การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยกรดร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

COLLAGEN EXTRACTION FROM PORCINE SKIN USING ACID TREATMENT INCORPORATED WITH PERIODIC PRESSURIZED TECHNIQUE

นางสาว กาญจนา ไชยยะ รหัสนิสิต 52364858

นางสาว ชโรชา ใจสันกลาง รหัสนิสิต 52364933

นางสาว มณีรัตน์ ทิมาสาร รหัสนิสิต 52365138

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ 5 ส.ค. 2556
เลขทะเบียน 16823693
เลขเรียกหนังสือ ฝร.
มหาวิทยาลัยนเรศวร ก 2556 2355

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2555

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยกรดร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

ผู้ดำเนินโครงงาน

นางสาว กาญจนา	ไชยยะ	รหัสนิสิต	52364858
นางสาว ชโรชา	ใจสันกลาง	รหัสนิสิต	52364933
นางสาว มณีรัตน์	ทิมาสาร	รหัสนิสิต	52365138

ที่ปรึกษาโครงงาน ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา วิศวกรรมอุตสาหการ

ปีการศึกษา 2555

.....

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....ที่ปรึกษาโครงงาน
(ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์)

.....กรรมการ
(ดร.นพวรรณ โม้ทอง)

.....กรรมการ
(ดร.ภมรรัตน์ จันธรรม)

.....กรรมการ
(อาจารย์อาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์)

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยกรดร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง			
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาว กาญจนา	ไชยยะ	รหัสนิสิต	52364858
	นางสาว ชโรชา	ใจสันกลาง	รหัสนิสิต	52364933
	นางสาว มณีรัตน์	ทิมาสาร	รหัสนิสิต	52365138
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์			
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี			
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ			
ปีการศึกษา	2555			

.....

บทคัดย่อ

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในหลายๆ ด้านอาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางค์เป็นต้นโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ปัจจุบันได้รับความนิยมในการนำคอลลาเจนมาประยุกต์ใช้งานมากขึ้นอาทิ ผิวหนังเทียมสำหรับผู้ป่วยแผลไฟไหม้ ไหมเย็บแผลและใช้ในการขนส่งยา

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยกรดร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงโดยทำการศึกษาจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงและความเข้มข้นของกรดอะซิติก วิเคราะห์คุณสมบัติของคอลลาเจนโดยการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ศึกษาสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจนโดยเทคนิค DSC และศึกษาโครงสร้างทางเคมีของคอลาเจนด้วยเทคนิค FT-IR

จากการศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ พบว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงกว่าคอลลาเจนด้วยวิธีการปั่นกวนที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเท่ากัน การเพิ่มจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันแบบช่วงส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นนอกจากนั้นยังพบว่าความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์

จากการศึกษาสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจนโดยเทคนิค DSC พบว่าการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วงมีผลต่อเสถียรภาพทางความร้อนของคอลลาเจน การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อโครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจน

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะ ดร. อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน และอาจารย์ประจำสาขาวิชาทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำคำปรึกษาแนะนำวิธีแก้ปัญหา รวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ได้ให้วิชาความรู้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางวิชาการแก่บุคคลทั่วไป นิสิต นักศึกษาที่สนใจค้นคว้าและเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยกรดร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

สุดท้ายนี้ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้การดูแล อบรมสั่งสอนและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา ตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จการศึกษา

คณะผู้ดำเนินโครงงานวิศวกรรม
นางสาว กาญจนา ไชยยะ
นางสาว ชโรชา ใจสันกลาง
นางสาว มณีรัตน์ ทิมาสาร

มีนาคม 2555

สารบัญ

หน้า

ใบรับรองปริญญานิพนธ์.....ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฌ

บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....1
1.2 จุดประสงค์การทดลอง.....2
1.3 ขอบเขตกำหนดช่วงการศึกษา.....2
1.3.1 ตัวแปรต้น.....2
1.3.2 ตัวแปรควบคุม.....3
1.3.3 การวิเคราะห์สมบัติการสกัดคอลลาเจน.....3
1.4 สถานที่ในการดำเนินงาน.....3
1.5 ระยะเวลาในการดำเนินงาน.....3
1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน.....4

บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....5
2.1 คอลลาเจน.....5
2.2 โครงสร้างคอลลาเจน.....6
2.3 ชนิดคอลลาเจน.....6
2.4 การสกัด.....8

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1 สถานะของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร....8
2.4.2 การสกัดคอลลาเจน....9
2.5 การใช้ประโยชน์....10
2.5.1 ทางการแพทย์....10
2.5.2 ทางด้านความงาม....11
2.5.3 อุสาหกรรมอาหาร....11
2.6 ทฤษฎีของการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry)....11

บทที่ 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....13

บทที่ 4 วิธีการดำเนินโครงการ....16
4.1 อุปกรณ์และสารเคมี....16
4.2 วิธีการทดลอง....16
4.2.1 การเตรียมหนังหมู....16
4.2.2 การกำจัดไขมัน....16
4.2.3 ขั้นตอนการสกัด Collagen....18
4.3 การวิเคราะห์....18
4.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้....18
4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจน....18
4.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน....19

บทที่ 5 ผลการทดลองและกาวิเคราะห์....20
5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้....20
5.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจน....22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.3 วิเคราะห์และตรวจสอบโครงสร้างของคอลลาเจนที่สกัดได้.....24
5.3.1 สเปกตรัมของ FT-IR ของคอลาเจนมาตรฐาน.....24
5.3.2 สเปกตรัมของ FT-IR ของคอลาเจนที่สกัดได้.....24
บทที่ 6 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....27
6.1 สรุป.....27
6.2 ข้อเสนอแนะ.....28
เอกสารอ้างอิง.....29

ภาคผนวก ก.....31

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน....4

2.1 ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ....7

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 รูปโครงสร้างของคอลลาเจน....5

2.2 รูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dehydration)....12

4.1 รูปแสดงขั้นตอนการทดลอง....17

4.2 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง....19

5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ของคอลลาเจนที่สกัดร่วมกับกรดอะซิติก....20

5.2 รูปการวิเคราะห์ด้วย DSC ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที วิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:2ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ และวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ ตามลำดับ....22

5.3 รูปการวิเคราะห์ด้วย DSC ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง :4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1-0.5 โมลาร์ 4 บาร์ ตามลำดับ....23

5.4 การวิเคราะห์ด้วย FT-IR ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที วิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:2ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ และวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1-0.5 โมลาร์ 4 บาร์ ตามลำดับ....25

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

คอลลาเจน (Collagen) เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักที่พบในร่างกายสัตว์พบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) โดยในโปรตีนทั้งหมดมีคอลลาเจนอยู่ประมาณร้อยละ 30 คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Fibrous Protein) มีคุณสมบัติ อ่อนนุ่ม บิดงอได้ไม่ยืดหยุ่น ไม่มีสีแต่เมื่ออยู่รวมกันเป็นมัด (Bundle) จะมองเห็นเป็นสีขาว แต่ละมัดจะประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนหลายๆ เส้นรวมกัน แต่ละเส้นใยมีความยาวมากและประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็กลงไปอีกเรียกว่า Fibril ซึ่งประกอบด้วย Microfibril หลายๆเส้นรวมกันเป็นคอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fibers) เนื่องจากคอลลาเจนมีความสามารถในการทนแรงดึงสูง จึงทำให้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระดูก กระดูกอ่อน ฟัน และผิวหนัง มีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นเมื่ออยู่รวมกับเคอราติน (Soft Keratin) เมื่อเกิดการเสื่อมสภาพจะทำให้เกิดเป็นรอยเหี่ยวย่นนอกจากนั้นคอลลาเจนยังทำให้หลอดเลือดแข็งแรงและกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ [1]

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในหลายๆด้านอาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางค์ การถ่ายรูปเป็นต้นโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ปัจจุบันได้รับความนิยมในการนำคอลลาเจนมาประยุกต์ใช้งานมากขึ้นอาทิ ผิวหนังเทียมสำหรับผู้ป่วยแผลไฟไหม้ ไหมเย็บแผลและใช้ในการขนส่งยา [2]

ในปัจจุบันกระบวนการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกันซึ่งวิธีที่นิยมใช้กันมากคือการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen) คอลลาเจนสามารถละลายได้ในสารละลายกรดอย่างเช่นพวก อะซิติก พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว [3] การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายเกลือ (Neutral Salt Soluble Collagen) การใช้สารละลายเกลือในการสกัดคอลลาเจนจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่าและปริมาตรของสารละลายเกลือที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ แล้วทำให้คอลลาเจนบริสุทธิ์ด้วยการไดอะไลซ์ การตกตะกอนและการเหวี่ยงแยก การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ (Soluble Collagen) อาทิ เอนไซม์เปปซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วนทีโลเปปไทด์ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Amino Acid)

อย่างไรก็ตามทั้งกระบวนการการสกัดด้วยกรดและเอนไซน์ยังมีข้อเสีย คือ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ต่ำ การประยุกต์ใช้แรงกลร่วมกับกรดหรือเอนไซน์เป็นกระบวนการสกัดที่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้ การประยุกต์ใช้แรงกลโดยการใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอมไซน์สามารถเพิ่มปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้และไม่ส่งผลทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนเสียสภาพ จากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้แรงกลร่วมกับการสกัดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดคอลลาเจนได้ [4]

กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วงเป็นกระบวนการทางกลที่มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ร่วมกับกรดหรือเอมไซน์ได้ ดังจะเห็นได้จากรายงานของ I. Prasertsung และคณะ [5] ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมู ในกระบวนการเตรียมดังกล่าวได้ประยุกต์กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซมในการกำจัดเซลล์ออกจากผิวหนังชั้นในของหมูที่มีความซับซ้อน จากการศึกษาพบว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ออกจากโครงสร้างของหนังหมูได้สูงขึ้นเนื่องจากการเพิ่มแรงดันสามารถช่วยทำให้เอนไซม์แทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดีขึ้นส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะมุ่งเน้นในการประยุกต์ใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้กรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยตัวแปรที่จะทำการศึกษาคือจำนวนรอบของกระบวนการอัดคลายแรงดันและเวลาที่ใช้ในการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

1.2 จุดประสงค์การทดลอง

1.2.1 ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized)

1.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางด้านความร้อนและทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้

