

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ Immunocytochemistry

1.1 Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 200 ml

NaCl	17.52 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.578 g
NaHPO ₄ ·2H ₂ O	2.983 g

เทสารทั้งสามรวมกันในบีกเกอร์ 250 ml เติมน้ำกลั่น 100 ml คนให้ละลายแล้วปรับ pH=7.5 โดยใช้ pH meter วัด pH ปรับ pH ให้สูงโดยใช้สารละลาย NaOH และปรับ pH ให้ลดลงใช้สารละลาย HCl หลังจากนั้นเทใส่ขวดปริมาตร 200 ml ปรับให้มีปริมาตร 200 ml

1.2 Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 100 ml

เจือจาง PBS ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า โดยนำ 10xPBS 10 ml ผสมกับน้ำกลั่น 90 ml เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ขวดสารเคมีแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

1.3 4% Paraformaldehyde fixative

เตรียมสารละลาย A, B, C และสารละลาย 1.0N NaOH

สารละลาย A : NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.74 g ในน้ำกลั่น 100 ml
สารละลาย B : NaOH	2.52 g ในน้ำกลั่น 100 ml
สารละลาย C : CaCl ₂	1.00 g ในน้ำกลั่น 100 ml
สารละลาย 1.0N NaOH	4.00 g ในน้ำกลั่น 100 ml

ชั่งสาร Paraformaldehyde 4 g (ใส่ถุงมือและทำในตู้ควัน) ใส่ขวด Erlenmeyer flask เติมสารละลาย B 17 ml และหยดสารละลาย 1.0N NaOH 2 หยด กวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก ให้สารละลายหมด (สารละลายมีลักษณะใส ไม่มีสี) เติม glucose 1.2 g กวนให้ glucose ละลายหมด เติมสารละลาย A 83 ml และเติมสารละลาย C 0.5 ml เติมทีละหยดและช้าๆจนหมด ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.2 วัดด้วย pH meter

1.4 สารละลาย 4% PBT (4% Triton, 2% BSA, 2% Normal Serum ใน PBS)

BSA	0.2 g
Triton x-100	400 µl
NS	200 µl
PBS	9.40 ml

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยคนด้วยแท่งแก้วแล้วแบ่งใส่ Eppendorf ละ 1 ml เก็บในตู้เย็น -20 °C

1.5 สารละลาย 0.4% PBT (0.4% Triton, 2% BSA, 2% Normal Serum ใน PBS)

BSA	0.2 g
Triton x-100	40 µL
PBS	9.76 ml

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยคนด้วยแท่งแก้วแล้วแบ่งใส่ Eppendorf ละ 1 ml เก็บในตู้เย็น -20 °C (เมื่อจะนำไปใช้จึงค่อยใส่ Normal Serum)

1.6 เตรียม DAPI solution

ผสม stock DAPI 100 µg กับน้ำ 100 µl และเขย่าให้เข้ากัน

1.7 เตรียม Working DAPI solution

ละลาย 3.6 g Na_2HPO_4 ในน้ำ 50.00 ml

เติม 100 µg DAPI solution

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวนลิขสิทธิ์

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัด Glycosaminoglycans (GAGs) และการทำ Liquid Scintillation Counting

2.1 สารละลาย 0.3 M NaOH ปริมาตร 100 ml

ชั่ง NaOH 1.2 g ละลายน้ำในขวดปริมาตร ขนาด 100 ml

2.2 สารละลาย 1% Potassium acetate ใน 95 % Ethanol ปริมาตร 100 ml

ชั่ง CH_3COOK 1.000 g ละลายด้วย 95 % Ethanol ในขวดปริมาตรขนาด 100 ml

2.3 1 M Tris-HCl Buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 ml

ชั่ง Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethane 6.057 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 ml แล้วเติม 1 M HCl ปริมาตร 29.2 ml เก็บสารละลายที่ 4 °C

2.4 สารละลาย pronase enzyme เข้มข้น 5 mg ใน 1 ml ของ 1 M Tris-HCl Buffer pH 8

ชั่ง pronase enzyme 5 mg ละลายด้วย 1 M Tris-HCl Buffer pH 8.0 ใน eppendorf ขนาด 1 ml

2.5 เตรียม phosphor-detergent liquid scintillation mixture ที่ใช้ในการทำ Liquid Scintillation

