักโมเลกุล M_3
- จนถึง imer N_i มีน้ำหนักโมเลกุล M_i

และให้ \overline{M}_n เป็นน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน

N เป็นจำนวนโมเลกุลทั้งหมด ซึ่งเท่ากับ $\sum N_i$ ดังนั้นความสัมพันธ์จะเป็น

$$N\overline{M}_n = \sum N_i M_i = N_1 M_1 + N_2 M_2 + N_3 M_3 \dots + N_i M_i$$

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{N} = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (2)$$

2.6.1.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight –average molecular weight)

ถ้าสารพอลิเมอร์หนัก W กรัม ประกอบด้วย

- monomer N_1 มีน้ำหนักโมเลกุล M_1
- dimer N_2 มีน้ำหนักโมเลกุล M_2
- trimer N_3 มีน้ำหนักโมเลกุล M_3
- จนถึง imer N_i มีน้ำหนักโมเลกุล M_i

และให้ \overline{M}_w เป็นน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก

$$W\bar{M}_w = \sum w_i M_i = w_1 M_1 + w_2 M_2 + w_3 M_3 \dots + w_i M_i$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum w_i M_i}{W} = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i} \quad (3)$$

เมื่อ $w_i = \frac{N_i M_i}{N_0}$

และ N_0 คือ เลขอโวกาโดร = 6.02×10^{23}

ได้

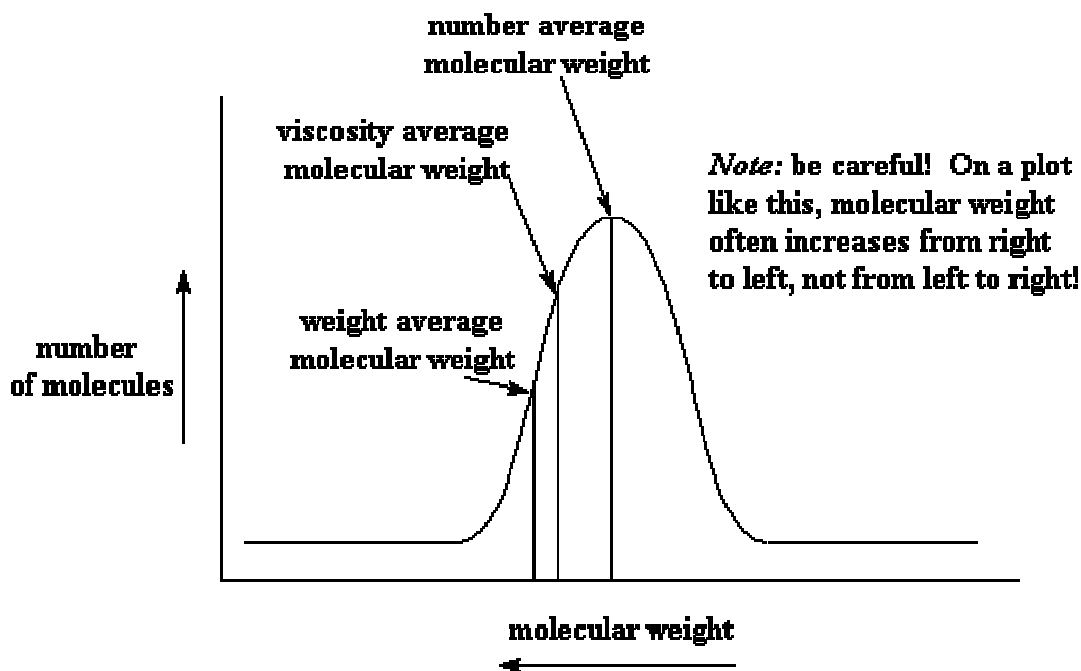
$$\bar{M}_w = \frac{\sum \left(\frac{N_i M_i}{N_0} \right) M_i}{\sum \left(\frac{N_i M_i}{N_0} \right)}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum (N_i M_i^2)}{\sum (N_i M_i)} \quad (4)$$

ในกรณีที่ใช้วิธีวัดความหนืดมาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย จะได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย จากความหนืด (Viscosity –average molecular weight) : \bar{M}_v คำนวณได้จาก

$$\bar{M}_v = \left(\frac{\sum N_i M_i^{1+a}}{\sum N_i M_i} \right)^{1/a} \quad (5)$$

เมื่อ a เป็นค่าคงที่ ของแต่ละระบบซึ่งได้จากการทดลอง และถ้า $a = 1$, \bar{M}_v จะเท่ากับ \bar{M}_w โดยทั่วไปค่า a จะอยู่ในช่วง 0.5-0.8 ดังนั้นค่า \bar{M}_v จะน้อยกว่า \bar{M}_w และมากกว่า \bar{M}_n เสมอเว้นแต่พอลิเมอร์มีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลน้อย ค่า \bar{M}_v , \bar{M}_w , และ \bar{M}_n จะใกล้เคียงกัน แผนภาพแสดงการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ตามน้ำหนักโมเลกุล ชนิดต่าง ๆ เป็นดังนี้



รูปที่ 2.11 การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลตามลำดับของน้ำหนักโมเลกุลชนิดต่าง ๆ

2.7 การทดสอบยืนยันและการวัดขนาดโมเลกุลของโมเลกุลของสารพอลิเมอร์^[16, 17]

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารและวัสดุพอลิเมอร์ถือว่าเป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการอธิบายคุณสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ โดยทั่วไปแล้วการพิสูจน์เอกลักษณ์จะทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

1. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้ เทคนิค Gel permeation chromatography, Light scattering, Osmometry, Viscometry, หรือ Mass spectroscopy เป็นต้น
2. การหาลำดับของหน่วยซ้ำ โดยการใช้ NMR spectroscopy
3. การวิเคราะห์หน่วยสุดท้ายโดยการใช้การไทเทรต, NMR spectroscopy หรือ FT-IR spectroscopy
4. การทดสอบความบริสุทธิ์โดยการใช้ NMR spectroscopy, elemental analysis และ FT-IR spectroscopy

ปัจจุบันนี้ไม่มีเทคนิคใดเทคนิคหนึ่งที่สามารถทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารตัวอย่างพอลิเมอร์ด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ข้างต้นได้ทั้งหมดทีเดียว

2.7.1 การทดสอบยืนยันด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy^[18, 19, 20]

การทดสอบยืนยันพอลิเมอร์ที่สกัดหรือเตรียมได้นั้น สามารถทำได้ง่ายโดยการทำการทดสอบเทียบกับสารมาตรฐาน หรือข้อมูลพื้นฐานที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว

Infrared (IR) Spectroscopy เป็นหนึ่งในเทคนิค Spectroscopic ทั่วๆ ไปที่ใช้ในทางเคมีอินทรีย์และ เคมีอนินทรีย์ โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ หรืออาจเรียกได้ว่าเป็น ลายพิมพ์โมเลกุล

IR Spectroscopy สามารถแยกได้เป็น 2 ประเภท คือ Dispersive Infrared Spectroscopy และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy โดย FTIR จะเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมากกว่า

การดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิศูนย์องศาสมบูรณ์ อะตอมทุกตัวในโมเลกุลจะมีการสั่นตลอดเวลา เมื่อความถี่ของการสั่นมีค่าเท่ากับความถี่ของรังสีอินฟราเรดที่ฉายมายังโมเลกุล โมเลกุลก็จะดูดกลืนรังสี จำนวนแถบการดูดกลืนทั้งหมดที่สังเกตได้จะมีค่าไม่เท่ากับการสั่นมูลฐานของโมเลกุลทั้งหมด โดยจะมีค่าลดลง ทั้งนี้เพราะจะมีบางแถบพลังงานที่ไม่มีการตอบสนองต่อพลังงานในช่วงรังสีอินฟราเรด

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน Infrared Spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล ทั้งที่เป็นของแข็ง ของเหลว และแก๊ส รวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด เทคนิค FTIR นี้มีความไวสูงและใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ

ส่วนประกอบของ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

ในระบบ FTIR มีส่วนประกอบหลักด้วยกัน 3 ส่วน คือ แหล่งกำเนิดรังสี, Interferometer และเครื่องตรวจวัด

แหล่งกำเนิดรังสีของ FTIR เป็นสารเชื้อเพลิงที่ถูกทำให้ร้อนจนมีอุณหภูมิ 1,000-1,800 องศาเซลเซียส สารที่นิยมใช้ ได้แก่ เนินสต์ โกลเวอร์ (Nernst Glower) ซึ่งประกอบด้วยออกไซด์ของพวกธาตุหายาก (rare earth oxides), โกลบาร์ (Globar) เป็นแท่งซิลิกอนคาร์ไบด์ และขดลวดนิโครม (Nichrome Coil) ซึ่งสารทั้งสามจะให้รังสีที่ต่อเนื่องแต่มีพลังงานที่แตกต่างกัน สำหรับตัวแยกรังสีของ FTIR จะเป็น Interferometer โดย Interferometer จะแยกลำรังสีออก ทำให้เกิด Path

difference ระหว่างลำแสง แล้วทำการรวมสัญญาณการแทรกสอดซึ่งเป็นฟังก์ชันกับ Path difference โดยเครื่องตรวจวัด

เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับ FTIR คือ Deuterated Triglycine Sulfate (DTGS) และ Mercury Cadmium Telluride (MCT) โดย DTGS เป็นเครื่องตรวจวัดประเภท Pyroelectric ที่สามารถส่งสัญญาณการตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว โดยจะทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ สำหรับ MCT เป็นเครื่องตรวจวัดโฟตอนซึ่งขึ้นกับ quantum nature ของรังสี และให้ผลการตอบสนองที่รวดเร็วมก ขณะที่ DTGS ทำงานที่อุณหภูมิห้อง แต่ MCT จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลว (77 เคลวิน) ซึ่งโดยทั่วไป MCT จะเร็วกว่าและมีความไวมากกว่า DTGS

หลักการการทำงานของ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

การทำงานของ Fourier Transform Infrared Spectroscopy เริ่มจากรังสีอินฟราเรดจากแหล่งกำเนิดจะถูกฉายไปยัง Interferometer ซึ่งตัวที่นิยมใช้ คือ Michelson Interferometer ซึ่งประกอบด้วยกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ กระจกที่ตรึงอยู่กับที่ โดยทั้งสองตั้งฉากซึ่งกันและกัน และตัวแยกแสงซึ่งเป็นอุปกรณ์กึ่งสะท้อนแสง โดยส่วนใหญ่ทำมาจากการนำฟิล์มบางของเจอร์มาเนียมวางลงบน KBr

ที่ตัวแยกแสง ลำรังสีครึ่งหนึ่งจะทะลุผ่านไปยังกระจกที่ตรึงอยู่กับที่ และอีกครึ่งหนึ่งจะสะท้อนไปยังกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นลำรังสีก็จะสะท้อนจากกระจกกลับมา รวมกันที่ตัวแยกแสง เกิดการแทรกสอดขึ้น หลังจากนั้นลำรังสีก็จะผ่านไปยังตัวอย่าง และในที่สุดก็จะตกลงบนเครื่องตรวจวัด

Path difference ระหว่างลำรังสีที่ถูกแยกออกเกิดขึ้นจากระยะทางสัมพัทธ์ระหว่างกระจกทั้งสอง ถ้าแขนยึดกระจกทั้งสองข้างของ Interferometer ยาวเท่ากัน ลำรังสีทั้งสองก็จะเดินทางด้วยระยะทางที่เท่ากัน มีเฟสตรงกัน ทำให้สัญญาณที่ไปถึงเครื่องตรวจวัดมีค่ามากที่สุด เมื่อกระจกเคลื่อนที่เป็นระยะทาง $\lambda/4$ ระยะทางเดินของรังสีจะเปลี่ยนเป็น $\lambda/2$ รังสีทั้งสองมีเฟสต่างกัน 180 องศา การแทรกสอดจะอยู่ในตำแหน่งหักล้าง เมื่อเคลื่อนกระจกเป็นระยะทางอีก $\lambda/4$ ระยะทางเดินของรังสีจะเปลี่ยนเป็น λ รังสีทั้งสองลำจะกลับมามีเฟสตรงกัน

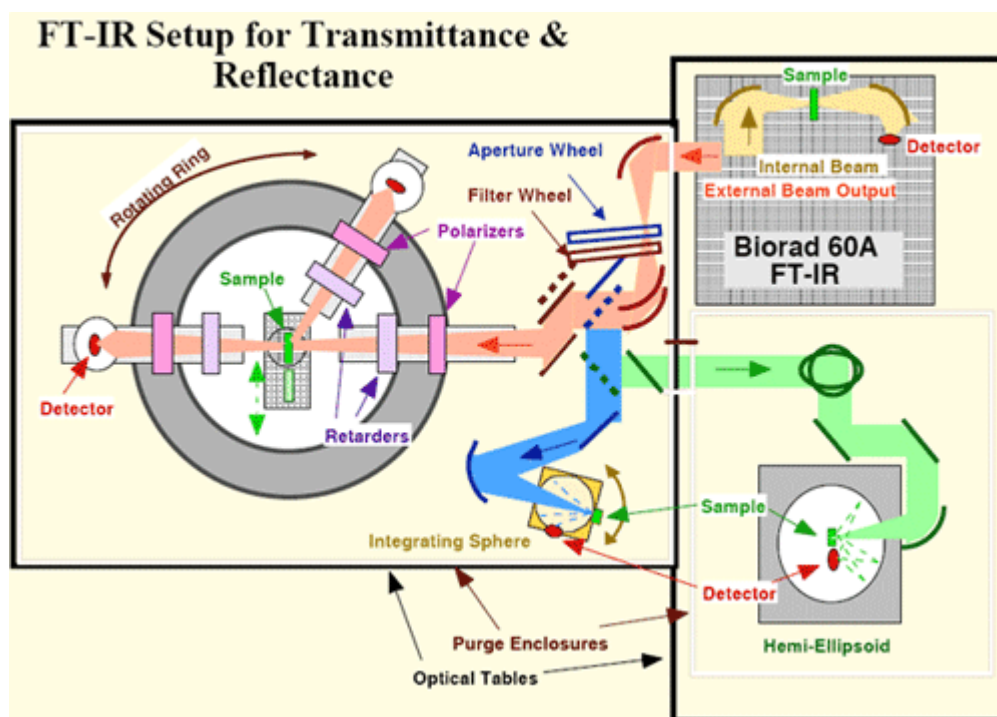
เมื่อกระจกเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ ความเข้มของสัญญาณที่เครื่องตรวจวัดได้จะมีลักษณะของ Interferogram เป็นรูปคลื่น sine โดยกราฟจะพล็อตระหว่างการตอบสนองที่เครื่องตรวจวัดบันทึกได้และเวลาที่กระจกมีการเคลื่อนที่ ถ้าตัวอย่างเกิดการดูดกลืนรังสีที่ค่าความถี่นี้ ขนาดของแอมพลิจูด จะลดลงโดยสัมพันธ์กับปริมาณของตัวอย่าง หลังจากนั้นใช้ Fourier Transform ซึ่งเป็นฟังก์ชันทางคณิตศาสตร์ในการแปลงผลที่ได้ (ขึ้นกับเวลา) ให้กลายเป็น

ค่าความเข้มกับความถี่ การได้มาซึ่งข้อมูลของเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy เป็นดังนี้



รูปที่ 2.12 การเปลี่ยนแปลงข้อมูลของเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy

นอกจากนี้ขั้นตอนการทำงานและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy สามารถสรุปออกมาได้ดังนี้



รูปที่ 2.13 แผนผังแสดงส่วนประกอบของ Fourier Transform Infrared Spectrometer

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี FTIR

ตัวอย่างหลายๆ ชนิดสามารถให้สเปกตรัมในช่วงอินฟราเรด ไม่ว่าจะเป็ของแข็งของเหลว หรือแก๊ส แต่อย่างไรก็ตามวัสดุอีกหลายชนิดที่ไม่ยินยอมให้รังสีอินฟราเรดทะลุผ่านจึงต้องทำการละลายในสารที่ยินยอมให้รังสีทะลุผ่าน นอกจากนี้อาจใช้วิธีการตรวจวัดการสะท้อนหรือการแผ่ของสเปกตรัมจากตัวอย่างเหล่านี้ได้โดยตรง

เซลล์สำหรับใส่ของเหลวใช้บรรจุตัวอย่างที่เป็นของแข็งซึ่งถูกละลายด้วยตัวทำละลายที่ยินยอมให้รังสีอินฟราเรดทะลุผ่าน โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 4000-1330 cm^{-1} และคาร์บอนไดซัลไฟด์ ซึ่งอยู่ในช่วง 1330-625 cm^{-1} สารทั้งสองนี้มีความเป็นพิษสูง ดังนั้นจึงต้องใช้อย่างระมัดระวัง หรืออาจใช้เตตระคลอโรเอทิลีน หรือเมทิลคลอไรด์ ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่ามาแทนที่คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และแทนที่คาร์บอนไดซัลไฟด์ด้วย n-hexane หรือ n-heptane ส่วนสารที่มีขั้ว เช่น น้ำ หรือแอลกอฮอล์ จะไม่นิยมนำมาใช้เป็นตัวทำละลายเพราะจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่นกลางอย่างรุนแรง และมีปฏิกิริยากับ alkali-metal halides เช่น โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมักจะใช้ทำเซลล์และ window ดังนั้น ตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายจึงต้องใช้เซลล์ชนิดพิเศษ เช่น BaF₂, AgCl หรือ KRS-5 (สารผสมระหว่างแกลเลียมโบรไมด์และแกลเลียมไอโอไดด์) และตรวจวัดด้วย attenuated total reflectance (ATR) accessories

โดยทั่วไปการวิเคราะห์สารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.05-10 จะใช้เซลล์ที่มีความหนา 0.1-1 มิลลิเมตร ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์มักจะใช้เซลล์ที่มีความหนา 0.01-0.025 มิลลิเมตร

ผลึกเกลือที่อยู่บนวัสดุที่ยินยอมให้อินฟราเรดทะลุผ่านถูกนำมาใช้กับตัวอย่างที่เป็นของเหลวที่ระเหยหรือไม่ระเหย โดยแผ่นของโซเดียมคลอไรด์ จะเป็นวัสดุที่นิยมใช้มากที่สุด โดยเฉพาะสำหรับของเหลวที่ไม่ละลายน้ำ ในขณะที่แผ่นผลึกซิลเวอร์คลอไรด์ หรือแบเรียมฟลูออไรด์จะนิยมใช้สำหรับสารละลายหรือตัวอย่างที่มีปฏิกิริยากับโซเดียมคลอไรด์ ตัวอย่างจะถูกหยดลงระหว่างแผ่นผลึกเกลือสองแผ่นจนเกิดเป็นฟิล์มที่มีความหนาประมาณ 0.01 มิลลิเมตร แผ่นเกลือทั้งสองจะติดกันด้วยแรงแคปิลารีหรือถูกหนีบไว้ด้วย screw-tightened holder หรือยึดไว้ด้วย o-ring supported holder หรืออาจจะใช้วิธีหลอมด้วยอุณหภูมิที่เป็นจุดหลอมเหลวของของแข็งที่มีจุดหลอมเหลวต่ำแล้วหยดลงบนแผ่นผลึกเกลือ

การอัดตัวอย่างเหมาะสำหรับตัวอย่างของแข็งที่หลอมเหลวหรือละลายได้ยาก ตัวอย่างปริมาณเล็กน้อย (0.5-1.0 มิลลิกรัม) ผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์แห้ง หรือ alkali halide ชนิดอื่นๆ ประมาณ 100 มิลลิกรัม สารผสมจะถูกอัดลงบนแผ่น transparent disk ที่ความดันสูง เพื่อไม่ให้เกิดผลจากการกระเจิงรังสีตัวอย่างจะต้องมีขนาดไม่เกิน 2 ไมครอน สเปกตรัมที่ได้จาก

เทคนิคนี้จะอยู่ในช่วงระหว่าง $3450-1640\text{ cm}^{-1}$ โดยลักษณะของเซลล์สำหรับอัดสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งมีลักษณะดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.14 เซลล์สำหรับใส่สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

การบดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ตัวอย่างประมาณ 1-5 มิลลิกรัมจะถูกบดแล้วทำการหยด mineral oil หรือที่เรียก Nujol หรือสารอื่นๆ เช่น Fluorolube , hexachlorobutadiene ลงไป 1-2 หยด แล้วทำการบดต่อจนเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อที่จะให้ได้แถบสเปกตรัมทั้งหมดจึงต้องใช้สารต่างๆ เหล่านี้หลายชนิดเพราะสารแต่ละตัวจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความยาวคลื่นต่างๆ กัน