1.3 ขอบเขตกำหนดช่วงการศึกษา

1.3.1 ตัวแปรต้น

1.3.1.1 จำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันแบบช่วงโดยอัดคลายแรงดัน ทุกๆ 15 นาที และทุกๆ 30 นาที

1.3.1.2 ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5-1 โมลาร์

1.3.2 ตัวแปรควบคุม

1.3.2.1 อุณหภูมิของสารละลาย 4-10 องศาเซลเซียส

1.3.2.2 ความดันภายในถังอัดคลายแรงดัน 4 บาร์

1.3.2.3 หนังหมูอายุ 3-6 เดือน

1.3.2.4 อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของหนังหมูต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 15

1.3.3 การวิเคราะห์สมบัติการสกัดคอลลาเจน

1.3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้จากการคิดน้ำหนักแห้งหลังการสกัดเปรียบเทียบกับน้ำหนักหนังหมูแห้งก่อนการสกัด

1.3.3.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนด้วยเทคนิค DCS (Differential Scanning Calorimetry)

1.3.3.3 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน

ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน

ตั้งแต่เดือน 1 มิถุนายน พ.ศ. 2555 ถึง 31 มกราคม พ.ศ. 2556

1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

ตารางที่ 1.1ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

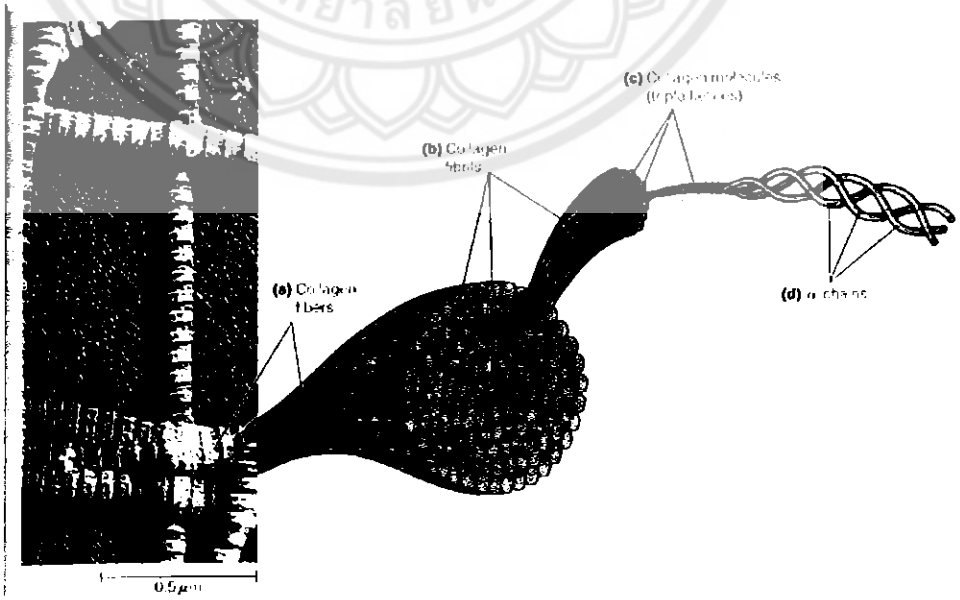
	การดำเนินโครงงาน	ช่วงเวลา															
		มิ.ย.		ก.ค.		ส.ค.		ก.ย.		ต.ค.		พ.ย.		ธ.ค.		ม.ค.	
1.6.1	วางแผนการดำเนินงาน																
1.6.2	ศึกษาค้นคว้าข้อมูลในการทำโครงงาน																
1.6.3	หาแหล่งวัตถุดิบและเครื่องมือเพื่อทดลอง																
1.6.4	ทำการทดลอง																
1.6.5	วิเคราะห์ผลการทดลอง																
1.6.6	สรุปผลการทดลอง																
1.6.7	ทำรูปเล่มรายงาน																

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอลลาเจน (Collagen)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเส้นใย (Fibrous Protein) จะพบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น เส้นเอ็น กระดูก ผิวหนัง ระบบท่อลำเลียงในสัตว์ รวมถึงแผ่นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเหนียว โปรตีนกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 10 ส่วนในปลาจะมีปริมาณน้อยกว่า คอลลาเจนมีหลายชนิด ทั้งที่ละลายในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง สารละลายกรด และบางชนิดก็ไม่ละลายในสารละลายชนิดใด

คอลลาเจน (Collagen) คือ โปรตีนโครงสร้างหลักที่พบในร่างกายสัตว์พบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) โดยในโปรตีนทั้งหมดจะมีคอลลาเจนอยู่ประมาณร้อยละ 30 ซึ่งคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Fibrous Protein) ที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของร่างกาย มีคุณสมบัติ อ่อนนุ่ม บิดงอได้ไม่ยืดหยุ่น ไม่มีสีแต่เมื่ออยู่รวมกันเป็นมัด (Bundle) จะมองเห็นเป็นสีขาว แต่ละมัดจะประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนหลายๆ เส้นรวมกันแต่ละเส้นใยมีความยาวมากและประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็กเรียกว่า Fibril ซึ่งประกอบด้วย Microfibril หลายเส้นรวมกัน คอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fibers) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1รูปโครงสร้างของคอลลาเจน [6]

จะทำให้เซลล์ต่างๆคงรูปร่างได้ และเนื่องจากคอลลาเจนมีความสามารถในการทนแรงดึงสูง จึงทำให้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระดูก กระดูกอ่อน ฟัน ทำให้ผิวหนังมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นเมื่ออยู่รวมกับเคอราติน (Soft Keratin) แต่เมื่อมันเกิดการเสื่อมสภาพจะทำให้เกิดเป็นรอยเหี่ยวย่นนอกจากนั้นคอลลาเจนยังทำให้หลอดเลือดแข็งแรงและกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ [2]

2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนมีโครงสร้างประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ที่ขดกันเป็นเกลียวและหมุนไปทางซ้าย (Left-Handed Helix Polypeptide Chain) 3 สายมาพันกันเป็นเกลียวอีกครั้ง โดยทิศทางการบิดของเกลียวจะหมุนไปทางด้านขวา (Right-Handed Coiled Coil) ได้โครงสร้างที่เรียกว่า ฮีลิกซ์สามสาย (Triple Helix) โดยภายในสายพอลิเปปไทด์แต่ละสายจะเกิดจากชุดของกรดอะมิโนของ (Gly-X-Y)n มาเรียงตัวต่อๆ กันไปเป็นสายของพอลิเมอร์ที่ยาวขึ้นโดย Gly คือ Glycine(Gly) X และ Y ส่วนใหญ่เป็น Proline (Pro) และ 4-Hydroxyproline (Hyp) โดย Hyp เป็นอนุพันธ์ของ Pro ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH Group) ลงใน Pro โดยอาศัยเอนไซม์ และมีโคแฟคเตอร์เป็นกรดแอสคอบิค (Ascorbic Acid) หรือวิตามินซีช่วยในการเกิดปฏิกิริยาในชุดของกรดอะมิโน โครงสร้างของคอลลาเจนจะมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อม ซึ่งจะมีผลทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงและคงตัวมากขึ้น ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆได้ยาก นอกจากนั้นโมเลกุลคอลลาเจนที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันได้คอลลาเจนไฟบริล (Collagen Fibril) และคอลลาเจนไฟบริลรวมกันเป็นคอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fiber) [2]

2.3 ชนิดของคอลลาเจน

คอลลาเจนที่พบในปัจจุบันมีทั้งหมดกว่า 30 ชนิด โดยการแบ่งประเภทของคอลลาเจนแบ่งตามมวลโมเลกุล การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ความยาวของสายฮีลิกซ์ และคุณสมบัติของส่วนที่ไม่เป็นสายฮีลิกซ์คอลลาเจนชนิดที่พบมากก็คือ คอลลาเจน Type I, II, IIIและ IV แสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งในการศึกษามักจะใช้คอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมากและมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในวงการแพทย์ ซึ่งคอลลาเจน Type I นี้พบได้ส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูงในส่วนของเอ็น หนัง และกระดูก ซึ่งจะประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สายα1(I) จำนวน 2 สาย และ α2(I) จำนวน 1 สายซึ่งสาย α1(I) และ α2(I) จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน คอลลาเจนชนิดนี้จะ

พบกรดอะมิโนชนิดไกลซีนประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีส่วนที่ไม่บิดเป็นเกลียวสั้น ประกอบด้วยไทโรซีนและฮิสติดีน ไม่พบทริปโตเฟนและซีสเตอีน [3]

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ [1]

Collagen Type	Chain Compossition	Tissue Distribution
I	$(\alpha1(I))_2\alpha2(I)$, Trimer$(\alpha1(I))_3$	Skin, Tendon, Bone, Cornea, Dentin, Fibrocartilage
II	$(\alpha1(II))_3$	Hyaline Cartilage, Vitreous, Nucleus Pulposus, Notochord
III	$(\alpha1(III))_3$	Large Vessels, Uterine Wall, Dermis, Intestine, Heart Valve, Gingiva (Usually Coexists With Type I Except In Bone, Tendon, Cornea)
IV	$(\alpha1(IV))_2$ $\alpha2(IV)$	Basement membranes in all organs
V	$\alpha1(V)$ $\alpha2(V)(3(V)$ or $(\alpha1(V))_2\alpha2(V)$ or $(\alpha1(V))_3$	Cornea, Placental Membranes, Bone, Large Vessels, Hyaline Cartilage, Gingival, Tendons, Interstitial Tissues
VI	$\alpha1(Vi)$ $\alpha2(VI)$ $\alpha3(VI)$	Descemet s Membrane, Skin, Nucleus Pulposus, Heart Muscle, Liver, Kidney, Perichondrium
VII	$(\alpha1(VII))_3$	Skin, Placenta, Lung, Cartilage, Cornea, Epidermal/Dermal Junction
VIII	$\alpha1(VIII)$ $\alpha2(VIII)$ Chain Organization Of Helix	Produced by Endothelial Cells, Descemet s Membrane
IX	$\alpha1(IX)$ $\alpha2(IX)$ $\alpha3(IX)$	Cartilage
X	$(\alpha1(X))_3$	Hypertrophic And Mineralizing Cartilage
XI	1 $\alpha2$ $\alpha3$ $\alpha1$ or $\alpha1(XI)$ $\alpha2(XI)$ $\alpha3(XI)$	Cartilage, Intervertebral Disc, Vitreous Humour