เตรียม TPM (toluene-phosphor mixture)

- 8 g ของ 2,5-diphenyl-oxazole + 50 mg ของ 1,4-bis-2'-(s'-diphenyl-oxazolyl)-benzene
- ปรับปริมาตรด้วย toluene จนได้ 1 ลิตร

น้ำ TPM 400 ml + triton-x 300 ml + methanol 20 ml

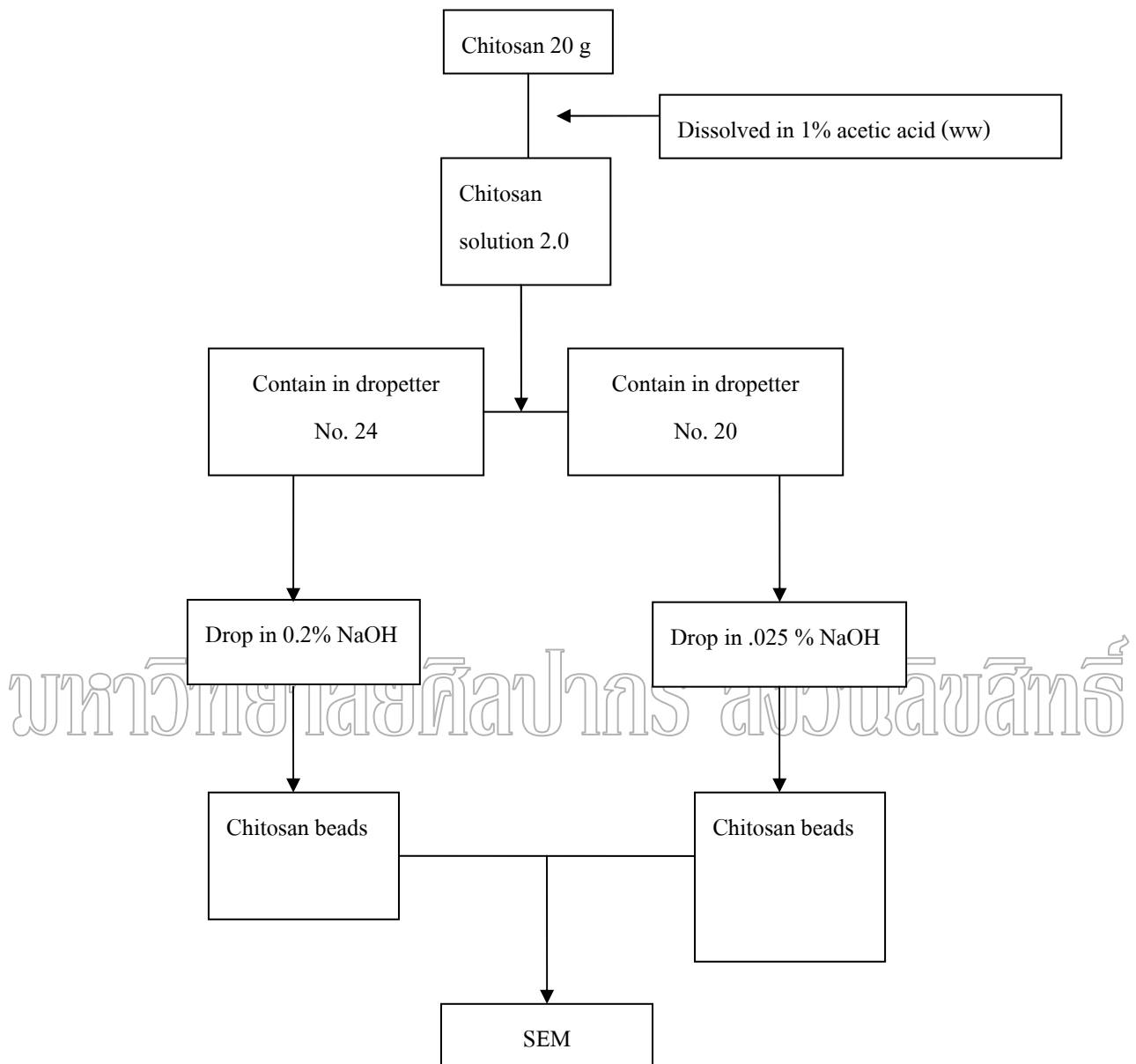
3. Preparation of chitosanbeads

1. chitosan highly vis. [2-amino-2-deoxy-(1-4)B-D glucopyranan] Biochemika Fluka
2. NaOH 0.2 M ,
3. 1.0% aceticacid (CH_3COOH)