เซลล์สำหรับก๊าซจะใช้กับตัวอย่างที่เป็นก๊าซหรือของเหลวที่มีจุดเดือดต่ำ เซลล์ประเภทนี้สามารถเพิ่มระยะทางเดินของรังสีจากเพียงไม่กี่เซนติเมตรไปจนถึง 120 เมตร ได้โดยการสะท้อนรังสีอินฟราเรดด้วยกระจกที่ติดอยู่ตรงปลายของเซลล์เข้าไปซ้ำมา เพื่อให้ได้สเปกตรัมที่เหมาะสม ความดันของแก๊สจะขึ้นกับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างและระยะทางเดินของรังสี โดยทั่วไปค่าความดันจะอยู่ที่ 50 ทอร์ ที่ระยะทาง 10 เซนติเมตร

ข้อดี-ข้อจำกัดของการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย FTIR

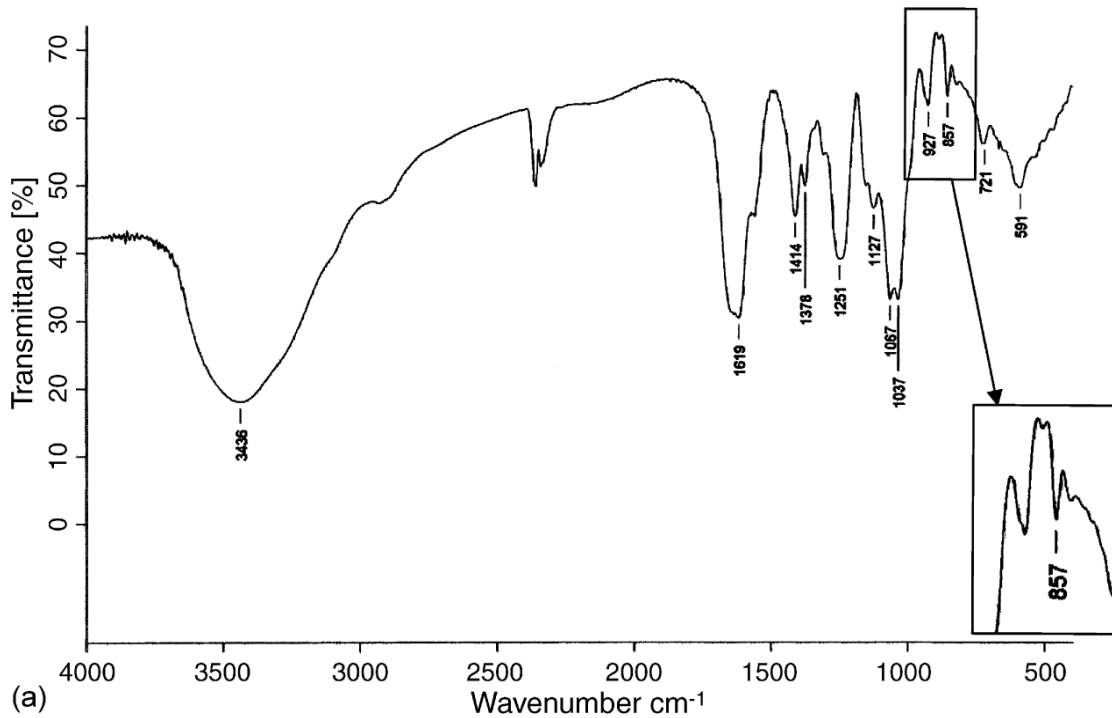
FTIR ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและมีความไวสูง (โดยส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 1-5 นาที) โดยมีอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise; S/N) ต่ำ อัตรา S/N จะแปรผันกับรากที่สองของปริมาณสัญญาณที่ตรวจวัดได้ทั้งหมด ความไวของเครื่องตรวจวัดสามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยการเพิ่ม S/N ร่วมกับการเพิ่มจำนวนรอบของแสง มีการใช้ circular optical aperture แทนที่ entrance slit ทำให้ลำรังสีมีขนาดมากกว่าแบบ Dispersive ถึง 75-100 เท่า มีกำลังแสงสูงขึ้น เหมาะสำหรับตัวอย่างหรือเทคนิคบางเทคนิคที่มีข้อจำกัดของกำลังแสง นอกจากนี้ FTIR ยังให้ประสิทธิภาพในการแยกสูงรวมทั้งมีความถูกต้องไม่ต่ำกว่า 0.01 cm^{-1} มีกลไกการทำงานที่ง่าย แต่ FTIR มีข้อจำกัดในการเตรียมตัวอย่างบางเทคนิคที่

ต้องใช้สารละลายที่ยินยอมให้รังสีทะลุผ่านและตัวอย่างจะต้อง active ในช่วงอินฟราเรด นอกจากนี้ เครื่องมือที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูงและมีค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาสูง

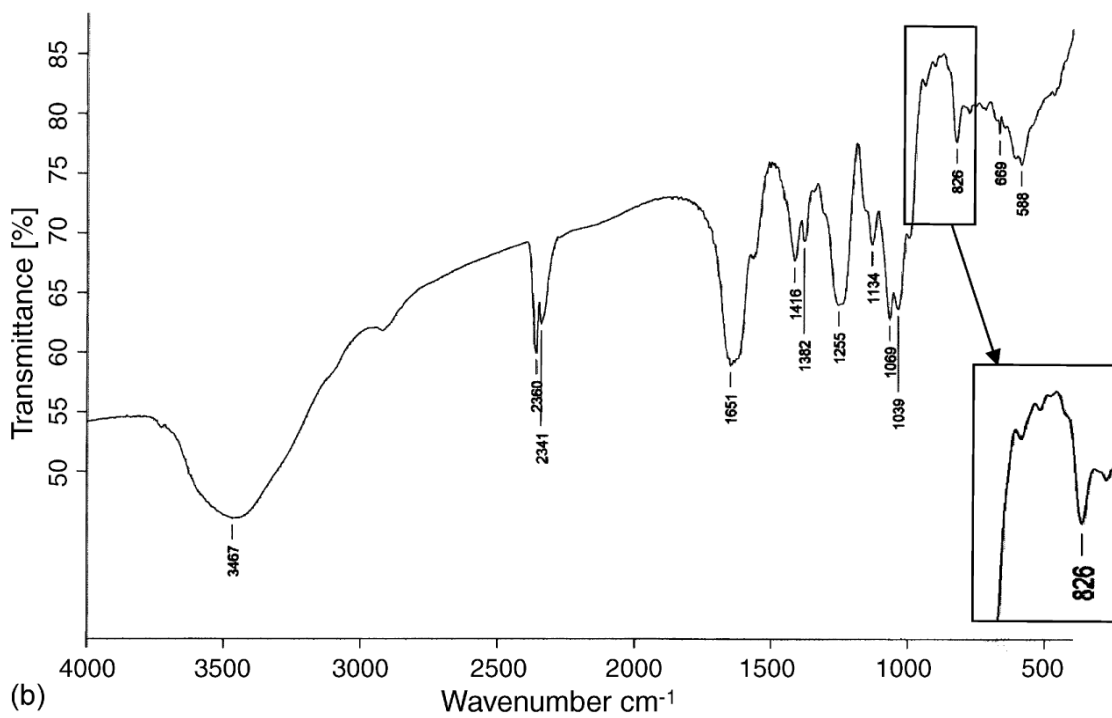
การประยุกต์ใช้งาน

โดยทั่วไป IR/FTIR นั้นจะใช้ในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ทุกประเภทและ สารประกอบ อินทรีย์ บางประเภท รวมถึงหมู่ฟังก์ชันในสารตัวอย่าง เช่น อินทรีย์วัตถุ สี โลหะ โพลีเมอร์ พลาสติก เรซิน สารเคลือบ ยา ยาฆ่าแมลง หรือสารปนเปื้อน เป็นต้น โดยทำการจับคู่สเปกตรัมของสารประกอบที่ต้องการเข้ากับสเปกตรัมอ้างอิง IR/FTIR ยังใช้ในการตรวจวัดโครงสร้างและสัณฐานของไอโซเมอร์ ใช้ในการบ่งบอกองค์ประกอบของสารที่เป็นตัวเกิดปฏิกิริยาหรือใช้ในการศึกษาการเคลื่อนไหวของปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบปริมาณของสารผสม สารที่ไม่บริสุทธิ์หรือสารที่เติมเข้าไปประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ และในบางกรณีนั้นสามารถตรวจสอบได้ต่ำถึง 0.01 เปอร์เซ็นต์

สำหรับคอนดรอยตินซัลเฟตเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่ง การพิสูจน์ยืนยันผลการสกัดและชนิดของคอนดรอยตินซัลเฟตจึงสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy มีงานวิจัยก่อนในอดีตของ Hidemitsu Uchisawa และคณะ และของ รศ. ดร. วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษและคณะได้ทำการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนของสัตว์ชนิดต่าง ๆ แล้วทำการทดสอบยืนยันด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy โดยใช้ KBr เป็นตัวประสาน หลังจากนั้นได้ทำการยืนยันชนิดของคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยตำแหน่งของสเปกตรัม โดย คณะของ Hidemitsu Uchisawa และคณะของ รศ. ดร. วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ^[1] ใช้สเปกตรัมที่ตำแหน่ง $854.5, 857 \text{ cm}^{-1}$ ในการยืนยัน Chondroitin-4-sulfate และที่ตำแหน่ง $823.7, 826 \text{ cm}^{-1}$ ในการยืนยัน Chondroitin-6-sulfate ตามลำดับ โดยลักษณะสเปกตรัมของสารมาตรฐาน Chondroitin-4-sulfate, และ Chondroitin-6-sulfate เป็นไปตามรูป 2.14 (a) และ (b) ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้ตำแหน่งและลักษณะของสเปกตรัมดังกล่าวในการยืนยันชนิดของคอนดรอยตินซัลเฟตได้



(a)



(b)

รูปที่ 2.15 ภาพแสดงสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ของสารมาตรฐาน

Chondroitin-4-sulfate (a) และ Chondroitin-6-sulfate (b)

2.7.2 การวัดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์

เนื่องจากพอลิเมอร์เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กันการระบุขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ จึงระบุเป็นค่าเฉลี่ย สมบัติต่าง ๆ ทางกายภาพของสารละลายพอลิเมอร์มีส่วนสำคัญในการเลือก วิธีการหาน้ำหนักโมเลกุล สมบัติของพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ในการหาขนาดโมเลกุลได้แก่ ความหนืด

ของสาร(Viscosity), หมู่ฟังก์ชัน, คุณสมบัติคอลลิกทีฟ (Colligative property), การกระจายแสง (Light scattering) เป็นต้น

สำหรับวิธีการที่ใช้ในการหาขนาดโมเลกุลมีหลายวิธี ซึ่งปัจจุบันมีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ที่นำสมัยเพื่อใช้ในการหาขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์มากมาย ได้แก่ Viscometer, Gel Permeation Chromatography (GPC), Laser Light Scattering (LAS), Gel Electrophoresis (GE), Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Capillary Electrophoresis (CE), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นต้น

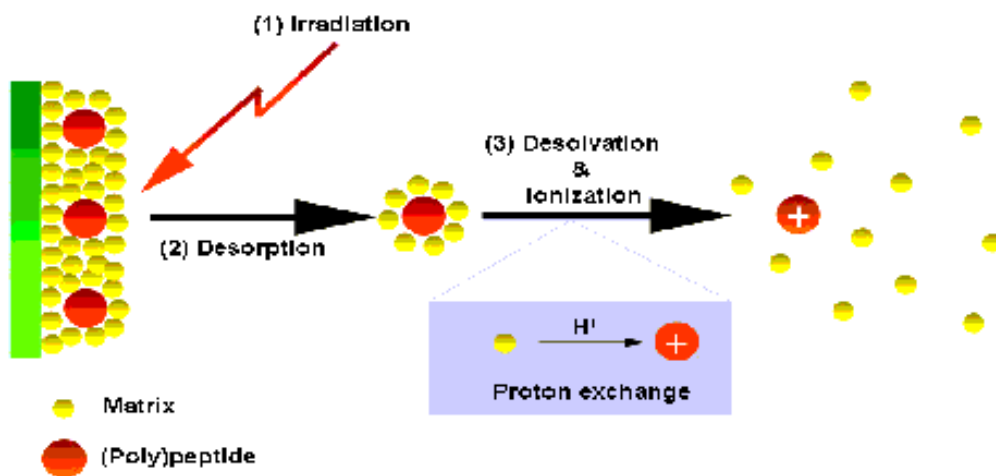
การใช้ Viscometer เป็นวิธีการเดียวที่ใช้เครื่องมือน้อย ไม่ยุ่งยากสามารถจัดเตรียมขึ้นมาใช้งานได้เอง แต่ค่าที่ได้นั้นจะเป็นค่าเทียบเคียง ซึ่งอาจจะมีผลผิดพลาดเกิดขึ้นได้มาก จึงนิยมใช้เครื่องมือชนิดอื่นที่มีความแม่นยำและให้ค่าสัมบูรณ์มากกว่า

2.7.2.1 การวัดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิคร่วม Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry^[22, 23]

การใช้เทคนิคร่วม Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพอย่างมากในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ลำดับของหน่วยซ้ำ และความบริสุทธิ์ ซึ่งผลที่ได้จะมีความถูกต้องสูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นมาก

Mass Spectrometry (MS) เป็นเทคนิคมีการนำมาใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 50 ปี แต่การนำเทคนิค MS มาใช้วิเคราะห์ชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์ จะมีข้อจำกัดอย่างมาก เนื่องจากสารเหล่านี้มีความสามารถในการกลายเป็นไอต่ำ และความเสถียรต่อความร้อนต่ำ เทคนิค MALDI-MS สามารถใช้ในการวัดชีวโมเลกุลและพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีขนาดใหญ่ถึง 200 kDa ได้ โดยใช้หลักการของการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน (ionization) และการทำให้กลายเป็นไอ (Vaporization) โดยไม่ทำให้สารเกิดการเสื่อมสลาย เทคนิค MALDI นั้นขึ้นอยู่กับ การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตของตัวกลาง โดยที่พอลิเมอร์จะถูกผสมเข้ากับตัวกลาง โดยตัวทำละลายจะทำหน้าที่ป้องกันการรวมตัวกันของพอลิเมอร์ จากนั้นสารตัวอย่างในตัวกลางจะถูกนำไปวางบน probe tip ในเครื่อง ภายใต้สภาวะสุญญากาศตัวทำละลายจะถูกกำจัดออก เหลือไว้แต่เพียงผลึกของโมเลกุลพอลิเมอร์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน แยกออกจากโมเลกุลของตัวกลาง จากนั้นลำของแสงเลเซอร์ที่มีความถี่หนึ่งจะฉายเทลงงานให้กับสารตัวกลางและทำให้เกิดการกลายเป็นไอขึ้นบางส่วน ทำให้พอลิเมอร์กลายเป็นไอและเกิดการแตกตัวเป็นประจุ การเพิ่มความถี่การยิงแสงเลเซอร์จะช่วยปรับปรุงเพิ่ม signal-to-noise ratio and the

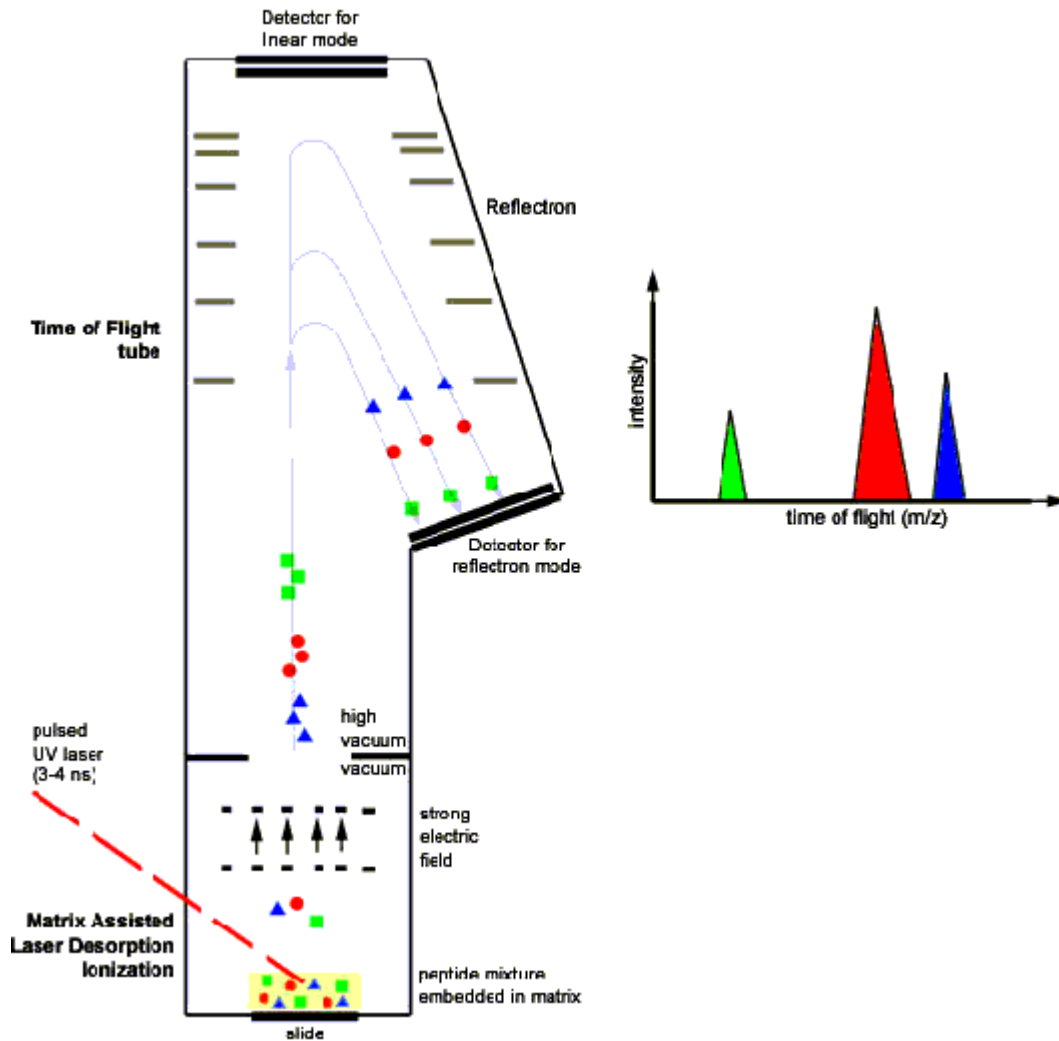
peak shapes ซึ่งจะเพิ่มความถูกต้องของการวัดน้ำหนักโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงของสารและตัวกลางเมื่อได้รับพลังงานจากเลเซอร์เป็นดังรูปที่ 2.15



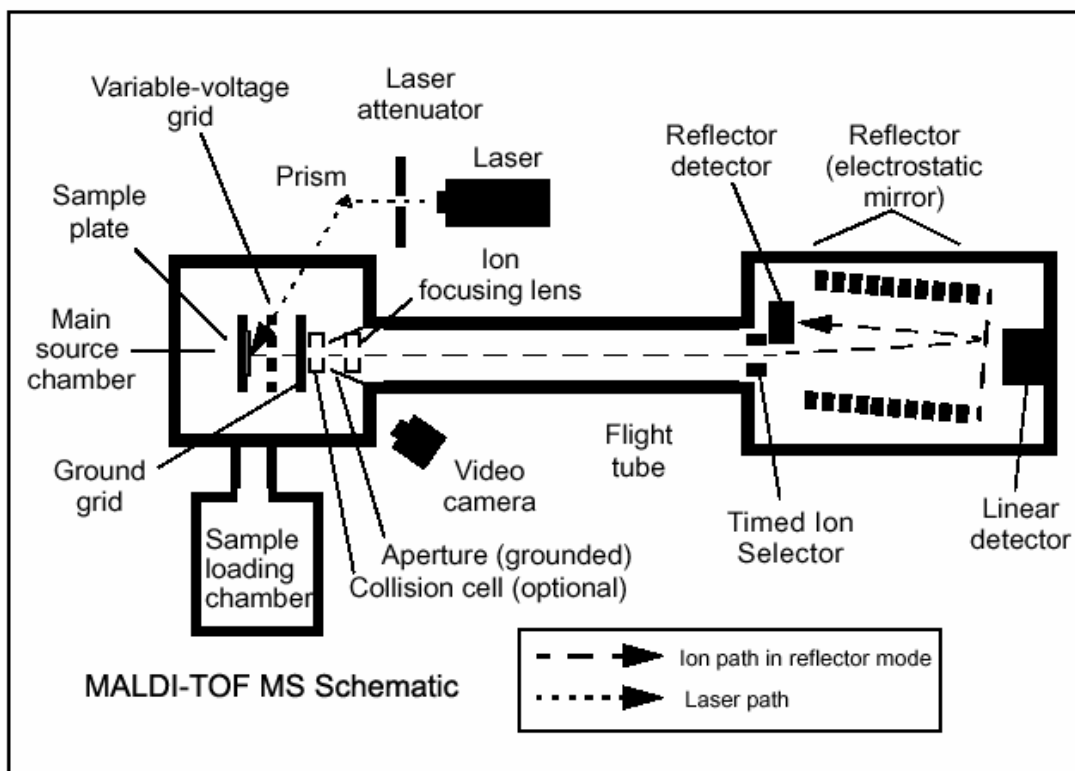
รูปที่ 2.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสารและตัวกลางเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการตรวจวัดมวลโมเลกุลของอิออนอิสระในสภาวะสุญญากาศสูง ซึ่งวิธี MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) จะสามารถตรวจวัดสารที่มีโมเลกุลใหญ่อย่างเช่น โปรตีน ได้โดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อยในระดับ picomole เทคโนโลยี MALDI ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางชีวเคมีเป็นจำนวนมาก โดยสามารถตรวจวัดเพื่อหาจุดที่เหมาะสมของการย่อยด้วยเอนไซม์, การวินิจฉัยโปรตีน, หรือการใช้สำหรับควบคุมคุณภาพในการสังเคราะห์เปปไทด์ เป็นต้น วิธี MALDI ถูกใช้เป็นวิธีสำหรับการทำ N-terminal และ C-terminal protein/peptide sequencing อีกทั้งยังสามารถใช้ได้กับการ Conformation อย่างรวดเร็วของ post translational modifications และการ quantitation ของยา และ chelators ซึ่งจะ conjugated ต่อกับ monoclonal antibodies ได้ TOF/TOF หรือ MS/MS เป็นเทคนิคพิเศษที่ถูกออกแบบมาให้ใช้กับเครื่อง Bruker Auto flex II TOF/TOF mass spectrometer ซึ่งสามารถแยก full fragment ion spectra ได้ภายในหนึ่งช่วงสแกน ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์และปริมาณตัวอย่างที่จะต้องใช้ลงไปได้เป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับวิธี segmented FAST spectra with corresponding reduced reflector potentials หลักการพื้นฐานของ TOF/TOF or MS/MS ก็คือการ boost ความต่างศักย์ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่ม kinetic energy ให้กับ parent ion และ fragmented ion ซึ่งจะสามารถตรวจพบได้ทั้ง parent ion และ

fragmented ion ได้พร้อมกัน วิธีนี้จะสามารถวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนในชิ้นส่วนของเปปไทด์ หรือโปรตีนได้ โปรตีน พอลิเมอร์ สารประกอบอินทรีย์สังเคราะห์ อีกทั้งยังใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ในระดับ 1 – 100 kDa ได้ แผนภาพแสดงการทำงานของพื้นฐานของเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นดังภาพ และส่วนประกอบของเครื่อง MALDI-TOF MS เป็นดังภาพ

