

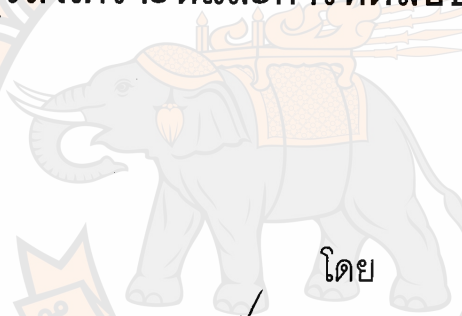


สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ



คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

✓ การสังเคราะห์และการทดสอบอนุพันธ์ของโคโตซาน



โดย

นายกฤษดา อินหาดกรวด

นายนฤพนธ์ นवलเจริญ

นางสาวสมจิตรร์ พาเจริญ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน 26 ก.ค. 2548

เลขทะเบียน 4890199

เลขเรียกหนังสือ T WA

ก2841
2548

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
มหาวิทยาลัยนเรศวร
กุมภาพันธ์ 2548

ชื่อเรื่อง การสังเคราะห์และการทดสอบอนุพันธ์ของไคโตซาน

คณะผู้ดำเนินการวิจัย นายกฤษดา อินทาดกรวด

นายณัฐพนธ์ นवलเจริญ

นางสาวสมจิตร์ พาเจริญ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัมภางค์ พลนอก

ภาควิชา เทคโนโลยีเภสัชกรรม

ปีการศึกษา 2547

บทคัดย่อ

ไคโตซานมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางเภสัชกรรมอย่างไรก็ตามความเป็นประจวบของไคโตซานทำให้เป็นข้อจำกัดต่อการนำไปใช้ในระบบนำส่งยาที่เป็นประจวบ เนื่องจากจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างประจวบงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษการดัดแปลงโครงสร้างของไคโตซานให้มีการเหมาะสมในการนำไปใช้ในระบบนำส่งยา โดยมีวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาการสังเคราะห์และประเมินอนุพันธ์ไคโตซานโดยนำ EDTA มาทำปฏิกิริยากับ ไคโตซาน ในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นนำมาศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุพันธ์ไคโตซาน ได้แก่ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดย Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), ปริมาณการแทนที่ของหมู่อะมิโนในสารสังเคราะห์, การยึดติดเยื่อเมือก, การพองตัวในน้ำ, การย่อยสลายโดยไลโซไซม์ และการวัดความหนืด ซึ่งจากการวิจัยพบว่า การวิเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซานโดยวิธี FTIR พบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1571 ซม.⁻¹ ซึ่งคาดว่าจะตำแหน่งของพันธะเอไมด์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของ ไคโตซานกับ EDTA ซึ่งผลการวัดหมู่อะมิโน ในไคโตซานโพลีเมอร์อาจจะนำมายืนยันปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากค่านี้จะลดลงเมื่ออัตราส่วนของ EDTA ที่สูงขึ้น ความหนืดและคุณสมบัติการยึดติดกับลำไส้หนูไม่แปรผันตามอัตราส่วนของ EDTA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่า ความหนืดของ อนุพันธ์ Chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:20 มีความหนืดน้อยกว่าอัตราส่วน 1:1 แต่ มีความหนืดมากกว่า อัตราส่วน 1:5 และ 5:1 ตามลำดับ ส่วนคุณสมบัติการยึดติดกับลำไส้หนูพบว่า ไคโตซานมีการยึดติดมากกว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ โดย อนุพันธ์ Chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:5 และ 5:1 มีค่ามากกว่าอัตราส่วน 1:20 และ อัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ ผลการทดสอบการย่อยสลายโดยไลโซไซม์พบว่า การสังเคราะห์อนุพันธ์ Chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:20 ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้มากที่สุดและอนุพันธ์ Chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:1 เป็นอัตราส่วนที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้น้อยที่สุด การทดสอบการพองตัวอัตราส่วน 1:20 พองตัวได้สูงสุด ส่วนอัตราส่วน 1:1 พองตัวได้น้อยที่สุด จากการวิจัยสรุปได้ว่าการทำปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานกับ EDTA อาจเกิดขึ้นได้โดยการเกิดพันธะเอไมด์ ซึ่งความแตกต่างระหว่างอัตราส่วนของไคโตซานกับ EDTA มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุพันธ์ที่ได้

Synthesis and characterization of a chitosan derivative

By: Kritsada Inhartkruat
 Naruphon Nuancharoen
 Somjit Phajaroen

Advisor: Assistant Professor. Assadang Polnok

Department: Pharmaceutical Technology

Academic Year: 2004

Abstract

Chitosan shows potential application in various pharmaceutical formulations. However it is limited by the positive charge on molecules. Interaction between positive charge of chitosan and negative charge of drugs may be occurring. Thus chitosan polymer is not suitable to use to deliver negative charge drug. The purpose of the present study was to synthesize and evaluate chitosan derivatives. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) was coupling with chitosan in different ratios. Fourier – Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to evaluate the possible coupling between chitosan and EDTA. UV absorbance of chitosan derivatives at 340 nm was determined in order to calculate degree of modification on primary amino groups with micro-plate reader. Further more evaluate chemical and physical properties of synthesized chitosan-EDTA conjugates polymer follow by mucoadhesive, viscosity, swelling in water and degradation by lysozyme. FTIR analysis revealed that the absorption peak of the -NH_2 of chitosan at 1623 cm^{-1} disappeared. A new signal at 1571 cm^{-1} could represent of N-H stretching of amide linkage between amino groups of chitosan and carboxyl groups of EDTA. The degree of modification was calculated by determining the amount of the remaining primary amino residues on chitosan. A higher molar ratio of chitosan-EDTA trended to a lower amount of remaining primary amino residues on polymers. A higher excess of EDTA during the coupling reaction did not relation with viscosity and mucoadhesive properties. The viscosity of chitosan-EDTA conjugate 1:20 and unmodified chitosan are less than conjugate 1:1 but more than conjugate 1:5 and 5:1 respectively. The mucoadhesive properties with porcine mucosa of chitosan-EDTA conjugate 1:5 and 5:1 less than unmodified chitosan but more than conjugate 1:20 and 1:1 respectively. The chitosan-EDTA conjugate 1:1 was degraded by lysozyme less than other substrate and the ratio 1:20 of chitosan-EDTA was the most degradable by lysozyme. The ratio 1 : 20 was swelled more than other. According to these results, chitosan coupling with EDTA may occur by formation of amide bonds. The different ratio of chitosan-EDTA effected on physical and chemical properties of polymers.

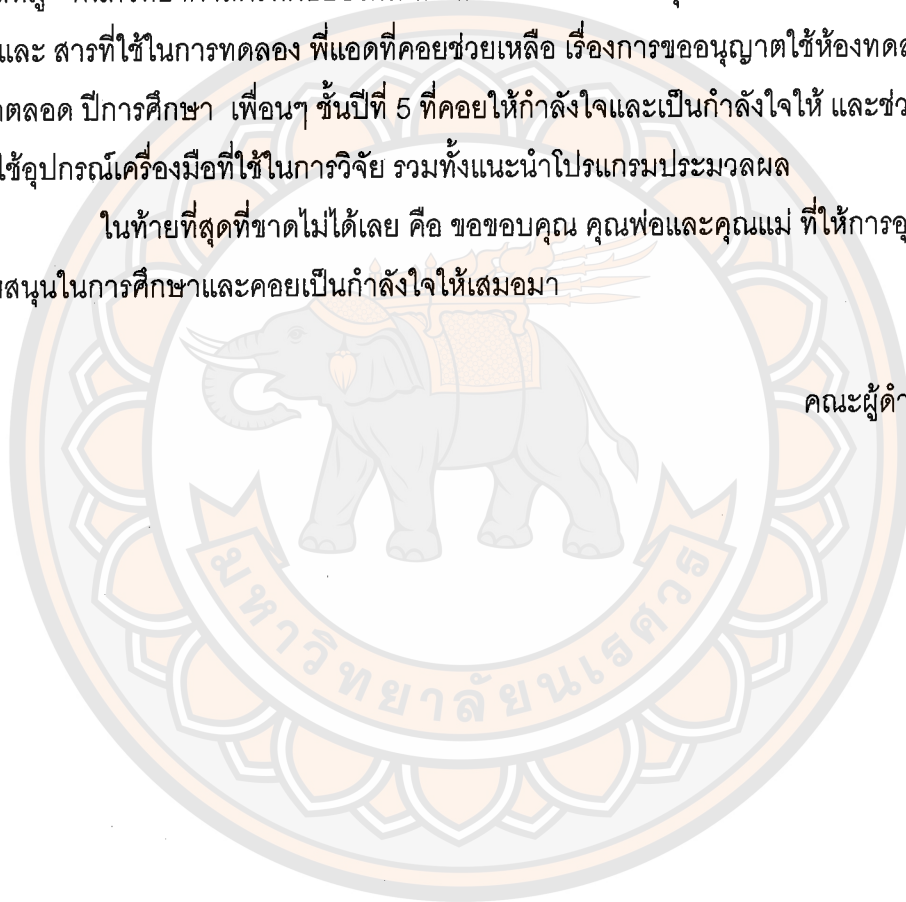
กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัษฎางค์ พลนอก อาจารย์ที่ปรึกษา
โครงการที่เข้าใจ เอาใจใส่ให้คำแนะนำและเป็นพี่ปรึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีให้คณะผู้วิจัย
ทำให้โครงการวิจัยได้บรรลุผลสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณแม่ค้าขายหมูที่เอื้อเฟื้อล่าไ้หมู เพื่อใช้ในการทดสอบการยึดติดเยื่อเมือก
ล่าไ้หมู พี่นักวิทยาศาสตร์ที่คอยช่วยเหลือ และแนะนำ การใช้อุปกรณ์ เครื่องมือในการทำการ
วิจัยและ สารที่ใช้ในการทดลอง พี่แอดที่คอยช่วยเหลือ เรื่องการขออนุญาตใช้ห้องทดลองนอก
เวลาตลอด ปีการศึกษา เพื่อนๆ ชั้นปีที่ 5 ที่คอยให้กำลังใจและเป็นกำลังใจให้ และช่วยแนะนำ
การใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งแนะนำโปรแกรมประมวลผล

ในท้ายที่สุดที่ขาดไม่ได้เลย คือ ขอขอบคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ที่ให้การอุปการะ
สนับสนุนในการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญตาราง	IV
สารบัญรูป	V
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ระเบียบวิจัย	2
บทที่ 2 การปริทัศน์วรรณกรรม	
ข้อมูลไคโตซาน (chitosan)	4
ข้อมูลสาร Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)	9
ข้อมูล 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide,hydrochloride(EDAC)	13
ข้อมูล 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid(TNBS)	13
ข้อมูล lysozyme	14
บทที่ 3 วิธีการที่ใช้ในการศึกษา	
การสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน-EDTA	
การตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	16
การทดสอบ Degree of modified primary amino group on chitosan derivative	17
การวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	18
การทดสอบการยึดติดกับเยื่อเมือก	18
การพองตัวของไคโตซาน	20
การย่อยสลายโดยเอนไซม์ lysozyme ของไคโตซานและอนุพันธ์	21
บทที่ 4 รายงานผลและอภิปรายผลการศึกษา	
ผลการตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด (FTIR)	22
ผลการทดสอบ Degree of modified primary amino group on chitosan derivatives	26
ผลการวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	30
ผลการวัดการยึดเกาะกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	31
ผลการพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์	32
ผลการทดลองคุณสมบัติการย่อยสลายโดยเอนไซม์ lysozyme	36
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 อัตราส่วน chitosan-EDTA ที่เข้าทำปฏิกิริยา	16
3-2 ปริมาณสารที่ได้จากการสังเคราะห์	16
4-1 การดูดกลืนแสงของ chitosan standard dilution	27
4-2 การดูดกลืนแสงของ chitosan-EDTA	28
4-3 ร้อยละของหมู่ amino ที่ไม่ถูกแทนที่ ด้วย EDTA	29
4-4 ผลการวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	31
4-5 ผลการวัดการยึดเกาะกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	32
4-6 ผลการพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์อัตราส่วน 1:1	33
4-7 ผลการพองตัวของอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:5 และ 5:1	34
4-8 ผลการพองตัวของอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:20	34
4-9 ผลการพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์	35
4-10 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 5:1 โดยเอนไซม์ lysozyme	37
4-11 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:1 โดยเอนไซม์ lysozyme	37
4-12 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:5 โดยเอนไซม์ lysozyme	38
4-13 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:20 โดยเอนไซม์ lysozyme	38
4-14 การย่อยสลายไคโตซาน โดยเอนไซม์ lysozyme	39
4-15 ร้อยละการย่อยสลายไคโตซานและอนุพันธ์ โดยเอนไซม์ lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม	39
4-16 ร้อยละการย่อยสลายไคโตซานและอนุพันธ์ โดยเอนไซม์ lysozyme	40

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1 โครงสร้างทางเคมีของไคติน	4
2-2 ปฏิกริยา deacetylation ของไคติน	5
2-3 ขั้นตอนการผลิตไคติน-ไคโตซาน	6
2-4 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	7
2-5 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA	9
2-6 การสังเคราะห์ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	11
2-7 nitrilotriacetic acid (NTA)	11
2-8 การเปลี่ยนแปลงของ EDTA	11
2-9 การสังเคราะห์ EDTA	12
2-10 โครงสร้างทางเคมีของ EDAC	13
2-11 ปฏิกริยาของ TNBS กับสารที่มีหมู่เอมีน	13
2-12 กลไกปฏิกริยาการตัดพันธะ β 1-4 glucosidic	14
2-13 ลำดับการเข้าทำปฏิกริยาระหว่างเอนไซม์ lysozyme และสายโพลีเมอร์ไคติน	14
3-1 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ chitosan-EDTA	16
3-2 เครื่องมือทดสอบการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้หนู	20
4-1 IR spectrum of chitosan	23
4-2 IR spectrum of chitosan-EDTA 5:1	23
4-3 IR spectrum of chitosan-EDTA 1:1	24
4-4 IR spectrum of chitosan-EDTA 1:5	24
4-5 IR spectrum of chitosan-EDTA 1:20	25
4-6 อธิบายผล FTIR ของไคโตซาน	26
4-7 อธิบายผล FTIR ของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	26
4-8 Calibration curve ของ Standard solution	27
4-9 กราฟแสดงการการดูดกลืนแสงของ chitosan-EDTA อัตราส่วนต่างๆ	28
4-10 กราฟแสดงร้อยละของหมู่ amino acid ที่ไม่ถูกแทนที่ โดย EDTA	30
4-11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	31
4-12 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยึดติดกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	32
4-13 คุณสมบัติการพองตัวของอนุพันธ์ chitosan-EDTA	35
4-14 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 1:1 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม	40
4-15 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 1:5 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม	40
4-16 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 5:1 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม	41
4-17 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 1:20 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม	41
4-18 เปรียบเทียบการย่อยสลายไคโตซานและอนุพันธ์โดยเอนไซม์ lysozyme	41

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่สกัดได้จากไคตินซึ่งมีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางค์ เนื่องจากเป็นโพลีเมอร์ที่มีลักษณะเฉพาะคือ สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต (biodegradable) สามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) และเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ (non - toxic)^(1, 2) อีกทั้งยังมีราคาถูกเนื่องจากสามารถสกัดได้จากธรรมชาติ เช่น กุ้ง ปู แมลง ผึ้ง เชื้อราพวก *Aspergillus niger* ไคโตซานคือ อนุพันธ์ที่เตรียมได้จากการเปลี่ยนแปลงไคติน โดยปฏิกิริยา deacetylation จากเดิมโมเลกุลเดี่ยวของไคตินที่เคยเป็น N-acetyl-D-glucosamine กลายเป็น glucosamine ที่มีหน่วยย่อยเป็น 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β - 1, 4 linked glycans เช่นเดียวกับไคติน แต่ยังมีโครงสร้างเป็นเส้นตรงน้ำหนักโมเลกุล (molecular weigh) ของไคโตซานจะอยู่ในช่วง 60,000 จนถึง 100,000 dalton ซึ่งสามารถเกิดขบวนการ deacetylation ได้⁽²⁻⁴⁾ ไคโตซานที่พบในท้องตลาดมีอยู่หลายเกรด ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย glucosamine (75 - 95 %) และ N-acetylglucosamine (5 - 25 %) คุณสมบัติเฉพาะตัวของไคโตซาน คือไม่ละลายในน้ำที่มี pH มากกว่า 6.5 แต่จะละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง เช่น acetic acid, formic acid, lactic acid, malic acid, propionic acid, succinic acid, tartaric acid, และ citric acid แต่จะไม่ละลายใน phosphoric acid และ sulfuric acid⁽³⁾ ทำให้ไคโตซานมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยา⁽⁴⁻⁶⁾ เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของไคโตซานที่มีประจุบวก⁽⁴⁾ หากนำมาใช้กับตัวยาที่มีประจุลบอาจส่งผลให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกของไคโตซานและประจุลบของตัวยา ส่งผลให้ตัวยาที่มีประจุลบไม่สามารถปลดปล่อยออกมาจากระบบนำส่งยาได้ ซึ่งในปัจจุบันโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ใช้เป็นยามีทั้งที่เป็นประจุบวกและเป็นประจุลบ หากนำไคโตซานมาใช้ในระบบนำส่งยาที่เป็นโปรตีนประจุลบอาจเกิดปัญหาในการปลดปล่อยยาจากระบบนำส่งยาดังที่ได้กล่าวไว้เบื้องต้นได้ จึงจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซานชนิดที่มีประจุลบเพื่อให้ใช้ในระบบนำส่งยาโปรตีนที่มีประจุลบ

การนำ Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) มาทำปฏิกิริยากับไคโตซานจะทำให้เกิดพันธะ amide ระหว่าง amino group ของไคโตซาน และ carboxyl groups ของ EDTA การ conjugate ของสารทั้งสองชนิด ทำให้ได้อนุพันธ์ของไคโตซานที่มีประจุลบกล่าวคือ ความเป็นประจุบวกของไคโตซานจะลดลงนั่นเอง^(3, 4, 7) ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของอนุพันธ์ของ chitosan - EDTA พบว่าสามารถป้องกันตัวยาที่เป็นเปปไทด์จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหารได้⁽⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ เกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุพันธ์ chitosan - EDTA ว่ามีผลช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยาเข้าเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จากคุณสมบัตินี้อาจนำไปประยุกต์ใช้กับระบบนำส่งยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งไคโตซานก็มีคุณสมบัติช่วยลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย จึงมีผลดีกับยาเตรียมที่ใช้เฉพาะที่ เช่น ยาป้ายปาก ยาตำรับครีม⁽⁶⁾ จากคุณสมบัติทั้งหมดที่กล่าวมาคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโตซานที่มีประจุลบ เพื่อนำไปใช้กับยาที่เป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ประจุลบได้ และผลจากการดัดแปลงโครงสร้างของไคโตซาน อาจทำให้คุณสมบัติต่าง ๆ ของไคโตซานเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินคุณสมบัติของอนุพันธ์ไคโตซานร่วม