Preparation of chitosanbeads

1. น้ำ chitosan 20 g ละลายใน สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 2% โดยปริมาตร
2. ละลายจนเข้ากันเป็นเนื้อเดียว กรองสารละลาย เอาส่วนที่ไม่ละลายออก ทิ้งให้ฟองอากาศหายไป
3. บรรจุสารละลาย chitosan ที่ได้ ในหลอดฉีดยาขนาด 10 cm^3 ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20 และเบอร์ 24
4. หยดสารละลาย chitosan ในหลอดฉีดยาเบอร์ 24 ลงใน สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.2 M อย่างช้าๆ กรองและเก็บเม็ด chitosan beads
5. หยดสารละลาย chitosan ในหลอดฉีดยาเบอร์ 20 ลงใน สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.25 M อย่างช้าๆ กรอง และเก็บ chitosan beads ในที่เย็น
6. ตรวจสอบลักษณะเม็ด chitosan ที่ได้โดยกล้องจุลทรรศน์ และ SEM

ขั้นตอนการเตรียมเม็ดไคโตซาน

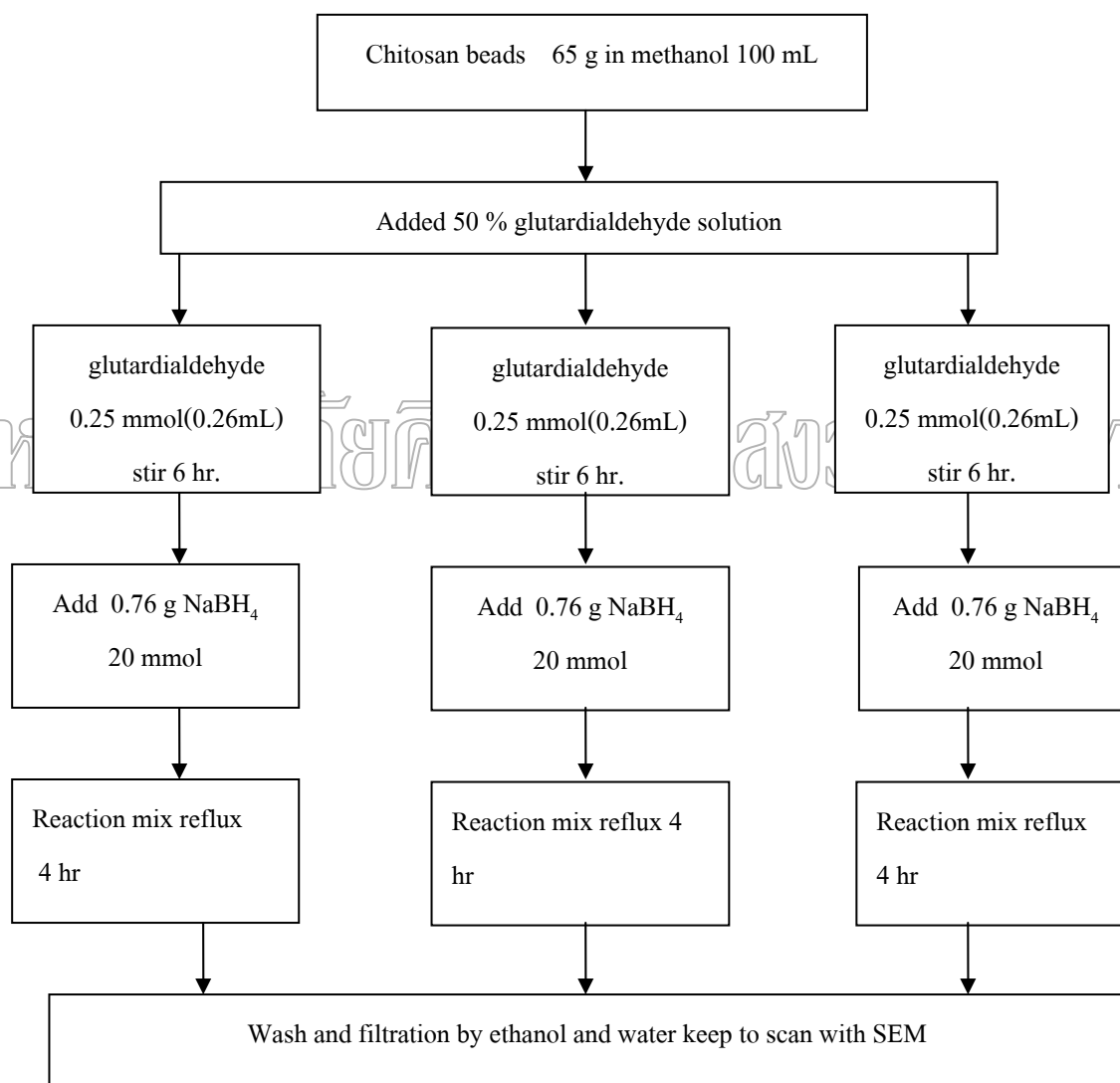


Preparation of chitosan derivatives

1. cross-linked with glutardialdehyde

chemicals

- chitosan beads
- glutardialdehyde (50%)
- methanol
- sodiumborohydride



Cross-linked with glutadialdehyde

นำ Chitosan beads ที่เตรียมได้ตากตอนที่ 1 จำนวน 56 g แช่ใน methanol 100 mL ทำ 3 ชุดการทดลอง ชุดที่ 1

1. เติม สารละลาย Glutadialdehyde เข้มข้น 25 % จำนวน 0.23 mL (0.6 mmol) คนทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง
2. เติม Sodiumborohydride (NaBH_4) จำนวน 0.76 g (20mmol) Reaction mixture was reflux 4 hr
3. ล้างด้วย ethanol และน้ำกลั่น กรอง นำไปตรวจดูผิวสัมผัสด้วย กล้องจุลทรรศน์ และ SEM

ชุดที่ 2

1. เติม สารละลาย Glutadialdehyde เข้มข้น 50 % จำนวน 0.46 mL (1.2 mmol) คนทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง
2. เติม Sodiumborohydride (NaBH_4) จำนวน 0.76 g (20mmol) Reaction mixture was reflux 4 hr
3. ล้างด้วย ethanol และน้ำกลั่น กรอง นำไปตรวจดูผิวสัมผัสด้วย กล้องจุลทรรศน์ และ SEM