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ [1]

Collagen type	Chain compossition	Tissue distribution
XII	$(\alpha 1(XII))_3$	Chicken Embryo Tendon, Bovine Periodontal Ligament, Tendons and Fibril Associated Collagen
XIII	Unknown	Cetal Skin, Bone, Intestinal Mucosa, Epidermis, Hair Follicles and Nail Root Cells
XIV	Unknown	Same as Type I
XV	Unknown	Many Tissues, Homology To Type XVIII
XVI	Unknown	Under Study
XVII	Unknown	Hemidesmosomes and Skin
XVIII	Unknown	Liver and Kidney
XIX	Unknown	Eyes, Brain, Testes, and Embryonic Tissues
XX - XXV	Unknown	Unknown

2.4 การสกัด

การสกัด คือ การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม เทคนิคการสกัดสามารถแบ่งย่อยได้ตามสถานะของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารสามารถแบ่งเป็น 3 วิธีดังนี้

2.4.1 สถานะของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร

2.4.1.1 Solid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของแข็ง การสกัดแบบนี้มีหลักการไม่แตกต่างจากการหาตัวทำละลายเพื่อตกผลึกสาร

2.4.1.2 Liquid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว

2.4.1.3 Acid/Base Extraction เป็นการใช้ปฏิกิริยากรดเบสเพื่อแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดแก่ กรดอ่อน กลาง และเบสออกจากกัน

2.4.2การสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนมีหลายวิธี โดยขั้นตอนแรกก่อนการสกัดจะเริ่มต้นจากการทำความสะอาดวัตถุดิบ เพื่อกำจัดสารอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน ยกตัวอย่างเช่น ไขมัน แล้วจึงค่อยทำการสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาด้วยวิธีการต่างๆ

2.4.2.1 การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen)

คอลลาเจนสามารถละลายได้ในสารละลายกรดเจือจางอย่างเช่นพวก อะซิติก พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว กรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าสารละลายเกลือ คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดเจือจางจะเป็นคอลลาเจน Type I [2] **สำหรับการสกัดคอลลาเจนจะมีปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) มาเกี่ยวข้อง ไฮโดรไลซีสเป็นปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปทำ**ปฏิกิริยาทำให้สารตั้งต้นหลุดออกไฮโดรไลซีสของเกลือ หมายถึง ปฏิกิริยาระ**หว่างเกลือกับน้ำ** เกลือเป็นอิเล็กโทรไลต์แก่ เมื่อเกลือละลายในน้ำ เกลือจะแตกตัวออกเป็นไอออนบวก**และไอออนลบทั้งหมด** ดังนั้นสมบัติของสารละลายของเกลือ จึงขึ้นอยู่กับไอออนบวกและไอออน**ลบในสารละลาย**ไอออนบางตัวสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำและให้ H^+ หรือ OH^- จึงเรียกปฏิกิริยา**นี้ว่า ไฮโดรไลซีส** [7] สำหรับไอออนบวก เช่น $NH4^+(aq)$ เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการได้ดังนี้

$$\mathbf{NH_4^+(aq) + H_2O \leftrightarrow NH_3(g) + H_3O^+(aq)} \qquad (2.1)$$

จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไอออนบวก $NH_4^+(aq)$ ที่เกิด**ขึ้น** NH_4^+ **จะให้**โปรตอนกับ H_2O (l) แล้วได้ H_3O^+ (aq) ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นกรด**สำหรับไอออนลบ เช่น** CH_3COO^- เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการ

$$\mathbf{CH_3COO^-(aq) + H_2O(l) \leftrightarrow CH_3COOH(aq) + OH^-(aq)} \qquad (2.2)$$

จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไอออนลบ CH_3COO^- **ที่เกิดขึ้น** CH_3COO^- (aq) จะรับ H^+ จากน้ำแล้วได้ OH^- (aq) ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นเบสดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ถ้าไอออนลบของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นเบส และถ้าไอออนบวกของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส จะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นกรด

2.4.2.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายเกลือ (Neutral Salt Soluble Collagen) การใช้สารละลายเกลือในการสกัดคอลลาเจนจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่าและปริมาตรของสารละลายเกลือที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ แล้วทำให้คอลลาเจนบริสุทธิ์ด้วยการไดอะไลซ์ การตกตะกอน และการเหวี่ยงแยกคอลลาเจนที่สกัดได้จะประกอบด้วยคอลลาเจน Typel และ Typelll เล็กน้อย [2]

2.4.2.3 การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ (Enzyme Soluble Collagen) การสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้คอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ที่เรียกว่า ส่วนทีโลเปปไทด์ ซึ่งจะไม่สามารถจะนำคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไปใช้ในทางการแพทย์ได้เพราะจะทำให้เกิดอาการแพ้ การแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำเอนไซม์มาใช้ร่วมในการสกัดโดยส่วนใหญ่ที่ใช้คือ เอนไซม์เปปซิน โดยเปบซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วนทีโลเปปไทด์ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Amino Acid) ทำให้ทีโลเปบไทด์ถูกกำจัดออก [2] ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส เช่น เมื่อเติมยีสต์ลงในสารละลายน้ำตาลทรายแล้วตั้งทิ้งไว้ เมื่อนำสารละลายที่ได้ทดสอบกับสารละลายเบเนดิกต์จะได้ตะกอนสีแดงอิฐของคอปเปอร์(I) ออกไซด์ (Cu_2O) เนื่องจากยีสต์มีเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสน้ำตาลทรายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กคือกลูโคสและฟรุกโตส

$$\underset{\text{Sucrose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O \xrightarrow{\text{hydrolysis}} \underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Fructose}}{C_6H_{12}O_6} \qquad (2.3)$$

2.5 การใช้ประโยชน์

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขว้างในหลายๆด้านอาทิ อุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ ความงาม เป็นต้น

2.5.1 ทางการแพทย์

คอลลาเจนมีการใช้งานอย่างกว้างขวางในวงการศัลยกรรมความงาม ศัลยกรรมกระดูก การจัดฟัน และวงการศัลยกรรมทั่วไป เป็นส่วนประกอบของผิวหนังสังเคราะห์ที่ใช้ในผู้ป่วยที่สูญเสียผิวหนังเนื่อง จากอุบัติเหตุไฟไหม้ ใช้ในการปกปิดแผล ซึ่งใช้คอลลาเจนสังเคราะห์จากผิวหนังของลูกวัวหรือจากหมู บางครั้งจะใช้ผิวหนังจากผู้บริจาค หรือใช้ซิลิโคนสังเคราะห์แทนผิวหนังแท้ที่สูญเสียไป

2.5.2ทางด้านความงาม

คอลลาเจนเป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ในเครื่องสำอางค์เพราะถือว่าปลอดภัย มักจะเป็นส่วนผสมในครีมบำรุงผิวและผม แป้งรองพื้น แต่เพียงช่วยปกปิดของร่างกายเท่านั้น ไม่สามารถแก้ไขโครงสร้างของคอลลาเจนภายในได้ คอลลาเจนมีคุณสมบัติช่วยอุ้มน้ำ จึงช่วยบำรุงผิวให้เนียนนุ่มชุ่มชื่น แต่คอลลาเจนในเครื่องสำอางค์มักมีโมเลกุลใหญ่จึงเคลือบได้เพียงภายนอกเท่านั้น ไม่สามารถซึมลงผิวหนังเพื่อลงมาทดแทน หรือกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนธรรมชาติได้เพียงชั่วคราวเท่านั้น

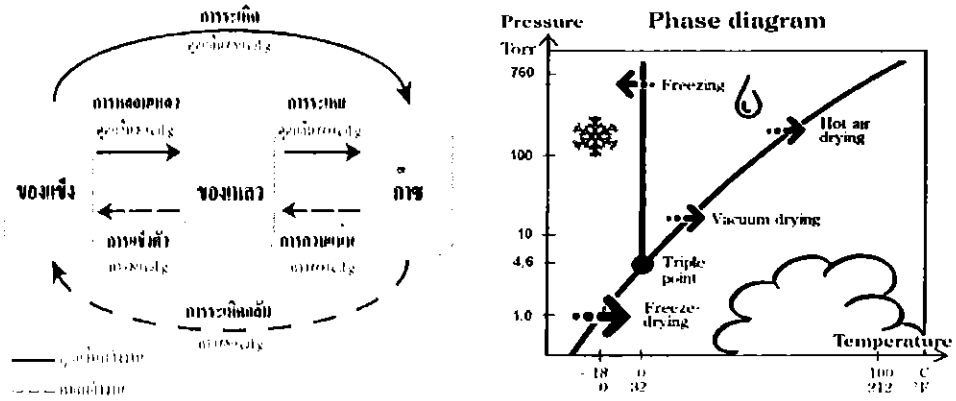
2.5.3 อุสาหกรรมอาหาร

คอลลาเจนที่ใช้ในอุตสาหากรรมอาหาร จะเป็นวุ้นๆที่เราเรียกว่าเจลาตินและผลิตฟิล์มเคลือบอาหาร แต่ที่กำลังนิยมคือการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยปัจจุบันในประเทศไทยจะพบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ผสมคอลลาเจนสังเคราะห์ หลายชนิด ไม่ว่าคอลลาเจนผง คอลลาเจนเม็ด เครื่องดื่มคอลลาเจนเป็นต้น

2.6 ทฤษฎีของการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) [8]

ในการสกัดคอลลาเจนเมื่อสกัดเสร็จ ทำการแยกกรดอะซิติกและน้ำออกจากคอลลาเจนที่สกัดได้ จึงมีการนำเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็งมาประยุกต์ใช้ในการแยกกรดอะซิติกและน้ำออกจากคอลลาเจนที่สกัดได้ออกเพราะกรดอะซิติกและน้ำมีจุด Triple Point สูงกว่าคอลลาเจนจึงทำให้กรดอะซิติกและน้ำระเหิดออกไปเมื่อมีการลดความดันลดอย่างรวดเร็ว กระบวนการดังกล่าวส่งผลให้มีกรดอะซิติกเหลืออยู่บางส่วน เพราะเวลาที่ใช้ในกระบวนการแยกอาจไม่เพียงพอ จึงทำให้กรดอะซิติกระเหิดออกไปไม่หมด ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างมาตรฐานของคอลลาเจนที่สกัดได้และยังเป็นการรักษาสมบัติและโครงสร้างของคอลลาเจนไม่ให้เสียสภาพจากกระบวนการแยก