ด้วย ได้แก่ ทำการประเมินคุณสมบัติการละลายในน้ำ ความหนืด การยึดเกาะกับเยื่อเมือก การซึมผ่านของ ความชื้น เพื่อให้ได้อนุพันธ์ไคโตซานที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาเตรียมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ chitosan-EDTA conjugate ที่เตรียมจากสัดส่วนต่าง ๆ กัน
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเจลที่เตรียมจาก chitosan – EDTA

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอนุพันธ์ chitosan – EDTA
2. ทราบคุณสมบัติทางกายภาพของอนุพันธ์ chitosan – EDTA สัดส่วนต่าง ๆ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมอนุพันธ์ของไคโตซาน chitosan – EDTA ⁽⁶⁾

เตรียมอนุพันธ์ chitosan – EDTA โดยการละลายไคโตซานจำนวน 2 กรัมลงในน้ำกลั่น (demineralized water) 150 mL ปรับ pH ด้วยสารละลาย 5 N HCl ให้ได้ pH ประมาณ 3 จนโพลิเมอร์ ละลายได้สมบูรณ์จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (demineralized water) จนครบ 200 mL หลังจากนั้นเติม EDTA ในอัตราส่วนต่าง ๆ ลงในสารละลายไคโตซานที่เตรียมได้ 10 ml ปรับ pH ด้วยสารละลาย 5 N NaOH ให้ได้ pH 6 จากนั้นเติมสารละลาย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 M จากนั้นปล่อยให้ปฏิกิริยาเกิดที่อุณหภูมิ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแยกโดย วิธี dialysis ด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย 0.05 N NaOH และน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนผลิตภัณฑ์ที่ได้แห้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องรอการทดสอบต่อไป

2. ศึกษาคุณลักษณะ chitosan – EDTA ที่เตรียมได้โดยนำ chitosan – EDTA ที่เตรียมได้มา ศึกษาคุณสมบัติโดยใช้ FT/IR spectroscopy โดยพิจารณาจาก spectrogram ที่ได้จากเครื่องมือเพื่อศึกษา โครงสร้างทางเคมีของ chitosan – EDTA ที่เตรียมจาก chitosan กับ EDTA ในสัดส่วนต่าง เช่น การเกิดการ เชื่อมกันระหว่างสายโพลิเมอร์ สัดส่วนการเกิด conjugate EDTA

3. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของ chitosan – EDTA เจลโดยนำ chitosan – EDTA ที่ เตรียมได้มาเตรียมเป็น hydrogel ในน้ำ แล้วนำไปศึกษาความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer วัดค่า ความหนืดและลักษณะการไหลโดยเทียบกับความเข้มข้นต่างของ chitosan – EDTA และสัดส่วนระหว่าง chitosan กับ EDTA คุณสมบัติการพองตัว (swelling) ของอนุพันธ์ของสารสังเคราะห์ในน้ำและการทดสอบการ ย่อยสลาย (degradation) โดยเอนไซม์ lysozyme

4. การวัดการยึดติดกับเยื่อเมือกโดยนำ chitosan – EDTA ที่เตรียมได้มาเตรียมเป็นฟิล์มแล้ว นำไปศึกษาการยึดติดกับเยื่อเมือกโดยใช้ ลำไส้หนูเป็นต้นแบบเยื่อเมือกวัดค่าการยึดติดระหว่าง chitosan – EDTA กับ เยื่อเมือกโดยใช้เทคนิคการเพิ่มการถ่วงน้ำหนักโดยการหยดน้ำลงในภาชนะที่ถ่วงน้ำหนัก เพื่อหา

น้ำหนักที่โพลีเมอร์หลุดจากเยื่อเมือกเทียบกับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ chitosan – EDTA และสัดส่วนระหว่าง chitosan กับ EDTA



บทที่ 2

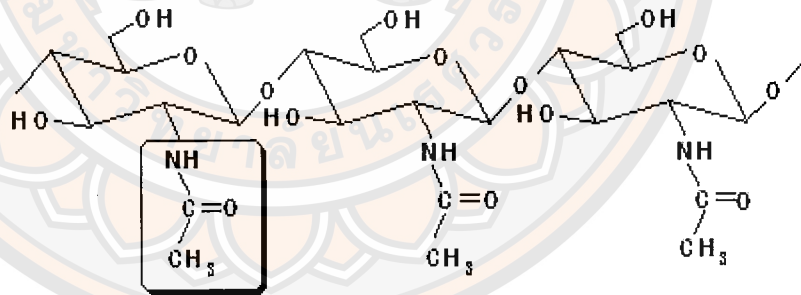
การปรีทัศน์วรรณกรรม

ข้อมูลไคโตซาน (chitosan)

ในปี ค.ศ. 1811 มีการค้นพบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตในเห็ดซึ่งมีโครงสร้างเป็นเส้นใยมีชื่อไคติน (chitin) โดย Henri Braconnat นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ต่อมาในปี ค.ศ. 1894 มีการเตรียมสารโพลิเมอร์ชีวภาพที่สกัดจากไคติน (chitin) มีชื่อว่า ไคโตซาน (chitosan) โดย Hoppe-Seiler หลังจากนั้น ไคโตซาน ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในหลายๆ ด้าน เช่น ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์และเภสัชกรรมอุตสาหกรรมด้านการเกษตร ด้านการแพทย์ ด้านการปศุสัตว์ ด้านการบำบัดน้ำเสีย และด้านสิ่งทอ⁽⁷⁻¹¹⁾ เนื่องจากเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) ที่ได้จากธรรมชาติ

ไคติน (chitin) เป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาวคล้ายเซลลูโลส เช่น โครงสร้างโมเลกุลสายยาว β -1, 4 linked glycans ที่คล้ายกับเซลลูโลส ไคติน (chitin) ที่พบในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น กุ้ง ปู แคน ปลาหมึก หอยมุก แมลง และผนังเซลล์ของพวกเชื้อรา ยีสต์และจุลินทรีย์ อีกหลายชนิด

โครงสร้างของไคตินประกอบด้วย ไฮโดรเจน 6.5 % ไนโตรเจน 6.9% และออกซิเจน 39.4 % โดยประมาณ หรือ N-acetyl-D-glucosamine (70-90%) และ D-glucosamine (10-30%) มีสูตรโมเลกุล คือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ ⁽⁹⁾ ที่เกิดจากหน่วยย่อยของ 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1, 4 ดังรูปที่ 2-1



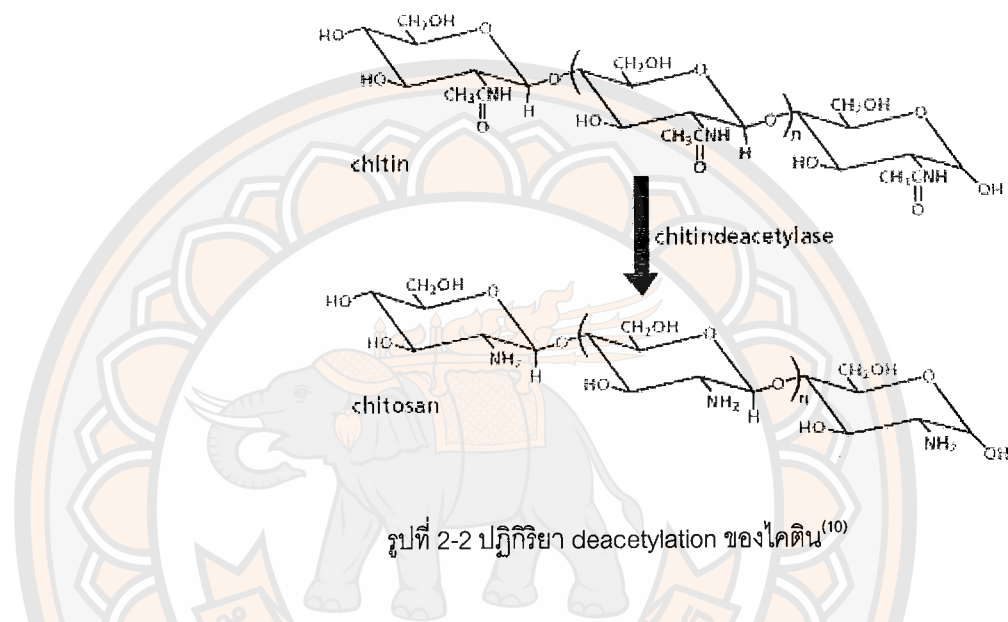
รูปที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของไคติน⁽¹⁰⁾

ไคตินที่ได้จากแต่ละแหล่ง มีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งลักษณะตามลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยได้ 3 กลุ่ม⁽¹⁰⁾ ดังนี้

1. แบบอัลฟา (α) มีการเรียงตัวของสายโซ่ในลักษณะสวนทางกัน มีความแข็งแรงสูง ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู
2. แบบเบตา (β) มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในทิศทางเดียวกัน จึงจับกันไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบ อัลฟา ได้แก่ ไคตินจากแกนปลาหมึก

3. แบบแกมมา (γ) มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลที่ไม่แน่นอน (สวนทางกันสลับทิศทางเดียวกัน) มีความแข็งแรงรองจากแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากเห็ดรา และพืชชั้นต่ำ

ไคโตซาน (chitosan) คือ อนุพันธ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของไคติน โดยปฏิกิริยา deacetylation ของไคตินจากเดิมที่เป็น N-acetyl-D-glucosamine ให้โมเลกุลเปลี่ยนเป็น glucosamine มีหน่วยย่อยเป็น 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1, 4 เช่นเดียวกับไคติน (chitin) โดยมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 2-2 ไคโตซาน (chitosan) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 60,000-1,000,000 dalton และสามารถเกิดปฏิกิริยา deacetylation ตั้งแต่ 20% ขึ้นไปโดยขั้นตอนการสกัดมีดังนี้



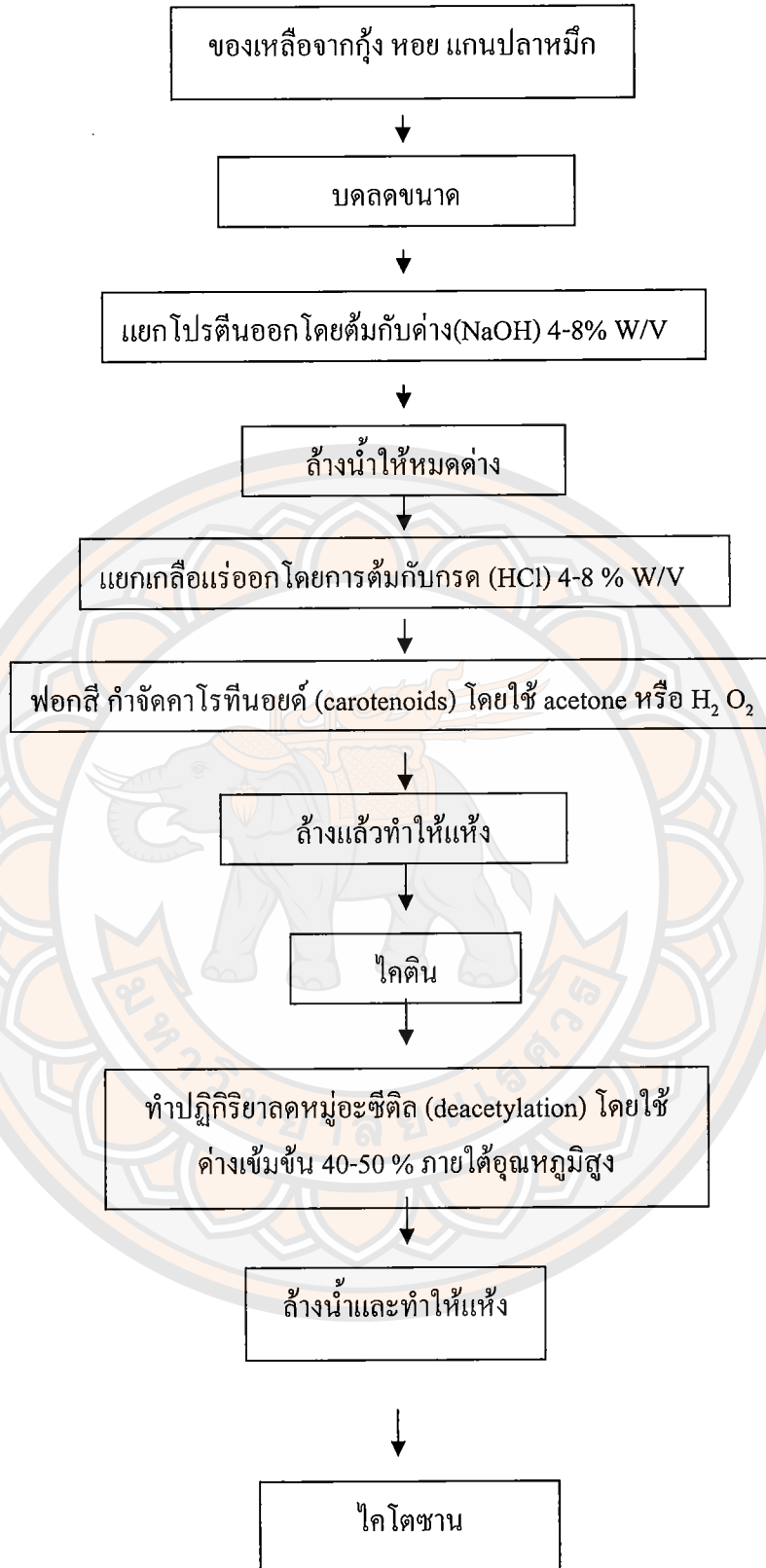
ขั้นตอนการผลิตไคติน-ไคโตซาน^(10, 11)

ประกอบด้วยหลักการสำคัญดังนี้

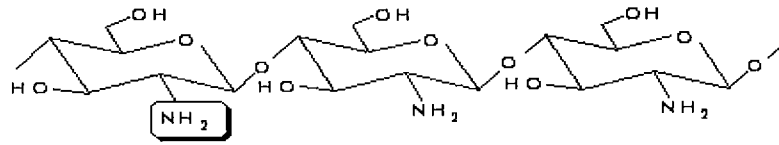
1. ขบวนการกำจัดโปรตีน (deproteination) โดยการทำปฏิกิริยากับด่าง ซึ่งส่วนใหญ่ใช้โซดาไฟ (NaOH) ในกระบวนการนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกขจัดออกไปจากวัตถุดิบ พร้อมกับไขมันบางส่วนและรงควัตถุบางชนิดจะถูกขจัดออกไปด้วย

2. การกำจัดเกลือแร่ (demineralization) โดยการนำวัตถุดิบซึ่งผ่านขั้นตอนขจัดโปรตีนออกมาแล้ว มาทำปฏิกิริยากับกรด ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ กรดเกลือ (HCl) ทำให้เกลือแร่ส่วนใหญ่ ได้แก่ หินปูน (calcium carbonate, CaCO_3) ซึ่งจะถูกกำจัดออกไปโดยเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide, CO_2) รงควัตถุและโปรตีนบางส่วนที่สามารถละลายได้ในกรดก็ถูกกำจัดออกไปกำจัดสีด้วย 0.5% KmnO_4 และ 0.5% oxalic acid หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้ง สารที่ได้หลังขั้นตอนนี้ก็คือ ไคติน

3. กระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซีทิล (deacetylation) เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ใช้ในการกำจัดหรือลดหมู่อะซีทิล ($\text{CH}_3\text{CO}-$) ที่มีบนหมู่ ไคติน เพื่อให้เกิดเป็นไคโตซาน ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) บนโมเลกุลของไคติน หมู่อะมิโนสามารถรับโปรตอนจากสารละลาย ซึ่งช่วยให้การละลายดีขึ้น เพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก (cation)



รูปที่ 2-3 ขั้นตอนการผลิตไคติน-ไคโตซาน



รูปที่ 2- 4 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน⁽¹⁰⁾

นอกจากนี้ไคโตซาน (chitosan) ยังมีคุณสมบัติย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต (biodegradable) เข้ากับสิ่งมีชีวิตได้ (biocompatible) และไม่เป็นพิษ (nontoxic) การกำจัดหมู่ acetyl ทำให้ไคโตซาน (chitosan) เกิดหมู่อะมิ (-NH₂) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และหมู่ hydroxyl (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่ง ที่ 3 และ 6 ที่พร้อมจะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่นได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการนำไคโตซาน (chitosan) มาดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้คุณสมบัติทางฟิสิกส์ที่ต้องการ เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านอื่น เช่น

1. ด้านอาหาร⁽¹⁰⁻¹⁶⁾

ไคโตซานมีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด โดยมีกลไกคือ ไคโตซานมีประจุบวกสามารถจับกับเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่นของเซลล์ ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคตินและไคโตซานให้เป็นสารที่ใช้เติมในอาหารได้ ไคโตซานสามารถคีเลต (chelating agent) ที่จำเพาะกับพวกจุลธาตุ (trace elements) บางชนิดและนำมาซึ่งการยับยั้งการผลิตสารพิษจากพวกเชื้อจุลินทรีย์และขัดขวางการเจริญเติบโตของมัน สมบัติการกักน้ำและการจับตัวกับน้ำได้ดี นำไปสู่การขัดขวางการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดใน จุลินทรีย์ นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลที่พอเหมาะสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวเคลือบของเซลล์จุลินทรีย์และพบว่ามีการจับตัวกันของ ไคโตซานกับ DNA ทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ โดยนำไปใช้เป็นสารกักตุน สารช่วยรักษากลิ่น รส และสารให้ความชุ่มชื้นใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ เพื่อรักษาความสดหรือผลิตในรูปแบบฟิล์มที่รับประทานได้ (edible film) สำหรับบรรจุอาหาร