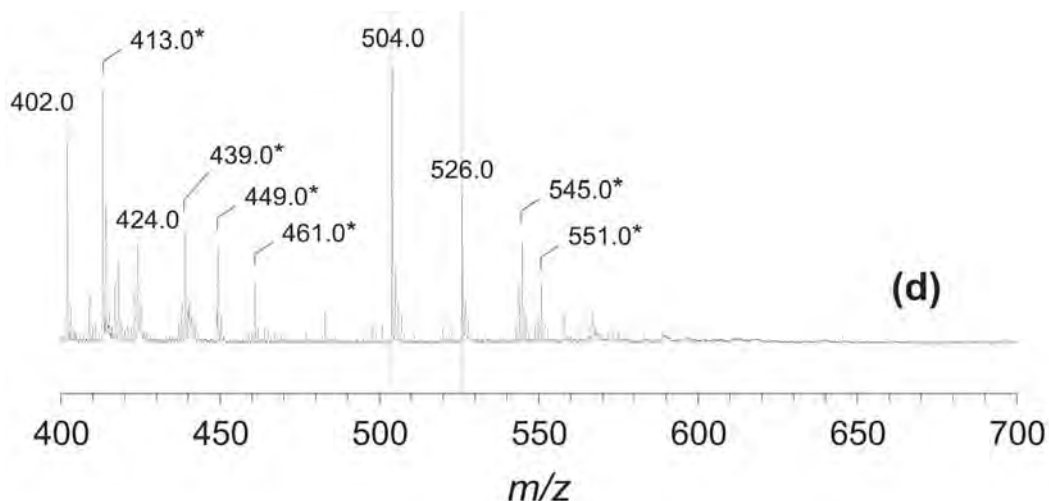


รูปที่ 2.17 แผนภาพแสดงการทำงานของพื้นฐานของเทคนิค MALDI-TOF MS



รูปที่ 2.18 อุปกรณ์ของเครื่อง MALDI-TOF MS

เนื่องจากการใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการวัดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์จะให้น้ำหนักโมเลกุลออกมาเป็นค่าสัมบูรณ์ อีกทั้งเทคนิคนี้ยังมีข้อดีอีกมาก ทั้งสามารถวิเคราะห์ได้ใช้ได้กับสารหลากหลายชนิด การวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ราคาในการวิเคราะห์ถูกกว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบมาก ทำให้มีการนำเทคนิค MALDI-TOF MS มาใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทีนซัลเฟตในงานวิจัยต่างๆ เป็นจำนวนมาก เช่น ในงานวิจัยของ Ariane Nimptsch วิเคราะห์ลำดับของคอนดรอยทีนซัลเฟต และน้ำหนักโมเลกุลที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นดังรูป 2.18



รูปที่ 2.19 ลักษณะสเปกตรัมของคอนดรอยทินซัลเฟตจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

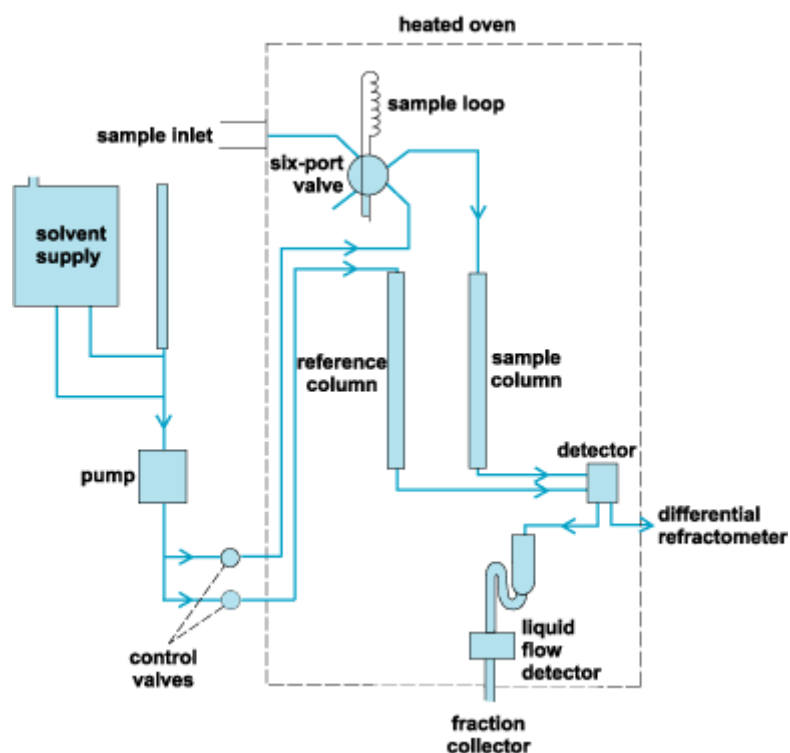
2.7.2.2 การวัดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Gel permeation chromatography (GPC)^[24]

Gel permeation chromatography (GPC) หรือที่รู้จักกันในนามของ size exclusion chromatography (SEC) เป็นเทคนิคการแยกทางโครมาโตกราฟีเทคนิคหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของสารที่มีสถานะเป็นของเหลวผ่านคอลัมน์ที่มีตัวกลางที่เป็นโพร่งซึ่งทำหน้าที่ในการแยก เทคนิค GPC เป็นเทคนิคที่ทำงานได้อย่างรวดเร็วสามารถแยกสารโพลิโเมอร์และพอลิเมอร์ได้อย่างรวดเร็วโดยการแยกนั้นจะอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุลในสารละลาย เทคนิค GPC จึงมีความสำคัญอย่างมากสำหรับงานวิจัยทางชีววิทยา และวิธีการนี้เป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับคามนิยมอย่างสูงในการนำมาใช้วิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์และการกระจายตัวของขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

ตัวกลางที่ทำหน้าที่ในการแยกจะเป็นของแข็งมีโครงสร้างเป็นโพร่ง เช่น แก้ว ซิลิกา หรือ เจลที่ได้รับการเชื่อมต่อกับโมเลกุล ซึ่งจะมีโพร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่เหมาะสมต่อการแยกนั้น สำหรับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้จะเป็นพวกรน้ำ หรือบัฟเฟอร์สำหรับการแยก และตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเหมาะสมกับตัวอย่าง และลักษณะของคอลัมน์ การเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่อาจจะอาศัยการไหลตามแรงโน้มถ่วง หรือใช้แรงดันสูงเพื่อให้ได้อัตราการไหลตามต้องการ สารตัวอย่างจะถูกนำเข้ามาทางส่วนต้นของคอลัมน์ เมื่อเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ โมเลกุลขนาดเล็กจะเสียเวลาผ่านโพร่งที่คดเคี้ยวมาก ขณะที่โมเลกุลใหญ่จะสามารถผ่านโพร่งไปได้เร็วกว่า ดังนั้นจึงมีขนาดของโพร่งที่พอเหมาะต่อการเคลื่อนที่ผ่านของโมเลกุลขนาดใหญ่ได้เร็ว ทำให้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่สามารถเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้ก่อนโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า โดยจะมีอุปกรณ์การวัดความเข้มข้น

อยู่ที่ปลายของคอลัมน์เพื่อวัดปริมาณของสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ นอกจากนี้แล้ว Detector ยังสามารถใช้ในการวัดขนาดโมเลกุลที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง โดยปริมาตรของตัวทำละลายที่ไหลผ่านจะเป็นตัวติดตามเพื่อใช้ในการหาค่าเฉลี่ยของขนาดโมเลกุลที่ชะออกมาจากคอลัมน์

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ สัญญาณจาก Detector วัดความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นเหนือระดับปกติ จากนั้นจะเพิ่มขึ้นจนสูงสุด แล้วลดค่าลงสู่ระดับปกติ ซึ่งสัญญาณนี้จะบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสาร และถูกบันทึกไว้ในรูปของปริมาตรของสารละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ สำหรับการวัดน้ำหนักโมเลกุลของสารนั้นจะใช้หลักของการกระเจิงแสงหรือการวัดความหนืดซึ่งจะให้สัญญาณที่ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุล



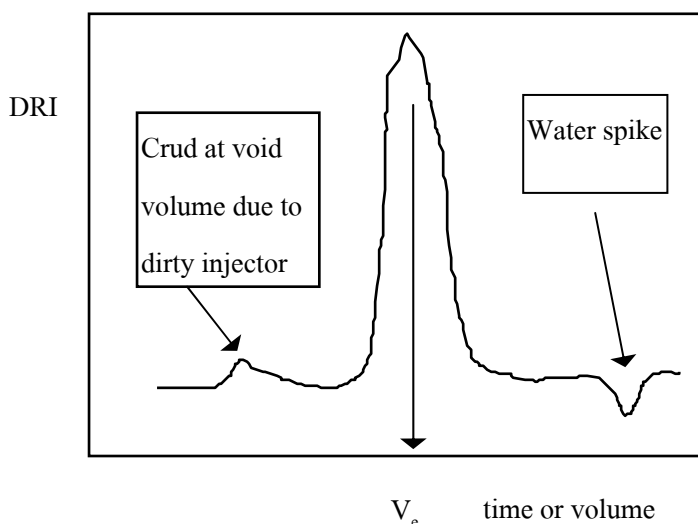
รูปที่ 2.20 แผนภาพแสดงการทำงานของเทคนิค Gel permeation chromatography

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค Gel permeation chromatography มาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ มากมาย มีการนำมาใช้วัดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์สังเคราะห์มากกว่า 50 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย เรซิน ยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์ เซลลูโลสเอสเทอร์ โพลีโอเลฟิน โพลีเอไมด์ โพลีเอสเทอร์ โพลีสไตรีน และสารพอลิเมอร์อื่น ๆ เป็นต้น นอกจากนี้ ความสามารถในการวัดน้ำหนักโมเลกุล และการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ อีกมากมาย ได้แก่ การศึกษาความยาวของสายพอลิเมอร์ อันตรกิริยาในสารละลาย การศึกษาทางรังสี การศึกษากลไกการสลายตัว กลไกในการเกิดปฏิกิริยาและการควบคุมปฏิกิริยาการเกิดพอลิ

เมอร์ และพัฒนากระบวนการทางพอลิเมอร์ สำหรับในด้านของพอลิเมอร์ธรรมชาตินั้น เทคนิค Gel permeation chromatography มีประโยชน์อย่างมากสำหรับระบบการแยกและการวิเคราะห์ สารพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น พวกรดอะมิโนและอนุพันธ์ เฮนไซม์ แอนติบอดี คอลลาเจน และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง แป้งและโปรตีนต่าง ๆ

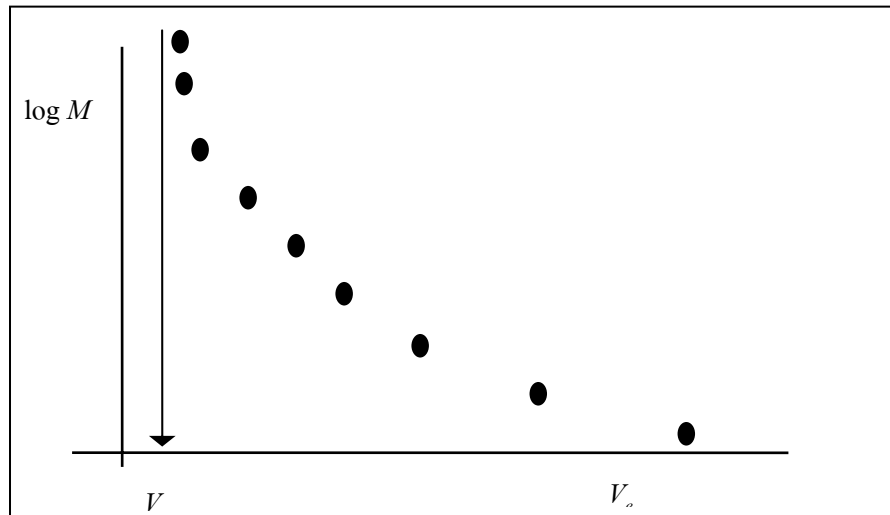
เนื่องจากที่คอนดรอยทินซัลเฟตเป็นสารในกลุ่ม heteropolysaccharide ที่เรียกว่า Glucoaminoglycans (GAGs) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงสามารถทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลได้ด้วยเทคนิค Gel permeation chromatography มีงานวิจัยจำนวนไม่น้อยที่นำเทคนิค Gel permeation chromatography มาใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้ หรือที่ได้จากกระบวนการสลายโมเลกุล เช่น ในงานวิจัยของ Michiru Ida และคณะได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และหน้าที่ของคอนดรอยทินซัลเฟตใน Milieu ของ Neural Stem Cells โดยใช้เทคนิค Gel permeation chromatography เป็นต้น

Gel permeation chromatography ไม่ใช่วิธีการวัดแบบสัมบูรณ์ดังนั้นระบบจึงต้องได้รับการปรับเทียบค่าจากสารพอลิเมอร์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนซึ่งได้รับการระบุน้ำหนักโมเลกุลจากวิธีการวัดที่ให้ค่าสัมบูรณ์ เช่น light scattering, osmometry, mass spectroscopy หรือ analytical ultracentrifugation สารพอลิเมอร์ที่เหมาะสมต่อการปรับเทียบค่าของระบบควรที่จะมีความยาวของสายพอลิเมอร์อยู่ในช่วงที่ต้องการพิจารณา และมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน โดยในการวิเคราะห์สารมาตรฐานนั้นลักษณะของกราฟที่ได้จะเป็นดังนี้



รูปที่ 2.21 ลักษณะของกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยเทคนิค GPC

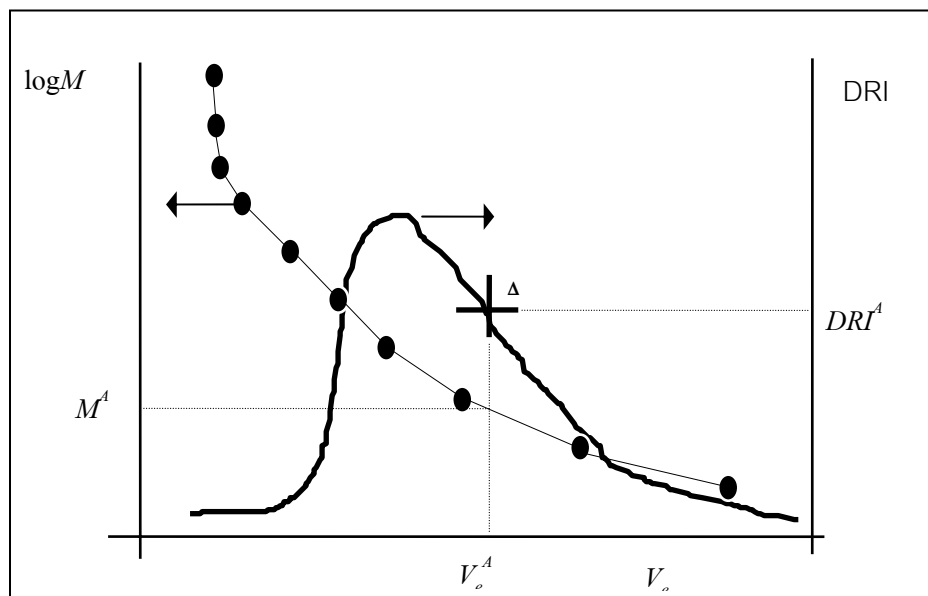
โดยจะนำค่า V_e ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานแต่ละชนิดมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log ของน้ำหนักโมเลกุลและเวลาของการชะหรือปริมาตร (elution time or elute volume) ดังภาพ



รูปที่ 2.22 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

จากกราฟมาตรฐานจะเห็นว่าสารที่น้ำหนักโมเลกุลมากจะออกมาจากคอลัมน์ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับ V_0 เนื่องจากสารพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่มาก ๆ จะไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในรูพรุนของคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงถูกชะออกมาที่ปริมาตรของรูพรุน V_0 (void volume) และโดยปกติแล้วจะใช้ $\log(M)$ มาสร้างกราฟแทนการใช้ค่าของน้ำหนักโมเลกุล (M)

กราฟมาตรฐานจะถูกนำมาสร้างขึ้นมาใหม่ดังภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์การกระจายตัวที่ค่อนข้างกว้างของสารบางชนิด



รูปที่ 2.23 กราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารที่มีการกระจายตัวกว้าง

จากกราฟดังกล่าว จะทำการเลือกจุดเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาจุด A ที่ตำแหน่งปริมาตร V_0^A อ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานได้ค่า M^A และเมื่อลากจาก

จุด A ไปยังแกน DRI ทางขวามือจะได้ค่า DRI^A จากนั้นทำการเลือกจุดต่าง ๆ อีกเท่าที่ต้องการแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน โดยค่า DRI ที่ได้จะเป็นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารพอลิเมอร์ด้วย

$$DRI \propto c \text{ (in g/mL)}$$

ค่าคงที่ของอัตราส่วนที่ได้จะเท่ากับ dn/dc หรือที่เรียกว่าค่าการเปลี่ยนแปลงของดัชนีหักเหเฉพาะ แต่อย่างไรก็ตามในเทคนิค GPC นั้นไม่จำเป็นต้องหาค่า dn/dc ก็สามารถที่จะหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามน้ำหนักได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$M_w = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} = \frac{\sum_A DRI^A M^A}{\sum_A DRI^A} \quad (6)$$

และสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามจำนวนได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$M_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} = \frac{\sum_i w_i}{\sum_i \frac{w_i}{M_i}} = \frac{\sum_A DRI^A}{\sum_A \frac{DRI^A}{M^A}} = \frac{\sum_A c^A}{\sum_A \frac{c^A}{M^A}} \quad (7)$$

โดยทั่วไปแล้วการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเช่น M_n และ M_w เป็นวิธีแบบเก่า หลักการโดยรวมของเทคนิค GPC นั้นคือการสร้างภาพของการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล อย่างไรก็ตามค่าทางสถิติของ M_n และ M_w เป็นวิธีที่สะดวกและให้ค่าทางสถิติที่ยอมรับได้ในการหาการกระจายตัวอัตราส่วนของ $M_w:M_n$ จะเป็นตัวอธิบายลักษณะการกระจายตัวของสาร กราฟที่ได้จากเทคนิค GPC จะเปลี่ยนแปลงไปบ้างตามลักษณะของคอลัมน์และระยะเวลา แต่อัตราส่วนระหว่าง $M_w:M_n$ จะไม่เปลี่ยนแปลงตามปัจจัยเหล่านั้น