ชุดที่ 3

1. เติม สารละลาย Glutadialdehyde เข้มข้น 50 % จำนวน 0.92 mL (2.4 mmol) คนทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง
2. เติม Sodiumborohydride (NaBH_4) จำนวน 1.52 g (40mmol) Reaction mixture was reflux 4 hr
3. ล้างด้วย ethanol และน้ำกลั่น กรอง นำไปตรวจดูผิวสัมผัสด้วย กล้องจุลทรรศน์ และ SEM

ทำ Cross-link ด้วย Glutardialdehyde และ Benzaldehyde

นำไคโตซานบีดส์ที่ได้จากข้อ 3.1.1 มา 20 กรัม ใส่ในขวดกันกลม เติมสารละลาย Glutardialdehyde 82.08 μL

เติมน้ำกลั่น 100 cm^3 ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง

เติมน้ำกลั่น 0.5 NaOH 6 cm^3 และ Benzaldehyde 1,000 μL ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง

ล้างเมดบีดส์ที่ได้ด้วยเครื่องกรอง

การทำการมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย

1) สารละลายมาตรฐานของไอออนฟอสเฟต

ละลาย KH_2PO_4 219.5 mg ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เป็น 1 dm^3 ซึ่งจะมี

ฟอสเฟตเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ทำเจือจางลง 10 เท่า โดยเปิดสารละลายมาตรฐานมา 10.0 cm^3 แล้วทำให้ปริมาตรรวมเป็น 100 cm^3 ด้วยน้ำกลั่นในขวดปริมาตร จะมีฟอสเฟตอยู่เข้มข้น 5.00 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

2) สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต

ละลาย $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 12 g ลงในน้ำกลั่น 85 cm^3 แล้วเติมน้ำ

สารละลายกรดซัลฟูริก ซึ่งเตรียมจากการเติมซัลฟูริกเข้มข้น 140 cm^3 ในน้ำ 200 cm^3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น 500 cm^3

3) สารละลาย SnCl_2

ละลาย $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g ในกลีเซอรอล 100 cm^3 นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน
จนด้วยแท่งแก้วจนเกลือละลายหมด สารละลายนี้เก็บไว้ได้นาน