2. ด้านอาหารเสริม⁽¹⁰⁻¹⁴⁾

มีรายงานว่า ไคโตซานช่วยลดคอเลสเตอรอล และไขมันในเส้นเลือด โดยไคโตซานไปจับกับคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้หรือดูดซึมนได้น้อยลง นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน เช่นวิตามินเอ ดี อี เค อาจทำให้ขาดวิตามินเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ N-acetyl-D-glucosamine ไปใช้รักษาไขข้อเสื่อม โดยอธิบายว่า ข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่ง glucosamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ proteoglycan และ matrix ของกระดูกอ่อน จึงช่วยทำให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้น

3. ด้านการแพทย์^(10-14, 16)

มีการวิจัยนำแผ่นไคโตซานมาใช้ปิดแผล ช่วยทำให้ไม่เป็นแผลเป็น โดยไคโตซานช่วยลดการ contraction ของ fibroblast ทำให้แผลเรียบ กระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลให้หายเร็วขึ้น การป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียและราหลังการผ่าตัด (inhibit mold and bacteria)

4. ด้านเภสัชกรรม^(10, 12, 14)

มีรายงานการใช้ไคโตซานเพื่อควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ สารให้ความคงตัว (stabilizer) สารเพิ่มความข้นหนืด (thickener) สารหุ้มเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (encapsulator)

5. ด้านการเกษตร^(10, 12, 14)

เนื่องจากไคตินและไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจนจะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลอย่างช้าๆ รวมทั้งช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศและดิน จึงใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช และกระตุ้นการนำแร่ธาตุไปใช้ ผลคือสามารถเพิ่มผลผลิตและคุณภาพการผลิตได้ ทำให้เกษตรกรมี ต้นทุนต่ำลง เนื่องจากลดการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลง ใช้ เป็นสารแยกสิ่งเจือปนในขบวนการผลิต เอนไซม์ (enzyme) โปรตีน (protein) สำหรับงานทางด้านเทคโนโลยีอาหาร เทคโนโลยีชีวภาพ วิศวกรรมชีวเคมี

6. ด้านการปศุสัตว์⁽¹⁰⁾

ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดการติดเชื้อ ทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์เพิ่มขึ้น

7. ด้านการบำบัดน้ำเสีย^(10, 12)

โดยทั่วไป น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร มีสารแขวนลอยสูง ไคโตซานมีประจุบวก สามารถจับกับโปรตีนและไขมันได้ดี ซึ่งโปรตีนที่ได้สามารถแยกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อไป นอกจากนี้ ไคโตซานยังสามารถดูดซับไอออนของโลหะหนัก และจับสี (dye) ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย

8. ด้านสิ่งทอ⁽¹⁰⁾

นำมาขึ้นรูปเป็นเส้นใย และใช้ในการทอร่วมหรือเคลือบกับเส้นใยอื่นๆ เพื่อให้ได้คุณสมบัติทางด้านจุลชีพ ลดการเกิดกลิ่นอับ

ไคโตซาน (chitosan) ละลายในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง เช่น acetic acid, formic acid, lactic acid, malic acid, propionic acid, succinic acid, tartaric acid และ citric acid และได้โพลีเมอร์ที่มีประจุบวก นอกจากนี้ยังสามารถละลายได้บ้างในกรดอินทรีย์เจือจางยกเว้น phosphoric และ sulfuric acid ค่า pH ที่ต่ำกว่า 6 ไคโตซานสามารถเกิดเป็น cationic polymer ที่ละลายได้ แต่เมื่อค่า pH ที่สูงขึ้น ไคโตซานมีแนวโน้มที่จะไม่ละลายและตกตะกอนออกมา เนื่องจากสูญเสียสภาพประจุบวกไป ในทางเภสัชกรรมนอกจากนี้ กล่าวมาข้างต้น ไคโตซาน (chitosan) ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบโดยเฉพาะรูปแบบที่

เกี่ยวข้องกับหมู่ hydroxyl groups และ amino groups บนสายโพลิเมอร์ของมัน ความสามารถในการอุ้มน้ำของไคโตซาน (chitosan) อาศัยคุณสมบัติของหมู่ hydroxy groups คุณสมบัติตรงข้อนี้ เมื่อไคโตซานอยู่ในสารละลายที่มี pH เหมาะสม ไคโตซานจะมีความหนืดสามารถอุ้มน้ำได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการแผ่เป็นแผ่นบางเคลือบบนผิวต่างๆ ได้⁽¹⁵⁾ ส่วนหมู่ amino groups นั้นทำหน้าที่เกี่ยวกับสมบัติการเป็น polyelectrolyte ช่วยให้เกิดการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนกับพวกโลหะต่างๆ ได้ดี

ด้วยสมบัติอุ้มน้ำดังกล่าว ทำให้มีการนำไคโตซานไปใช้เครื่องสำอาง พบว่าไคโตซานสามารถดูดซับไว้บนผิวหนังได้พร้อมกับสามารถแผ่เป็นแผ่นบางที่ยืดหยุ่นได้ ช่วยลดการสูญเสียน้ำจากผิวหนังได้ และยังช่วยเพิ่มการต้านทานน้ำของพวกสารป้องกันแดด (sunscreen) บนผิวหนังได้ด้วย ไคโตซานยังสามารถจับกับสาร keratin ในเส้นผมซึ่งช่วยในการคงรูปของผมและยังช่วยควบคุมสารที่ทำลายเส้นผมได้ด้วย

ข้อมูลสาร Ethylenediaminetetraacetic acid⁽¹⁷⁻²⁰⁾

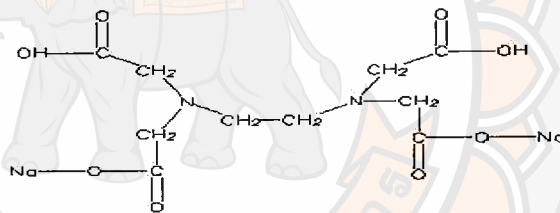
ชื่อสาร: Ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA

ชื่อพ้อง: Editic acid, (ethylenedinitrilo) tetraacetic acid

ชื่อทางเคมี (chemical name): N, N-1, 2-Ethanediybis [N-(carboxymethyl)glycine]

สูตรทางเคมี: $C_{10}H_{16}N_2O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 292.24

สูตรโครงสร้าง:



รูปที่ 2-5 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA

หน้าที่ของสาร : Chelating agent

สาร EDTA มักนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม ด้านผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ และอาหารโดยทำหน้าที่เป็น chelating agent EDTA สามารถละลายได้ในน้ำ และจับเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (chelate) ได้กับ alkaline earth และสารโลหะหนัก รูป chelate ของสาร EDTA เป็นคุณสมบัติบางส่วนของรูป free ion ส่วนใหญ่ มักเกิดจากการปลดปล่อยไอออน (removing) จากสารละลาย ความคงตัวของของการจับกับสารโลหะ (metal- edentate complex) จะขึ้นอยู่กับไอออนของโลหะเองและ pH ของสารละลายนั้น นอกจากนี้ EDTA ยังทำหน้าที่คล้ายกับสารต้านการออกซิเดชัน (antioxidant) สามารถจับกับสารโลหะหนัก คอปเปอร์ (copper) เหล็ก (iron) แมงกานีส (manganese) ซึ่งสามารถเร่งให้เกิดการเหนี่ยวนำปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยตัวของมัน (autoxidation reaction) อาจใช้ EDTA เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับสารต้านการออกซิเดชันอื่นๆ ได้ ความเข้มข้นที่ใช้มักอยู่ที่ 0.005-0.1% นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) ใน ascorbic acid, corticosteroids, epinephrine, folic acid, formaldehyde, gums และ resin เป็นต้น ในปริมาณสาร 0.01-0.1% สามารถใช้เป็นเสริมในสารกันบูด (antimicrobial preservative synergists) มีการใช้ EDTA และ disodium EDTA เพื่อปรับ

สภาพน้ำให้มีความกระด้างลดลง โดยเป็นสารที่เข้าจับกับแคลเซียม (calcium) และแมกนีเซียม (magnesium) ในน้ำกระด้าง

คุณสมบัติของสาร

1. คุณสมบัติความเป็นกรดเป็นด่าง ที่ความเข้มข้น 0.2% W/V สารละลายมี pH เท่ากับ 2.2
2. ความสามารถในการต้านแบคทีเรีย (antimicrobial activity) สามารถต้านเชื้อ Gram -negative microorganisms, pseudomonas aeruginosa, ยีสต์ (yeasts) บางชนิด และเชื้อรา (fungi) แม้จะไม่มีคุณสมบัติที่พบจะไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียหรือใช้เป็น สารกันบูด แต่มีการพิสูจน์ว่า สามารถออกฤทธิ์เสริม ประสิทธิภาพสารกันบูดได้ เช่น benzalkonium chloride, bronopol, cetrimide, imidurea, parabens และ phenol สำหรับการเพิ่มสาร disodium EDTA ในสาร phenylmercuric nitrate และ thimerosal พบว่าลดฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การเข้าจับกับ divalent ของสารทั้งสอง
3. ค่า dissociation constant:
 $pK_{a1} = 2.00$ $pK_{a2} = 2.67$ $pK_{a3} = 6.16$ $pK_{a4} = 10.26$
4. จุดหลอมเหลว (melting point): ประมาณ 200 °C
5. ความสามารถในการละลาย (solubility): สามารถละลายในสารละลายด่าง (alkali hydroxides) สัดส่วนที่ละลายในน้ำ คือ 1 ส่วน ในน้ำ 500 ส่วน

การเก็บรักษา

แม้ว่าสาร EDTA จะมีความคงตัวในรูปของแข็ง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นที่ 120 °C จะทำให้ผลึกของสารสูญเสียน้ำ ที่อุณหภูมิ 150 °C อาจทำให้สารเกิดปฏิกิริยา decarboxylates ดังนั้นควรเก็บสารไว้ในที่อุณหภูมิที่ควบคุมสถานที่แห้งและบรรจุด้วยภาชนะมิดชิด

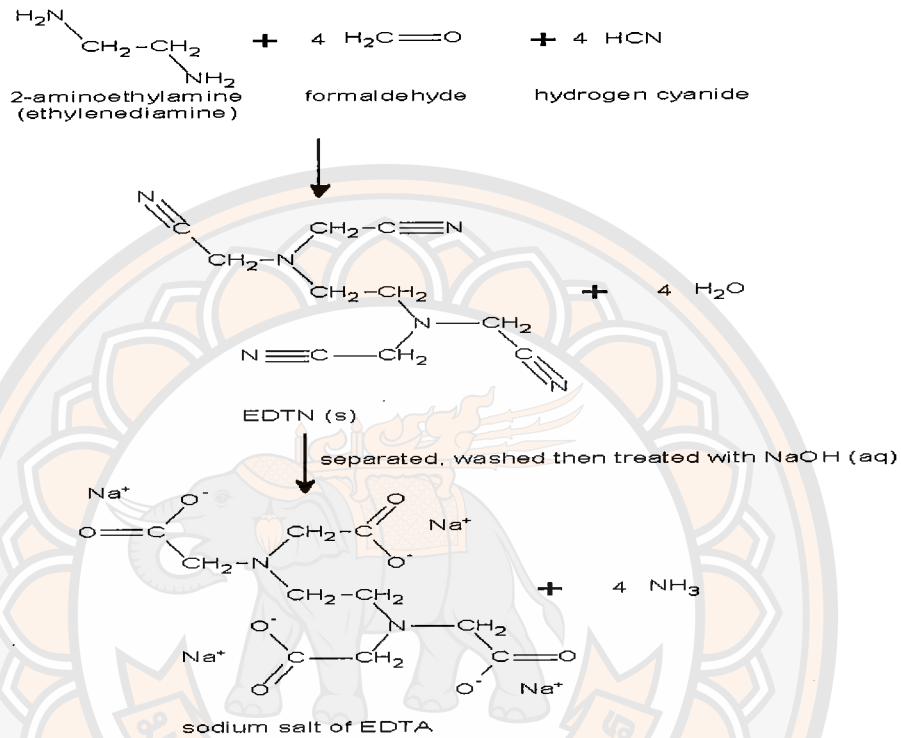
ความไม่เข้ากันของสาร (incompatibility)

สาร EDTA จะไม่เข้ากันกับสารออกซิไดซ์รุนแรง (strong oxidizing agent) เบสแก่ (strong base) และสารโลหะที่มีขั้ว (polyvalent metal ions) เช่น นิกเกิล คอปเปอร์ นอกจากนี้ยังไม่เข้ากันกับยาอินซูลิน เนื่องจากการเข้าจับกับสารสังกะสี (zinc) รวมทั้งสารอาหารที่ให้ทางหลอดเลือดที่มีเกลือแร่รวม (trace metal) calcium EDTA ไม่เข้ากันกับยา amphotericin และยา hydralazine hydrochloride ในการให้แบบ infusion fluid

วิธีการสังเคราะห์ (method of manufacture)

การสังเคราะห์ EDTA สามารถสังเคราะห์ได้จาก ethylenediamine, formaldehyde และ cyanide ซึ่งได้แก่ HCN และ NaCN EDTA ในรูปเกลือจะปนเปื้อนรวมอยู่กับ nitrilotriacetic acid (NTA) สาร ammonia (NH₃) ที่ได้สามารถแยกออกโดยการระเหยและการ recovered วิธีการสังเคราะห์ที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 2-6

วิธีการสังเคราะห์ที่ 2 แตกต่างจากการสังเคราะห์ที่ 1 คือการใช้ hydrogen cyanide แทน sodium cyanide ดังรูปที่ 2-8 นอกจากนี้ยังสามารถเตรียม EDTA ได้จากการทำ condensation ระหว่าง ethylenediamine กับ sodium monochloroacetate ใน presence ของ sodium carbonate หลังจากนั้นให้สารละลายอยู่ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้อุณหภูมิลดลง เพิ่ม hydrochloric acid เพื่อให้ EDTA ตกตะกอน



รูปที่ 2-9 การสังเคราะห์ EDTA

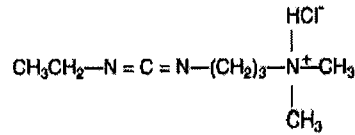
ความปลอดภัย (safety)

EDTA ในรูปแบบที่ใช้ทั่วไป พบว่าไม่มีพิษ และไม่เกิดการระคายเคืองที่รุนแรง การเกิดหลอดลมหดตัว (bronchoconstriction) จะขึ้นอยู่กับขนาดของการใช้ที่เป็นสารกันบูดในสาร nebulizer solution ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะว่าไม่ควรใช้ EDTA ในสาร nebulizer solution การเติมสาร EDTA ในสารประกอบยาอาจทำให้การดูดซึมในระบบทางเดินอาหารลดลง ค่า LD₅₀ ในหนู mouse, IP: 0.25 g/kg ,ในหนู mouse, oral: 0.03 g/kg ,ในหนู rate, IP: 0.397 g/kg

ข้อมูล 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide,hydrochloride

ชื่อสาร: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide,hydrochloride: EDAC

สูตรทางเคมี: $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ น้ำหนักโมเลกุล:191.7



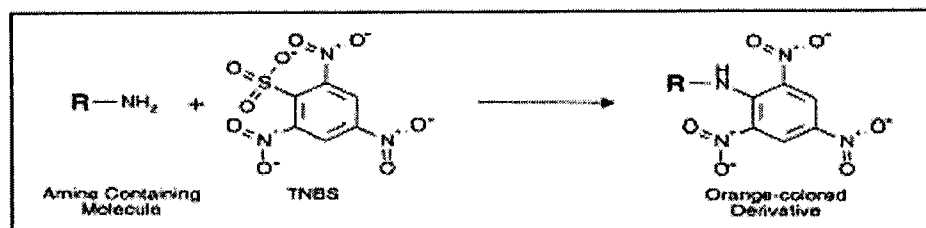
รูปที่ 2- 10 สูตรโครงสร้าง EDAC

ข้อมูลทั่วไป

EDAC คือสารเคมีชนิดหนึ่งที่ใช้เพื่อการเชื่อมโมเลกุลโดยการเกิดพันธะโควาเลนต์ที่แยกอะตอมของ 2 โมเลกุลเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุล ขึ้นอยู่กับลักษณะและชีวภาพของแต่ละสารการเชื่อมโยงนี้เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการเตรียม conjugate ใน immunotechnologies และการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน (โครงสร้าง การทำปฏิกิริยา การถูกทำลาย) โดยทั่วไป EDAC ทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นการเกิดพันธะเอไมด์กับระหว่าง carboxyl กับ primary amine โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ phosphate EDAC ใช้ในการสังเคราะห์ peptide ใช้เชื่อมระหว่างกรดนิวคลีอิก และใช้เตรียมตัวอย่างทาง immunoconjugate ปกติจะใช้ใน pH ช่วง 4 – 6 EDAC ทำปฏิกิริยากับ carboxyls โดยเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่เรียกว่า o-acylisourea. ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ใน acidic buffer (pH 4.7 – 5.5) buffer อาจสูงถึง 7.4
การละลาย: EDAC สามารถละลายน้ำได้ถึง 100 mg/ml
การเก็บรักษา : -20 °C(อาจเก็บที่ +4 °C ได้)

ข้อมูล 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid

2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBSA or TNBS)เป็นสารที่มีความไวต่อปฏิกิริยาการวิเคราะห์หมู่ free amino groups และ primary amines ซึ่งหมู่ดังกล่าวจะเข้าทำปฏิกิริยาและจับกับโครงสร้างของ TNBSA และเกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่มีสี (highly chromogenic derivative) ดังรูปที่ 2-10 ซึ่งสามารถวัดค่าได้ที่ค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 335 nm

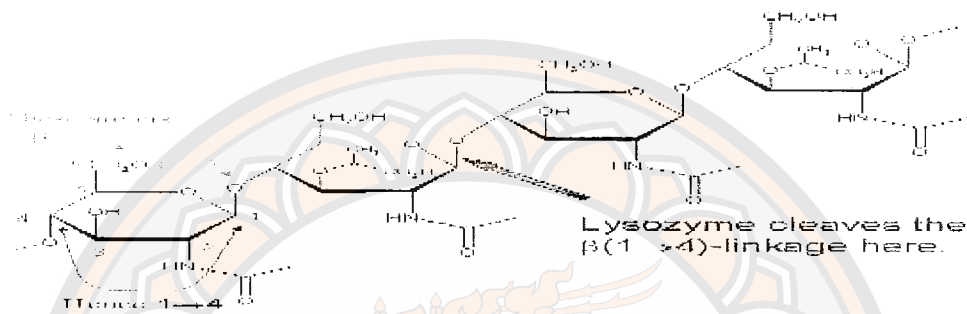


Reaction of TNBSA with a primary amine-containing molecule to produce a chromogenic derivative.