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dehydration หรือ Lyophilization) หมายถึงการทำแห้ง (Dehydration) ด้วยการการแช่เยือกแข็ง (Freezing) ให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อนแล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (Sublimation) เป็นไอ ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ (ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสน้ำแข็งระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า)



รูปที่ 2.2รูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dehydration) [8]

ขั้นตอนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับการทำแห้งแบบ**แช่เยือกแข็ง** ก็**เหมือน**กับการผลิตอาหารแห้งโดยทั่วไป คือเริ่มจาก การเตรียมวัตถุดิบให้อยู่ใน**สภาพที่เหมาะสม**จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการหลักซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การแช่เยือกแข็ง (Freezing) เป็นการลดอุณหภูมิของสารให้**ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง** (Freezing Point) **เพื่อ**ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) อัตราเร็วของ**การแช่เยือกแข็ง** (Freezing Rate) ควรเป็นการแช่แข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก **การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว** ที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น ทำการแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) **ทำการแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน** (Cryogenic Freezing) และ**ทำการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด** (Immersion Freezing) เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 2 การทำแห้งขั้นต้น (Primary Drying) เป็นการลดปริมาณน้ำ (Dehydration) **โดยการระเหิด** น้ำแข็งให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศ **เพื่อ**ให้ผลึกน้ำแข็งที่**อยู่ภายในเกิดการระเหิด**เป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของสุญญากาศ (Vacuum) **ควรอยู่ต่ำกว่า** 132 ปาสกาล และ 132 มิลิปาสกาลตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ **การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง** (Ice Layer) **จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระเหิดไป**เป็นไอทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) จากนั้น เป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้ง ออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาการระเหิด ขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

ขั้นตอนที่ 3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) **เมื่อการทำแห้งขั้นต้น เสร็จสมบูรณ์** น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพื่ออุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

บทที่3
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1994 P. Semal และ R. Orban [9] ได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากกระดูก ซึ่งกระดูกที่นำมาศึกษาในการสกัดคือ กระดูกคน กระดูกกวางเรนเดียร์ และกระดูกสัตว์โบราณประเภทม้า (อายุ47,000 ปี) โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ตอน คือสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 2 มิลลิลิตร ต่อ ผงกระดูกน้ำหนัก 200 มิลลิกรัม และใช้การเหวี่ยงแยกกับไม่ใช้การเหวี่ยงแยก จากผลการศึกษาพบว่ากระดูกมนุษย์สามารถให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่น นอกจากนั้นยังพบว่าการเหวี่ยงแยกตะกอนร่วมกับการสกัดสามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ในปี ค.ศ. 2004 J.H. Muyonga และคณะ [10] จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา Nile Perch ในสองช่วงอายุ คือ ปลาที่ยังไม่โตเต็มวัยกับปลาที่โตเต็มไวโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนน้ำหนักของผิวหนังปลา 1 กรัม ต่อกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ 20 มิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาที่ยังไม่โตเต็มวัยได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนังปลาที่โตเต็มวัยแล้ว โดยปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลายังไม่โตเต็มวัยได้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 63.1 และ หนังปลาที่โตเต็มวัยได้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 58.7

ในปี ค.ศ. 2007 I. Prasertsung และคณะ [5] ได้นำเสนอวิธีการใช้ Enzymes ร่วมกับเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงในการผลิตผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมูสดที่หาได้จากโรงฆ่าสัตว์ในท้องถิ่น จากการศึกษาพบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคอัดคลายแรงดัน (Pressurized Technique) ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มแรงดันสามารถช่วยให้เอนไซม์แทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดีขึ้นส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น จากการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์พบว่าการอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์ Dispase II สามารถกำจัดเซลล์ได้ดีกว่าเอนไซม์ Trypsin จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์มีศักยภาพสูงในการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมูเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง (Skin Tissue Engineering)

ในปี ค.ศ. 2008 M. Yan และคณะ [12] ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากปลา Walleye Pollock เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติก ส่งผลต่อองค์ประกอบต่างๆของ

คอลลาเจนโดยใช้การทดสอบ SDS-Page เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของกรดอะมิโน FT-IR เพื่อตรวจสอบโครงสร้างซึ่งสามารถบอกได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดจากปลาชนิดนี้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ I และ DSC เพื่อตรวจสอบอุณหภูมิในการเสียสภาพพบว่าอุณหภูมิในการเสียสภาพ (Td) ของคอลลาเจนที่สกัดจากปลา Walleye Pollock อยู่ที่ 24.6 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิการเสียสภาพที่ต่ำมากสำหรับคอลลาเจนชนิดที่ I อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลา Cod อุณหภูมิในการเสียสภาพของปลา Walleye Pollock นั้นสูงกว่า

ซึ่งผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าผิวปลา Walleye Pollock เป็นแหล่งที่มีศักยภาพของคอลลาเจนและให้พื้นฐานทางทฤษฎีการวิจัยอื่นต่อไป

ในปี ค.ศ. 2009 D. Li และคณะ [4] ได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ซึ่งทำการสกัดเปรียบเทียบผลการสกัดกับการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เปปซินเพียงอย่างเดียว จากการศึกษาพบว่าการใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้ในการสกัดเพิ่มขึ้น จากการวิเคราะห์โครงสร้างคอลลาเจนที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี โดยใช้เครื่อง FT-IR พบว่าการสกัดด้วยอัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินไม่ส่งผลต่อโครงสร้างของคอลลาเจน จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscopy) และวิธี Circular Dichroism พบว่าการสกัดคอลลาเจนโดนใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินไม่ส่งผลทำให้เกิดการเสียภาพของคอลลาเจน จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้แรงกลร่วมกับการสกัดคอลลาเจนด้วยเอมไซม์สามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ในปี ค.ศ. 2009 F.Y. Cheng และคณะ [11] ได้เสนอการใช้กรด 3 ชนิดคือ กรดอะซิติก (Acetic Acid) กรดซิติก (Citric Acid) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid) ร่วมกับการใช้เอนไซม์เปปซินจาก Silky Fowl Feet ซึ่งกำหนดค่าความเข้มข้นของกรดทั้ง 3 ชนิดคือ 0.5 โมลาร์ร่วมกับเอมไซม์เปปซินร้อยละ 0.1 โดยให้ผลออกมาคือ กรดที่สกัดร่วมกับเอมไซม์เปปซินที่สามารถให้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้สูงสุดคือกรดอะซิติก (Acetic Acid)

ในปี ค.ศ. 2011 D. Su และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและเสถียรภาพทางความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดจาก Palygorskite เพื่อยืนยันว่าเป็นคอลลาเจนชนิดที่ I โดยการตรวจสอบทางโครงสร้างนั้นทดสอบโดย FT-IR โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับคอลลาเจนบริสุทธิ์แสดงให้เห็นว่ามีการหดตัวและรวมตัวของคอลลาเจนในบางโมเลกุล แต่ไม่ส่งผลและไม่ทำลายสายฮีลิกซ์เกลียวสามสายซึ่งเป็นโครงสร้างของคอลลาเจนแต่อย่างใด และทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยคอลลาเจนโดยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ซึ่งปรากฏ Nanorod และเส้นใยคอลลา

เจนอย่างชัดเจน และจากการแสกนความร้อนด้วยเครื่อง DSC เปรียบเทียบกับคอลลาเจนบริสุทธิ์พบว่าการสกัดคอลลาเจนจาก Palygorskite มีเสถียรภาพทางความร้อนสูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการปรับปรุง Nanocomposite ซึ่งการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจาก Palygorskite เป็นสารเสริมและรักษาโครงสร้างฮีลิกซ์สามสายซึ่งเป็นโครงสร้างของคอลลาเจน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องเป็นการศึกษาที่ครอบคลุมทั้งการสกัดคอลลาเจนโดยวิธีการสกัดรวมไปถึงการนำเทคนิคการใช้แรงทางกลมาใช้ร่วม การเลือกใช้สารเคมีที่จะใช้ในการสกัดเพื่อการเพิ่มปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้รวมไปถึงตัวแปรที่จะต้องควบคุมอย่างเช่น อุณหภูมิ อายุของหนังหมู เป็นต้น โดยการศึกษางานวิจัยเหล่านี้เพื่อนำไปเป็นเงื่อนไขในการสกัดคอลลาเจน

จากงานวิจัยจึงได้ทำการเลือกใช้กรดอะซิติกมาเป็นสารที่ใช้สกัดคอลลาเจน เพราะ จากงานวิจัยการสกัดพบว่าในการใช้กรดหลายชนิดในการสกัด กรดอะซิติกให้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้สูงที่สุดจึงนำมาใช้ การเลือกใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดัน ในงานวิจัยพบว่าเมื่อใช้เทคนิคทางกลจะช่วยให้กรดหรือสารละลายเข้าไปละลายคอลลาเจนในโครงสร้างผิวหนังของหนังหมูได้เพิ่มมากขึ้น

บทที่ 4
วิธีการดำเนินโครงงาน

4.1 อุปกรณ์และสารเคมี

4.1.1 หนังหมูสด (อายุหมูอยู่ระหว่าง 3-6 เดือน)

4.1.2 กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 99.8 ยี่ห้อ GRëC Grade AR

4.1.3 อะซิโตนยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

4.1.4 เครื่องอัดคลายแรงดัน

4.1.5 ผ้าขาวบาง

4.1.6 เครื่องปั่นกวนยี่ห้อ IKA รุ่น RW20 Digital

4.1.7 เครื่อง DCS (Differential Scanning Calorimetry)

4.1.8 เครื่อง FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

4.1.9 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) ยี่ห้อ LABCONCO รุ่น Freezone®2.5 Liter Freeze Dry System

4.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการสกัดคอลลาเจนด้วยกระบวนการการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้กรดสามารถสรุปดังแสดงในรูปที่ 4.1