2.7.2.3 การวัดขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยการวัดความหนืด ^[26, 27, 28]

เมื่อทำการละลายพอลิเมอร์ด้วยตัวทำละลายจะทำให้ได้ที่มีความหนืด ดังนั้นจึงมีการใช้พอลิเมอร์เป็นสารในการเพิ่มความหนืด หรือทำให้ข้นในแชมพู หรือแม้แต่ไอศกรีม จากผลในการทำให้หนืดนั้นจึงสามารถใช้ในการประมาณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ได้ ความหนืดที่เกิดขึ้นในสารละลายพอลิเมอร์นั้นเกิดจากการที่พอลิเมอร์เคลื่อนที่ได้ช้ามาก และมากกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นเมื่อละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลาย การที่พอลิเมอร์เคลื่อนที่ช้าจึงทำให้สารละลายทั้งหมดหนืด ผลจากการทำให้สารหนืดจึงทำให้สามารถประมาณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ได้ เนื่องจากสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าจะทำให้ได้สารละลายพอลิเมอร์ที่มีความหนืดมากกว่า พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก จะถูกล้อมรอบด้วยน้ำจำนวนมาก ทำให้มีปริมาณที่ใหญ่และกีด

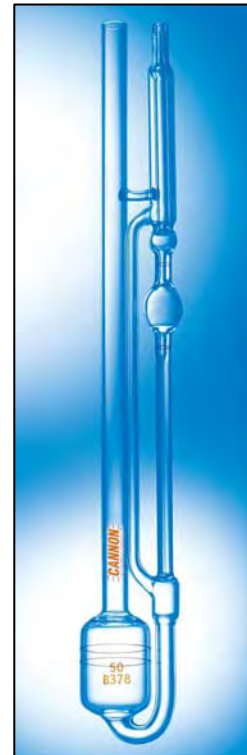
ขบวนการเคลื่อนที่ของสารละลาย นอกจากนี้อัตราโมเลกุลพอลิเมอร์ขนาดใหญ่จะมีแรงกระทำกับตัวทำละลายมากกว่า จึงมีผลให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลตัวทำละลายช้าลงไปด้วย ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีความหนืดสูง เนื่องจากพอลิเมอร์ทุกชนิดจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและความหนืด ดังนั้นการวัดความหนืดจึงสามารถใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลได้

การวัดความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์

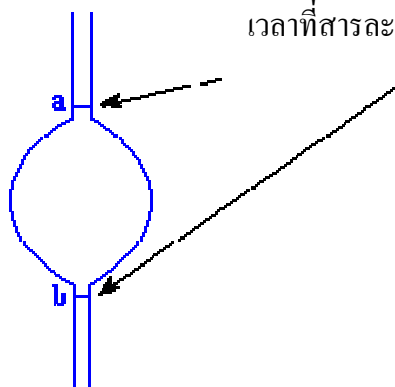
เครื่องมือที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวัดความหนืดของสารละลาย คือ ออสท์วาลด์วิสโคมิเตอร์ (Ostwald viscometer) และ อับเบลไฮด์ วิสโคมิเตอร์ (Ubbelohde viscometer) ลักษณะของเครื่องมือเป็นดังรูป



รูปที่ 2.24 Ostwald viscometer (ซ้าย) และ Ubbelohde viscometer (ขวา)



ปล่อยสารละลายพอลิเมอร์ไหลผ่านท่อ แล้วจับ
เวลาที่สารละลายเคลื่อนที่ผ่านจากตำแหน่ง a ไป b



รูปที่ 2.25 การวัดความหนืด

การวัดความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์สามารถทำได้ง่ายโดยใช้อุปกรณ์ที่มีลักษณะดังภาพ จากนั้นทำการวัดเวลาการเคลื่อนที่ของสารปริมาตรหนึ่ง เพื่อให้มั่นใจว่าทำการวัดที่ปริมาตรเท่ากันทุกครั้ง จึงทำการวัดเวลาเมื่อสารละลายอยู่ในระดับเส้นแรกคือ เส้น a จับเวลาจนกระทั่งสารละลายเคลื่อนมาถึงตำแหน่งล่าง คือเส้น b การที่ต้องมีกระเปาะระหว่างตำแหน่งทั้งสองเพื่อเพิ่มปริมาตร และทำให้ง่ายต่อการเห็นความแตกต่างของระยะเวลาในสารละลายต่างชนิดกัน โดยเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านจุด a และจุด b คือ efflux time จากนั้นทำการวัด efflux time ของสารละลายพอลิเมอร์ที่ต้องการหาขนาดโมเลกุลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และทำการเปรียบเทียบ efflux time (t) กับ efflux time ของสารละลายบริสุทธิ์ที่ไม่มีพอลิเมอร์ละลายอยู่ ซึ่งมีค่าเป็น t_0 คำนวณหาค่าความหนืดสัมพัทธ์ (η_r , relative viscosity) ของสารละลายตามสมการ

$$\frac{\text{efflux time of solution}}{\text{efflux time of our solvent}} = \text{relative viscosity}$$

$$\frac{t}{t_0} = \eta_r$$

หรือทำการคำนวณหาค่าความหนืดเฉพาะ (η_{sp} , specific viscosity) ได้ตามสมการ

$$\frac{(\text{efflux time of solution} - \text{efflux time of solvent})}{\text{efflux time of our solvent}} = \text{specific viscosity}$$

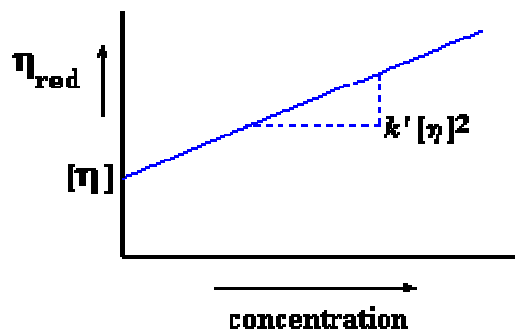
$$\frac{t - t_0}{t_0} = \eta_{sp}$$

จากนั้นทำการหารความหนืดเฉพาะด้วยความเข้มข้นของสารพอลิเมอร์จะได้ค่าความหนืดที่ลดลง (η_{red} , reduced viscosity) ดังสมการ

$$\frac{\text{specific viscosity}}{\text{concentration}} = \text{reduced viscosity}$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \eta_{red}$$

นำค่าความหนืดที่ลดลง (η_{red} , reduced viscosity) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายพอลิเมอร์ ชนิดนั้นที่วัดได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์กับความเข้มข้น โดยให้ η_{red} เป็นแกน y และความเข้มข้นเป็นแกน x ลักษณะของกราฟที่ได้เป็นดังรูป



รูปที่ 2.26 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{red} และความเข้มข้น

จากกราฟ ความสัมพันธ์ที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งเมื่อทำการ Extrapolate ไปที่ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0 โดยการลากกราฟต่อไปถึงแกน y จะได้จุดตัดแกน y คือค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$ intrinsic viscosity)

ตามความสัมพันธ์เชิงเส้นจะได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืดที่ลดลง η_{red} และความเข้มข้นดังนี้

$$y = mx + b$$

$$\eta_{red} = k'[\eta]^2 c + [\eta]$$

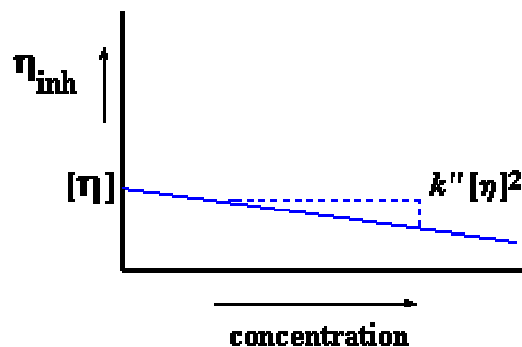
จากสมการความชันของเส้นตรงคือค่า $k'[\eta]$ และจุดตัดแกน y คือค่าความหนืดที่แท้จริง $[\eta]$ ซึ่งค่า $[\eta]$ ที่ได้นี้จะมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารพอลิเมอร์

การหาค่าความหนืดที่แท้จริงสามารถทำอีกวิธีหนึ่ง โดยการใช้ความหนืดสัมพัทธ์ (η_r , relative viscosity) เพื่อนำมาหา inherent viscosity (η_{inh}) ดังสมการ

$$\frac{\ln(\text{relative viscosity})}{\text{concentration}} = \text{inherent viscosity}$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = \eta_{inh}$$

จากนั้นนำค่า inherent viscosity (η_{inh}) ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{inh} และความเข้มข้น โดยกราฟที่ได้จะมีลักษณะดังรูป



รูปที่ 2.27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{inh} และความเข้มข้น

เช่นเดียวกับกราฟความสัมพันธ์ก่อนหน้า ความสัมพันธ์ที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งเมื่อทำการ Extrapolate ไปที่ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0 โดยการลากกราฟต่อไปถึงแกน y จะได้จุดตัดแกน y คือค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$ intrinsic viscosity)

ตามความสัมพันธ์เชิงเส้นจะได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า η_{inh} และความเข้มข้น ดังนี้

$$y = mx + b$$

$$\eta_{inh} = k[\eta]^2 c + [\eta]$$

จากค่าความหนืดที่แท้จริงที่หาได้ไม่ว่าจากวิธีการที่ 1 หรือ 2 สามารถนำไปใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ได้จากสมการ Mark-Houwink

สมการ Mark-Houwink (Mark-Houwink Equation) ^[29]

สมการ Mark-Houwink เป็นสมการที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$ intrinsic viscosity) ของพอลิเมอร์กับน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสมการเป็นดังนี้

$$[\eta] = KM^a$$

โดยที่ $[\eta]$ คือค่าความหนืดที่แท้จริง, K และ a คือค่าคงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารพอลิเมอร์, ชนิดของตัวทำละลาย, อุณหภูมิ และ M_v คือ viscosity average molecular weight ในกรณีที่ไม่มี การทดลองเรื่องความหนืดของสารพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งมาก่อน ทำให้ไม่มีค่า K และ a ไว้ก่อน การหาค่าของ K และ a สามารถทำได้โดยการใช้สารละลายพอลิเมอร์มาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนจากการวัดของเทคนิคที่ให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลสมบูรณ์ เช่น เทคนิค light scattering และทำการทดลองหาความหนืดที่แท้จริง เพื่อหาค่า K และ a

สมการ Mark-Houwink สามารถเปลี่ยนเป็นสมการเส้นตรงได้ด้วยฟังก์ชัน logarithm ดังนี้

$$[\eta] = KM_v^a$$

$$\log[\eta] = \log K + a \log M_v$$

เมื่อ M_v คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Viscosity Average Molecular Weight) ทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์โดยให้ค่า $\log [\eta]$ เป็นแกน y และค่า $\log M_v$ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชันเป็นค่า a และสามารถหาค่า K ได้จากจุดตัดแกน y ดังนั้นเมื่อได้ K และ a ก็จะทำให้ได้สมการ Mark-Houwink สำหรับใช้กับสารพอลิเมอร์ชนิดนั้น ที่สภาวะดังกล่าว

แต่สำหรับสารพอลิเมอร์บางชนิดที่มีการศึกษาไว้ก่อนแล้ว จะมีการนำเสนอสมการ Mark-Houwink ที่ระบุถึงค่า K และ a ที่สภาวะหนึ่งไว้เรียบร้อยแล้วทำให้การหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร

พอลิเมอร์ชนิดนั้นทำได้ง่ายขึ้น เช่นในงานวิจัยเรื่อง Physicochemical Properties of Chondroitin Sulfate ของ Kiichiro TANAKA^[30] ซึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตกับค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$ intrinsic viscosity) โดยพบว่าความสัมพันธ์ของค่าความหนืดที่แท้จริงในสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.2 M ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และน้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาดูแลสามารถแสดงได้ดังสมการ

$$[\eta] = 6.5 \times 10^{-6} M_v^{1.14}$$

ความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตที่สภาวะดังกล่าวได้โดยการใช้ค่าความหนืดที่แท้จริงที่หาได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี

- 3.1.1 ยางมะลอะกอสต
- 3.1.2 Sodium chloride (NaCl)
- 3.1.3 Ethanol (C₂H₅OH)
- 3.1.4 Sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄·H₂O)
- 3.1.5 Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄·7H₂O)
- 3.1.6 Ethylenediaminetetra acetic acid(EDTA)(HOCOCH₂)₂NCH₂CH₂N(HOCOCH₂)₂
- 3.1.7 Cystein hydrochloride (monohydrate) (HSCH₂CH(NH₂)COOH.HCl.H₂O)
- 3.1.8 Sodium azide (NaN₃)
- 3.1.9 Trichloroacetic acid (CCl₃COOH)
- 3.1.10 Cetylpyridinium chloride (monohydrate) (C₁₂H₃₈ClN.H₂O)
- 3.1.11 Potassium thiocyanate (KSCN)
- 3.1.12 1,9-dimethylmethylene blue(chloride)
- 3.1.13 Glycine CH₂NH₂COOH
- 3.1.14 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.1.15 กระจกอ่อนนอกไก่
- 3.1.16 น้ำกลั่น

อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

- 3.1.17 ปีกเกอร์
- 3.1.18 กระจกตวง
- 3.1.19 กรวยแก้ว
- 3.1.20 ปิเปต
- 3.1.21 ซ้อนตักสาร
- 3.1.22 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- 3.1.23 แผ่น dialysis

- 3.1.24 กระดาษยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์
- 3.1.25 Hot plate
- 3.1.26 Heater
- 3.1.27 ชุดเครื่องกลั่น
- 3.1.28 ชุดปั๊มอากาศขนาดเล็ก และสายยาง
- 3.1.29 มีดปลายแหลม
- 3.1.30 เทอร์โมมิเตอร์
- 3.1.31 ชุด Viscometer ชนิด Ubbelohde viscometer ของบริษัท Cannon
- 3.1.32 เครื่อง High Speed Centrifuge Machine ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.1.33 เครื่อง freeze dry
- 3.1.34 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy Perkin Elmer รุ่น Spectrum One ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.1.35 เครื่องฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 ของภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.1.36 เครื่องฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 Gamma cell 220excel ของสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ
- 3.1.37 เครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry ของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- 3.1.38 เครื่อง Gel permeation chromatography (GPC) ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- 3.1.39 อุปกรณ์วัดปริมาณรังสี (Dosimeter)
- 3.1.40 เตาอบ
- 3.1.41 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสกัดปาเปนและการทำให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอสด^[31, 32]

- 3.2.1.1 การสกัดปาเปนเริ่มจากนำมะละกอดิบที่สดมากที่สุดที่ผิวตามแนวขวางเพื่อเก็บน้ำยางมะละกอจนได้ยางมะละกอหนัก 10 กรัม
- 3.2.1.2 เติม NaCl ปริมาณ 2 กรัม ลงในยางมะละกอทันที และคนให้เกลือละลาย

- 3.2.1.3 ทิ้งสารละลายที่ได้ให้ตกตะกอนเป็นเวลาประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง แล้วนำไปกรอง เพื่อแยกตะกอนเก็บไว้ แล้วตากแดดให้แห้ง
- 3.2.1.4 นำจะได้ตะกอน (paste) ที่ได้ไปเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดแน่นไม่มีอากาศเข้า เช่น ถุงพลาสติก กุ้ง หรือกระป๋องที่อุดหนุมิห้อง จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป
- 3.2.1.5 การทำให้ปาเปนบริสุทธิ์ทำได้โดยการนำตะกอนของแข็งของปาเปนที่สกัดได้ ปริมาณ 3 กรัมมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 15 mL
- 3.2.1.6 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเพื่อแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแยก (Centrifuge Machine)



รูปที่ 3.1 ตะกอนของปาเปนที่สกัดได้ก่อนทำให้บริสุทธิ์

- 3.2.1.7 นำสารละลายที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอทานอล ปริมาตร 60 mL ลงไป แล้วทิ้งให้สารละลายตกตะกอน
- 3.2.1.8 นำสารละลายที่ตกตะกอนไปปั่นเพื่อแยกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ทิ้ง สารละลายใส แล้วเก็บตะกอนที่ได้ไว้
- 3.2.1.9 นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum Dryer จะได้ตะกอนสีขาวของ ปาเปนที่มีความบริสุทธิ์สูง



รูปที่ 3.2 ปาเปนบริสุทธิ์ที่สกัดได้

3.2.2 การเตรียมกระดูกอ่อนนอกไก่

3.2.2.1 นำกระดูกอ่อนนอกไก่สดมาทำความสะอาดเพื่อกำจัดเศษเนื้อและคราบต่าง ๆ จากนั้นต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 – 95 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างในน้ำสะอาด

3.2.2.2 เก็บกระดูกอ่อนนอกไก่ที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ – 18 °C จนกว่าจะใช้งาน



รูปที่ 3.3 กระดูกอ่อนนอกไก่แช่แข็งที่นำมาใช้ในการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต

3.2.3 การสกัดคอนดรอยทินซัลเฟตด้วยเอนไซม์ปาเปน (Method of Nakano) ^[33]

- 3.2.3.1 นำกระดูกอ่อนอกไก่แห้งที่แช่แข็งไว้ปริมาณ 10 กรัม สับหรือบั่นจนเป็นชิ้นเล็ก ๆ
- 3.2.3.2 ไฮโดรไลซ์กระดูกอ่อนอกไก่ด้วยเอนไซม์ปาเปน (4 มิลลิกรัม/กรัมของกระดูกอ่อนอกไก่) ปริมาณ 40 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี EDTA 0.005 M, crytein hydrochloride 0.005 M และ sodium azide 0.02%) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภาพแสดงการจัดตั้งอุปกรณ์เป็นไปตามรูปที่ 3.4 และสารละลายที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.5
- 3.2.3.3 นำสารละลายที่ได้มาเติม trichoroacetic acid จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 7 %โดยมวลต่อปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C
- 3.2.3.4 นำสารละลายไป Centrifuge ที่ความเร็ว 132,000×g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แยกโปรตีนที่ตกตะกอนทิ้งแล้วเก็บสารละลายใสส่วนลอยไว้
- 3.2.3.5 นำสารละลายใสส่วนลอยไป dialyzed ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3.2.3.6 เติม cetylpyridinium chloride 1.5 กรัม ลงในสารละลาย glucoaminoglycans (GAGs) ที่ได้ จะได้ตะกอนแขวนลอยในสารละลายตามรูปที่ 3.6 แล้วนำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 6320×g เป็นเวลา 30 นาที
- 3.2.3.7 เก็บตะกอนที่ได้ไว้ แล้วล้างด้วยสารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 40 ml แล้วนำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 6320×g เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.4 การตั้งอุปกรณ์ในการสกัดคอนดรอยทินซัลเฟต



รูปที่ 3.5 สารละลายที่ได้หลังจากการตั้งสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- 3.2.3.8 เก็บตะกอนที่ได้ไว้ แล้วละลายด้วยสารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 2.1 M ปริมาตร 100 ml
- 3.2.3.9 เติมสารละลาย potassium thiocyanate ความเข้มข้น 1 M ลงไปเพื่อตกตะกอน cetylpyridium thiocyanate
- 3.2.3.10 รองตะกอนที่ได้ทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไป dialyzed ในน้ำกลั่น
- 3.2.3.11. นำสารละลายที่ได้ไปทำการ freeze dry แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะได้คอนครอยตินซัลเฟตที่แห้ง



รูปที่ 3.6 ภาพแสดงการตกตะกอน GAG ทั้งหมดที่ได้จากการสกัดกระดูกอ่อนอกไก่



รูปที่ 3.7 สารละลายคอนครอยทินซัลเฟตที่ได้ก่อนนำไปทำให้แห้ง

3.2.4 การฉายรังสีคอนครอยทินซัลเฟต

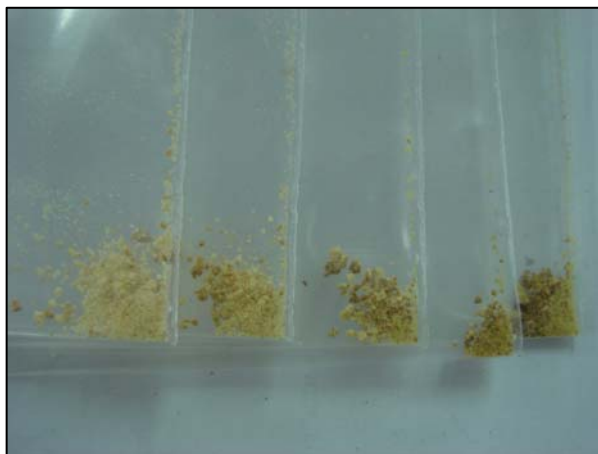
3.2.4.1 นำคอนครอยทินซัลเฟตของแข็งที่ได้แบ่งใส่ในภาชนะบรรจุพลาสติกทรงกระบอกที่มีฝาปิดแน่น เพื่อใช้ในการฉายรังสี