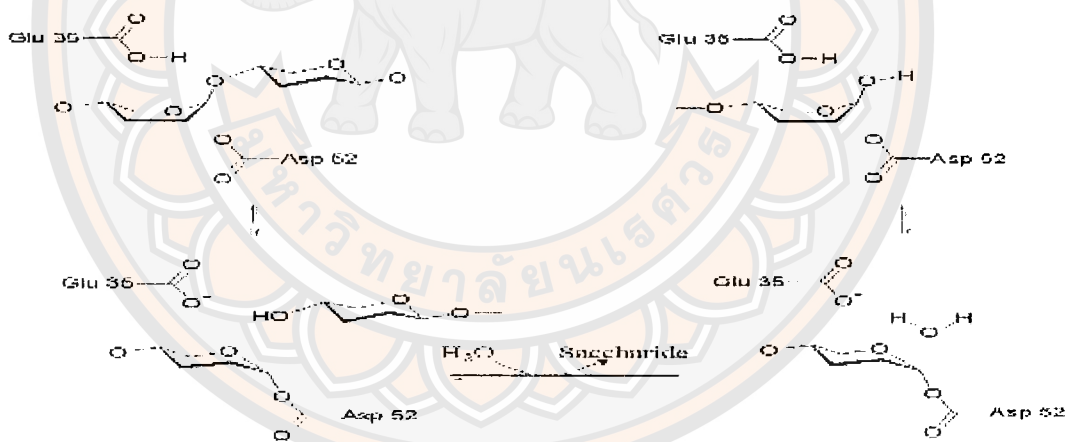
รูปที่ 2-11 ปฏิกิริยาของ TNBS กับสารที่มีหมู่เอมีน

ข้อมูล lysozyme⁽²¹⁻²³⁾

เอนไซม์ lysozyme เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะ β -1,4 glucosidic linkages ระหว่าง หมู่ N-acetylmuramic acid และหมู่ N-acetylglucosamine ในโครงสร้างมิวโคเปปไทด์ (mucopetide) ของผนังเซลล์ เช่น เชื้อ *Micrococcus lysodeikticus*. และโคติน lysozyme เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั้งในสัตว์และพืช hen egg white (lysozyme "c"). เป็น lysozymem ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เราพบเอนไซม์ lysozyme ในสารคัดหลั่งและเนื้อเยื่อ เช่น น้ำลาย น้ำตา น้ำนม ไต ตัวอย่างกลไกปฏิกิริยาการตัดพันธะ β -1,4 glucosidic



รูปที่ 2-12 กลไกปฏิกิริยาการตัดพันธะ β -1,4 glucosidic



รูปที่ 2-13 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ lysozyme และสายโพลีเมอร์โคติน

ลักษณะเฉพาะตัว: น้ำหนักโมเลกุล 14,388 กิโลดาลตันสามารถถูกยับยั้งได้โดยสาร dodecyl sulfate, fatty acids และแอลกอฮอล์ ความคงตัว เอนไซม์ lysozyme ในรูปผงแห้ง (dry lyophilized) ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส สามารถรักษาสภาพได้นานเป็นปี ในรูปสารละลายควรเก็บไว้ที่ pH 4-5 ในตู้เย็น สามารถคงสภาพได้นานหลายสัปดาห์ สารละลายที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไว้ได้ 1 วัน

บทที่ 3

วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

การสังเคราะห์อนุพันธ์chitosan-EDTA สารเคมีและอุปกรณ์

1. Chitosan (cosmetic grade 10, TM 568, %DD 94.5, viscosity 12 cps.)
2. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide: EDAC (Lot.No.1057411, assay >98% , Fluka chemie GmbH CH 9471 Buchs, Germany.)
3. Ethylenediaminetetraacetic acid:EDTA (EDTA Synthesis grade, Lot.No. 27002/0149, Scharlau chemie S.A. Spain.)
4. 5 N NaOH
5. 2 N HCl
6. Dialysis membrane (MWCO 12 – 14,000, Lot.No.10668, The spectrum companies US&Cannada))
7. ปีกเกอร์ขนาด 25, 100, 250, 2,000 มิลลิลิตร
8. น้ำกลั่น (demineral water)
9. pH meter
11. plate
12. magnetic stirrer

วิธีเตรียมสารทดลอง

1. เตรียมสารละลายไคโตซาน 1 % w/v

ซึ่ง ไคโตซาน 2 g ใส่ในปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจำนวน 150 มิลลิลิตร ลงในปีกเกอร์ ปรับ pH ด้วย 5 N HCl จนได้ pH ประมาณ 3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร

2. เตรียม 2 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

ซึ่ง EDAC จำนวน 5.7513 g ใส่ในปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 15 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3. เตรียม ethylenediaminetetraacetic acid:EDTA (EDTA Synthesis grade, lotnumber 27002/0149 Scharlau chemie S.A. Spain.)

ซึ่ง EDTA จำนวน x กรัม เติมน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 15 มิลลิลิตร

4. เตรียม 5 N NaOH

ซึ่ง NaOH จำนวน 40 กรัม ใส่ในปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 150 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร

5. เตรียม 2 N HCl

ตวง สารละลาย 37 % HCl มา 17 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ chitosan-EDTA

1. ผสมสารละลายไคโตซานกับ EDTA ตามสัดส่วนดังนี้

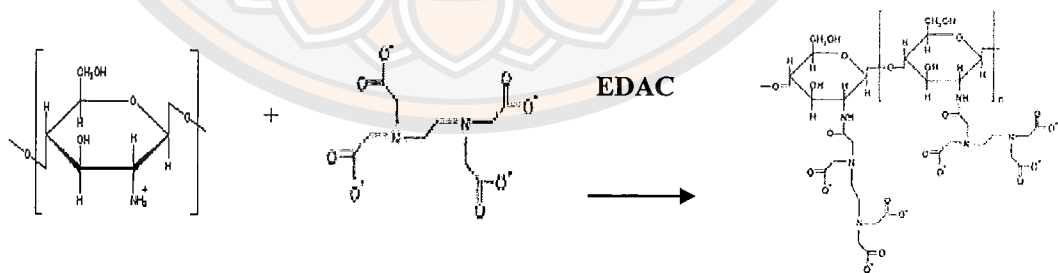
ตารางที่ 3 -1 อัตราส่วน chitosan-EDTA ที่เข้าทำปฏิกิริยา

Chitosan-EDTA	Chitosan 1 %	EDTA (g)
5:1	50 ml	0.3632
1:1	50 ml	1.816
1:5	50 ml	9.08
1:20	50 ml	36.32

2. ผสมไคโตซานกับ EDTA ให้เข้ากันโดยใช้ magnetic sterrier ปรับด้วย 5 NaOH จน pH เท่ากับ 6
3. เติม EDAC ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 M ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำมาทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 1,800 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
5. ด้วย 0.05 N NaOH จำนวน 1,800 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 1,800 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงอีกครั้งหนึ่ง
7. เก็บอนุพันธ์ที่ได้นำมาเทฟิล์มโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 -2 ปริมาณสารที่ได้จากการสังเคราะห์

Sample	Chitosan+EDTA	น้ำหนักสารที่ได้(g)	% yeld
5:1	0.8632	0.5353	62.01
1:1	2.316	0.5665	24.46
1:5	9.58	2.93	2.93
1:20	18.66	2.29	2.29



รูปที่ 3-1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ chitosan-EDTA

การทดสอบคุณสมบัติของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

1. การตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสาร ในช่วง Infrared (IR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่พัฒนามาจากเครื่อง IR Spectrophotometer โดยมีการใช้ระบบทางเดินแสงแบบ Interferometer แทนระบบทางเดินแสงแบบเก่า ซึ่งจะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น มีความไวในการวิเคราะห์มากขึ้นและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง นำมาศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล จากการจัดเรียงตัวของอะตอมภายในโมเลกุล โครงสร้างของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสาร มีความจำเป็นที่ใช้ในการระบุชนิดของสารเนื่องจากสารที่มีสูตรโมเลกุลเหมือนกันถ้ามีการจัดเรียงโมเลกุลต่างกันก็จะเป็นสารคนละชนิดกัน FTIR นี้ใช้หลักการสั่นของโมเลกุลในการศึกษาโครงสร้าง ปัจจัยที่มีผลทั้งความถี่และการสั่นของโมเลกุลนั้นจะมี 2 ปัจจัย คือ

1. มวลอะตอมของสารที่สร้างพันธะกัน
2. ชนิดของพันธะ (พันธะเดี่ยว, คู่ และ พันธสาม)

ความถี่ลดลงเมื่อมวลอะตอมมากขึ้นและความถี่เพิ่มขึ้นเมื่อพลังงานพันธะเพิ่มขึ้น⁽²⁴⁾

นำ chitosan และ chitosan-EDTA ที่เตรียมได้มาตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด (FTIR) แล้วพิจารณา spectrogram ที่ได้จากเครื่องมือเพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ chitosan เปรียบเทียบกับ อนุพันธ์ chitosan-EDTA ที่เตรียมจาก chitosan กับ EDTA ในสัดส่วนต่าง

2. การทดสอบ Degree of modified primary amino group on chitosan derivatives สารเคมีและอุปกรณ์

1. สารโคโตซานและอนุพันธ์ (chitosan-EDTA polymer) 0.1 กรัม
2. Reagent: 0.1 % TNBS
3. 4% NaHCO₃
4. 2 N HCl
5. ปีกเกอร์ขนาด 1, 25, 50 มิลลิลิตร
6. น้ำกลั่น (demineral water)
7. เครื่องวัดและอ่านปริมาณแสงแบบจานหลุม (Packard Spectra Count™ : A Packard Bioscience Company)
8. micropipette
9. จานหลุม 96-well plate
10. ขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

วัดระดับการเข้าทำปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง chitosan และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จากการวัดหมู่ primary amino group บนโคโตซานโพลีเมอร์ ที่ไม่ถูกแทนที่ด้วย EDTA โดยใช้ 2, 4, 6 - trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) reagent ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมสารตัวอย่างโดยนำ

สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาทำให้พองตัว (swelling) ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 %w/v ดูดสารละลายที่ได้ 80 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน 96-well plate แต่ละหลุม เติม 4% NaHCO₃ และ 0.1% TNBS อย่างละ 80 ไมโครลิตร ลงไป นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 2 N HCl ลงไป 80 ไมโครลิตร ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดและอ่าน ปริมาณแสงแบบจานหลุม⁽²⁾ (Packard Spectra Count™ : A Packard Bioscience Company) คำนวณหมู่ amino ที่ไม่ถูกแทนที่โดย EDTA จาก standard curve ที่ได้จากการวัด หมู่ primary amino ของ สารละลาย chitosan ที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125 และ 0.5 %w/v

การเตรียมสารทดลอง

1. Chitosan 1 % w/v เพื่อทำ standard curve

นำ chitosan 0.5 กรัม กระจายตัวในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร คนให้กระจายตัว ปรับ pH ให้เป็น 3 ด้วย 5 N HCl คนตลอดเวลาเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 1% w/v นำสารละลายที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125 และ 0.5 %w/v เพื่อนำไปวัด การดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร และนำมา plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นกับการดูดกลืนแสง เพื่อใช้ เป็นเป็น standard curve

2. สารตัวอย่าง

ซึ่งสารตัวอย่าง (chitosan-EDTA polymer) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายของสารตัวอย่าง 0.1 กรัม ใน 25 มิลลิลิตร (0.4 % w/v)

3. Reagent: 0.1 % TNBS (Picrylaulfonic acid solution, 5%w/v lotnumber 014k5007, Sigma Aldrich. Inc. Germany)

ดูดสารละลาย 5% TNBS ด้วย micro pipette 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ได้ สารละลาย 0.1 % TNBS

4. 4% NaHCO₃

ละลาย NaHCO₃ 1 กรัมในน้ำ 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร

5. 2 N HCl

ตวง สารละลาย 37 % HCl มา 17 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. การวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

สารเคมีและอุปกรณ์

1. สารโคโตซานและอนุพันธ์

2. 2 N HCl

3. น้ำกลั่น

4. เครื่องวัดความหนืด Brookfield viscometer

วิธีการทดลอง

1. เตรียมโคโตซาน โดยชั่งโคโตซาน 0.1 กรัม นำมาละลายน้ำ 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 3 หรือจนโคโตซาน ละลายด้วย 2 N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร
2. เตรียมอนุพันธ์ chitosan-EDTA โดย ชั่งสารอนุพันธ์ chitosan-EDTA ที่สังเคราะห์ได้นำแต่ละอัตราส่วน จำนวน 0.1 กรัม มาละลายน้ำจำนวน 25 มิลลิลิตร
3. นำแต่ละตัวอย่างมาจำนวนตัวอย่างละ 8 มิลลิลิตร วัดความหนืดโดยเครื่องมือวัดความหนืด Brookfield viscometer

4. การทดสอบการยึดติดกับเยื่อเมือก⁽²⁾

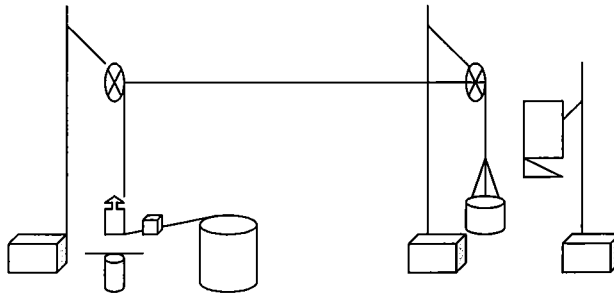
โดยนำ chitosan-EDTA ที่เตรียมได้มาเตรียมเป็นฟิล์มแล้วนำไปศึกษาการยึดเกาะกับเยื่อเมือก โดยใช้ ลำไส้หมูเป็นต้นแบบเยื่อเมือกวัดค่าการยึดเกาะระหว่าง chitosan-EDTA กับ เยื่อเมือกโดยใช้เทคนิคการเพิ่มการถ่วงน้ำหนักโดยการหยดน้ำลงในภาชนะที่ถ่วงน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักที่โพลีเมอร์หลุดจากเยื่อเมือกเทียบกับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ chitosan-EDTA และสัดส่วนระหว่าง chitosan กับ EDTA

สารเคมีและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง
2. ลูกตุ้มเหล็กหนัก 35.62 กรัม
3. รอกขนาดเล็ก 2 ตัว
4. เชือก
5. ขวดขนาดเล็ก 1 ขวด
6. ภาชนะถ่วงน้ำหนัก 1 ใบ
7. Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร 1 ใบ
8. Separate funnel
9. นาฬิกาจับเวลา
10. plunger ขนาด 10 มิลลิลิตร
11. ขาดั่ง 2 อัน
12. อนุพันธ์ chitosan-EDTA
13. เยื่อเมือกลำไส้หมู

การเตรียมอุปกรณ์ดังรูป

1. นำขาดั่งมาติดกับรอก ทั้ง 2 ตัวให้สูงจากพื้น 47 เซนติเมตรและวางห่างกันประมาณ 60 เซนติเมตร
2. นำ plunger มาเจาะรูและใส่เชือกเพื่อนำมายึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้หมู
3. นำภาชนะถ่วงน้ำหนักมาติดกับอุปกรณ์เพื่อใส่น้ำถ่วงน้ำหนัก
4. วางขวดขนาดเล็กห่างจากขวดถ่วงน้ำหนักประมาณ 15 เซนติเมตร



รูปที่ 3-2 เครื่องมือการทดสอบการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้หมู

การเตรียมเยื่อเมือกลำไส้หมู

นำเยื่อเมือกลำไส้หมู มาทำความสะอาดด้วย 0.9% normal saline + 3.5% dextrose in water จากนั้นตัดเยื่อเมือกลำไส้หมูให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 เซนติเมตรแล้วนำเยื่อเมือกลำไส้หมูติดกับปากขวดขนาดเล็ก

วิธีการทดลอง

1. หยดน้ำลงบนภาชนะถ่วงน้ำหนัก ให้รอกเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ จากนั้นนำภาชนะถ่วงน้ำหนักไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักไว้เพื่อเป็น baseline
2. นำแผ่นอนุพันธ์ chitosan ขนาด 1 x 1 เซนติเมตร มาติดกับ plunger
3. นำ plunger ที่ติดกับแผ่นอนุพันธ์ chitosan มาติดกับเยื่อเมือกลำไส้หมู
4. วางลูกตุ้มขนาดน้ำหนัก 35.62 กรัมกดทับเป็นเวลา 5 นาที
5. นำลูกตุ้มออก
6. เริ่มหยดน้ำลงบนภาชนะถ่วงน้ำหนักจนกว่าแผ่นอนุพันธ์ chitosan จะหลุดออกจากเยื่อเมือกลำไส้หมู
7. นำภาชนะถ่วงน้ำหนัก ไปชั่งน้ำหนัก บันทึก แล้วนำไปลบออกจาก baseline จะได้ค่าการยึดเกาะกับเยื่อเมือกลำไส้หมู

5. การพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์ สารเคมีและอุปกรณ์

1. สารสังเคราะห์ไคโตซานและอนุพันธ์
2. ตะแกรงลวดละเอียด
3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 1,000 มิลลิลิตร
5. น้ำกลั่น
6. นาฬิกาจับเวลา
7. กระดาษทิชชู

วิธีการทดลอง

1. ชั่งสารสังเคราะห์โคโตซาน และอนุพันธ์ ตัวอย่างละ 0.1 กรัม บันทึกน้ำหนัก
2. เตรียมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
3. ชั่งตะแกรงลวด (โดยจุ่มในน้ำกลั่นและซับน้ำส่วนเกินออก) บันทึกน้ำหนักที่ได้
4. นำสารสังเคราะห์โคโตซาน และอนุพันธ์ใส่ในตะแกรงลวดบันทึกน้ำหนักสารเริ่มต้น
5. นำสารตัวอย่างที่ได้ในข้อ 4 จุ่มลงในน้ำกลั่นที่เวลา (t) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40 และ 60 นาที (ทุกเวลาที่กำหนดก่อนชั่งน้ำหนักสาร ต้องซับน้ำส่วนเกินออก บันทึกน้ำหนักที่ได้ ทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่างและหาค่าเฉลี่ย
6. นำผลค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองข้อ 4 มาบันทึกผลในตาราง

6. การย่อยสลายโดยเอนไซม์ lysozyme ของโคโตซานและอนุพันธ์⁽²²⁾

สารเคมีและอุปกรณ์

1. สารสังเคราะห์โคโตซานและอนุพันธ์
2. สารละลายเอนไซม์ lysozyme 500 มิลลิลิตร
3. ตะแกรงลวดละเอียด
4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 1,000 มิลลิลิตร
6. สารบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 5.53
7. นาฬิกาจับเวลา
8. กระดาษฟิชชู
9. pH meter

วิธีการเตรียมสารละลาย phosphate บัฟเฟอร์

ใช้สูตรของ Sorensen modified phosphate buffer

1. เตรียม Acid stock solution :	Sodium biphosphate, anh.	4.003 g.
	purified water, qs	500 ml.
Alkaline stock solution :	Sodium phosphate, anh	0.9473 g.
	purified water, qs	100 ml.