4.2.1 การเตรียมหนังหมู

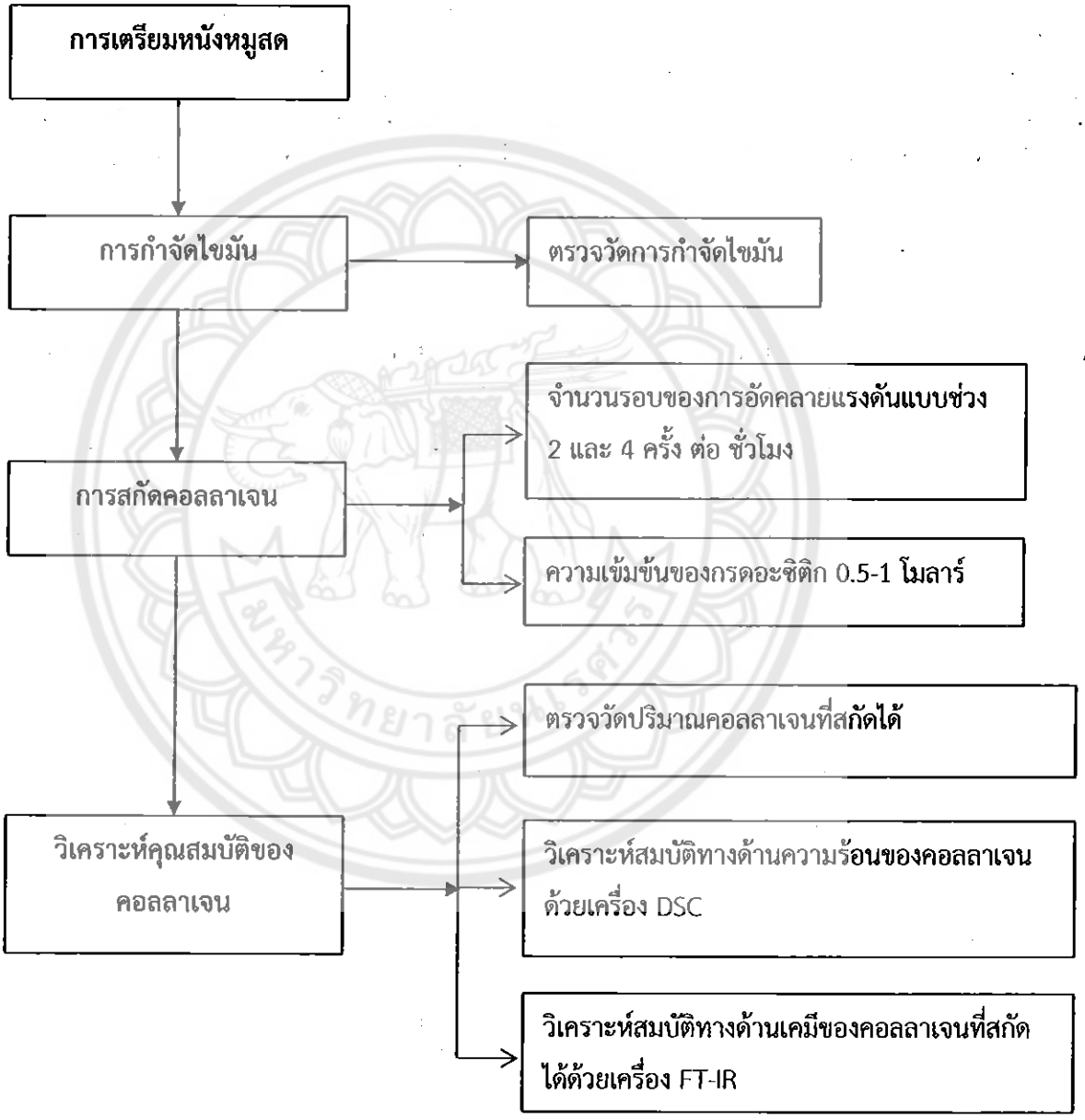
นำหนังหมูสดอายุ 3-6 เดือนมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดจนมีขนาดประมาณ 0.3x0.3 ตารางมิลลิเมตร

4.2.2 การกำจัดไขมัน

กำจัดไขมันโดยใช้อะซิโตนเข้มข้นร้อยละ100ใช้อัตราส่วนระหว่างหนังหมูต่อสารละลายอะซิโตน 1:10 (w/v) ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยวัดปริมาณการกำจัดไขมันได้โดยอาศัยการคิดน้ำหนักแห้งก่อนการกำจัดไขมันและหลังกำจัดไขมันดังสมการต่อไปนี้ [4]

$$\% \text{ การกำจัดไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้}(g) - \text{น้ำหนักสุดท้าย}(g)}{\text{น้ำหนักเริ่มต้}(g)} \times 100\% \qquad (4.1)$$

กระบวนการในการสกัด



รูปที่ 4.1 แสดงขั้นตอนการทดลอง

4.2.3 ขั้นตอนการสกัด Collagen

นำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันและทำแห้งด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็งมาสกัดคอลลาเจนด้วยกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับกรด ดังแสดงในรูปที่ 4.2 โดยแบ่งการสกัดออกเป็น 4 การทดลองคือคือ การทดลองที่ 1 การสกัดโดยการปั่นกวนร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยจะใช้อัตราส่วนของหนังหมูต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 1:15 ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง การทดลองที่ 2 การสกัดคอลลาเจนโดยการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันทุกๆ 30 นาที (1ชั่วโมง:2ครั้ง) ที่ความดัน 4 บาร์ การทดลองที่ 3 การสกัดคอลลาเจนโดยการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันทุกๆ 15 นาที (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ที่ความดัน 4 บาร์ การทดลองที่ 4 การสกัดคอลลาเจนโดยการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันทุกๆ 15 นาที (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ที่ความดัน 4 บาร์

4.3 การวิเคราะห์

4.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้

การวิเคราะห์ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยการคิดน้ำหนักแห้งในการวิเคราะห์โดยการนำคอลลาเจนที่สกัดได้ทำการแช่แข็ง จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) หลังจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักหนังหมูแห้งก่อนการสกัด ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%\ \text{yield} = \frac{W_2 \times 100}{W_1} \qquad (4.2)$$

เมื่อ $W_2 =$ น้ำหนักคอลลาเจนแห้งที่สกัดได้(g)

$W_1 =$ น้ำหนักของหนังหมูแห้งก่อนทำการสกัด (g)

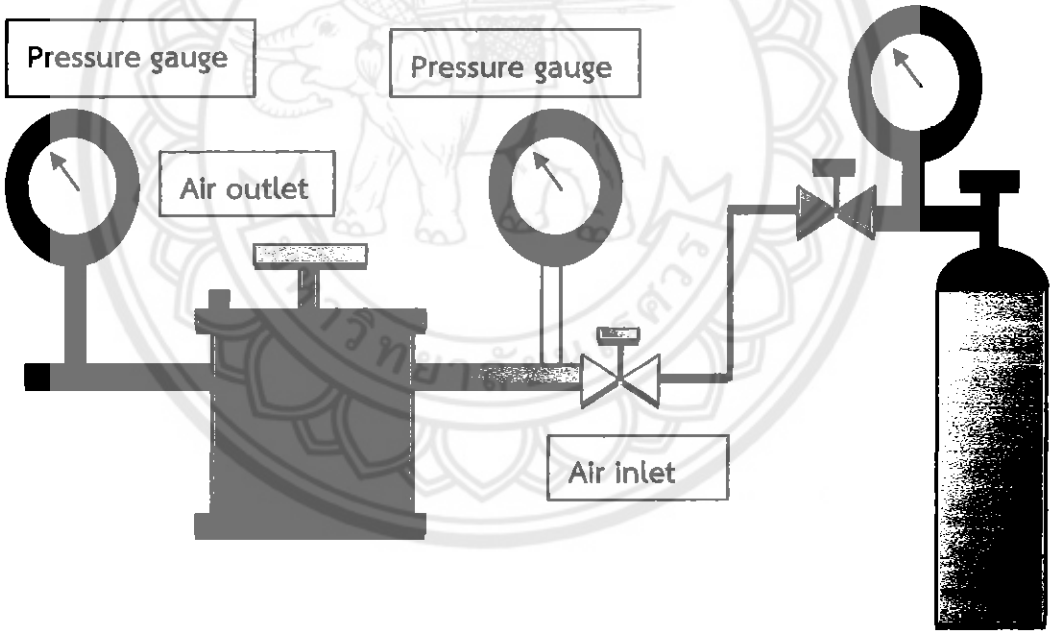
4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจน[2]

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจนสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิควิธี Differential Scanning Calorimeter (DSC) นำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งน้ำหนัก 15 มิลลิกรัม

ใส่ใน Aluminum Pan และนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนโดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยใช้อัตราในการให้วามร้อน (Heating Rate) เท่ากับ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และศึกษาในช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 350 องศาเซลเซียส

4.3.3การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน[16]

การศึกษาสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนโดยการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) เพื่อใช้ในการตรวจสอบโครงสร้างของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยนำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้ง ด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) มาบดผสมเข้ากับ KBr โดยให้มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.01 และอัดขึ้นรูปให้ได้แผ่นบางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ขึ้นรูปได้ไปวัดด้วยเครื่อง FT-IR ที่ Resolution 4 ซ.ม.$^{-1}$ ที่จำนวนสแกน 12 สแกน