4) รีเอเจนต์ แบลงก์ (reagent blank)

นำน้ำกลั่นใส่ในขวดปริมาตร 100 cm^3 เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 25 cm^3 เติม
สารละลาย SnCl_2 200 μL เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร 100 cm^3 ทิ้งไว้ 10 นาที

การทำกราฟมาตรฐาน

- 1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานของไอออนฟอสเฟตมา 1, 2, 10, 20, 50,
100 cm^3 ใส่ในขวดปริมาตร 100 cm^3 6 ขวด เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 cm^3 ทุกขวด ได้
สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5 ppm ตามลำดับ
- 2) ปิเปตสารละลายจากข้อ 1) มา 25 cm^3 ใส่ในขวดปริมาตร 100 cm^3
- 3) เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 4 cm^3 เขย่าให้เข้ากัน
- 4) เติมสารละลาย SnCl_2 200 μL เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร 100 cm^3 ทิ้งไว้ 10 นาที
- 5) นำไปค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยถ่ายสารละลายใส่เซลล์ขนาด 1 cm^3
วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 700 nm
- 6) นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน และบันทึกผล

การทำกราฟมาตรฐานของคอปเปอร์ซัลเฟต

1. เตรียมสารละลาย CuSO_4 เข้มข้น 2×10^4 ppm โดยละลาย CuSO_4 5 กรัม
ในน้ำกลั่น 250 cm^3
2. ปิเปตสารละลาย CuSO_4 จากข้อ 3.3.6.1 มา 50 cm^3 ใส่ในขวดปริมาตร 100 cm^3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 cm^3 จะมี CuSO_4 เข้มข้น 1×10^4 ppm
3. ปิเปตสารละลาย CuSO_4 จากข้อ 3.3.6.2 มา 50 cm^3 ใส่ในขวดปริมาตร 100 cm^3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 cm^3 จะมี CuSO_4 เข้มข้น 5×10^3 ppm
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยถ่ายสารละลายใส่เซลล์
ขนาด 1 cm^3 วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 853 nm
5. บันทึกค่า absorbance และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน

adsorption west S-35 derivative (C1) chitosan-beads

count in west

NO.	beads weight	time adsorption(hr.)	CPMA	CPMB
w1/31/10/48	0.1121	0.167	5306.4	5207.2
w2/31/10/48	0.1021	1	5234.2	5135
w3/31/10/48	0.0904	2	4695.4	4613.4
w4/31/10/48	0.089	4	4833.6	4743.2
w5/31/10/48	0.0987	6	3999.6	3925.4
w6/31/10/48	0.0863	12	1639	1605.8

count in beads

NO.	beads weight	time adsorption(hr.)	CPMA	CPMB
b1/31/10/48	0.1121	0.167	201	194.4
b2/31/10/48	0.1021	1	201.2	192.2
b3/31/10/48	0.0904	2	233	221.4
b4/31/10/48	0.089	4	331	316.2
b5/31/10/48	0.0987	6	303.6	293.4
b6/31/10/48	0.0863	12	256	247

error count in west before adsorption 6840.4 6810.4

west not keep in dark and not cover with aluminium sheet

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวนลิขสิทธิ์

ผลการทดลอง ใช้ cross-linked chitosan beads จับ ฟอสเฟตไอออน

เวลา	ความเข้มข้นที่เหลือ	มวล บีสต์	เวลา	มวล เฉลี่ย	ความเข้มข้นที่เหลือเฉลี่ย
5	1.365	1.0065	5	1.00975	1.233545
10	1.687	1.0081	10	1.00955	1.340809
30	1.051	1.0023	30	1.0049	1.967333
60	2.906	1.009	60	1.0053	2.25256
120	3.198	1	120	1.0052	2.325695

ครั้ง 2

เวลา	ค่า abs	มวล บีสต์	ความเข้มข้นที่ เหลือ
5	0.208	1.0065	1.014139
10	0.213	1.0081	1.038518
30	0.392	1.0023	1.911263
60	0.438	1.009	2.135544
120	0.432	1	2.10629