3.2.4.2 วางภาชนะบรรจุคอนครอยทินซัลเฟตในกระบอกอลูมิเนียมแล้ววางในช่องฉายของเครื่องฉายรังสี Gammacell ของภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยีในตำแหน่งที่ทราบอัตราปริมาณรังสีที่แน่นอนเท่ากับ 0.692 kGy/ชั่วโมง และเครื่องฉายรังสี Gammacell 220excel ซึ่งให้รังสีแกมมาจาก Co-60 ของสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติในตำแหน่งที่ทราบอัตราปริมาณรังสีที่แน่นอนเท่ากับ 14.286 kGy/ชั่วโมง

3.2.4.3 ฉายรังสีด้วยปริมาณรังสีสะสมต่าง ๆ เพื่อลดน้ำหนักโมเลกุลของคอนครอยทินซัลเฟตดังตามที่ต้องการ



รูปที่ 3.8 ภาชนะที่ใช้ในการบรรจุสารเพื่อฉายรังสีแกมมา



รูปที่ 3.9 ตัวอย่างคอนดรอยทีนซัลเฟตที่ผ่านการฉายรังสีด้วยปริมาณรังสีต่าง ๆ กัน โดยเรียงจากปริมาณรังสีน้อยไปมาก จากซ้ายไปขวา

3.2.5 การทดสอบยืนยันสารที่สกัดได้ว่าเป็นคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy^[1]

นำสารที่สกัดได้ปริมาณ 2 mg ผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ปริมาณ 100 – 200 mg แล้วนำไปอัดในเซลล์สำหรับใส่ตัวอย่างด้วยเครื่องอัดแรงดัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer แล้วบันทึกสเปกตรัมในช่วงอินฟราเรดตอนกลาง (mid-infrared) เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานที่มีการรายงานไว้แล้ว

3.2.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry^[34]

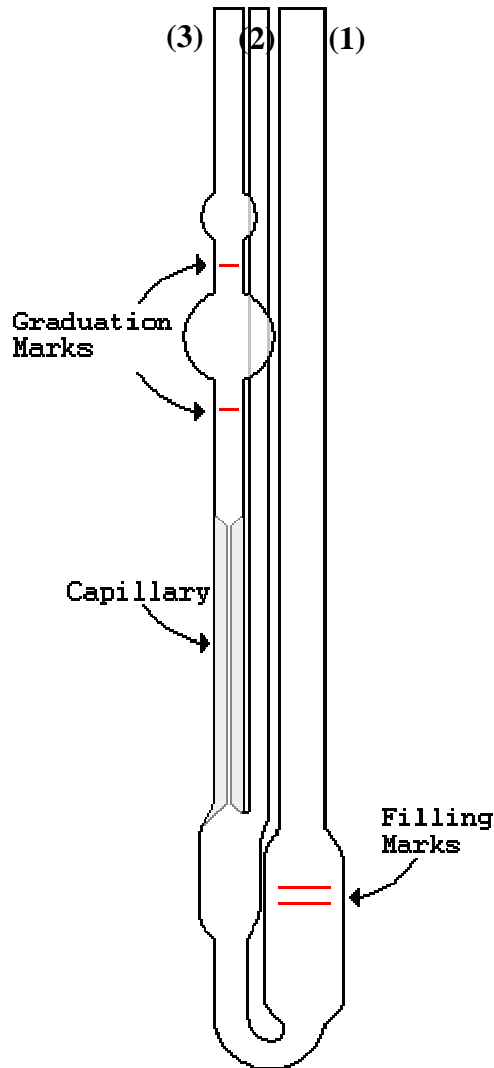
นำคอนดรอยทีนซัลเฟตที่ได้จากการฉายรังสีตัวอย่างละ 10 μg ละลายในสารละลาย 50% ACN (acetonitrile) ในน้ำที่ใช้เป็นสารตัวกลางแล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry บันทึกสเปกตรัมที่ได้

3.2.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเครื่อง Gel permeation chromatography (GPC)^[35]

นำคอนดรอยทีนซัลเฟตที่ได้จากการฉายรังสีตัวอย่างละ 4 μg ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.2 M เป็นสารละลายในการชะคอลัมน์ บันทึกสเปกตรัมที่ได้

3.2.8 การทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลคอนตรอยทินซัลเฟตก่อนและหลังการฉายรังสีด้วย Ubbelohde Viscometer ^[30]

- 3.2.8.1 เตรียมสารละลายคอนตรอยทินซัลเฟตก่อนและหลังการฉายรังสีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 4 ความเข้มข้น โดยอยู่ในช่วงไม่เกิน 0.2 %w/v ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 M แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่เย็นเป็นเวลา 1 คืน
- 3.2.8.2 ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 M, สารละลายคอนตรอยทินซัลเฟตที่เตรียมได้ และระบบวัดความหนืด (Viscometer) ให้คงที่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้ water bath และวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์เป็นระยะ
- 3.2.8.3 ทำการวัดความหนืดของสาร โดยเริ่มจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 M ปิดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 M ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ใน Viscometer ในหลอดที่ 1 จากนั้นใช้น้ำชุดที่ปลายหลอดที่ 2 พร้อมกับใช้ลูกยางดูดสารละลายให้ขึ้นมาตามท่อในหลอดที่ 3 จนสารละลายขึ้นมาสูงจนเต็มกระเปาะบนเหนือตำแหน่ง Graduation Marks แล้วปล่อยให้เปิดนิ้วและนำลูกยางออก เพื่อปล่อยให้สารละลายไหลลงมาตามหลอด Capillary เริ่มจับเวลาเมื่อสารละลายไหลมาถึงตำแหน่ง Graduation Marks บน และหยุดจับเวลาเมื่อสารละลายเคลื่อนลงมาถึงตำแหน่ง Graduation Marks ล่าง บันทึกค่าเวลาที่ได้ ซึ่งค่าที่ได้คือ efflux time ของสารละลายหรือ t_0



รูปที่ 3.10 Ubbelohde Viscometer และตำแหน่งที่ใช้ในการวัดความหนืด

- 3.2.8.4 เทสารละลายที่อยู่ในหลอดออกทั้งหมด แล้วทำการทดลองตามข้อ 3.2.8.3 ซ้ำอีกสองครั้ง
- 3.2.8.5 ทำการวัดสารละลายคอนดรอยตินซัลเฟตที่เตรียมไว้โดยเริ่มจากสารละลายคอนดรอยติน ซัลเฟตที่เตรียมจากคอนดรอยติน ซัลเฟตที่ไม่ได้รับการฉายรังสีตามวิธีที่อธิบายไว้ข้างต้นกับสารละลายทุกความเข้มข้นที่เตรียมไว้ ทำซ้ำและบันทึกข้อมูลล้างคอลัมน์ด้วยน้ำแล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 M แล้วจึงไปทำการทดลองกับสารละลายคอนดรอยตินซัลเฟตชุดอื่น ๆ จนครบ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการสกัดปาเปนและการทำให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอสด

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดปาเปนจากยางมะละกอ

ครั้งที่	น้ำหนัก (g)			%extraction	%recovery
	ยางมะละกอสด	ตะกอนปาเปน	ปาเปนบริสุทธิ์		
1	28.46	1.48	1.23	5.19	83.60
2	25.32	1.16	0.99	4.57	85.15
3	12.31	0.73	0.62	5.90	85.28
เฉลี่ย				5.22	84.68

การคำนวณ

$$\%extraction = (\text{น้ำหนักตะกอนปาเปน} / \text{น้ำหนักน้ำยางสด}) \times 100$$

$$\%recovery = (\text{น้ำหนักปาเปนบริสุทธิ์} / \text{น้ำหนักตะกอนปาเปน}) \times 100$$

4.2 ผลการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยเอนไซม์ปาเปน

ตารางที่ 4.2 ผลการสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยเอนไซม์ปาเปน

ครั้งที่	น้ำหนัก (g)		% extraction
	กระดูกอ่อนไก่	Chondroitin sulfate	
1	10.02	4.78	47.71
2	10.00	4.54	45.40
3	10.00	4.63	46.30
เฉลี่ย			46.47

4.3 ผลการฉายรังสีคอนดรอยตินซัลเฟต

ตารางที่ 4.3 การฉายรังสีคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ เพื่อลดขนาดโมเลกุล

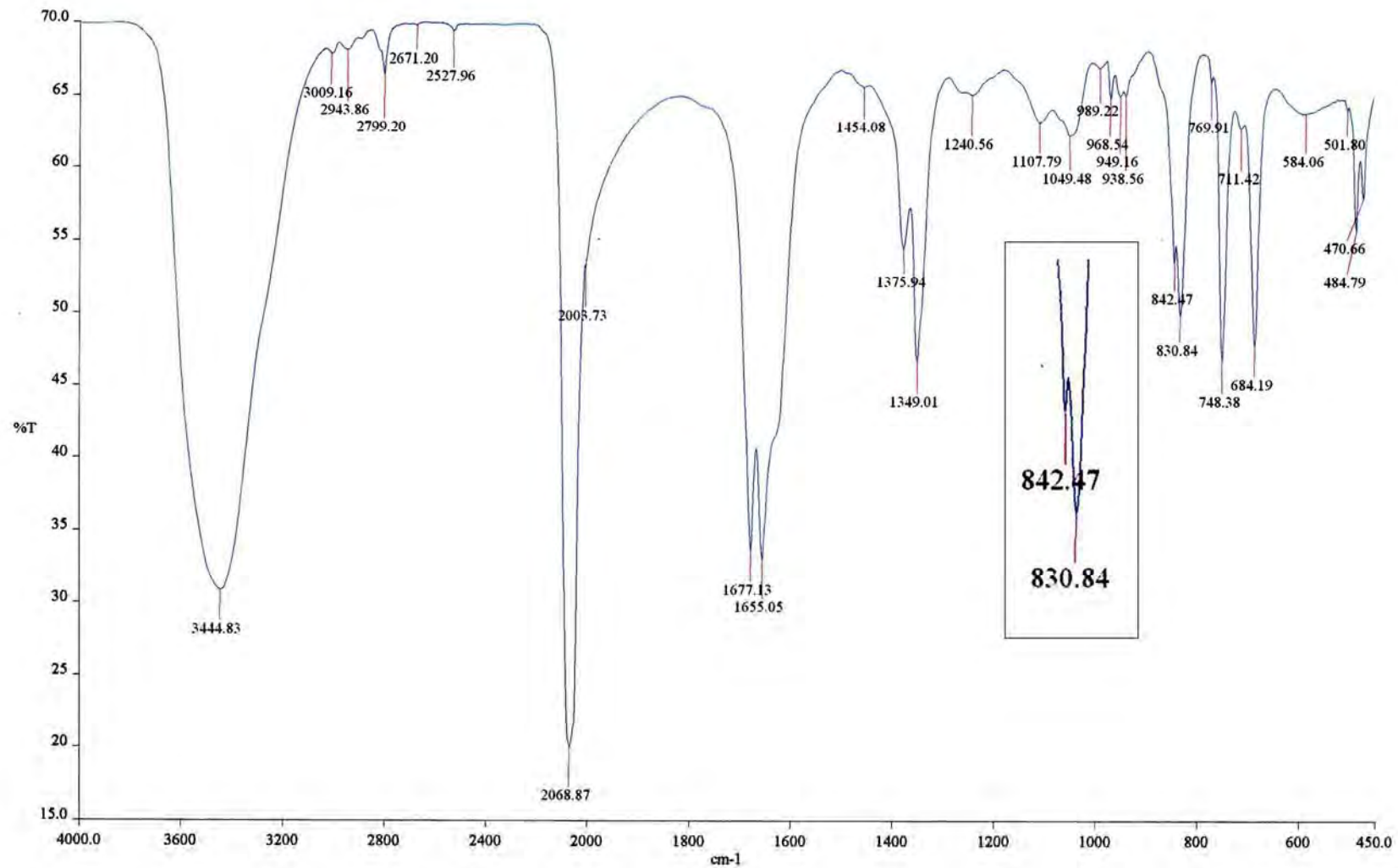
คอนดรอยตินซัลเฟตชุดที่	ปริมาณรังสีที่ได้รับ (kGy)	Dose rate(kGy/hr)
1	46	0.69
2	77	0.69
3	163	14.29
4	213	14.29
5	246	14.29
6	277	14.29
7	346	14.29
8	513	14.29

4.4 ผลการทดสอบยืนยันคอนดรอยตินซัลเฟตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

ผลการวิเคราะห์ระบุว่า สารที่นำไปวิเคราะห์เป็นสารประกอบในกลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl) โดยมีหมู่คีโตน และเอไมด์เป็นองค์ประกอบ โดยมีสเปกตรัมที่สำคัญดังนี้

ตารางที่ 4.4 ตำแหน่ง, ลักษณะของสเปกตรัมที่สำคัญ และหมู่ฟังก์ชันที่น่าจะเป็น

ตำแหน่ง (cm ⁻¹)	ลักษณะ	หมู่ฟังก์ชันที่น่าจะเป็น
3444.83	Broad, Singlet	-OH stretching, -NH stretching (amine)
2068.87	Stretch, Singlet	- CH stretching
1677.13, 1655.05	Stretch, Doublet	-C=O stretching (ketone, amide)
842.47, 830.84	Medium Stretch, Doublet	Chondroitin-4-sulfate, Chondroitn-6-sulfate ^[1, 4]



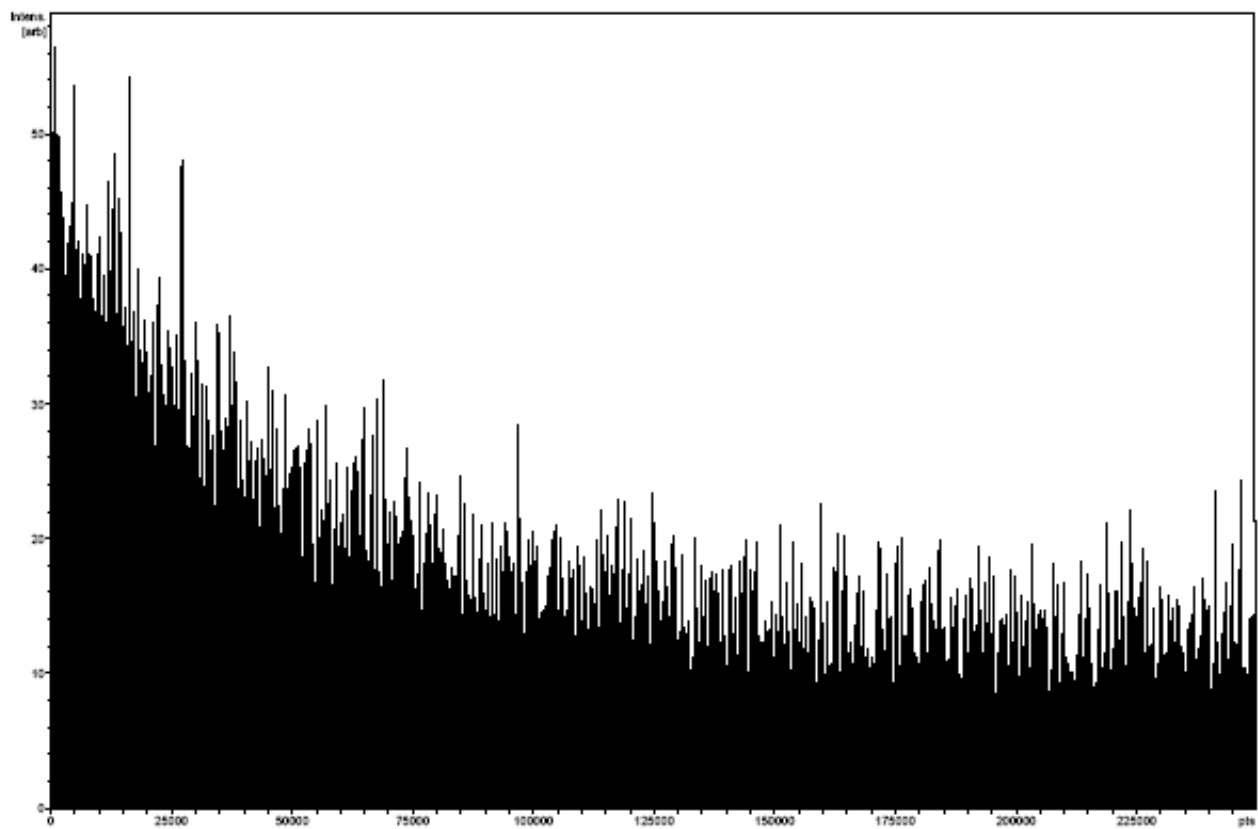
รูปที่ 4.1 FTIR spectrum ของคอนกรีตยี่สิบสี่เฟตที่สกัดได้

4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาด้วยปริมาณรังสีต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ด้วย mode ต่าง ๆ ผลที่ได้แสดงดังรูป 4.2 ก-จ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีสเปกตรัมที่แสดงถึงน้ำหนักโมเลกุลเกิดขึ้นเลย

รูปที่ 4.2 Mass spectrum ของการวิเคราะห์คอนดรอยทีนซัลเฟตที่ผ่านการฉายรังสีด้วยปริมาณรังสีต่าง ๆ ด้วยเทคนิค MADI-TOF

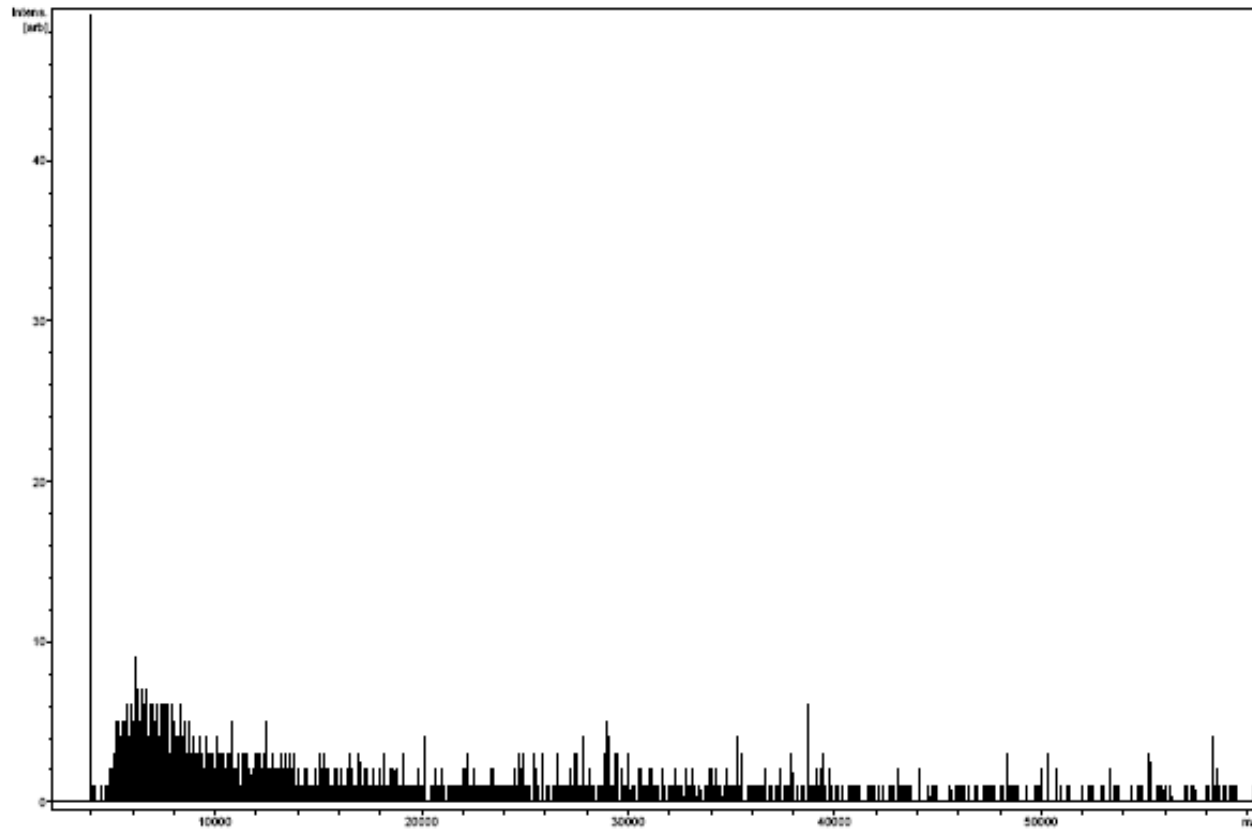
รูปที่ 4.2 (ก) Mass spectrum ของคอนดรอยตินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 246 kGy จากการวิเคราะห์ด้วย Reverse Negative mode