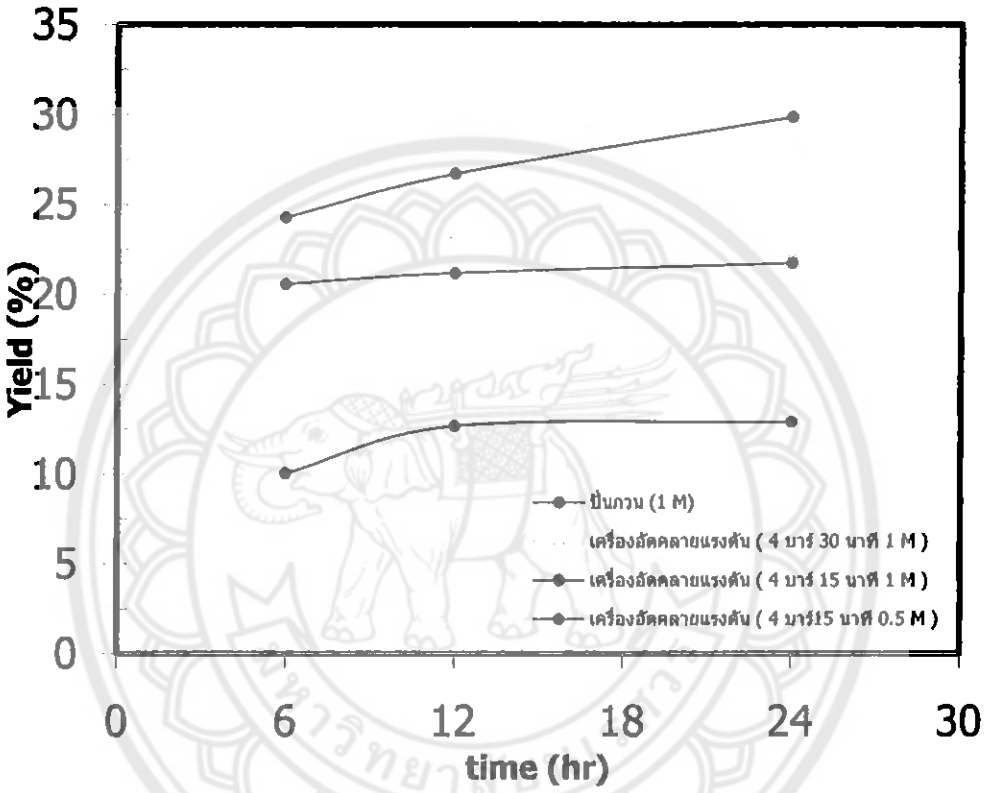


รูปที่ 4.2 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง

บทที่ 5

ผลการทดลองและการวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้



รูปที่ 5.1 รูปปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้โดยการประยุต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับกรดอะซิติก

จากรูปที่ 5.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ที่เวลา 0-24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าการปั่นกวนร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่เวลา 6 ชั่วโมงได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 10.06 เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัด 12 และ 24 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 12.7 และ 12.93 ตามลำดับการเพิ่มเวลาในการสกัดจะส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะช่วยให้กรดอะซิติกสัมผัสกับหนังหมูมากขึ้นและทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

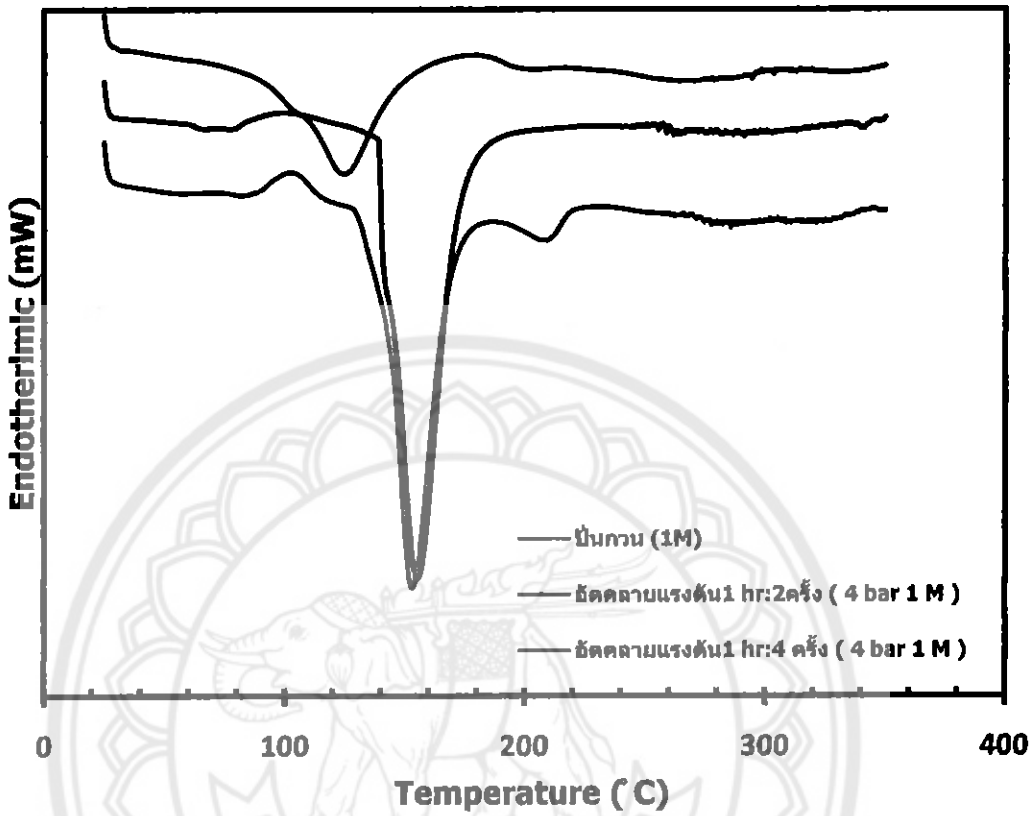
การประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันในการสกัดโดยสภาวะที่ใช้คือ แรงดัน 4 บาร์ จำนวนรอบการอัดคลายแรงดันทุก 30 นาที ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ ที่เวลา 0 ถึง 24 ชั่วโมง

พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 20.59 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 23.06 และที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 21.92 เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเพราะเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะช่วยให้กรดแทรกซึมและสัมผัสกับหนังหมูได้มากขึ้นแต่จากผลการทดลองนี้เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ 12 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้อาจบอกได้ว่าที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นเวลาที่สามารถสกัดคอลลาเจนออกมากได้มากที่สุดเพราะอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดแต่ถ้ามีการใช้จำนวนชั่วโมงที่มากขึ้นปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้อาจจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงดังนั้นถ้ามีการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่มากขึ้นจะทำให้ทราบแนวโน้มที่ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันจะทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการปั่นกวน เนื่องจากการอัดคลายแรงดันจะช่วยให้กรดอะซิติกสามารถแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างของหนังหมูที่มีความซับซ้อนได้ดีและรวดเร็วขึ้นจึงส่งผลให้มีการเพิ่มของปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากขึ้น

การเพิ่มจำนวนรอบการอัดคลายแรงดันจากทุกๆ 30 นาทีเป็นทุกๆ 15 นาที พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 24.48 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 26.72 และที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 29.87 ซึ่งปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการอัดคลายแรงดันทุกๆ 30 นาที ที่ทุกช่วงเวลา ซึ่งการเพิ่มจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันจะมีผลทำให้กรดอะซิติกสามารถแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างของหนังหมูได้ดีขึ้น และทั่วถึง จึงทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงขึ้นตามไปด้วย

การลดความเข้มข้นของกรดอะซิติกจาก 1 โมลาร์ เป็น 0.5 โมลาร์ ที่จำนวนรอบการอัดคลายแรงดันทุกๆ 15 นาที ความดัน 4 บาร์ พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 20.59 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 21.19 และที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 21.71 การลดความเข้มข้นของกรดอะซิติกจะส่งผลทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากกรดอะซิติกความเข้มข้นต่ำจะมีความสามารถในการละลายคอลลาเจนได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรดความเข้มข้นสูงและส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้น้อยตามไปด้วย

5.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจน

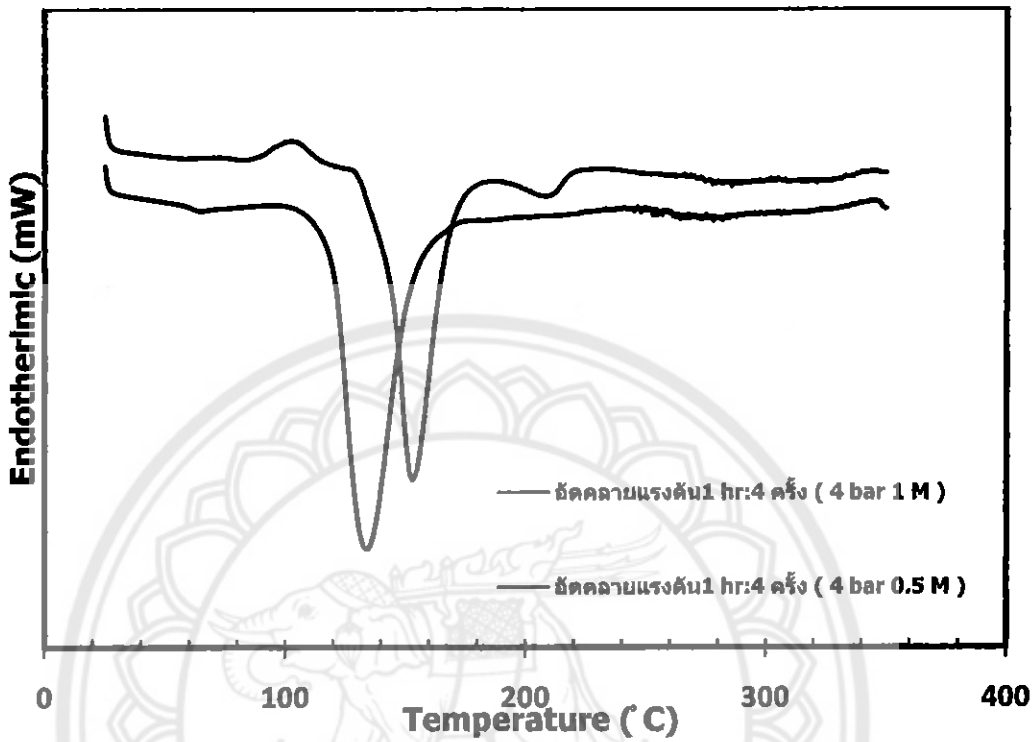


รูปที่ 5.2 การวิเคราะห์ด้วย DSC ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวน 150 รอบต่อนาทีวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:2ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ และวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ ตามลำดับ

จากรูปที่ 5.2 แสดงการวิเคราะห์สมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนการสกัดด้วยวิธีการปั่นกวนความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1.0 โมลาร์ คอลลาเจนมีอุณหภูมิการเสียสภาพที่ 123.17 องศาเซลเซียส ส่วนคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดัน 4 บาร์ ที่จำนวนรอบ 1 ชั่วโมงต่อ 2 ครั้ง และ 1 ชั่วโมงต่อ 4 ครั้ง ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1.0 โมลาร์ มีการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 153.33 องศาเซลเซียส และ 151.17 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากการทดลองจะพบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวนจะมีการเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดโดยวิธีการอัดคลายแรงดัน ซึ่งทั้งนี้เสถียรภาพทางความร้อนของคอลลาเจนขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำในคอลลาเจนและการเชื่อมขวางของสายโซ่ [13] การสกัดคอลลาเจนโดยวิธีการอัดคลายแรงดันจะส่งผลต่อการเชื่อมขวางของสายโซ่คือทำให้โครงสร้างของสายฮีลิกซ์สามสายมีความ