ครั้ง 3

เวลา	ค่า abs	มวล บีสต์	ความเข้มข้นที่ เหลือ
5	0.298	1.013	1.45295
10	0.337	1.011	1.643101
30	0.415	1.0075	2.023403
60	0.486	1.0016	2.369576
120	0.522	1.0104	2.5451

adsorption west S-35 of derivative GH3 GH4 GH5 chitosan-beads

count in west

NO.	beads weight	time adsorption(hr.)	CPMA	CPMB
GH3	0.1121	0.167	4676.6	4666.2
GH4	0.1021	0.167	4435.2	4422.6
GH5	0.1042	0.167	4425.6	4402.6
GH3	0.1002	1	4606.6	4587.4
GH4	0.105	1	4333.2	4323.4
GH5	0.101	1	4326.4	4320.2

count in beads

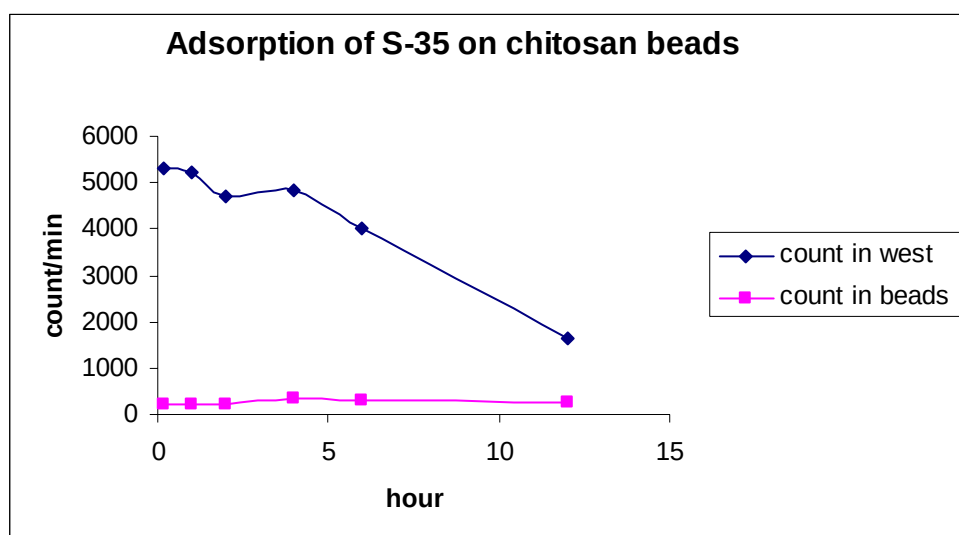
NO.	beads weight	time adsorption(hr.)	CPMA	CPMB
GH3	0.1121	0.167	199.4	190.2
GH4	0.1021	0.167	197.2	188.8
GH5	0.1042	0.167	201.2	198.4
GH3	0.1002	1	198.4	192.6
GH4	0.105	1	196.6	190.2
GH5	0.101	1	197.6	192.2

count in west before adsorption

5780.4 5664.2

west not keep in dark and not cover with aluminium sheet

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



ผลการทดลอง ใช้ chitosan beads จับ ฟอสเฟตไอออน

เวลา	ความเข้มข้นที่เหลือ	มวลบีสต์	เวลา	มวลเจลลี่	ความเข้มข้นที่เหลือเจลลี่
0	4		0		4
5	3.592	1.0024	5	1.0024	2.59174
10	4.593	1.0014	10	1.00127	3.61238
30	4.846	1.0045	30	1.0045	3.84642
60	5.228	1.0075	60	1.00783	3.7783
120	4.498	1.0058	120	1.0058	3.57175

ครั้งที่ 1

เวลา	ค่า abs	มวลบีสต์	ความเข้มข้นที่เหลือ
5	0.626	1.0048	3.05217
10	0.943	1.001	4.597757
30	0.746	1.0046	3.63725
60	0.998	1.0081	4.865919
120	0.76	1.0062	3.70551

ครั้งที่ 3

เวลา	ค่า abs	มวลบีสต์	ความเข้มข้นที่เหลือ
5	0.719	1	3.505607
10	0.865	1.0014	4.217455
30	0.897	1.0044	4.373476
60	0.966	1.0079	4.709898
120	0.749	1.0054	3.651877

ครั้งที่ 2

เวลา	ค่า abs	มวลบีสต์	ความเข้มข้นที่เหลือ
5	0.865	1.0024	4.217455
10	1.03	1.0014	5.021941
30	1.339	1.0045	6.528523
60	1.253	1.0075	6.109215
120	1.304	1.0058	6.357874