Bruker Daltonics flexControl

Display Screenshot - Generated On 2009-01-22 14h25m48s

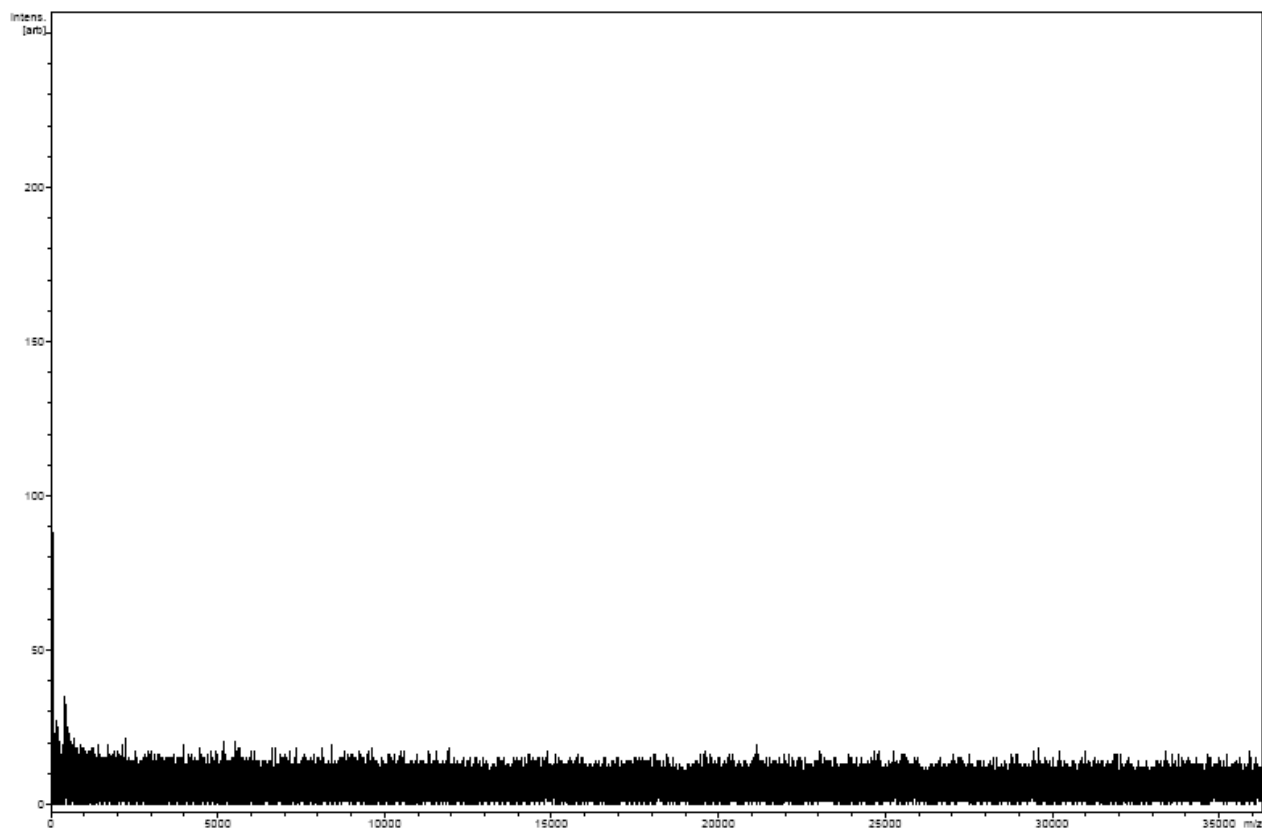
รูปที่ 4.2 (ข) Mass spectrum ของคอนดรอยตินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 246 kGy จากการวิเคราะห์ด้วย Linear Positive mode



Bruker Daltonics flexControl

Display Screenshot - Generated On 2009-01-22 14h31m08s

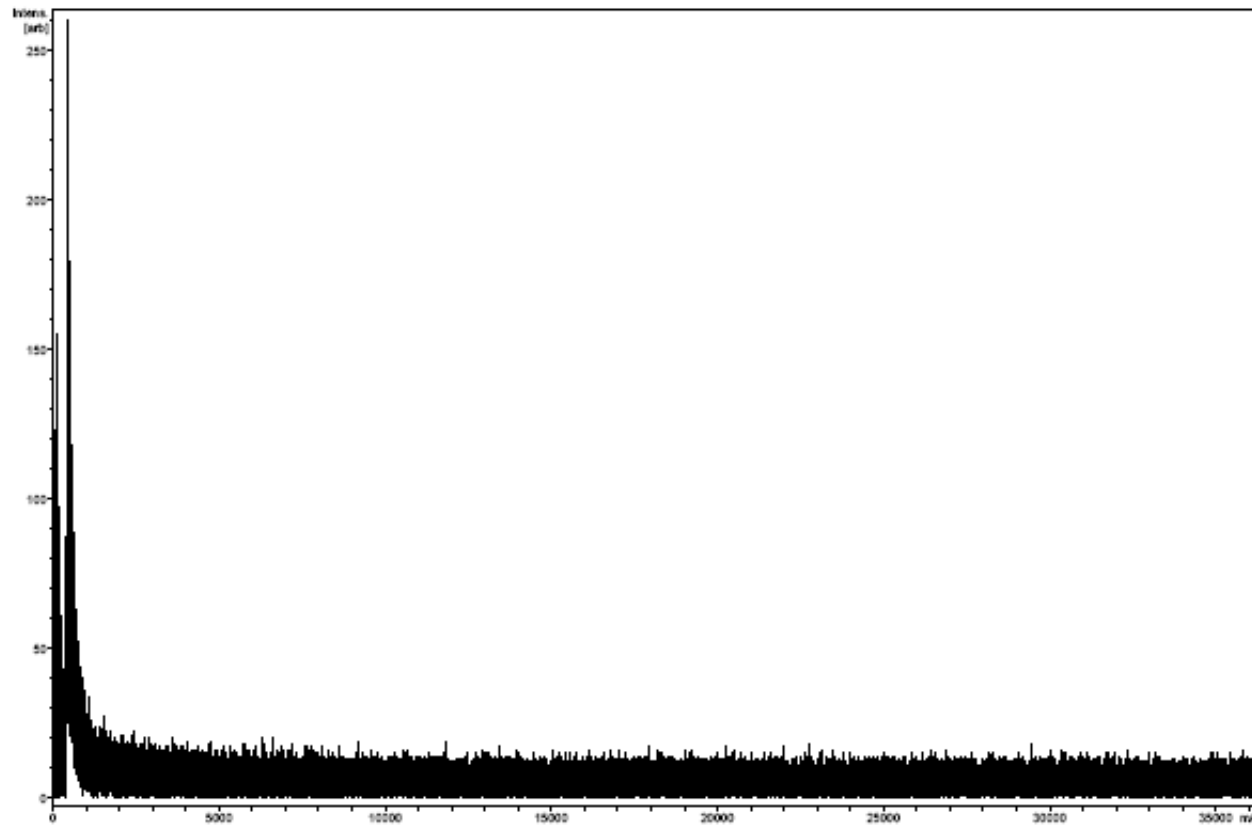
รูปที่ 4.2 (ค) Mass spectrum ของคอนดรอยทีนซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 213 kGy จากการวิเคราะห์ด้วย Reverse Negative mode



Bruker Daltonics flexControl

Display Screenshot - Generated On 2009-01-22 14h16m05s

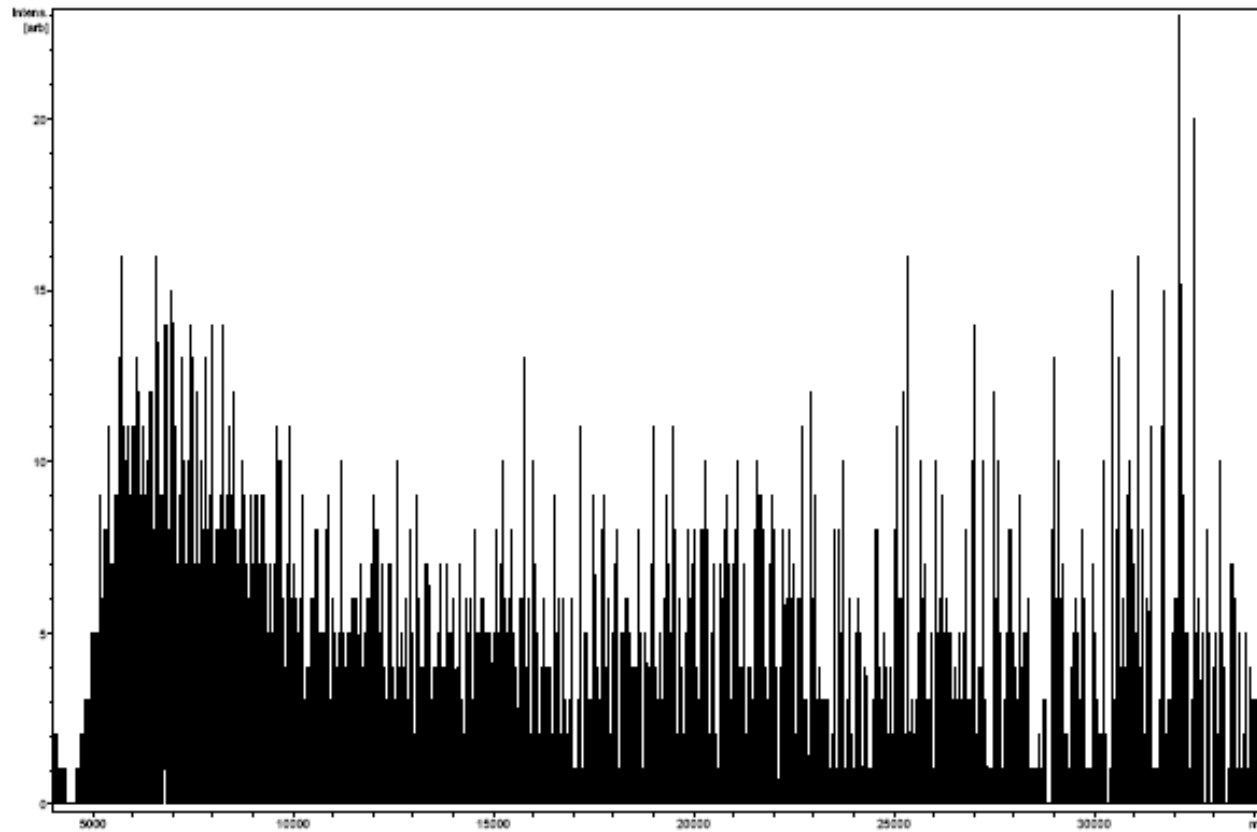
รูปที่ 4.2 (ง) Mass spectrum ของคอนดรอยตินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 77 kGy จากการวิเคราะห์ด้วย Reverse Negative mode



Bruker Daltonics flexControl

Display Screenshot - Generated On 2009-01-22 14h11m59s

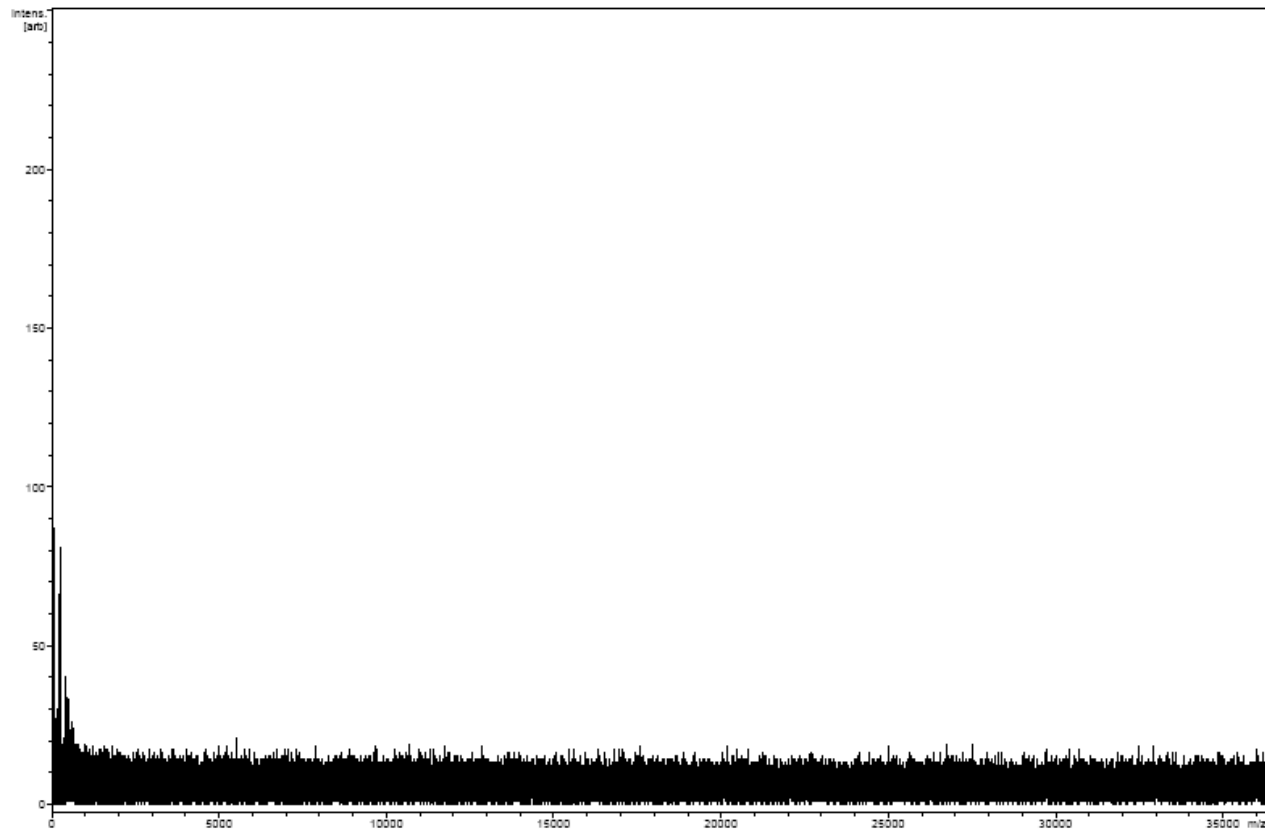
รูปที่ 4.2 (จ) Mass spectrum ของคอนดรอยตินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 46 kGy จากการวิเคราะห์ด้วย Linear Positive mode



Bruker Daltonics flexControl

Display Screenshot - Generated On 2009-01-22 14h06m50s

รูปที่ 4.2 (ฉ) Mass spectrum ของคอนดรอยทีนซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 46 kGy จากการวิเคราะห์ด้วย Linear Negative mode



Bruker Daltonics flexControl

Display Screenshot - Generated On 2009-01-22 14h09m51s

4.6 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทินซัลเฟตด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)

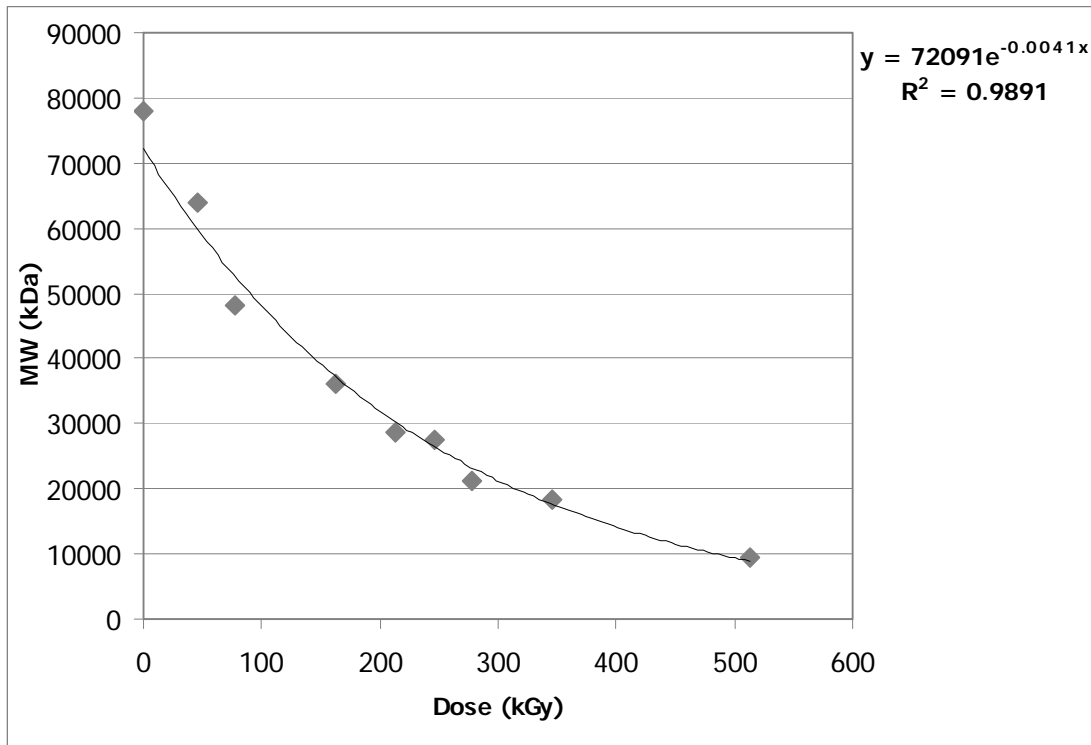
ไม่สามารถทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทินซัลเฟตได้ด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)

4.7 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Viscosity average molecular weight) ของคอนดรอยทินซัลเฟตด้วย Viscometer

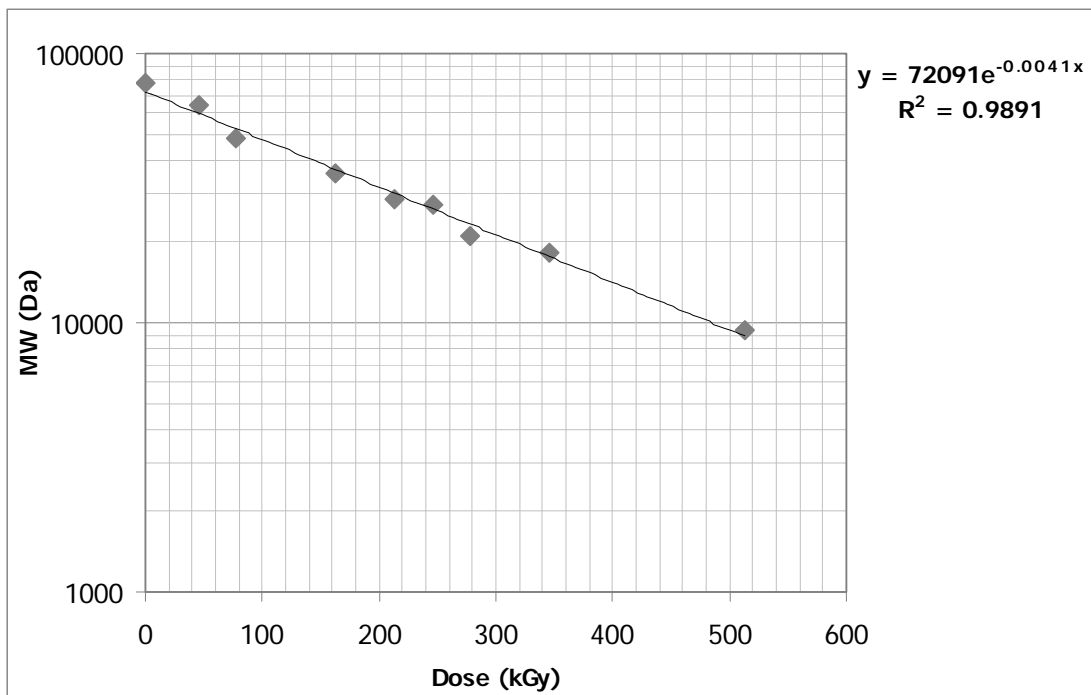
ตารางที่ 4.5 ผลการวัดค่าความหนืดที่แท้จริง และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของ คอนดรอยทินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสีแกมมาต่าง ๆ

ปริมาณรังสี (kGy)	ความหนืดที่แท้จริง [η]	น้ำหนักโมเลกุล (M_v , kDa)
0	2.458	78.1
46	1.953	63.9
77	1.417	48.2
163	1.017	36.0
213	0.784	28.7
246	0.745	27.4
277	0.553	21.1
346	0.469	18.3
513	0.219	9.37