แข็งแรงและทนความร้อนได้มากยิ่งขึ้น [15] จึงทำให้เสถียรภาพทางความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดันมีมากกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวน



รูปที่ 5.3 การวิเคราะห์ด้วย DSC ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 และ 1 โมลาร์ 4 บาร์ ตามลำดับ

จากรูปที่ 5.3 การวิเคราะห์ด้วย DSC ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลาย**แรงดัน 4 บาร์ ที่จำนวนรอบ 1 ชั่วโมง ต่อ 4 ครั้ง ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1.0 โมลาร์ มีการเสีย**สภาพที่อุณหภูมิ 151.17 องศาเซลเซียส ส่วนคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดัน 4 บาร์**ที่จำนวนรอบ 1 ชั่วโมงต่อ 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ที่มีการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 131.50 องศาเซลเซียส**

จากการทดลองจะพบว่าความเข้มข้นของกรดอะซิติกส่งผลต่อเสถียรภาพทางความร้อน [15] คือ การใช้กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ในการสกัดจะส่งผลให้มีเสถียรภาพทางความร้อนสูงกว่าความเข้มข้นที่ 0.5 โมลาร์ เพราะ การใช้กรดที่ความเข้มข้นต่ำกว่าจะทำให้การตัดสายโมเลกุลของคอลลาเจนได้สายที่ยาว เมื่อเกิดการเชื่อมขวาง (Cross-Link) ทำให้โครงสร้างที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงน้อยกว่าซึ่งจะทนต่อความร้อนได้น้อย

5.3 วิเคราะห์และตรวจสอบโครงสร้างของคอลลาเจนที่สกัดได้

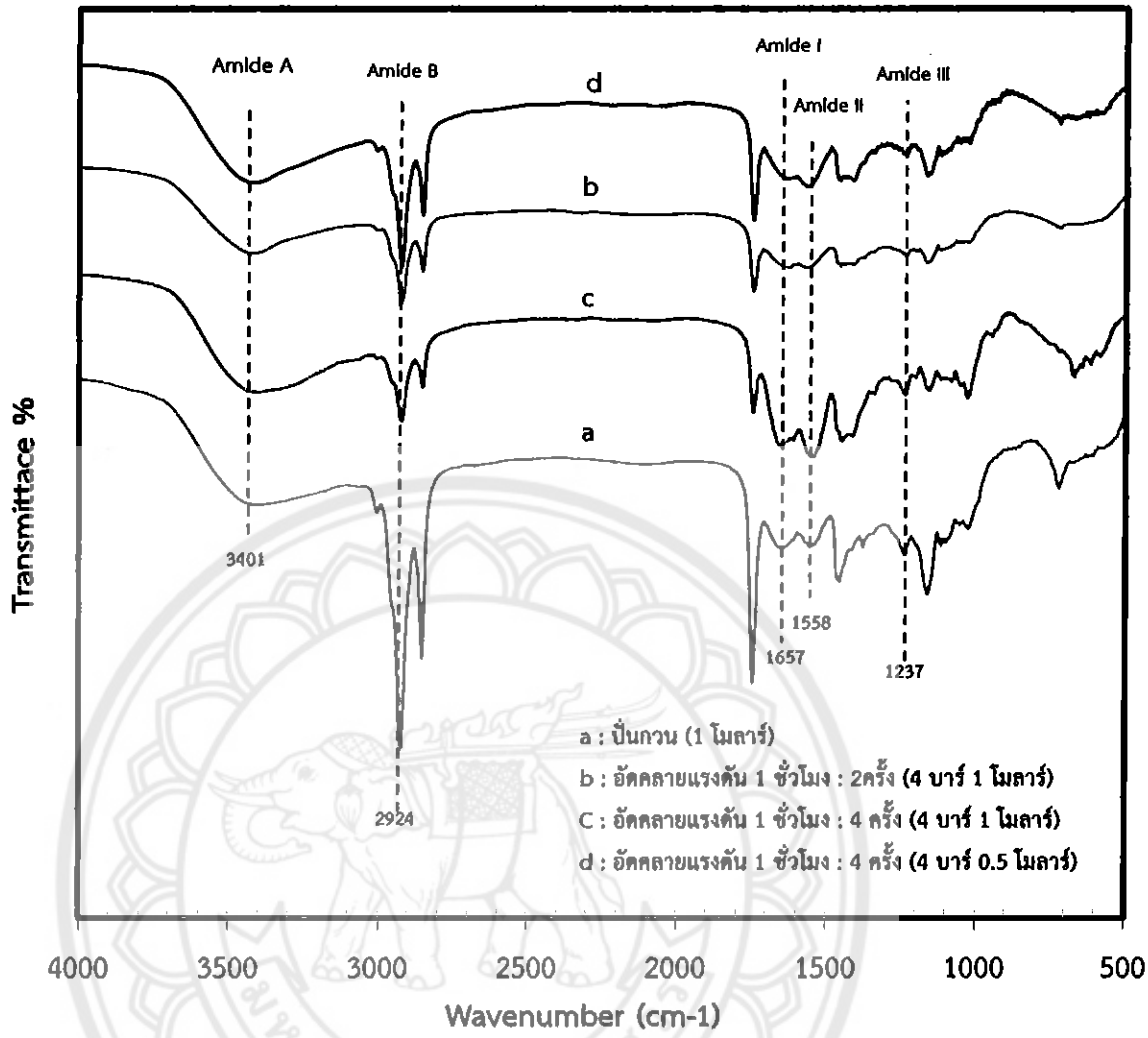
5.3.1สเปกตรัมของ FT-IR ของคอลาเจนมาตรฐาน

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการดูดกลืนคลื่นแสงของคอลลาเจนมาตรฐานแสดงโครงสร้างของคอลลาเจนที่พบเป็นหมู่เอไมด์ A (Amide A Band) ที่ช่วงคลื่น 3400 ซ.ม.$^{-1}$ ถึง 3440 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง N-H Stretching หมู่เอไมด์ B (Amide B Band) ที่ช่วงคลื่น 2925 ซ.ม.$^{-1}$ ถึง 2935 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง CH_2 Stretching พบหมู่เอไมด์ I (Amide I Band) ที่ช่วงคลื่น 1600 ซ.ม.$^{-1}$ ถึง 1700 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง C=O Stretching หมู่เอไมด์ II (Amide II Band) ที่ช่วงคลื่น 1550 ซ.ม.$^{-1}$ ถึง 1600 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching และหมู่เอไมด์ III (Amide III Band) ที่ช่วงคลื่น 1220 ซ.ม.$^{-1}$ ถึง 1320 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching ซึ่งตำแหน่งของการดูดกลืนคลื่นแสงจะพบได้ในคอลลาเจนมาตรฐาน [18-19]

5.3.2 สเปกตรัมของ FT-IR ของคอลลาเจนที่สกัดได้

จากรูปที่ 5.4 แสดงสเปตตรัมในการดูดกลืนคลื่นแสงของคอลลาเจน จากการวิเคราะห์พบว่าคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธีการปั่นกวนดังแสดงในเส้น a จะพบว่าปรากฏหมู่เอไมด์ A (Amide A Band) ที่ช่วงคลื่น 3401.05 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง N-H Stretching ปรากฏหมู่เอไมด์ B (Amide B Band) ที่ช่วงคลื่น 2924.93 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง CH_2 Stretching ปรากฏหมู่เอไมด์ I (Amide I Band) ที่ช่วงคลื่น 1657.70 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง C=O Stretching หมู่เอไมด์ II (Amide II Band) ที่ช่วงคลื่น 1558.39 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching และปรากฏหมู่เอไมด์ III (Amide III Band) ที่ช่วงคลื่น 1237.71 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างเกลียวสามของคอลลาเจน

เมื่อพิจารณาการสกัดโดยมีการประยุกต์ใช้อัตคลายแรงดันแบบช่วงที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ ซึ่งใช้จำนวนรอบในการอัตคลายแรงดันแบบช่วงเป็น 1 ชั่วโมง ต่อ 2 ครั้ง ดังแสดงในในเส้น b จะพบว่าปรากฏหมู่เอไมด์ A (Amide A Band) ที่ช่วงคลื่น 3420.53 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง N-H Stretching หมู่เอไมด์ B (Amide B Band) ที่ช่วงคลื่น 2925.04 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง CH_2 Stretching หมู่เอไมด์ I (Amide I Band) ที่ช่วงคลื่น 1638.39 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง C=O Stretching หมู่เอไมด์ II (Amide II Band) ที่ช่วงคลื่น 1568.89 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching และหมู่เอไมด์ III (Amide III Band) ที่ช่วงคลื่น 1235.07 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างเกลียวสามของคอลลาเจน



รูปที่ 5.4 การวิเคราะห์ด้วย FT-IR ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวน 150 รอบต่อนาทีวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:2ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 โมลาร์ 4 บาร์ และวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 1 และ 0.5 โมลาร์ 4 บาร์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาสเปคตรัมของคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดโดยมีการประยุกต์ใช้อัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก1 โมลาร์ 4 บาร์ ซึ่งใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงเป็น 1 ชั่วโมงต่อ 4 ครั้งดังแสดงในเส้น c พบว่าปรากฏหมู่เอไมด์ A (Amide A Band) ที่ช่วงคลื่น 3415.16 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง N-H Stretching ปรากฏหมู่เอไมด์ B (Amide B Band) ที่ช่วงคลื่น 2924.81 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง CH_2Stretching ปรากฏหมู่เอไมด์ I (Amide I Band) ที่ช่วงคลื่น 1654.54 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง C=O Stretching หมู่เอไมด์ II (Amide II Band) ที่ช่วงคลื่น 1558.72 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching และปรากฏหมู่เอไมด์ III (Amide III

Band) ที่ช่วงคลื่น 1236.81 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching แสดงให้เห็นโครงสร้างเกลียวสามของคอลลาเจน