ที่ pH 5.53 ใช้ acid stock solution 450 ml และ alkaline stock solution above 50 ml ปรับ pH ด้วย alkaline stock solution จนได้ pH ใกล้เคียงหรือเท่ากับ pH 5.53

การเตรียมสารละลาย lysozyme

ชั่งสาร lysozyme 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร (stock solution concentration 10 mg/ml) จากนั้นนำมาเจือจางด้วย phosphate บัฟเฟอร์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml ร่อนนำไปทดสอบต่อไป (การเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)

วิธีการทดลอง

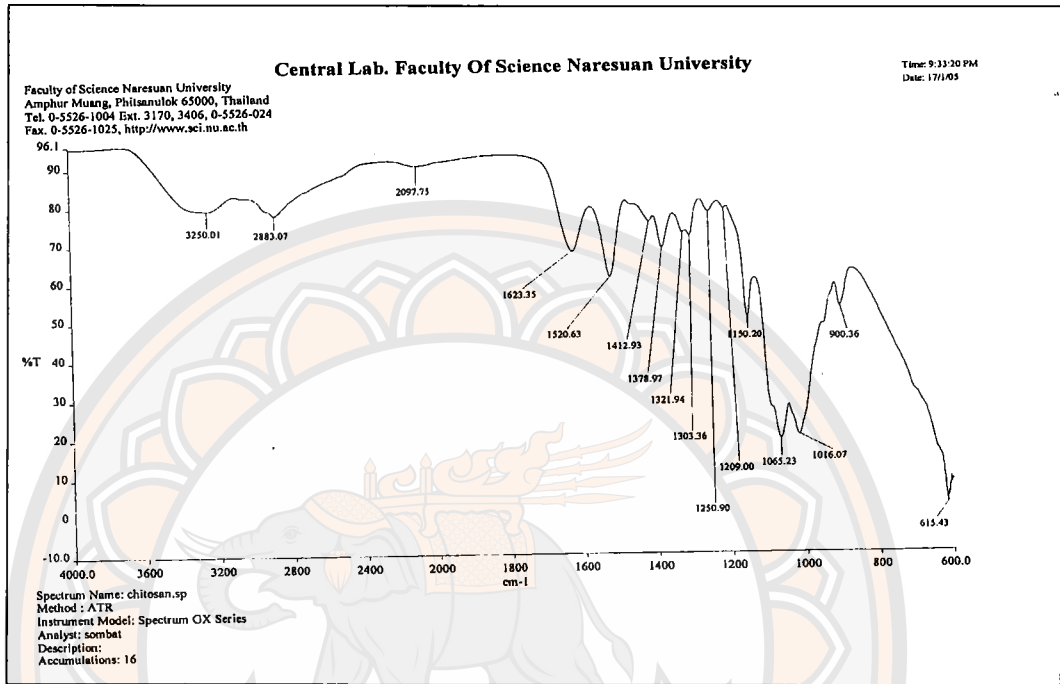
1. ชั่งสารสังเคราะห์โคโคซาน และอนุพันธ์ ตัวอย่างละ 0.05 กรัม บันทึกน้ำหนัก
2. แช่สารทดสอบลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จนสารมีการพองตัวเต็มที่เป็นเวลา 40 นาที
3. ชั่งตะแกรงลวด (โดยจุ่มในน้ำกลั่นและซับน้ำส่วนเกินออก) บันทึกน้ำหนักที่ได้
4. นำสารสังเคราะห์โคโคซาน และอนุพันธ์ใส่ในตะแกรงลวดบันทึกน้ำหนักสารเริ่มต้น
5. นำสารตัวอย่างที่ได้ในข้อ 4 จุ่มลงในสารละลายที่มีเอนไซม์ lysozyme ที่เวลา (t) 0, 5, 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที (ทุกเวลาที่กำหนดก่อนซึ่งน้ำหนักสาร ต้องซับน้ำส่วนเกินออก บันทึกน้ำหนักที่ได้ ทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่างและหาค่าเฉลี่ย)
6. นำผลค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองข้อ 5 มาบันทึกผลในตาราง



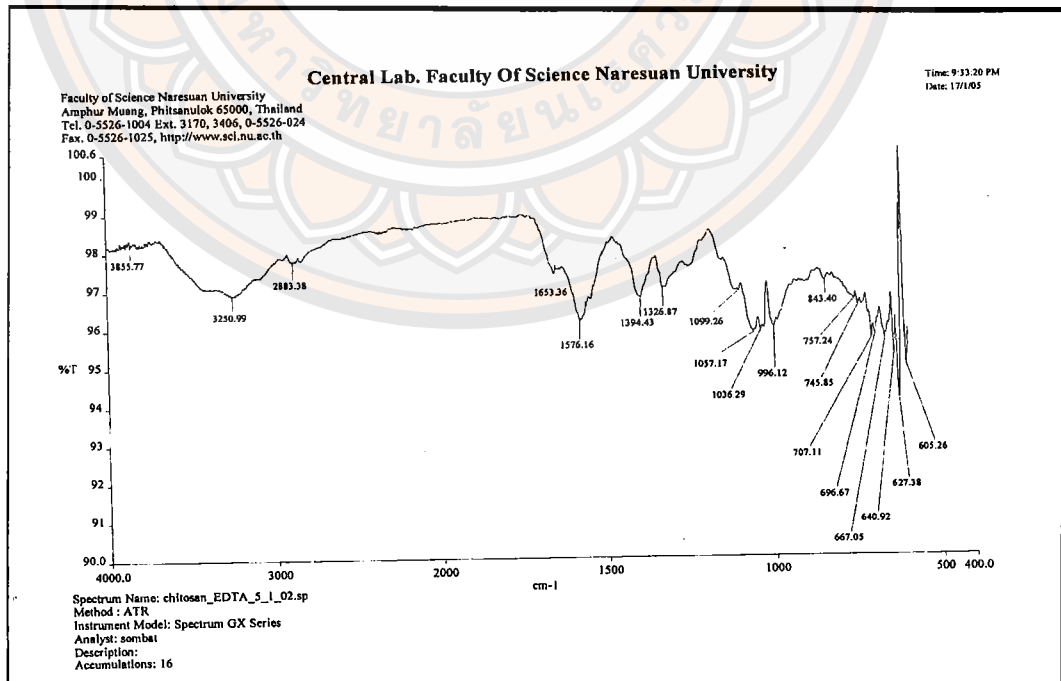
บทที่ 4

รายงานผลและอภิปรายผลการศึกษา

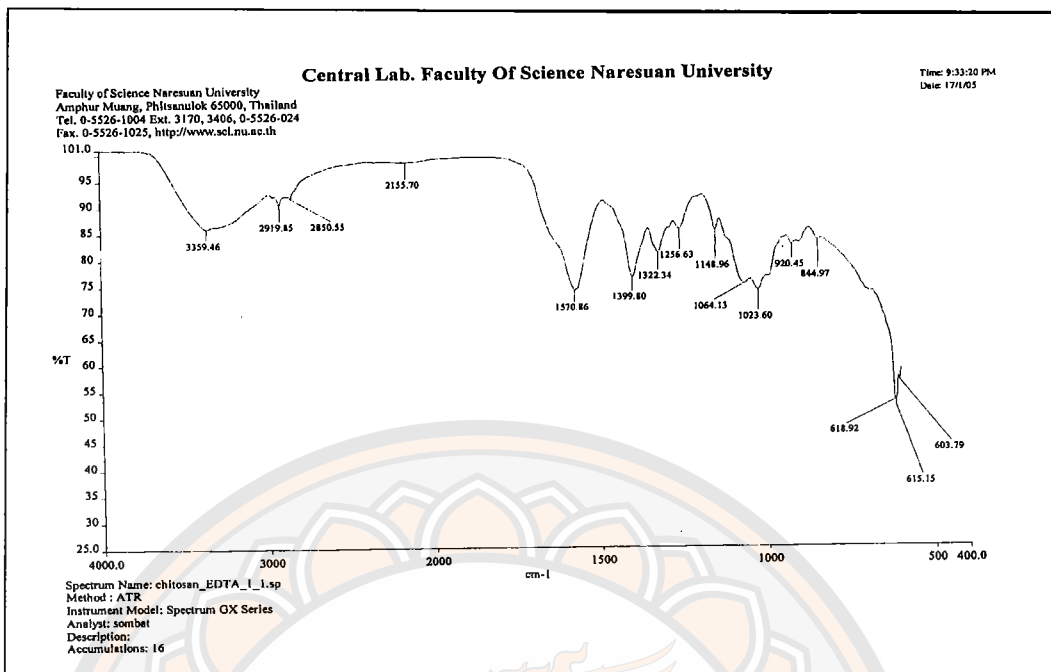
1. การตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด (FTIR)



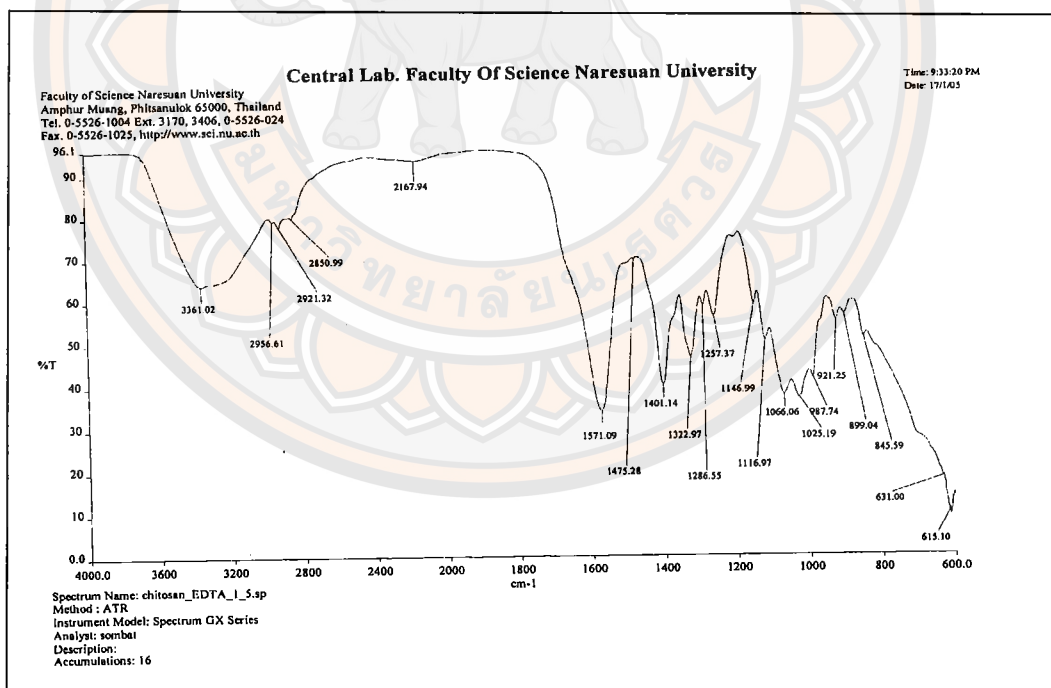
รูปที่ 4-1 IR spectrum of chitosan



รูปที่ 4-2 IR spectrum of chitosan-EDTA 5:1



รูปที่ 4-3 IR spectrum of chitosan-EDTA 1:1



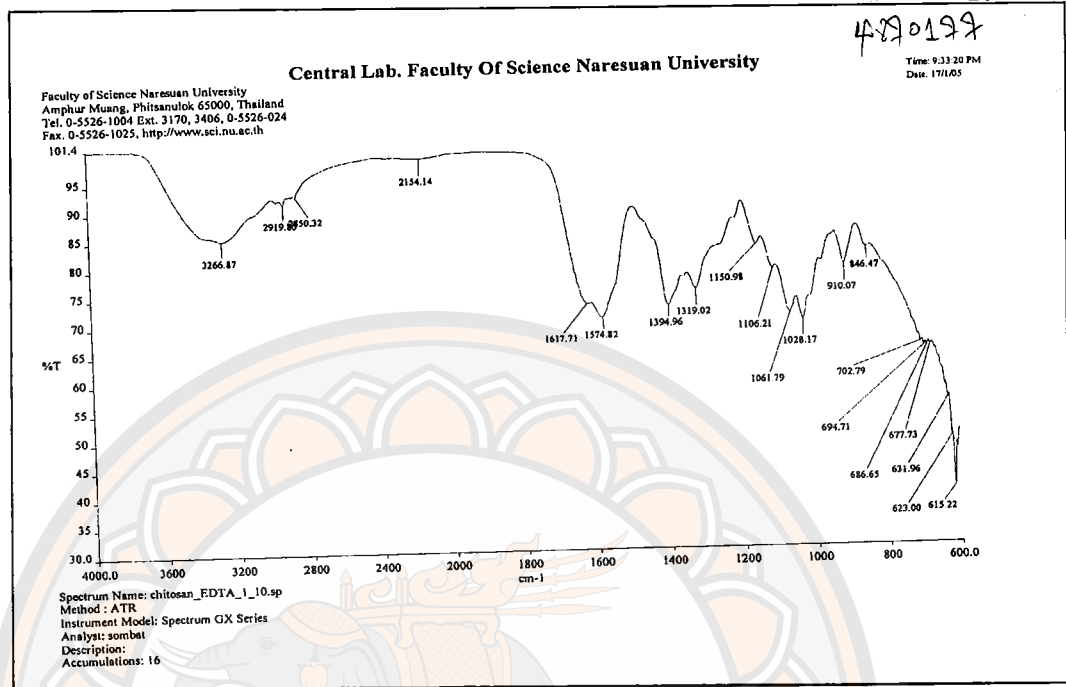
รูปที่ 4-4 IR spectrum of chitosan-EDTA 1:5



สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

26 กค. 2548

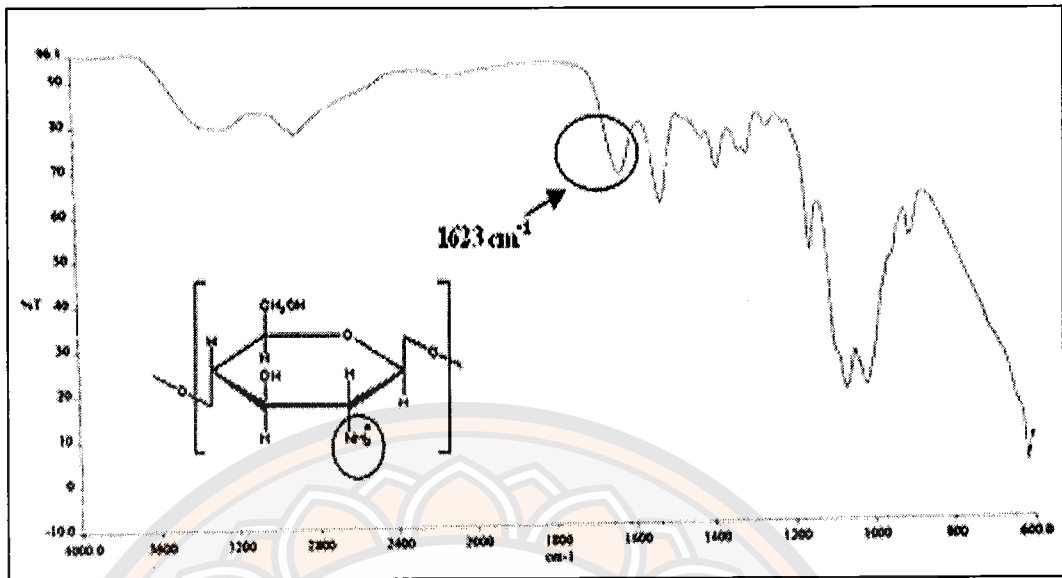
4780199



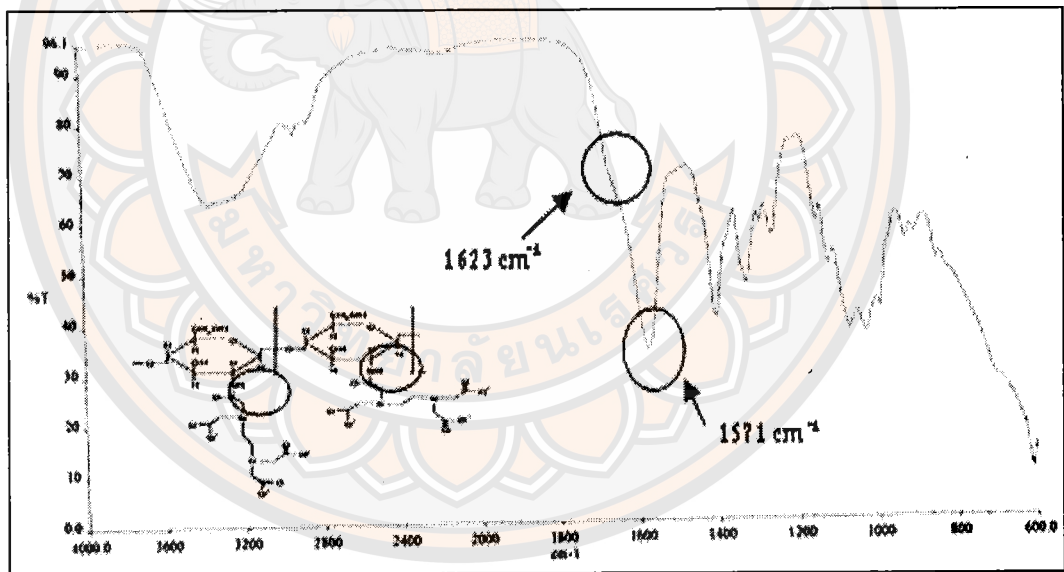
รูปที่4-5 IR spectrum of chitosan-EDTA 1:20