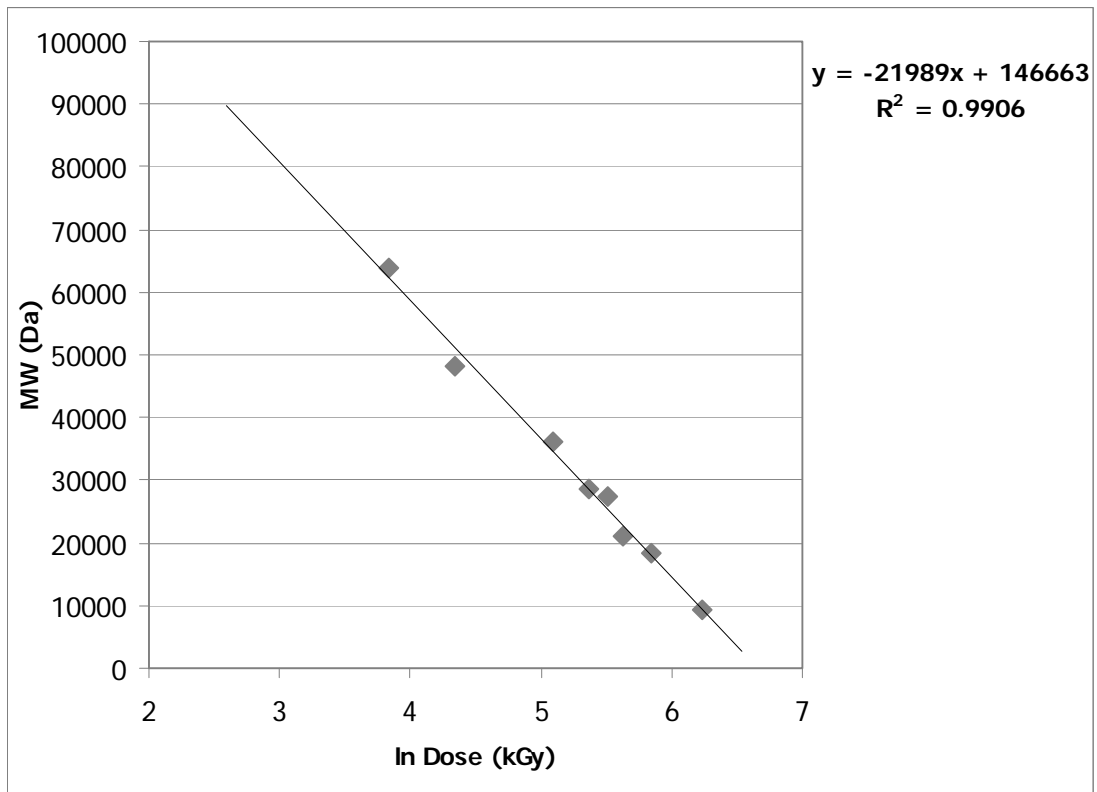
รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดและปริมาณรังสีที่คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log ของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดและปริมาณรังสีที่คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ



รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด และค่า Ln ของปริมาณรังสีที่คอนดรอยตินซัลเฟตได้รับ



จากกราฟที่ 4.3 จะได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของคอนดรอยตินซัลเฟต (ค่า y) และค่า Ln ของปริมาณรังสีที่คอนดรอยตินซัลเฟต (ค่า x) ได้รับ สมการความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นดังนี้

$$y = -21989x + 146663$$

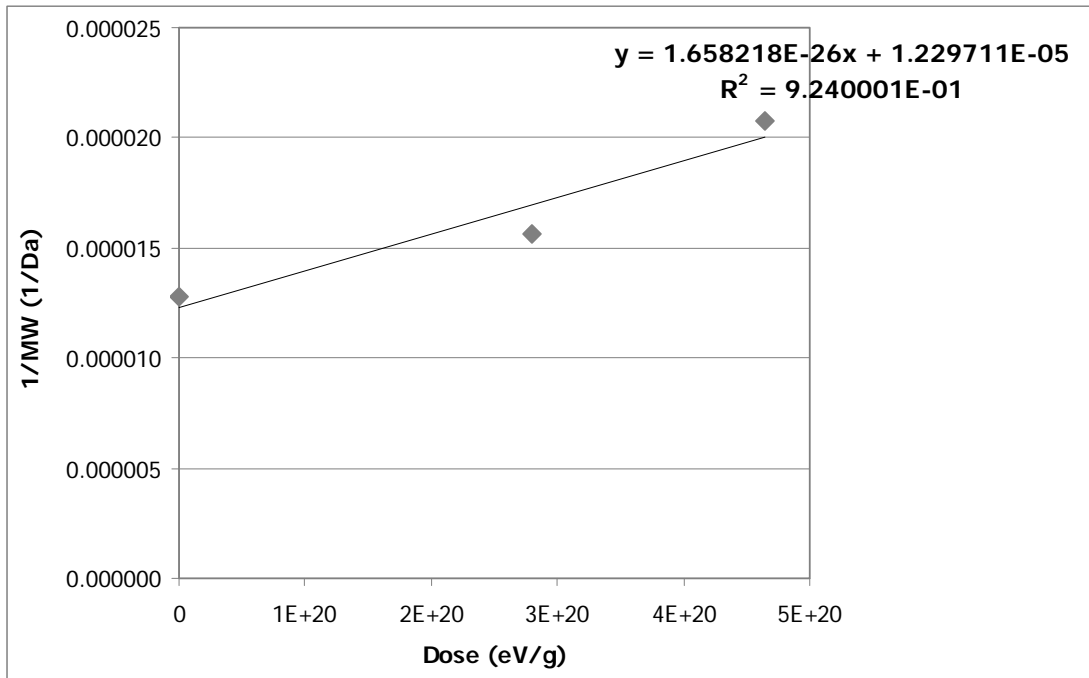
ดังนั้นปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตให้มีขนาดเป็น 20000 – 10000 Da คือ 317 – 500 kGy

4.8 ผลการคำนวณหาค่า $G_{(s)}$ -Value

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดและปริมาณรังสีที่คอนดรอยทินซัลเฟตได้รับ

Dose rate (kGy/hr)	ปริมาณรังสี (kGy)	ปริมาณรังสี (D, eV/g)	น้ำหนักโมเลกุล (M_v , kDa)	$1/(M_v)$
0.69	0	0	78.1	1.28×10^{-5}
0.69	46	2.80×10^{20}	63.9	1.57×10^{-5}
0.69	77	4.64×10^{20}	48.2	2.08×10^{-5}
14.29	163	9.82×10^{20}	36.0	2.78×10^{-5}
14.29	213	1.28×10^{21}	28.7	3.49×10^{-5}
14.29	246	1.48×10^{21}	27.4	3.65×10^{-5}
14.29	277	1.67×10^{21}	21.1	4.74×10^{-5}
14.29	346	2.09×10^{21}	18.3	5.48×10^{-5}
14.29	513	3.09×10^{21}	9.37	1.07×10^{-4}

รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/MW$ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด และปริมาณรังสี (eV/g) ที่คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 48.2 – 78.1 kDa ที่ Dose rate 0.69 kGy/hr



นำสมการที่ได้จากกราฟที่ 4.4 ไปหาค่า $G(s)$ - value ตามความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดกับปริมาณรังสีที่ได้รับดังนี้

$$\frac{1}{M_n} = \frac{1}{M_{n,0}} + \frac{G(s) \times D}{100 \times N_A}$$

จากสมการความสัมพันธ์ที่ได้ $y = (1.658218 \times 10^{-26})x + 1.229711 \times 10^{-5}$

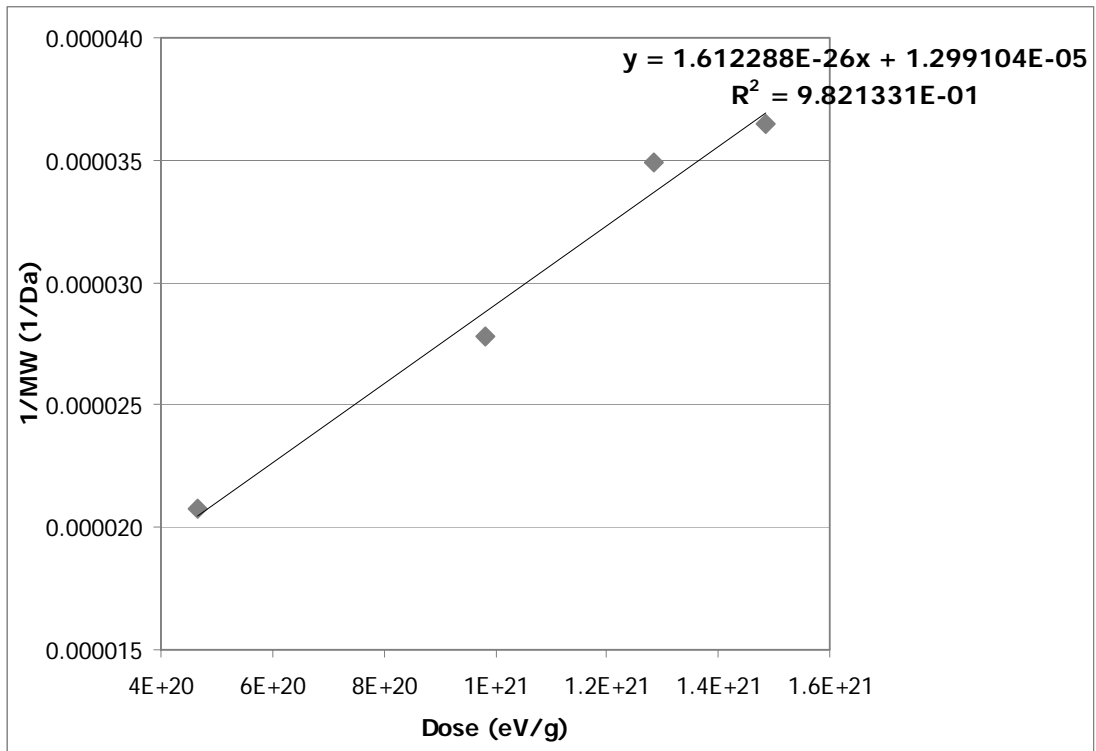
ค่าความชันในสมการ

$$slope = 1.658218 \times 10^{-26} = \frac{G(s)}{100 \times N_A}$$

$$G(s) = 0.9986$$

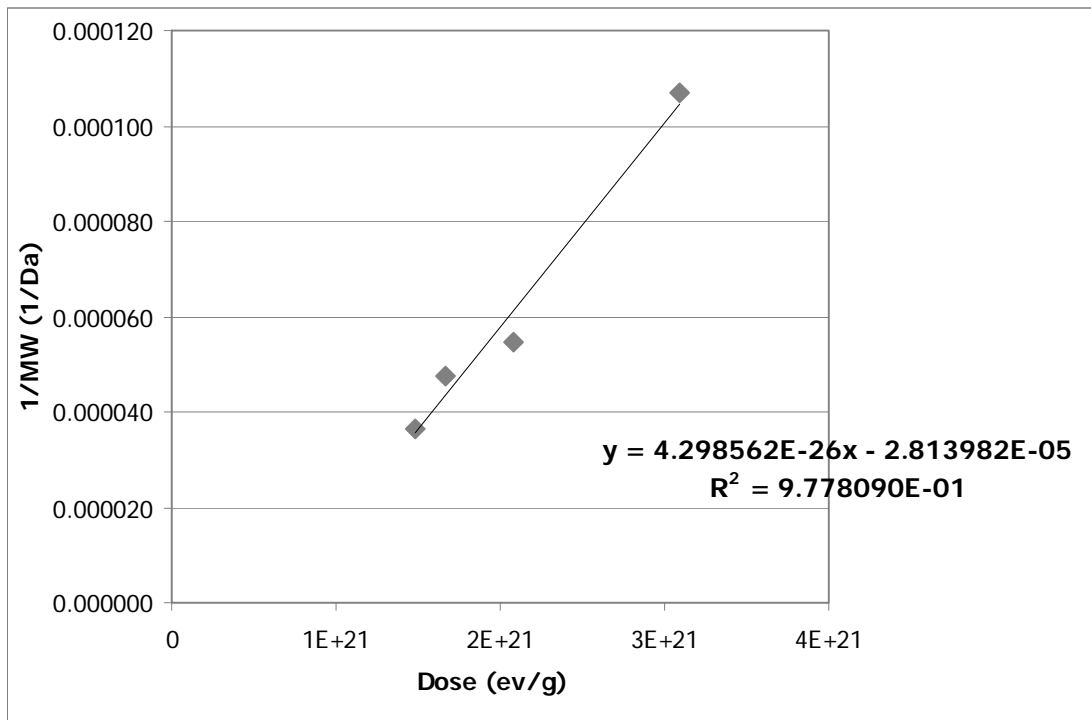
ดังนั้น $G(s)$ - value ของคอนดรอยทีนซัลเฟตในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 78.1 – 48.2 kDa ที่ Dose rate 0.69 kGy/hr มีค่าเท่ากับ 0.999

รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/MW$ น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่คอนดรอยติน ซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 27.4 – 48.2 kDa ที่ Dose rate 14.3 kGy/hr



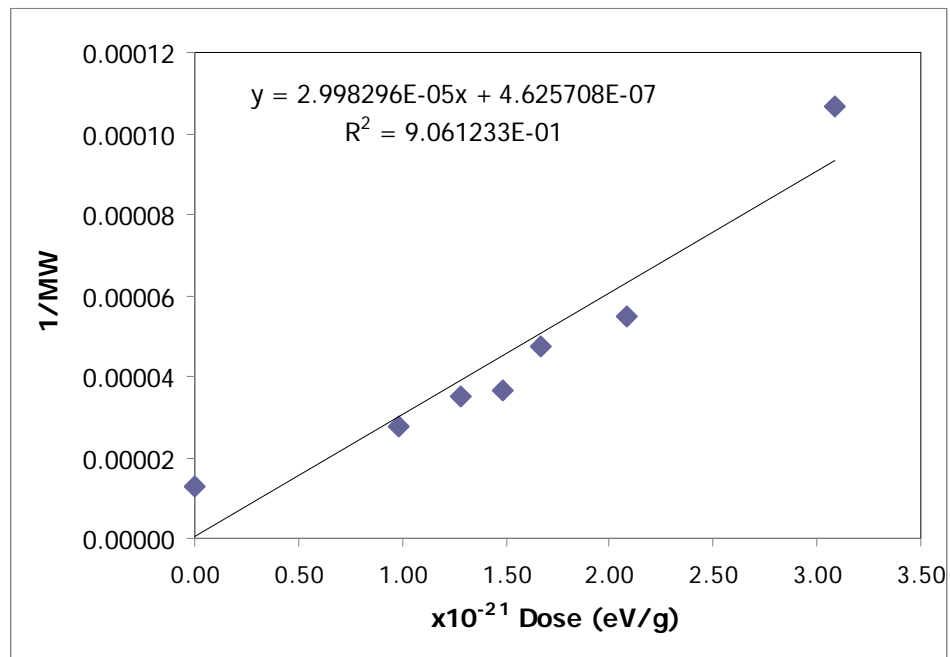
ดังนั้น $G_{(s)}$ - value ของคอนดรอยตินซัลเฟตในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 48.2 – 27.4 kDa ที่ Dose rate 14.3 kGy/hr มีค่าเท่ากับ 0.971

รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่คอนดรอยตินซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 9.37 – 27.4 kDa ที่ Dose rate 14.3 kGy/hr



ดังนั้น $G_{(s)}$ - value ของคอนดรอยตินซัลเฟตในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 27.4 – 9.37 kDa ที่ Dose rate 14.3 kGy/hr มีค่าเท่ากับ 2.59

รูปที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/MW$ น้ำหนักโมเลกุล และปริมาณรังสี (eV/g) ที่คอนดรอยทีนซัลเฟตได้รับ ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด



ดังนั้น $G_{(s)}$ - value ของคอนดรอยทีนซัลเฟตในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 78.1 – 9.37 kDa มีค่าเท่ากับ 1.81

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 งานวิจัยนี้มีความจำเป็นที่จะต้องใช้เอนไซม์ปาเปน เพื่อใช้ในการเตรียมคอนดรอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนอกไก่ แต่เนื่องจากเอนไซม์ปาเปนมีราคาสูง จึงทำการสกัดเอนไซม์ปาเปนเพื่อใช้งานเองโดยเลือกวิธีการสกัดที่ง่ายและใช้ต้นทุนในการสกัดต่ำ การสกัดใช้โซเดียมคลอไรด์หรือเกลือแกงเป็นสารในการสกัดปาเปนออกจากร่างกายมะละกอดิบ ผลการสกัดเอนไซม์ปาเปนเป็นที่น่าพอใจได้ร้อยละของการสกัดเฉลี่ย (%extraction) เท่ากับ 5.22 และเมื่อนำเอนไซม์ปาเปนที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลพบว่าได้ร้อยละของการนำเอนไซม์ปาเปนกลับคืนเฉลี่ย (%recovery) 84.7 ซึ่งนับว่าสูงมาก โดยส่วนของน้ำหนักที่หายไปน่าจะเป็นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหลือจากการสกัดและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ทำให้ได้เอนไซม์ปาเปนผงละเอียดสีขาว ที่มีความบริสุทธิ์สูง

5.1.2 การสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนอกไก่ได้ร้อยละของการสกัดเฉลี่ย (%extraction) สูงกว่าร้อยละ 46.5 โดยการสกัดเริ่มจากการใช้เอนไซม์ปาเปนเพื่อย่อยโปรตีนในกระดูกอ่อนและองค์ประกอบอื่น ๆ ของกระดูกไก่โดยใช้ปาเปน 4 มิลลิกรัม/กรัมของกระดูกอ่อนอกไก่ และทำการสกัดตัวอย่างกระดูกอ่อนอกไก่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วย Trichloroacetic acid (TCA) ทำให้เหลือแต่ส่วนของสารประกอบ Glycosaminoglycans (GAGs) หรือ mucopolysaccharides ในสารละลาย ใช้ Cetylpyridinium chloride เพื่อตกตะกอน Glycosaminoglycans (GAGs) ได้เป็นสารประกอบ Cetylpyridinium-GAG แยกออกจากสารละลาย จากนั้นใช้ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกันเพื่อแยกสารประกอบในกลุ่มของ Glycosaminoglycans (GAGs) ชนิดต่าง ๆ ออกจากคอนดรอยตินซัลเฟตที่ต้องการ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 M เพื่อละลาย Hyaluronidase ออกจากสารประกอบ Cetylpyridinium-GAG แล้วจึงละลายสารประกอบ Cetylpyridinium-CS ที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.1 M สารละลายที่ได้คือสารละลายของ Cetylpyridinium-CS ใช้ Potassium Thiocyanate แยก Cetylpyridinium ออกโดยตกตะกอนเป็นสารประกอบ Cetylpyridinium Thiocyanate ดังนั้นสารละลายที่เหลือคือ

สารละลายของคอนดรอยทินซัลเฟตนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งจะได้ผงคอนดรอยทินซัลเฟตสีขาวอมเหลือง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้ซึ่งค่อนข้างสูงและสูงกว่างานวิจัยที่ได้ใช้วิธีการสกัดแบบเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ปาเปนที่สกัดใช้เองและระบบการสกัดว่ามีประสิทธิภาพสูงในการสกัดคอนดรอยทินซัลเฟตออกจากกระดูกไก่ อีกทั้งยังมีต้นทุนในการสกัดต่ำอีกด้วย

5.1.3 เมื่อนำคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้ไปทำการทดสอบยืนยันด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy ผลการวิเคราะห์ระบุว่า สารที่นำไปวิเคราะห์เป็นสารประกอบในกลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl) โดยมีหมู่คีโตน และเอไมด์เป็นองค์ประกอบ โดยในการวิเคราะห์พบลักษณะและตำแหน่งสเปกตรัมของสเปกตรัมที่ใช้ยืนยันหมู่ไฮดรอกซิล, แอลคิล, คาร์บอกซิล, คีโตน, เอไมด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ D-glucuronic acid (GlcA) และ N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) ที่เป็น monomer ทั้งสองชนิดของคอนดรอยทินซัลเฟต ดังนั้นสารที่นำไปวิเคราะห์จึงน่าจะเป็นคอนดรอยทินซัลเฟตจริง เพื่อเป็นการยืนยันผลการสกัดคอนดรอยทินซัลเฟตให้แม่นยำมากขึ้น จึงมีการนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการยืนยันตำแหน่งสเปกตรัมที่ใช้ในการยืนยันการมีอยู่ของคอนดรอยทินซัลเฟตพบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีสเปกตรัมที่ตำแหน่ง 830.84 และ 842.47 cm^{-1} ซึ่งใกล้เคียงกับตำแหน่งสเปกตรัมของ Chondroitin-6-sulfate และ Chondroitin-4-sulfate ที่ได้รับการยืนยันจากคณะของ Hidemitsu Uchisawa^[21] และคณะของ รศ. ดร. วรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู^[1] ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการสารที่ได้จากการสกัดกระดูกอ่อนไก่เป็นคอนดรอยทินซัลเฟตจริง ซึ่งประกอบด้วยคอนดรอยทินซัลเฟตทั้งสองชนิดคือ Chondroitin-6-sulfate และ Chondroitin-4-sulfate