ในเส้น d แสดงสเปคตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้จากการประยุกต์ใช้อัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมในการสกัดด้วยกรดที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ 4 บาร์ ซึ่งใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงเป็น 1 ชั่วโมง ต่อ 4 ครั้งพบว่าปรากฏหมู่เอไมด์ A (Amide A Band) ที่ช่วงคลื่น 3414.23 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง N-H Stretching หมู่เอไมด์ B (Amide B Band) ที่ช่วงคลื่น 2924.77 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง CH_2 Stretching ปรากฏหมู่เอไมด์ I (Amide I Band) ที่ช่วงคลื่น 1633.39 ซ.ม.$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง C=O Stretching หมู่เอไมด์ II (Amide II Band) พบที่ช่วงคลื่น 1565.48 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching และหมู่เอไมด์ III (Amide III Band) ที่ช่วงคลื่น 1233.23 ซ.ม.$^{-1}$ แสดงถึง N-H Bending คู่กับ C-N Stretching แสดงถึงโครงสร้างเกลียวสามของคอลลาเจน

จากการทดลองพบว่าการสกัดโดยวิธีการปั่นกวนในเส้น a การประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงดังแสดงในเส้น b c และ d พบโครงสร้างหลักของคอลลาเจน Type I แสดงให้เห็นว่าการสกัดคอลลาเจนโดยวิธีปั่นกวนและการอัดคลายแรงดันไม่ทำให้โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลง

บทที่ 6
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันร่วมกับกรดอะซิติก มีปริมาณคอลลาเจนที่ได้สูงสุดที่ร้อยละ 29.87 ซึ่งจากการทดลองแบ่งเป็น 2 แบบ คือ ปั่นกวนและการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดัน โดยการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันจะมีการปรับสภาวะเพื่อเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ดังนี้ การเปลี่ยนจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันและความเข้มข้นของกรดอะซิติก พบว่า สภาวะดังกล่าวมีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ คือ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนรอบมากขึ้นจะมีผลทำให้กรดอะซิติกสามารถแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างของหนังหมูได้ดีขึ้นและทั่วถึงจึงทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงมากกว่าจำนวนรอบที่น้อยกว่า และการลดความเข้มข้นของกรดอะซิติกจะส่งผลทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากกรดอะซิติกความเข้มข้นต่ำจะมีความสามารถในการละลายคอลลาเจนได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรดความเข้มข้นสูง ซึ่งจากการทดลองการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันและการเปลี่ยนสภาวะดังที่กล่าวไปพบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้และโครงสร้างของคอลลาเจนไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลาย

ศึกษาสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจน โดยใช้เทคนิค DSC ในการวิเคราะห์เพื่อหาการเสียสภาพของคอลลาเจน จากผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการปั่นกวนจะมีการเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วงและความเข้มข้นของกรดอะซิติกมีผลต่อเสถียรภาพทางด้านความร้อนคือ ถ้าความเข้มข้นมากจะมีเสถียรภาพทางความร้อนมากกว่าความเข้มข้นน้อย

ศึกษาโครงสร้างของคอลลาเจน โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ FT-IR โดยทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับค่าคอลลาเจนมาตรฐาน จากผลการทดลองพบว่าการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค FT-IR พบสเปคตรัมของ เอไมด์ เอ เอไมด์ บี เอไมด์ I เอไมด์ II และเอไมด์ III ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบในโครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจน Type I แสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อโครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจน

6.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองสกัดคอลลาเจนพบว่าเมื่อมีการประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วงสภาวะที่มีการปรับเปลี่ยนมีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ เช่น ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมควรจะมีการเพิ่มจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันให้มากขึ้น เพราะอาจจะส่งผลให้มีปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้สูงขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของกรดที่มากขึ้น เพราะความเข้มข้นของกรดมากจะสามารถละลายคอลลาเจนได้มากซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากขึ้น และอาจมีการเพิ่มจำนวนแรงดันให้มากกว่า 4 บาร์เพราะอาจจะส่งผลต่อปริมาณการสกัดเช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

[1] สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ. (2551). ชีวโมเลกุล. (พิมพ์ครั้งที่2). กรุงเทพฯ: บริษัท วี.พริ้นท์ (1991) จำกัด.

[2] นันทพร อัคนิจ. (2550). การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกุดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้.วิทยานิพนธ์วท.บ., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[3] ตระกูล พรหมจักร. (2552).การสกัดเจลาตนจากหนังปลาเผาะ.วิทยานิพนธ์ วท.บ.,มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

[4] D. Li, Ch. Mu, S. Cai, & W. Lia. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. Ultrasonic Sonochemistry, 16, 605-609.

[5] I. Prasertsung, S. Kanokpanont,T. Bunaprasert,V. Thanakit& S. Damrongsakkul. (2008). Development of Acellular Dermis From Porcine Skin Using Periodic Pressurized Technique.Journal of Biomedical Materials Reseach Part B: Apply Biomaterials, 85,210 - 219.

[6] I. Liet al. (2012)Chapter 4 Extracellular matrix, Cell junction and celladhension. Retrieved August 30, 2012. Fromhttp://jpkc.scu.edu.cn/ywwy/zbsw (E)/edetail4.htm.

[7] I. Caputo, M. Lepretti, C. Scarabino, C. Esposito & A. Proto. (2012). An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. Annals of Anatomy, 421, 92-96.

[8] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. (2012). Freeze Drying/การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.วันที่สืบค้น18 กุมภาพันธ์ 2556. จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3133/freeze-drying-การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

[9] P. Semal& R. Orban. (1994).Collagen Extraction from Recent and Fossil Bones: Quantitative and Qualitative Aspects.Journal of Archaeological Science, 22,463 467.

[10] J.H. Muyonga, C.G.B. Cole, K.G. Duodu. (2004).Characterisation of acid soluble

collagen from skins of young andadult Nile perch (Latesniloticus). **Food Chemistry,** 85,81 89.

[11] F.Y. Cheng, F.W. Hsu, H.S. Chang, L. Lin& R. Sakata. (2009). Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food Chemistry,** 113,563-567.

[12] M. Yan et al. (2008).Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleyepollock (Theragrachalcogramma). **Food Chemistry,** 107, 1581-1506.

[13] D. Su et al. (2012).Influence of palygorskite on the structure and thermal stability of collagen.Applied Clay. Science, 62-63, 41-46.

[14] แม้น อมรสิทธิ์. (2534). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. (พิมพ์ครั้งที่1)** กรุงเทพฯ:ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

[15] S. Nalinanon,S. Benjakul,W. Visessanguanm& H. Kishimura. (2007).Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeyesnapper (Priacanthustayenus).Food Chemistry, 104, 593 601.

[16] นิพนธ์ ตังคณานุรักษ และ คณิตา ตังคณานุรักษ. (2547). **สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์** (Analytical Spectroscopy).กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[17] สมเดช กนกเมธากุล. (2547). สเปกโทรสโกปี: ในการพิสูจน์โครงสร้างของสาร**อินทรีย์**.ขอนแก่น:ขอนแก่นการพิมพ์.

[18] D. Liu, L. Liang, J. M. Regenstein & P. Zhou.(2012).Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales,skins, bones and swim-bladders of bighead carp (Hypophthalmichthysnobilis). Food **Chemistry,** 133,1441-1448.

[19] C. Petibois, G. Gouspillou, K. Wehbe, J.P. Delage& G. Déléris. (2006). Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. Anal **BioanalChem,**386.1961 1966.

[20] L. Li giaetal.(2011).Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. **Polímeros,** 21(1), 97 105.

ภาคผนวก ก

ตารางบันทึกผลการทดลองและวิธีการคำนวณ

ตารางบันทึกผลการทดลอง

น้ำหนักหนังหมูแห้งก่อนการสกัด 6.67 กรัม ต่อ สารสะลายกรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร

วิธีการสกัด	เวลาที่ใช้ในการสกัด (hr)	ความเข้มข้นของกรดอะซิติก (M)	ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (g)	Yield (%)
ปั่นกวน	6	1.0	0.6711	10.06
	12	1.0	0.8470	12.70
	24	1.0	0.8624	12.93
อัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:2ครั้ง)	6	1.0	1.3740	20.60
	12	1.0	1.5386	23.07
	24	1.0	1.4621	21.92
อัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง)	6	1.0	1.6207	24.30
	12	1.0	1.7826	26.73
	24	1.0	1.9929	29.88
อัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง)	6	0.5	1.3738	20.60
	12	0.5	1.4138	21.20
	24	0.5	1.4506	21.75

การหาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ (% yield)

ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \textbf{ yield } = \frac{W_2 \times 100}{W_1} \qquad (4.2)$$

เมื่อ $W_2 =$ น้ำหนักคอลลาเจนแห้งที่สกัดได้ (g)

$W_1 =$ น้ำหนักของหนังหมูแห้งก่อนทำการสกัด (g)

หาปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ 4 บาร์ที่ 24 ชั่วโมง

จากสมการ $\% \text{ yield} = \frac{W_2 \times 100}{W_1}$

จะได้ว่า $\% \text{ yield} = \frac{1.4506 \times 100}{6.67}$

$\therefore \quad \% \text{ yield} = 21.7481259$

ดังนั้นปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ (% yield) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (1ชั่วโมง:4ครั้ง) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ 4 บาร์ที่ 24 ชั่วโมง เป็นร้อยละ 21.75

ตารางบันทึกผลการทดลอง

sample	น้ำหนักเริ่มต้น(g)	น้ำหนักสุดท้าย(g)	น้ำหนักที่หายไป(g)	%การกำจัดไขมัน
1	8.76	7.1	1.66	18.96%
2	8.76	4.8	3.96	45.21%
3	8.76	5.04	3.72	42.47%
ค่าเฉลี่ย			3.113	35.54%
SD			1.264	0.144

การหาปริมาณการกำจัดไขมัน

ปริมาณการกำจัดไขมันคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ การกำจัดไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้}(g) - \text{น้ำหนักสุดท้าย}(g)}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}(g)} \times 100 \qquad (4.1)$$

หาปริมาณการกำจัดไขมัน (% การกำจัดไขมัน) ของตัวอย่างที่ 2

จากสมการ $\% \text{ การกำจัดไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้}(g) - \text{น้ำหนักสุดท้าย}(g)}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}(g)} \times 100$

จะได้ว่า $\%$ การกำจัดไขมัน $= \frac{8.76(g)-4.8(g)}{8.76(g)} \times 100$

$\therefore$ $\%$ การกำจัดไขมัน $= 45.21\%$

ดังนั้น ปริมาณการกำจัดไขมันคิดเป็นร้อยละ 45.21