ผลการทดลอง

การตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด (FTIR) เป็นการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของของ ไคโตซาน และอนุพันธ์ ที่สังเคราะห์ได้ในอัตราส่วนต่างๆ ผลการทดลองพบว่า การตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด ของไคโตซานเกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1623 ซม.⁻¹ ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่อะมิโน^(25, 26) ส่วนการศึกษการตรวจวัดโดยแสงอินฟราเรด ของอนุพันธ์ของ chitosan-EDTA พบว่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 1623 ซม.⁻¹ นี้ไม่ค่อยชัดเจน และเกิดการดูดกลืนแสงขึ้นใหม่ที่ 1571 ซม.⁻¹ (ดังรูปที่ 4-6, 4-7) ซึ่งคาดว่าเป็นตำแหน่งของ N-H bending ของพันธะเอไมด์ ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ อะมิโนของไคโตซานและ หมู่คาร์บอกซิลิก ของ EDTA⁽²⁶⁾ แต่อนุพันธ์ chitosan-EDTA อัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้นให้กราฟการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4-6 อธิบายผล FTIR ของ ไคโตซาน

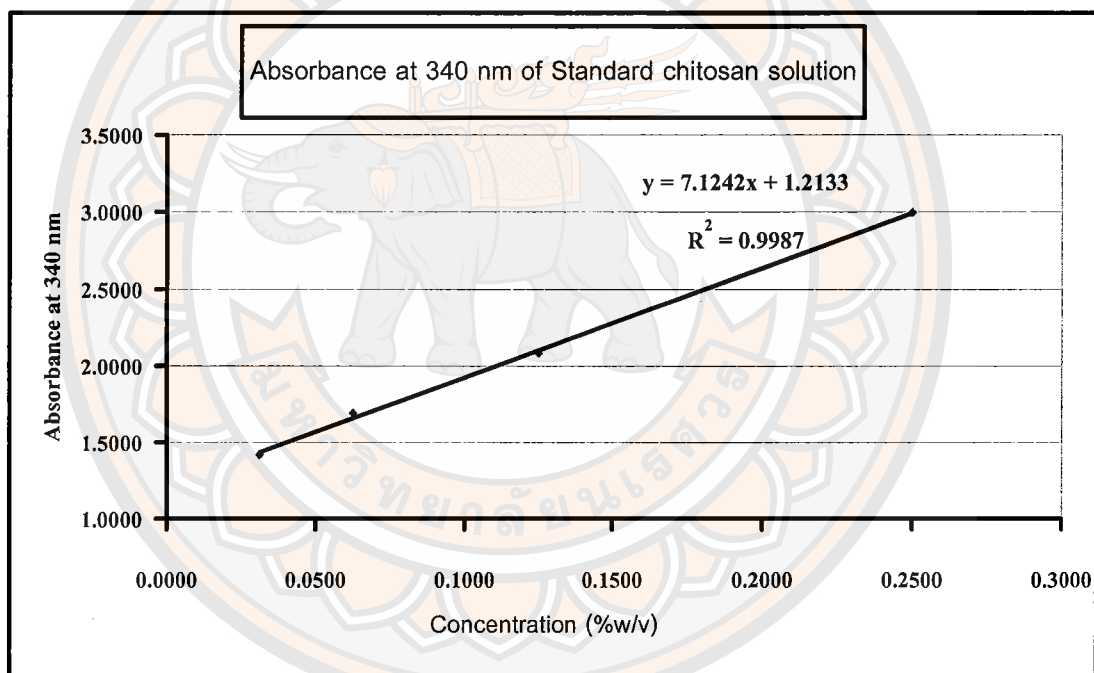


รูปที่ 4-7 อธิบายผล FTIR ของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

2. ผลการทดสอบ Degree of modified primary amino group on chitosan derivative

ตารางที่ 4-1 การดูดกลืนแสงของ chitosan standard dilution

Absorbance (at 340 nm)	Concentration of Chitosan (% w/v)			
	0.03125	0.0625	0.125	0.25
Replication 1	1.4110	1.6870	2.0570	2.963
Replication 2	1.4330	1.7130	2.0710	2.977
Replication 3	1.4120	1.6750	2.1250	3.054
Average	1.4187	1.6917	2.0843	2.998

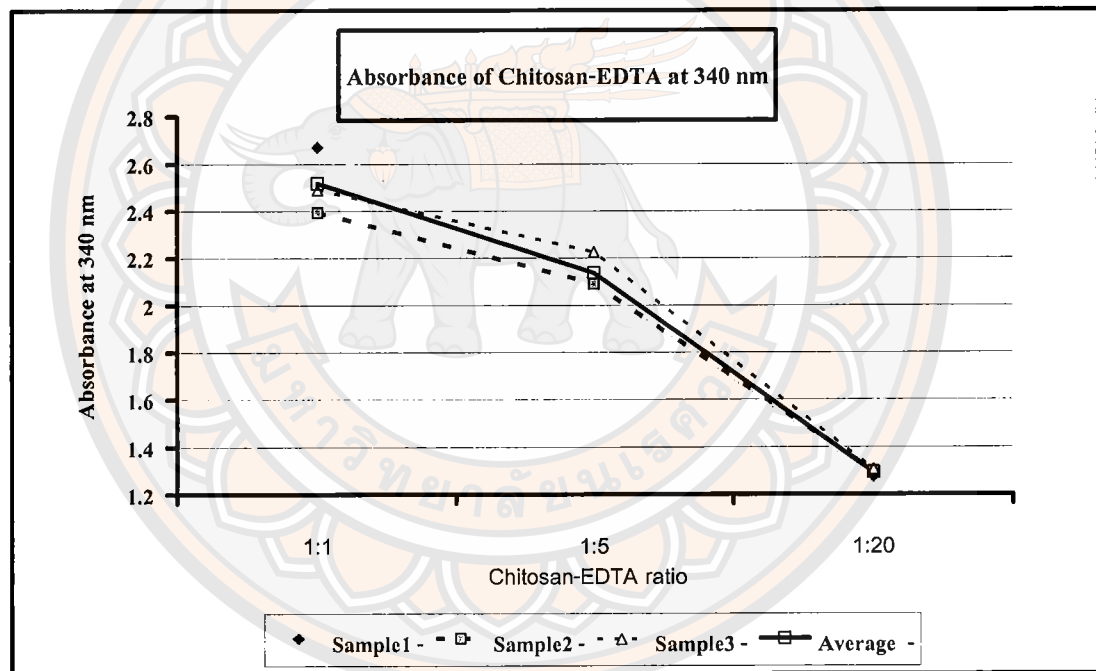


รูปที่ 4-8 Calibration curve ของ Standard solution

ตารางที่ 4-2 การดูดกลืนแสงของ chitosan-EDTA

Absorbance at 340 nm of Chitosan-EDTA				
Sample	Chitosan : EDTA ratio			
	5:1	1:1	1:5	1:20
Sample1	-	2.67	2.094	1.275
Sample2	-	2.394	2.091	1.299
Sample3	-	2.49	2.226	1.306
Average	-	2.518	2.137	1.29333

*ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากสารไม่ละลายในน้ำ



รูปที่ 4-9 กราฟแสดงการการดูดกลืนแสงของ chitosan-EDTA อัตราส่วนต่างๆ

การคำนวณร้อยละของการทำปฏิกิริยาระหว่าง chitosan กับ EDTA

Ab_{STD}	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเท่ากับสารละลายตัวอย่าง
Ab_{SAM}	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
% sample	คือ	ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (% w/v)
A และ B	คือ	ค่าที่ได้จากสมการ linear regression ของ Standard curve $Y = AX + B ; y = 7.1242x + 1.2133$
% Sample	คือ	ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

สูตรคำนวณ

$$\% \text{ sample} = 0.4\% \text{ (w/v)}$$

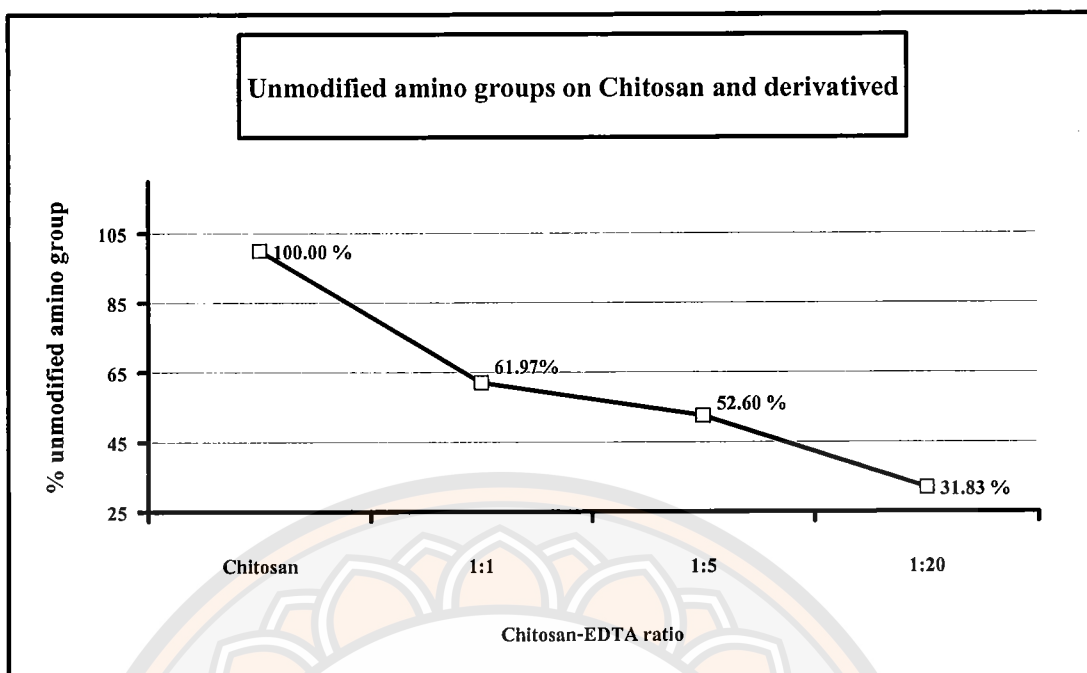
$$Ab_{STD} = 0.4 \times 7.1242 + 1.2133$$

$$\% \text{ Unmodified amino} = \frac{100Ab_{SAM}}{(\%w/v \text{ sample} \times A) + B}$$

ตารางที่ 4-3 ร้อยละของหมู่ amino ที่ไม่ถูกแทนที่ ด้วย EDTA

Chitosan- EDTA Ratio	Absorbance At 340 nm	Ab. Standard ที่ความ เข้มข้นเท่า sample	% Unmodified	% modified
Chitosan	4.06298	4.06298	100	0
5:1*	-	-	-	-
1:1	2.51800	4.06298	61.97	38.03
1:5	2.13700	4.06298	52.60	47.40
1:20	1.29333	4.06298	31.83	68.17

*ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากสารไม่ละลายในน้ำ



รูปที่ 4-10 กราฟแสดงร้อยละของหมู่ amino acid ที่ไม่ถูกแทนที่ โดย EDTA

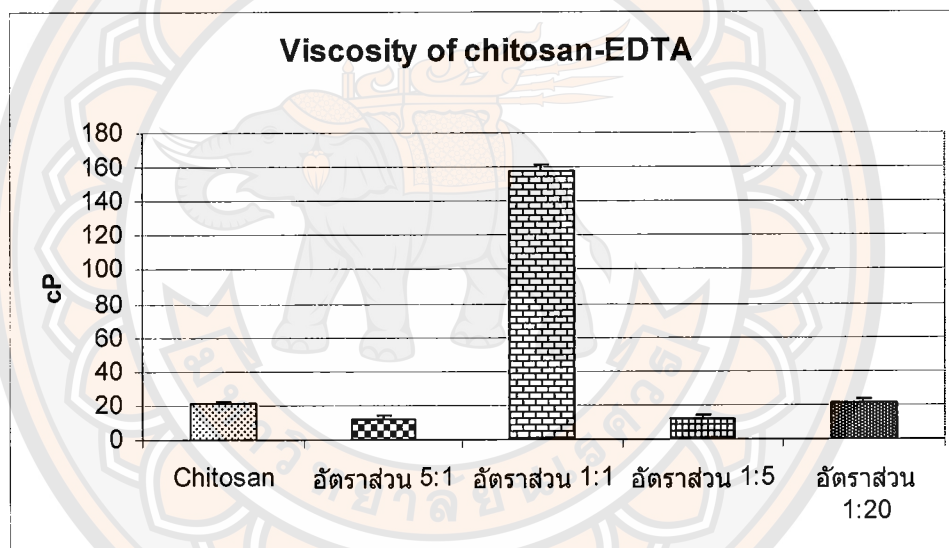
ผลการทดสอบ Degree of modified primary amino group on chitosan derivative

จัดระดับการทำปฏิกิริยาระหว่าง ไคโตซาน และ EDTA โดยการวัดหมู่ primary amino ใน ไคโตซาน โพลีเมอร์ โดยใช้ 2, 4, 6 - trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) reagent แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ค่าที่ได้สามารถนำมาคำนวณหมู่ primary amino ที่อยู่ในไคโตซานโพลีเมอร์ ได้ การเข้าทำปฏิกิริยาของ EDTA กับ ไคโตซาน เกิดจากการสร้างพันธะ amide bond ระหว่าง หมู่ primary amino ของ ไคโตซานโพลีเมอร์ กับ หมู่ carboxyl group ของ EDTA ทำให้ primary amino ของ ไคโตซานโพลีเมอร์ ในตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากับ EDTA หายไป ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเทียบกับ calibration curve เพื่อคำนวณหา Degree of modification พบว่า อนุพันธ์ ไคโตซานที่มีอัตราส่วนของ EDTA สูงขึ้นจะมี degree of modification สูงขึ้นด้วย ซึ่งแปรผกผันกับค่า ร้อยละของหมู่ primary amino ที่ไม่ถูกเข้าทำปฏิกิริยา (% unmodified amino group) ซึ่งมีค่าลดลงเมื่ออัตราส่วน EDTA ที่สูงขึ้น คือ Chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:1 ค่าร้อยละของหมู่ primary amino ที่ไม่ถูกเข้าทำปฏิกิริยา เป็นร้อยละ 61.97 ส่วน อัตราส่วน 1:5 และ 1:20 เป็น ร้อยละ 52.60 และ 31.83 ตามลำดับ ส่วนอัตราส่วน 5:1 นั้นไม่ได้ทำการทดสอบ เนื่องจากการละลายของสารเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

3. ผลการวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

ตารางที่ 4-4 ผลการวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

สาร	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	Average	S.D.
Chitosan	20.00	22.00	21.00	1.41
อัตราส่วน 5:1	10.00	13.00	11.50	2.12
อัตราส่วน 1:1	160.00	155.00	157.50	3.54
อัตราส่วน 1:5	10.00	13.00	11.50	2.12
อัตราส่วน 1:20	20.00	23.00	21.50	2.12



รูปที่ 4-11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

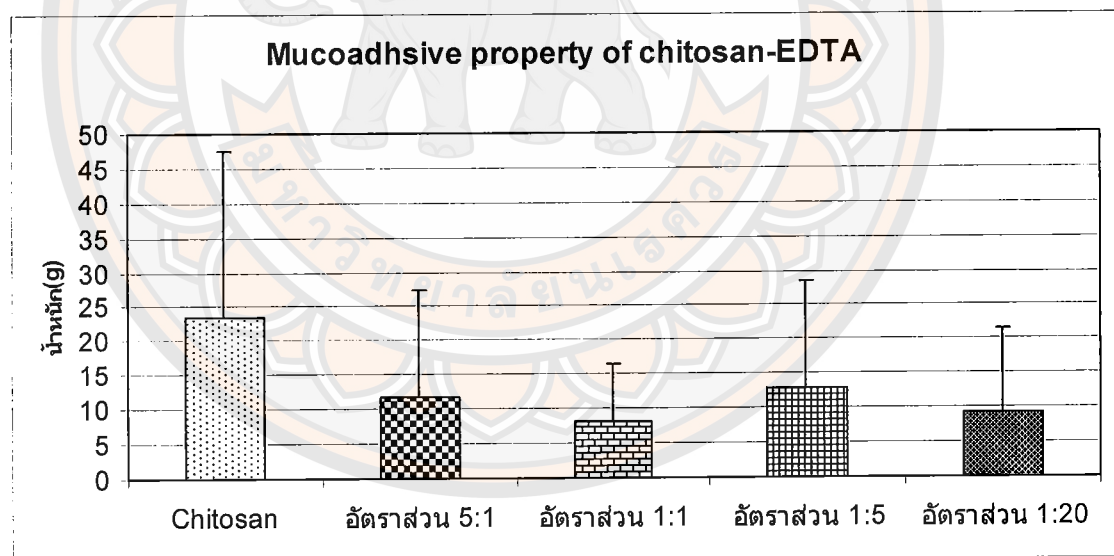
จากการทดลองการวัดความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA ด้วยเครื่อง Brookfield viscometer พบว่า อนุพันธ์ chitosan-EDTA ทุกอัตราส่วนมีความหนืดแตกต่างจากไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้นอัตราส่วน 1:20 มีความหนืดเท่ากับไคโตซาน พบว่าอัตราส่วน 1:1 มีความหนืดสูงกว่าไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งความหนืดไม่แปรผันตามอัตราส่วนของ EDTA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแนวโน้มความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA น่าจะมีความหนืดน้อยกว่าไคโตซานแต่อัตราส่วน 1:1 มีความหนืดสูงกว่าไคโตซานซึ่งเป็นไปได้ว่าอนุพันธ์ chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:1 เกิดการ crosslink ระหว่างหมู่ NH_2 ของไคโตซานและหมู่ COOH ของ EDTA จึงทำให้มีความหนืดสูงแตกต่างจากไคโตซานและอนุพันธ์อัตราส่วนอื่นๆ แต่การที่ความหนืดของอนุพันธ์ chitosan-EDTA ไม่แปรผันตามอัตราส่วนของ EDTA ที่เพิ่มขึ้น อาจเกิดเนื่องมาจาก

ปัจจัยต่างๆ ของโพลีเมอร์ ได้แก่ การพองตัวไม่เต็มที่ของโพลีเมอร์หรือการที่สายโพลีเมอร์สั้นยาวแตกต่างกัน และอาจมีการเกิด interaction ระหว่างสายโพลีเมอร์ทำให้ความหนืดที่วัดได้ไม่แปรผันตามอัตราส่วนของ EDTA ซึ่งต้องทำการควบคุม ความชื้น ขนาดของสายโพลีเมอร์ ในการวัดความหนืดด้วย

4. ผลการวัดการยึดติดกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

ตารางที่ 4-5 ผลการวัดการยึดติดกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