5.1.4 หลังจากการนำคอนดรอยทินซัลเฟตของแข็งที่สกัดได้ไปทำการฉายรังสีเพื่อให้ได้รับรังสีในปริมาณต่าง ๆ ในอุณหภูมิห้อง และความดันปกติ ได้เลือกทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตด้วยเทคนิค Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight (MALDI-TOF MS) ซึ่งให้น้ำหนักโมเลกุลที่เป็นค่าสัมบูรณ์ ใน Mode ต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย Reverse Negative mode, Linear Positive mode และ Linear Negative mode ผลการวิเคราะห์ ไม่พบตำแหน่งสเปกตรัมใด ๆ ที่แสดงถึงน้ำหนักโมเลกุลและการแตกองค์ประกอบของคอนดรอยทินซัลเฟตเลย พบแต่สเปกตรัมของ Background เท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเทคนิค (MALDI-TOF MS) สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้น้อยมาก เนื่องจากความสามารถในการปลดปล่อยพลังงานที่ได้รับมาจากแสงเลเซอร์อยู่อัตราที่ต่ำมากของสารประกอบชนิดนี้โดยเฉพาะสารประกอบ polysaccharide ที่มีความเป็นกรดสูงอย่างคอนดรอยทินซัลเฟต ทำให้สารประกอบพวกคอนดรอยทินซัลเฟตแตกตัวได้

ยากมากในสภาวะที่เป็นกรดเช่นนี้ การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟต สามารถทำได้โดยการเติมสารบางชนิดเข้าไปเพื่อปรับสภาวะความเป็นกรดให้กลายเป็นกลาง แต่วิธีการเหล่านั้นก็สามารถใช้กับการกับการวิเคราะห์คอนดรอยทินซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำในระดับ disaccharide ถึงระดับ oligosaccharide (< 4000 Da) ได้เท่านั้น เพราะคอนดรอยทินซัลเฟตที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถแตกตัวได้ในสภาวะของเครื่อง MALDI-TOF ดังนั้นคอนดรอยทินซัลเฟตในงานวิจัยนี้ที่มีขนาดสูงถึง 10000 – 100000 Da จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนี้

5.1.5 เทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC) เป็นเทคนิคที่มีการนำมาใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารพอลิเมอร์ โดยให้ผลเป็นค่าสัมพัทธ์ เทคนิคนี้มีการนำมาใช้งานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ที่ง่ายและใช้ได้กับพอลิเมอร์หลากหลายชนิด แต่การวิเคราะห์จะแยกระบบการวิเคราะห์เป็นคอลัมน์สำหรับสารพอลิเมอร์ที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ กับสารพอลิเมอร์ที่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ เนื่องจากงานวิจัยเรื่องน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ในประเทศไทย มุ่งความสนใจไปที่ผลิตภัณฑ์ที่สกัดด้วยสารอินทรีย์ เช่น พอลิเมอร์ในกลุ่มยางเป็นหลัก ดังนั้นเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) จึงเป็นระบบที่ใช้กับตัวทำละลายอินทรีย์เท่านั้น แต่สำหรับคอนดรอยทินซัลเฟตต้องการวัดขนาดโมเลกุลในงานวิจัยนี้ต้องใช้ระบบวัดที่ใช้ตัวทำละลายที่เป็นน้ำเพราะคอนดรอยทินซัลเฟตเป็นสารที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ (aqueous solvent) ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เตตระไฮโดรฟลูออโร แคลอโรฟอรัม และไดคลอโรมีเทน ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในระบบวัดของเครื่อง GPC จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตด้วยเครื่อง GPC ที่มีอยู่ได้

5.1.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของคอนดรอยทินซัลเฟตด้วย Viscometer โดยใช้ Viscometer ชนิด Ubbelohde viscometer พบว่าคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนอกไก่มีน้ำหนักโมเลกุล (M_w) 78.1 kDa ซึ่งอยู่ในช่วงที่ของรายงานที่ระบุว่าน้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของสัตว์จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50000 – 100000 Da เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสีต่าง ๆ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลลดลงตามปริมาณรังสีที่ได้รับเพิ่มขึ้นดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.5 จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของคอนดรอยทินซัลเฟต กับปริมาณรังสีที่ได้รับ และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดกับค่า \ln ของปริมาณรังสีที่ได้รับดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าความสัมพันธ์ที่ได้เป็นความสัมพันธ์แบบเอ็กโพเนนเชียล ซึ่งเป็นไปตามที่มีนำเสนอไว้ในการงานวิจัยในอดีต แสดงให้เห็นว่าในช่วงแรก การลดขนาดโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตด้วยรังสีแกมมานั้นสามารถทำได้ง่าย แต่เมื่อขนาดโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตลดลงถึงระดับประมาณ 500 Da แล้ว การ

ลดขนาดโมเลกุลด้วยรังสีแกมมาจะทำให้ยาก จึงต้องใช้ปริมาณรังสีมากขึ้นเพื่อลดขนาดโมเลกุลให้เล็กลง จากนั้นนำผลการแสดงความสัมพันธ์เส้นตรงที่ได้จากกราฟที่ 4.2 มาใช้ในการคำนวณหาปริมาณรังสีที่ต้องการเพื่อใช้ลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟต ให้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20000 – 10000 Da ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ คือ 317 – 500 kGy ซึ่งนับเป็นปริมาณรังสีที่ค่อนข้างสูง การที่ปริมาณรังสีที่ใช้ในการลดขนาดโมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตมีปริมาณสูงนั้นอาจมาจากการที่น้ำหนักโมเลกุลที่ต้องการเป็นช่วงปลายของความสัมพันธ์แบบเอ็กโพเนนเชียลจึงต้องการปริมาณรังสีที่มาก และเนื่องมาจากการฉายรังสีคอนดรอยตินซัลเฟตนั้นใช้คอนดรอยตินซัลเฟตที่เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผง ลักษณะของสารที่จัดเรียงตัวกันแน่นอาจจะทำให้เกิดการฉายรังสีรวมตัวกันได้ง่ายทำให้โมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตกลับมารวมตัวเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ดั้งเดิม ไม่แตกออกเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ผลการทดลองนี้ก็แสดงให้เห็นว่าการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตที่เป็นของแข็งให้มีขนาดตามที่ต้องการนั้นสามารถทำได้โดยไม่ต้องเติมสารเจือปนอื่นเลย

5.1.7 ตามสมการความสัมพันธ์เพื่อหาค่า $G_{(s)}$ - value นั้นเป็นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีที่ได้รับกับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน แต่เนื่องจากว่าไม่สามารถหาวิธีการวิเคราะห์ที่ให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนได้ จึงประมาณว่าคอนดรอยตินซัลเฟตเป็นพอลิเมอร์ที่มีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลต่ำมาก ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดมีค่าใกล้เคียงกันมาก จึงสามารถใช้ค่าเฉลี่ยโดยความหนืดในการคำนวณหาค่า $G_{(s)}$ - value ได้ จากผลข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณรังสีที่ใช้สามารถนำมาสร้างกราฟเพื่อหาค่า $G_{(s)}$ -value ของการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตได้ดังกราฟที่ 4.4 – 4.6 ซึ่งได้ทำการหาและแสดง ค่า $G_{(s)}$ -value ของการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตในช่วงน้ำหนักโมเลกุลและ Dose rate ต่าง ๆ ไว้ จากผลการคำนวณค่า $G_{(s)}$ -value จากแต่ละช่วง พบว่ามีค่า $G_{(s)}$ -value ที่ค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่าการตัดโมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตให้มีขนาดเล็กลงนั้นสามารถทำได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบค่า $G_{(s)}$ -value ในแต่ละช่วงที่ทำการวิเคราะห์ พบว่าค่า $G_{(s)}$ -value ในแต่ละช่วงน้ำหนักโมเลกุลมีค่าแตกต่างกันไปโดยพบค่า $G_{(s)}$ -value โดยรวมของน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 78.1 – 9.37 kDa มีค่าเท่ากับ 1.81 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทุกพลังงาน 100 eV ที่ให้แก่คอนดรอยตินซัลเฟตที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงดังกล่าว จะทำให้เกิดการตัดโมเลกุลคอนดรอยตินซัลเฟตให้มีขนาดเล็กลง 1.81 โมเลกุล การที่ค่า $G_{(s)}$ -value ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ มีค่าแตกต่างกันนั้นมีปัจจัยหลายประการ ประการหนึ่งที่สำคัญคืออัตราการให้ปริมาณรังสี หรือ Dose rate โดยอัตราการให้ปริมาณรังสีที่มากจะมีผลต่อปริมาณของ

อนุมูลอิสระที่จะให้เกิดการเสื่อมสลายของโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟต ดังนั้นค่า $G_{(s)}$ -value ที่นำเสนอจึงจะสามารถนำไปใช้ได้ในสภาวะการทดลองเช่นเดียวกันนี้เท่านั้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการหาปริมาณรังสีที่ใช้ในการลดน้ำหนักโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตให้มีขนาด 10 – 20 kDa ต้องใช้ปริมาณรังสี 317 – 500 kGy ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่องค์การอนามัยโลกระบุไว้ โดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดไว้ว่าหากมีการฉายรังสีอาหารเกินกว่า 10 kGy จะต้องมีผลการทดลองผลของรังสีในอาหารกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสัตว์ เช่น หมู แต่สำหรับภายในประเทศไทยนั้นได้มีการกำหนดไว้ว่าไม่อนุญาตให้มีการฉายรังสีอาหารเกินกว่า 10 kGy โดยไม่มีข้อยกเว้น ดังนั้นจึงควรมีการทำการทดลองเรื่องการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้นในอนาคตเพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก และอาจจะทำการทดลองเพื่อลดปริมาณรังสีที่ต้องใช้ โดยการเปลี่ยนจากการฉายรังสีคอนดรอยทีนซัลเฟตในสถานะของแข็งเป็นการฉายรังสีสารละลายคอนดรอยทีนซัลเฟตในน้ำ, สารละลายไฮเดียมคลอไรด์ หรือสารละลายอื่นๆ เพื่อเพิ่มการเกิดอนุมูลอิสระในการทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตซึ่งจะมีผลให้ใช้ปริมาณรังสีน้อยลงได้ แต่การกระทำดังกล่าวก็ต้องมีการเพิ่มขึ้นตอนในการกำจัดตัวทำละลายและการทำคอนดรอนทีนซัลเฟตให้บริสุทธิ์อีกขั้นตอนหนึ่ง

งานวิจัยนี้มีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมการผลิตคอนดรอยทีนซัลเฟตในแง่ของการสนองตอบความต้องการของผู้บริโภคเพื่อประโยชน์อันสูงสุด และในแง่ของการประหยัดต้นทุนในการผลิต โดยได้ทำการวิจัยเพื่อให้ได้เงื่อนไขการผลิตที่ง่าย นั่นคือการลดขนาดโมเลกุลคอนดรอยทีนซัลเฟตในสถานะของแข็ง ภายใต้อุณหภูมิห้องและความดันปกติ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงจำเป็นต้องมีผลการทดลองที่แม่นยำเป็นอย่างสูง แต่เนื่องจากการขาดความพร้อมทางด้านเครื่องมือวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลสัมบูรณ์ของประเทศไทยทำให้ต้องทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเปรียบเทียบซึ่งอาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดขึ้นบ้าง แม้จะไม่มากนักเนื่องจากค่าที่ใช้แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย แต่หากได้ทำการทดลองซ้ำด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมกว่าก็จะช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำได้มากขึ้น ถึงอย่างไรก็ดี งานวิจัยชิ้นได้เสนอแนวทางที่เป็นประโยชน์อย่างมากต่อวงการอุตสาหกรรมซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้จริงได้ไม่ยาก

รายการอ้างอิง

- [1] W. Garnjanagoonchorn, et al., 2007. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage, Chemical Engineering and Processing 46: 465–471.
- [2] R. J. Miller, A. Shiedlin, 2002. Molecular weight reduction of polymer using irradiation treatment, US Patent 6383344B1.
- [3] L. D. Ambrosi, et al., 1991. Process for the controlled preparation of low molecular weight glycoaminoglycan, US Patent 4987222.
- [4] H. Uchisawa, et al., 2001. Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chains of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan, Int. Congr. Ser 1223: 205–220.
- [5] M. Ida, et al., 2006. Identification and Functions of Chondroitin Sulfate in the Milieu of Neural Stem Cells, the journal of biological chemistry 281: 5982–5991.
- [6] K. Tanaka, 1978. Molecular Weight Dependence of Intrinsic Viscosity and Sedimentation Coefficient, and Analysis as a Semi-Flexible Coil, J. Biochem 83: 655 – 659.
- [7] Technical Resources International, Inc., 2007. Summary of data for chemical selection: Chondroitin Sulfate: 9007-28-7.
- [8] G. Moyna, 1999. Lecture 35: Carbohydrates III.
- [9] T. E. McAlindon, et al., 2000. Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis, JAMA 283: 1469-1475.
- [10] Available from: www.life-enhancement.com/article_template.asp?ID=334#top
- [11] Available from: http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/rheumatoid/oa
- [12] Available from: <http://lifestyle.kingsolder.com/health>
- [13] Available from: <http://sarojpcu.phpnet.us/health04.html>

- [14] ร.ศ.ชยากริต ศิริอุปถัมภ์, 2551. เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชา Radiation Processing, ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [15] Available from: http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/MolWeight
- [16] Available from: <http://web.missouri.edu/~kattik/katti/Molecular%20Weight%20Determination.pdf>
- [17] Available from: <http://www.eng.uc.edu/~gbeaucag/Classes/Characterization/MolecularWeighthtml/MolecularWeight.html>
- [18] Thermo Nicolet Corporation, 2001. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry.
- [19] อรทัย ลีลาพจนานพร, 2546. Fourier Transform InfraRed Spectrometer, สำนักพัฒนา ศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ
- [20] Available from: <http://www.forensic2.go.th/fpd21/FTIR.htm>
- [21] H. Uchisawa, et al., 2001. Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chains of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan, Int. Congr. Ser 1123: 205 – 220.
- [22] Available from: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>
- [23] Available from: <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html>
- [24] ผศ.ดร.รุ่งสิริ ชาติปฏิเวชกุล, 2550. โครมาโตกราฟี (Chromatography), คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- [25] P. Russo, 2001. Gel Permeation Chromatography/Light Scattering.
- [26] Available from: http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/Viscosity.pdf
- [27] Available from: <http://www.cannoninstrument.com/Viscosity%20Definitions.pdf>

- [28] Available from: <http://pslc.ws/mactest/vis.htm>
- [29] Available from: <http://web.mst.edu/~wlf/MW/Mark.html>
- [30] K. Tanaka, 1978. Molecular Weight Dependence of Intrinsic Viscosity and Sedimentation Coefficient, and Analysis as a Semi-Flexible Coil, J. Biochem 83: 655 – 659.
- [31] I. Khantikaew, et al., Simple separation of papain from fresh fruit skins of *Carica Papaya* by precipitation, Chemical Research Institute, Rajamangala Institute of Technology.
- [32] D. Krishnaiah, et al., 2002. Commercialisation of papain enzyme from papaya, Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources Vol. 1.
- [33] T. Nakano, et al., 1996. Study of sulfated glycosaminoglycans from porcine skeletal muscle epimysium including analysis of iduronosyl and glucuronosyl residues in galactosaminoglycan fractions, J. Agric. Food Chem 44: 1424–1434.
- [34] A. Nimptsch, et al., 2008. Characterization of the quantitative relationship between signal-to-noise (S/N) ratio and sample amount on-target by MALDITOF MS: Determination of chondroitin sulfate subsequent to enzymatic digestion, Analytica Chimica Acta.
- [35] B. Stuart, 2006. Analysis of chondroitin in supplements, LGC Limited.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของคอนดรอยทินซัลเฟตจากผลการวัดความหนืด

ตัวอย่างการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของคอนดรอยทินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 46.482 kGy

ตารางที่ ก.1 ผลการจับเวลาเพื่อวัดความหนืดของสารละลายคอนดรอยทินซัลเฟต

ความเข้มข้น (%w/v)	<i>t</i>			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.0000*	866	864	862	864**
0.0282	907	914	906	909
0.0565	957	957	960	958
0.1130	990	988	998	992
0.2260	1073	1053	1068	1064.5

* ความเข้มข้น 0.000 %w/v คือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 M ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการวัดความหนืดของคอนดรอยทินซัลเฟต

** ค่าเฉลี่ยที่ได้นี้คือ ค่า t_0

คำนวณหาค่าความหนืดสัมพัทธ์ (η_r , relative viscosity) ของสารละลายตามสมการ

$$\frac{\text{efflux time of solution}}{\text{efflux time of our solvent}} = \text{relative viscosity}$$

$$\frac{t}{t_0} = \eta_r$$

จากนั้นนำค่า η_r ที่ได้ไปคำนวณหาค่า inherent viscosity (η_{inh}) ดังสมการ

$$\frac{\ln(\text{relative viscosity})}{\text{concentration}} = \text{inherent viscosity}$$

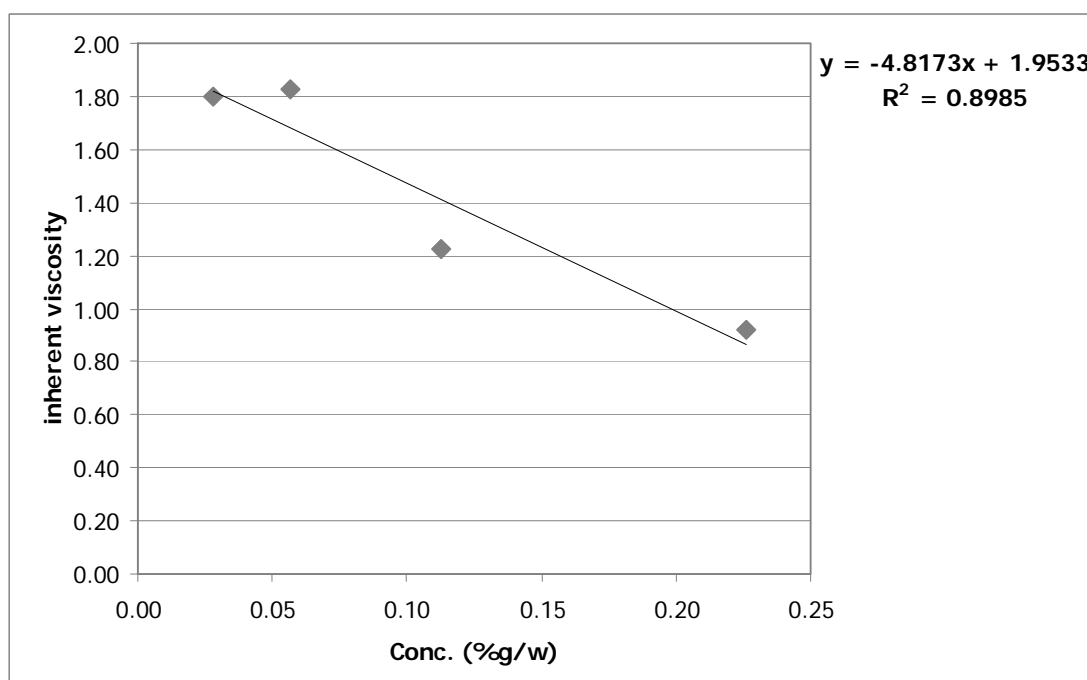
$$\frac{\ln \eta_r}{c} = \eta_{inh}$$

ตารางที่ ก.2 ค่าความหนืดสัมพัทธ์ (η_r) ค่า $\ln(\eta_r)$ และ ค่า inherent viscosity (η_{inh})

ความเข้มข้น (%w/v)	t	t_0	η_r	$\ln(\eta_r)$	η_{inh}
0.0282	909	864	1.0521	0.0508	1.7976
0.0565	958	864	1.1088	0.1033	1.8282
0.1130	992	864	1.1482	0.1382	1.2228
0.2260	1064.5	864	1.2321	0.2087	0.9236

จากนั้นนำค่า inherent viscosity (η_{inh}) ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{inh} กับความเข้มข้น โดยกราฟที่ได้จะมีลักษณะดังนี้

กราฟที่ ก.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง η_{inh} กับความเข้มข้นของคอนดรอยตินซัลเฟต



ความสัมพันธ์ที่ได้ี้จะเป็นเส้นตรง โดยมีจุดตัดแกน y เป็นค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$ intrinsic viscosity) ตามความสัมพันธ์เชิงเส้นจะได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า η_{inh} และความเข้มข้นดังนี้

$$\eta_{inh} = k''[\eta]^2 c + [\eta]$$

สมการเส้นตรงที่ได้เป็นดังนี้

$$y = -4.8173x + 1.9533$$

ซึ่งค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$) = 1.9533 นำค่า $[\eta]$ ที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของคอนดรอยทินซัลเฟต จากสมการ Mark-Houwink ของคอนดรอยทินซัลเฟต

$$[\eta] = 6.5 \times 10^{-6} M_r^{1.14}$$

ดังนั้นคอนดรอยทินซัลเฟตที่ได้รับปริมาณรังสี 46.5 kGy มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (M_v) 63.8 kDa

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิมพ์สิริ พร้อมวงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 9 พฤษภาคม พ.ศ. 2527 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (นิเวศวิทย เทคโนโลยี) ที่ภาควิชานิเวศวิทยเทคโนโลยี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550