สาร	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	Average	S.D.
Chitosan	25.3	22.38	24.15	25.16	23.45	24.088	1.22
อัตราส่วน 5:1	21.22	15.08	19.20	10.28	11.82	15.52	4.67
อัตราส่วน 1:1	11.25	7.00	7.25	7.98	8.09	8.314	1.71
อัตราส่วน 1:5	13.81	21.14	16.13	15.81	12.71	15.92	3.24
อัตราส่วน 1:20	15.87	12.29	12.62	11.51	9.29	12.316	2.37



รูปที่ 4-12 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยึดติดกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

จากการทดลองการยึดติดกับเยื่อเมือกพบว่า อนุพันธ์ของ chitosan-EDTA ทุกอัตราส่วนมีการยึดติดกับเยื่อเมือกแตกต่างจากโคไคซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อนุพันธ์ chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:1 มีการยึดติดกับเยื่อเมือกน้อยกว่าอัตราส่วน 5:1 และ 1:20 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งการยึดติดกับเยื่อเมือกนั้นขึ้นอยู่กับ 1. แรงดึงดูดระหว่างประจุของอนุพันธ์กับเยื่อเมือก 2. การพองตัวหรือความชอบน้ำของโพลีเมอร์ 3. ความยืดหยุ่นของโพลีเมอร์แรง 4. vander waals interaction และหรือ hydrogen bond ซึ่งเกิดขึ้นระหว่าง

โพลีเมอร์กับเยื่อเมือกกล้วยไม้ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการยึดติดของโพลีเมอร์กับเยื่อเมือกกล้วยไม้ เนื่องจากการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานกับ EDTA น่าจะทำให้ความเป็นประจุบวกของ ไคโตซานลดลง จึงทำให้การยึดติดน่าจะลดลงด้วย ซึ่งจากการทดลองพบว่า การเพิ่มจำนวนของ EDTA ในโมเลกุลของไคโตซานนั้น ทำให้คุณสมบัติการยึดติดของโพลีเมอร์ลดลง แต่การลดลงของความหนืดของโพลีเมอร์ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนของ EDTA ที่เพิ่มขึ้นซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น มีส่วนทำให้การยึดติดกับเยื่อเมือกกล้วยไม้แปรผันไป

5. ผลการพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์

ตารางที่ 4-6 ผลการพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์อัตราส่วน 1:1

Time (minute)	Weight (gram)							
	chitosan	chitosan	Average	S.D.	1 : 1	1 : 1	Average	S.D.
0	0.0990	0.1005	0.0997	0.0009	0.0973	0.1191	0.1082	0.0154
2	0.9469	0.9854	0.9660	0.0277	0.2200	0.1480	0.1840	0.0509
4	0.7500	0.8720	0.8110	0.0863	0.2700	0.5080	0.3890	0.1683
6	0.5818	0.6540	0.6170	0.0510	0.2500	0.5830	0.4165	0.2354
8	-	0.2100	-	-	0.2800	0.4727	0.3764	0.1363
10	-	-	-	-	0.3100	0.5920	0.4510	0.1994
12	-	-	-	-	0.2900	0.5622	0.4261	0.1925
14	-	-	-	-	0.3600	0.8428	0.6010	0.3410
16	-	-	-	-	0.4400	0.7795	0.6090	0.2400
18	-	-	-	-	0.4200	0.6806	0.5500	0.1840
20	-	-	-	-	0.3900	0.0645	0.5200	0.1802
30	-	-	-	-	0.3320	0.6602	0.4461	0.2320
40	-	-	-	-	0.3300	0.5899	0.4590	0.1834
50	-	-	-	-	0.2900	0.4242	0.3571	0.0948
60	-	-	-	-	0.2900	0.3440	0.3170	0.0381

ตารางที่ 4-7 ผลการพองตัวของอนุพันธ์โคโตซานอัตราส่วน 1:5 และ 5:1

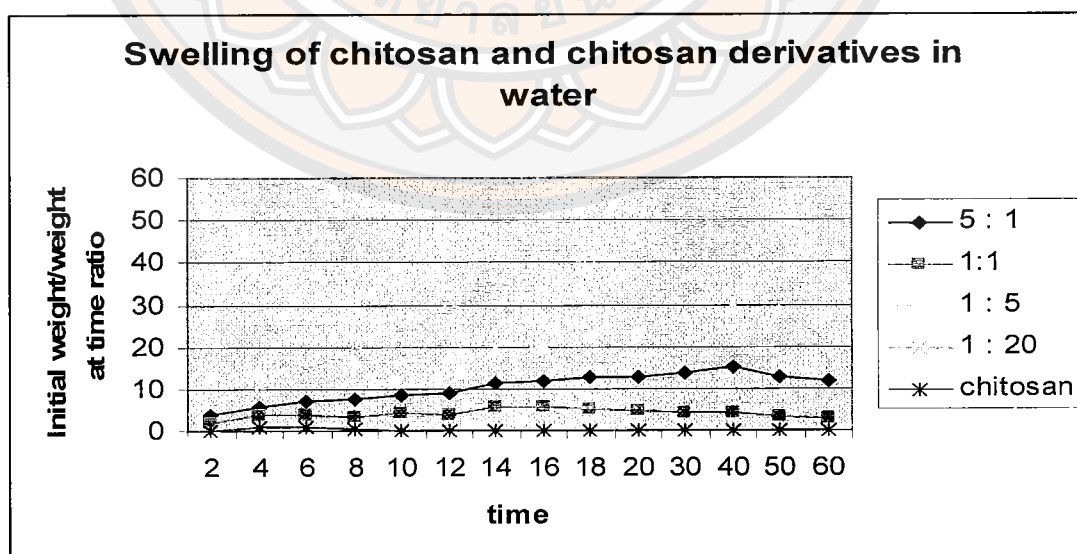
Time (minute)	Weight (gram)							
	1 : 5	1 : 5	Average	S.D.	5: 1	5 : 1	Average	S.D.
0	0.1002	0.1009	0.1005	0.0005	0.1079	0.1012	0.1045	0.0047
2	1.3820	1.2350	1.3085	0.1039	0.6000	0.1548	0.3774	0.3148
4	1.5616	1.3130	1.4365	0.1746	0.6700	0.5040	0.5870	0.1170
6	1.5306	1.5000	1.5150	0.0212	0.8360	0.6733	0.7546	0.1150
8	1.7715	1.6010	1.6855	0.1195	0.9880	0.6191	0.8035	0.2608
10	1.6723	1.6130	1.6415	0.0403	1.0700	0.7510	0.9100	0.2256
12	1.7622	1.7140	1.7370	0.0325	1.1100	0.8150	0.9625	0.2085
14	1.8100	1.9560	1.8780	0.1103	1.5000	0.8650	1.1825	0.4490
16	1.8305	2.1284	1.9792	0.2110	1.5701	0.8814	1.2257	0.4867
18	2.1230	2.3993	2.2596	0.1979	1.4600	1.2500	1.3550	0.1484
20	2.3120	2.4940	2.3970	0.1344	1.5000	1.2127	1.3550	0.2050
30	2.4220	3.1479	2.7739	1.0630	1.6000	1.2306	1.4150	0.2616
40	2.4180	3.5033	2.9566	0.7730	1.6703	1.5060	1.5850	0.1200
50	2.5300	3.1320	2.8310	0.4257	1.6300	1.0340	1.3320	0.4214
60	2.4706	3.1298	2.8002	0.4661	1.5801	0.9280	1.2540	0.4610

ตารางที่ 4-8 ผลการพองตัวของอนุพันธ์โคโตซานอัตราส่วน 1:20

Time (minute)	Weight (gram)				Time (minute)	Weight (gram)			
	1:20	1: 20	Average	S.D.		1:20	1: 20	Average	S.D.
0	0.0994	0.1004	0.0099	0.0007	16	4.4800	2.9830	3.7315	1.0580
2	0.5200	0.7227	0.6213	0.1433	18	4.4900	3.2786	4.1090	1.1750
4	0.9280	0.9831	0.9555	0.0389	20	4.8200	3.7820	4.3000	0.7339
6	1.6900	1.2457	1.4678	0.3141	30	4.7910	4.7290	4.7600	0.0438
8	2.2500	1.6279	1.9389	0.4398	40	4.8310	5.7060	5.2680	0.6187
10	2.8600	1.9631	2.4110	0.6342	50	4.8250	5.5950	5.4000	0.5444
12	3.5300	2.1900	2.8600	0.9470	60	4.8000	5.5420	5.1710	0.5246
14	4.3400	2.4390	3.3895	1.3440	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4-9 ผลการพองตัวของไคโตซานและอนุพันธ์

อัตราการพองตัวที่เวลา (นาที)	5:01	1:01	1:05	1:20	chitosan
2	3.61	1.7	13.02	6.22	0.09
4	5.62	3.6	14.29	9.56	0.96
6	7.22	3.85	15.07	14.69	0.81
8	7.69	3.48	16.77	19.41	0.62
10	8.71	4.17	16.33	24.13	-
12	9.21	3.94	17.28	28.63	-
14	11.32	5.55	18.69	33.93	-
16	11.73	5.63	19.69	37.35	-
18	12.97	5.08	22.48	41.13	-
20	12.97	4.81	23.85	43.04	-
30	13.54	4.12	27.6	47.65	-
40	15.17	4.24	29.42	52.73	-
50	12.75	3.3	28.17	52.15	-
60	12	2.93	27.86	51.76	-



รูปที่ 4-13 คุณสมบัติการพองตัวของอนุพันธ์ chitosan-EDTA

ผลการทดลองพบว่าสารไคโตซานและอนุพันธ์ สามารถพองตัวได้ในน้ำกลั่นที่เวลาเริ่มต้นเดียวกัน ($t = 1$ นาที) สารไคโตซานสามารถพองตัวได้สูงสุดที่เวลา 1 นาที และเริ่มสลายตัวที่เวลาผ่านไป 2 นาที สลายตัวสมบูรณ์ที่เวลาประมาณ 10 นาที ส่วนสารสังเคราะห์ chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:1, 1:5, 5:1, 1:20 ได้ผลการทดลองดังนี้

1. อัตราส่วน chitosan-EDTA (1:1) สามารถพองตัวได้สูงสุด ที่เวลา 40 นาที ปริมาณน้ำหนักที่ซึ่งได้เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 4 เท่าและน้ำหนักเริ่มลดลงที่เวลา 60 นาที
2. อัตราส่วน chitosan-EDTA (1:5) สามารถพองตัวได้สูงสุด ที่เวลา 40 นาที ปริมาณน้ำหนักที่ซึ่งได้เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 29 เท่าและน้ำหนักและเริ่มลดลงที่เวลา 60 นาที
3. อัตราส่วน chitosan-EDTA (5:1) สามารถพองตัวได้สูงสุด ที่เวลา 40 นาที ปริมาณน้ำหนักที่ซึ่งได้เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 13 เท่าและน้ำหนักและเริ่มลดลงที่เวลา 60 นาที
4. อัตราส่วน chitosan-EDTA (1:20) สามารถพองตัวได้สูงสุด ที่เวลา 40 นาที ปริมาณน้ำหนักที่ซึ่งได้เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 53 เท่าและน้ำหนักและเริ่มลดลงที่เวลา 60 นาที

คุณสมบัติการพองตัวของไคโตซานพบว่า ไคโตซานสามารถพองตัวได้ตั้งแต่แรกที่สัมผัสกับน้ำและละลายหมดในเวลาที่ 10 อนุพันธ์ของไคโตซานอัตราส่วน 1:20 มีความสามารถในการพองตัวมากกว่าอนุพันธ์ chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:5, 1:5 และ 1:1 โดยวัดจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 53 เท่า อัตราส่วน 1:5 เท่ากับ 29 เท่า อัตราส่วน 5:1 เท่ากับ 13 เท่า และอัตราส่วน 1:1 เท่ากับ 4 เท่า ตามลำดับ จากคุณสมบัติที่พบในการทดสอบคุณสมบัติการบวมตัวของอนุพันธ์สารสังเคราะห์คาดว่าปฏิกิริยาที่เกิดการ crosslink ระหว่างไคโตซานและสาร EDTA ทำให้เกิดร่างแหและช่องว่างขึ้นในโมเลกุล เนื่องจากลักษณะเฉพาะตัวของโครงสร้าง EDTA ทำให้เกิดช่องว่างขึ้นร่วมกับความเป็นประจุลบของสาร EDTA ภายในโมเลกุลทำให้สามารถเก็บกักน้ำไว้ในโมเลกุลได้เพิ่มขึ้น ดังนั้นอัตราส่วนที่สารไคโตซานทำปฏิกิริยา crosslink กับสาร EDTA ได้มาก คุณสมบัติการพองตัวจึงมาก

6. ผลการทดลองคุณสมบัติการย่อยสลายโดยเอนไซม์ lysozyme

ตารางที่ 4-10 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 5:1 โดยเอนไซม์ lysozyme

Chitosan : EDTA	Weight (gram)							
	initial weight	Swell 40 min	5	10	15	30	45	60
5 : 1	0.0511	0.1783	0.1440	0.1241	0.1030	0.1020	0.0829	0.0733
5 : 1	0.0501	0.1834	0.1030	0.0714	0.0838	0.0780	0.0816	0.0841
Average	0.0500	0.1800	0.1260	0.0977	0.0934	0.0900	0.0822	0.0787
Percentage	-	-	70	54.2777	51.8888	50.0000	45.6666	43.7222
S.D.	0.0090	0.0036	0.0325	0.0372	0.0136	0.0169	0.0009	0.0076
5 : 1 (buffer pH 5.3)	0.0512	0.2642	0.2065	0.2050	0.2127	0.2399	0.2056	0.2100
Percentage	-	-	78.1604	77.5927	80.5071	90.8024	77.8198	79.4852

ตารางที่ 4-11 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:1 โดยเอนไซม์ lysozyme

Chitosan : EDTA	Weight (gram)							
	initial of weight	swell 40 min	5	10	15	30	45	60
1: 1	0.0500	0.2800	0.1866	0.1810	0.1545	0.1460	0.1070	0.1050
1: 1	0.0501	0.4220	0.4833	0.4433	0.4131	0.4101	0.4098	0.4075
Average	0.0500	0.3510	0.3349	0.3121	0.2838	0.2780	0.2584	0.2562
Percentage	-	-	95.41311	88.9173	80.8547	79.2022	73.6182	72.9914
S.D.	0.0001	0.1004	0.2090	0.1850	0.1828	0.1867	0.2141	0.2138
1: 1 (buffer pH 5.3)	0.0524	0.8628	0.7061	0.5180	0.7753	0.7234	0.9080	0.9357
Percentage	-	-	81.8382	60.03709	89.8586	83.8433	105.2388	108.4492

ตารางที่ 4-12 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:5 โดยเอนไซม์ lysozyme

Chitosan : EDTA	Weight (gram)							
	initial weight	Swell 40 min	5	10	15	30	45	60
1: 5	0.0515	0.1828	0.1166	0.1108	0.0792	0.7040	0.0651	0.0601
1: 5	0.0510	0.1244	0.0366	0.0366	0.0222	0.0128	0.0071	0.0054
Average	0.0512	0.1536	0.0766	0.0737	0.0507	0.0416	0.0361	0.0328
Percentage	-	-	49.86979	47.98177	33.00781	27.08333	23.5026	21.32161
S.D.	0.0003	0.0412	0.0566	0.0524	0.0403	0.0407	0.0410	0.0387
1: 5 (buffer pH 5.3)	0.0505	0.2620	0.1744	0.1253	0.1598	0.1743	0.1709	0.1217
Percentage	-	-	66.56489	47.82443	60.99237	66.52672	65.22901	46.45038

ตารางที่ 4-13 การย่อยสลายอนุพันธ์ไคโตซานอัตราส่วน 1:20 โดยเอนไซม์ lysozyme

Chitosan : EDTA	Weight (gram)							
	initial weight	swell 40 min	5	10	15	30	45	60
1: 20	0.0500	0.2808	0.1163	0.0665	0.0557	0.0464	0.0469	0.0468
1: 20	0.0508	0.1616	0.0890	0.0870	0.0511	0.0748	0.0240	0.0125
Average	0.0504	0.2212	0.1026	0.0767	0.0534	0.0606	0.0355	0.0296
Percentage	-	-	46.3833	34.6745	24.1410	27.3960	16.0262	13.3815
S.D.	0.0006	0.0842	0.0193	0.0145	0.0033	0.0200	0.0162	0.0242
1: 20 (buffer pH 5.3)	0.0501	0.3396	0.1480	0.1511	0.1464	0.1265	0.0854	0.0876
Percentage	-	-	43.5806	44.4935	43.1095	37.2497	25.1472	25.7950

ตารางที่ 4-14 การย่อยสลายไคโตซาน โดยเอนไซม์ lysozyme

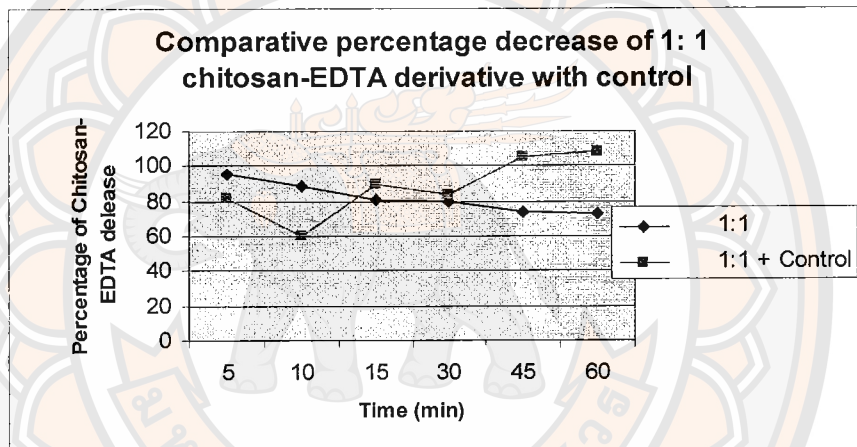
Sample	Weight (gram)							
	initial of weight	swell 40 min	5	10	15	30	45	60
Chitosan	0.0511	-	0.0434	-	-	-	-	-
chitosan	0.0514	-	0.0156	-	-	-	-	-
Average	0.05125	-	0.0295	-	-	-	-	-
Percentage	-	-	57.5609	-	-	-	-	-
S.D.	0.0002	-	0.0196	-	-	-	-	-
Chitosan (buffer pH 5.3)	0.0514	-	0.0317	-	-	-	-	-
Percentage	-	-	61.6731	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4-15 ร้อยละการย่อยสลายไคโตซานและอนุพันธ์ โดยเอนไซม์ lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม

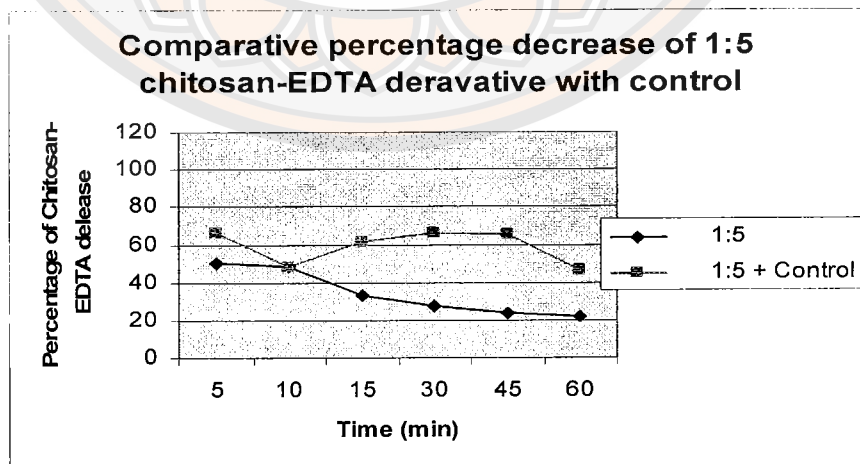
Sample	Percentage degradation by lysozyme					
	5	10	15	30	45	60
Chitosan	57.56	-	-	-	-	-
Chitosan + Control	61.67	-	-	-	-	-
5:1	70.00	54.28	51.89	50.00	45.67	43.72
5:1 + Control	78.16	77.59	80.51	90.80	77.82	79.48
1:1	95.41	88.92	80.85	79.20	73.62	72.99
1:1 + Control	81.84	60.04	89.86	83.84	105.24	108.45
1:5	49.87	47.98	33.01	27.28	23.50	21.32
1:5 + Control	66.56	47.82	60.99	66.53	65.23	46.45
1:20	46.38	34.67	24.14	27.40	16.03	13.38
1:20 + Control	43.58	44.49	43.11	37.25	25.15	25.80

ตารางที่ 4-16 ร้อยละการย่อยสลายโคไโตซานและอนุพันธ์ โดยเอนไซม์ lysozyme

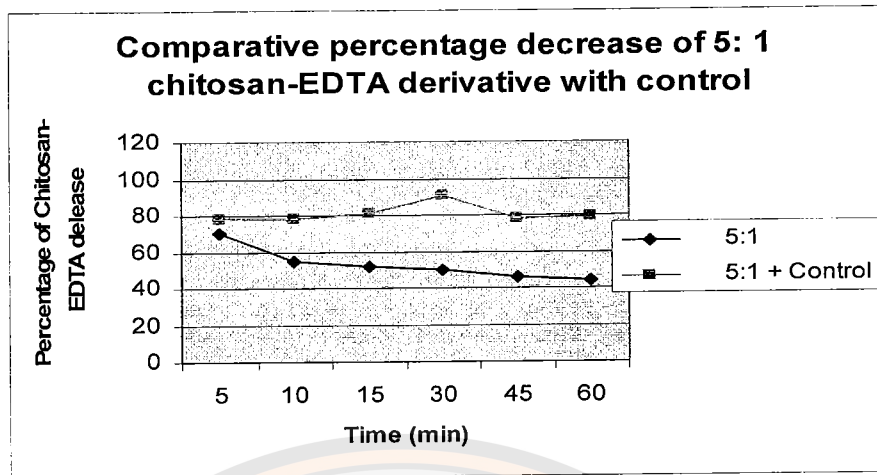
Sample	Percentage degradation by lysozyme					
Time (min)	5	10	15	30	45	60
Chitosan	57.56	-	-	-	-	-
5:1	70.00	54.28	51.89	50.00	45.67	43.72
1:1	95.41	88.92	80.85	79.20	73.62	72.99
1:5	49.87	47.98	33.01	27.28	23.50	21.32
1:20	46.38	34.67	24.14	27.40	16.03	13.38



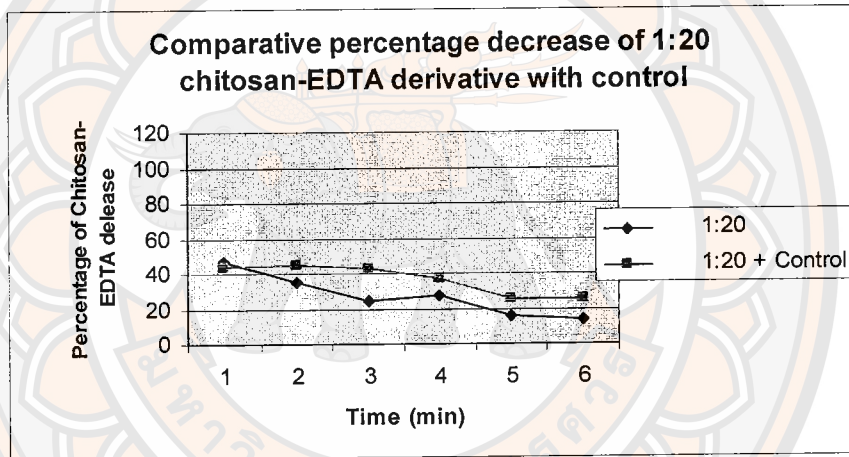
รูปที่ 4-14 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 1:1 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม



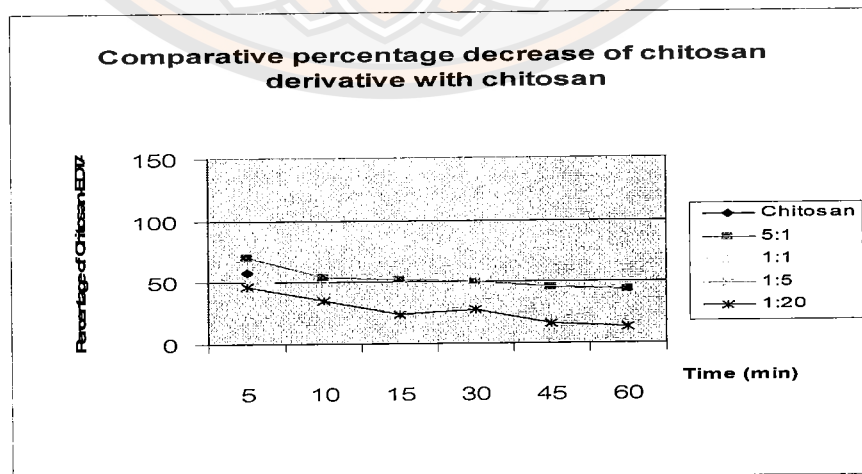
รูปที่ 4-15 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 1:5 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4-16 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 5:1 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4-17 การย่อยสลายอนุพันธ์อัตราส่วน 1:20 โดย lysozyme เทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4-18 เปรียบเทียบการย่อยสลายไคโตซานและอนุพันธ์โดยเอนไซม์ lysozyme

การย่อยสลายไคโตซานและอนุพันธ์โดยเอนไซม์ lysozyme สารไคโตซานและอนุพันธ์สังเคราะห์ทั้งหมดสามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ หลังการสังเคราะห์พบว่าอนุพันธ์อัตราส่วน 1:20 เป็นอัตราส่วนที่ถูกย่อยสลายได้มากกว่าอัตราส่วนอื่น ที่เวลา 60 นาที พบสารเหลือร้อยละ 13.38 อัตราส่วน 1:5 เหลือร้อยละ 21.32 อัตราส่วน 5:1 เหลือร้อยละ 43.72 อัตราส่วน 1:1 เท่ากับ 72.99

ไคโตซานเป็นสารที่สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิตโดยการแยกพันธะที่ตำแหน่ง β 1-4 linked glycans ของไคโตซาน จากการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายของอนุพันธ์ chitosan-EDTA พบว่าอัตราส่วน 1:20 เป็นอนุพันธ์ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ lysozyme มากกว่าอนุพันธ์อื่น โดยวัดจากค่าน้ำหนักที่ลดลง ที่ เวลา 60 นาที พบว่าปริมาณสารที่ซั่งได้เท่ากับร้อยละ 13.38 เทียบกับน้ำหนักสารเริ่มต้น และอัตราส่วน 1:1 เป็นอนุพันธ์ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ lysozyme น้อยกว่าอนุพันธ์อื่นที่ เวลา 60 นาทีพบว่ามีปริมาณสารที่ซั่งได้เท่ากับร้อยละ 72.99 จากน้ำหนักสารเริ่มต้น คาดว่าปฏิกิริยาที่เกิดการ crosslink ระหว่างหมู่อะมิโนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของไคโตซานและสาร EDTA ทำให้เกิดร่างแหและช่องว่างขึ้นในโมเลกุลแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง พันธะ β 1-4 linked glycans ของไคโตซานเดิม ดังนั้นเอนไซม์ lysozyme จึงสามารถแทรกซึมเข้าภายในโมเลกุลของสารสังเคราะห์ได้ แม้ว่าสารไคโตซานจะทำปฏิกิริยา crosslink กับสาร EDTA แต่คุณสมบัติการย่อยสลายในสิ่งมีชีวิตยังคงคุณสมบัติดั้งเดิม

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน (chitosan-EDTA) โดยการนำไคโตซานมาทำปฏิกิริยากับ EDTA ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าไคโตซานและ EDTA เกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่าง หมู่อะมิโนของไคโตซาน กับ หมู่คาร์บอกซิลิกของ EDTA เป็นพันธะเอไมด์เกิดขึ้น ดังเห็นได้จากการศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ chitosan-EDTA เปรียบเทียบกับโครงสร้างเดิมของไคโตซาน โดย วิธี FTIR พบว่าอนุพันธ์ไคโตซานไม่พบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1623 ซม.⁻¹ ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่เอไมด์ซึ่งพบในโครงสร้างของไคโตซาน และเกิดการดูดกลืนแสงขึ้นใหม่ที่ 1571 ซม.⁻¹ (ดังรูปที่ 4-6 และ 4-7) ซึ่งคาดว่าเป็นตำแหน่งของพันธะเอไมด์ ที่เกิดขึ้นภายหลังการทำปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานกับ EDTA ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสัมพันธ์กับการศึกษาอัตราการทำปฏิกิริยาระหว่าง ไคโตซาน และ EDTA (degree of modification) โดยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 340 นาโนเมตร เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวมาคำนวณหมู่ primary amino ที่เหลืออยู่ในไคโตซานโพลีเมอร์ พบว่าอนุพันธ์ chitosan-EDTA ที่มีอัตราส่วนของ EDTA สูงขึ้นจะมี degree of modification สูงขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตามการแทนที่หมู่เอมิโนโดย EDTA นั้นไม่ได้เกิดอย่างสมบูรณ์แม้จะมีการเพิ่มอัตราส่วนโดยโมลของ ไคโตซานต่อ EDTA ถึง 1 ต่อ 20 แต่การแทนที่ของ EDTA เกิดขึ้นเพียงร้อยละ 31.83 เท่านั้น

การศึกษาคคุณสมบัติต่างๆ ของอนุพันธ์พบว่าแนวโน้มความเหนียวของอนุพันธ์ chitosan-EDTA น่าจะมีความเหนือน้อยกว่าไคโตซานแต่ อัตราส่วน 1:1 มีความเหนียวที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า อัตราส่วน 1:1 เกิดการ crosslink กันทำให้ความเหนียวมากกว่าอนุพันธ์อัตราส่วนอื่นๆและความเหนียวนั้นไม่แปรผันตามอัตราส่วนของ EDTA ที่เพิ่มขึ้น การยึดติดกับเยื่อเมือกของอนุพันธ์ chitosan-EDTA พบว่าทุกอัตราส่วนมีการยึดเกาะกับเยื่อเมือกแตกต่างจากไคโตซาน โดยอนุพันธ์ chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:1 มีการยึดติดกับเยื่อเมือกน้อยกว่าอัตราส่วน 5:1 และ 1:20 การทดสอบการพองตัวของอนุพันธ์ chitosan-EDTA อัตราส่วน 1:20 มีความสามารถในการพองตัวมากกว่าอัตราส่วนอื่นๆ ส่วนอัตราส่วน 1:1 มีความสามารถในการพองตัวต่ำกว่าอัตราส่วนอื่นๆ นอกจากนี้อนุพันธ์ chitosan-EDTA ยังมีคงมีคุณสมบัติเดิมของ ไคโตซาน คือ สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต (biodegradable) ดังเห็นได้จากผลการทดลองพบว่าอนุพันธ์ chitosan-EDTA ทุกอัตราส่วนสามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ lysozyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในร่างกายสิ่งมีชีวิต

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้มีข้อจำกัดหลายๆ ด้าน ทำให้การสังเคราะห์อนุพันธ์ มีปริมาณน้อย การทดสอบคุณสมบัติของสารบางอย่างจึงไม่สามารถทำการศึกษาซ้ำได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ ที่สภาวะต่างๆ ที่คาดว่าจะมีผลต่อกระบวนการ และผลของการสังเคราะห์ เช่น มีการเตรียมสารที่มีอัตราส่วนของ EDTA มากขึ้น หรือศึกษาเปลี่ยนแปลงปริมาณของ EDAC ว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร นอกจากนี้ควรมีการศึกษาคุณสมบัติของอนุพันธ์ chitosan-EDTA เพิ่มเติม เช่น การพิสูจน์ประจุของอนุพันธ์ ว่ามีการเปลี่ยนแปลงและแตกต่างจากโคโตซานอย่างไร เพื่อหาอัตราส่วน และวิธีการสังเคราะห์ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาต่อไป



เอกสารอ้างอิง

1. Bernkop-Schnurch A. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. *J pharm Sci* 2000;194:1-13.
2. Bernkop-Schnurch A, Krajicek ME. Mucoadhesive polymers as platforms for peroral peptide delivery and absorption: synthesis and of different chitosan-EDTA conjugates. *J control Release* 1998;50:215-23.
3. Bernkop-Schnurch A, Kast CE. Chemically modified chitosan as enzyme inhibitors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:127-37.
4. Bernkop-Schnurch, Humenberger C, Valenta C. Basic studies on bioadhesive delivery systems for peptide and protein drugs. *Int J pharm* 1998;2:217-25.
5. Bernkop-Schnurch A, Paikl C, Valenta C. Novel Bioadhesive Chitosan-EDTA conjugate protects leucine enkephalin from degradation by aminopeptidase N. *Pharm Res* 1997;14:917-22.
6. Okuyama K, Noguchi K, Kanenari M, Egawa T and Osawa K. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr Polym* 2000;41:237-47.
7. Roldo M, Hornol M, Caliceti P and Bernkop-Schnurch A. Mucoadhesive thiolated chitosan as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:115-21.
8. Valenta C, Christen B, Bernkop-Schnurch A. Chitosan-EDTA conjugate: A novel polymer for topical gels. *J Pharm Pharmacol* 1998;50:445-52.
9. Khan TA, Peh KK and Ching HS. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan film for wound dressing. *J Pharm Pharmaceut sci* 2000;3:303-11.
10. ปรัชญา พัชรกรกุลชัย, รัตนา ทรงเมฆ, วราพร พิมสาร. การตั้งตำรับและพัฒนาแผ่นแปะผิวหนังที่ผสมสารสกัดจากมะขาม [ปริญญาานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยนครสวรรค์; 2546.
11. ไคติน-ไคโตซาน [monograph on the internet]. ประภัสสร สุรวัฒนาวรรณ. [ม.ป.ท.; กลุ่มวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ]; 2545 [date unknow: cited 2006 Jan 10]; [3 screens]. Available from: <http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/chitin.html>.
12. Chitin- chitosan; ไคติน - ไคโตซาน [monograph on the internet]. ปวย อุ๋นใจ. [ม.ป.ท.; ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ]; [date unknow: cited 2006 Jan 10]; [5 screens]. Available from: <http://www.thailabonline.com/news3chitin-chitosan.htm>.
13. วีระ อวิคุณปะเสริฐ. การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์พลอยได้: การนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ประโยชน์.[ม.ป.ท.; โครงการจัดตั้งภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร]; [date unknow: cited 2006 Jan 5]; [11 screens]. Available from: <http://www.agri.ubu.ac.th/information/byproduct.pdf>

Available from: <http://www.agri.ubu.ac.th/information/byproduct.pdf>

14. สุวดี จันทร์กระจ่าง. ผลิตภัณฑ์จากไคติน-ไคโตซานและการประยุกต์ใช้ในประเทศ. การประชุม ไคติน-ไคโตซานแห่งประเทศไทย: 17-18 กรกฎาคม 2546; กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย.
15. Shepherd R, Reader S, Folshaw A. Chitosan function properties. *Glycoconjugate Journal* 1997; 14: 535-42.
16. Sashiwa H, Shigemasa. Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohydr Polym* 1999;39:127-38.
17. Parfitt K, editor. *Matindale the extra pharmacopoeia*. 13th ed.n.p.: In fo Acess & Distribution. 1994. p 682.
18. Wade A , Weller PJ. *Hand book of pharmaceutical excipients*. 2nd ed. Northampton: Alden multimedia. 1994. p 176-179.
19. Budavari S, editor. *The merch index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 11th ed. Newjersey: Merch & CO. 1989. p 550.
20. EDTA - a- molecule with a complex story [monograph on the internet]. Sinex SA.[place unknown: publisher unknow]; 2004 [2004 Mar 1: cited 2005 Jan 6]. The EDTA molecul; [4 screens]. Available from: www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edtah.htm.
21. Mechanisms of enzyme catalysis [monograph on the internet]. Jakubowski DR. [place unknown: publisher unknown]; [date unknown: cited 2005 Feb 10] [3 screens]. Available from:<http://www.employees.csbsju.edu/hjakubowki/classes/ch331/catalysis/olcatenzmech.html>.
22. Another example of protein function-Lysozyme [monograph on the internet]. Wellington: University of Victoria;[date unknown: cited 2005 Feb 16] [4 screens]. Available from:http://www.vuw.ac.nz/staff/paul_teesdale-spittle/essentials/chapter-6/proteins/lysozyme.html.
23. Hjerde RJN, Varum KM, Grasdalen H, Tokura S, Smidsrod O. Chemical composition of O-(carboxymethyl)- chitins in relation to lysozyme degradation rates. *Carbohydr Polym*1997;34:131-9.
24. Carey FA. *Organic chemistry*. 5th ed. New York: Von Hoffmann Press; 2003
25. Chen XG, Park HJ. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydr Polym* 2003;53:355-359.
26. Weast RC. *Handbook of chemistry and physics*. 56th ed. Ohio: CRC press; 1975.