ผลการทดลอง ใช้ cross-linked chitosan beads จับ ฟอสเฟตไอออน

เวลา	ความเข้มข้นที่เหลือ	มวลบีสต์	เวลา	มวลเจลลี่	ความเข้มข้นที่เหลือเจลลี่
			0		4
5	1.365	1.0065	5	1.00975	1.233545
10	1.687	1.0081	10	1.00955	1.340809
30	1.051	1.0023	30	1.0049	1.967333
60	2.906	1.009	60	1.0053	2.25256
120	3.198	1	120	1.0052	2.325695

ครั้ง
1

เวลา	ค่า abs	มวล บีสต์	ความเข้มข้นที่ เหลือ
5	0.208	1.0065	1.014139
10	0.213	1.0081	1.038518
30	0.392	1.0023	1.911263
60	0.438	1.009	2.135544
120	0.432	1	2.10629

ครั้ง
1

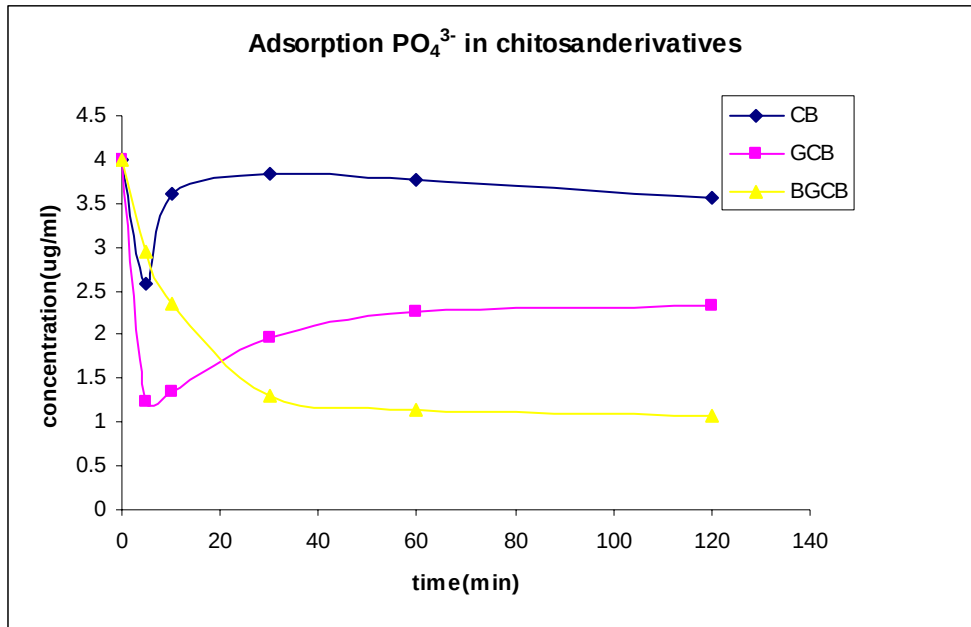
เวลา	ค่า abs	มวล บีสต์	ความเข้มข้นที่ เหลือ
5	0.298	1.013	1.45295
10	0.337	1.011	1.643101
30	0.415	1.0075	2.023403
60	0.486	1.0016	2.369576
120	0.522	1.0104	2.5451

ผลการทดลอง ใช้ cross-linked chitosan beads+glutadialdehyde จับ ฟอสเฟตไอออน

เวลา	ค่า abs	มวลเจลลี่	ความเข้มข้นเหลือเจลลี่
0			4
5	2.942	1.0072	2.94198
10	2.343	1.0065	2.343247
30	1.3013	1.0018	1.301316
60	1.1506	1.005	1.152446
120	1.0739	1.001	1.072973

เวลา	ค่า abs	มวลบีสต์	ความเข้มข้นที่ เหลือ	เวลา	ค่า abs	มวลบีสต์	ความ เข้มข้นที่ เหลือ
5	0.594	1.0072	2.896148	5	0.617	1.0021	3.008289
10	0.412	1.0065	2.008776	10	0.5482	1.0054	2.672843
30	0.2044	1.0018	0.996587	30	0.303	1.0019	1.477328
60	0.1834	1.005	0.894198	60	0.264	1.0087	1.287177
120	0.1734	1.001	0.845441	120	0.2488	1.0009	1.213067

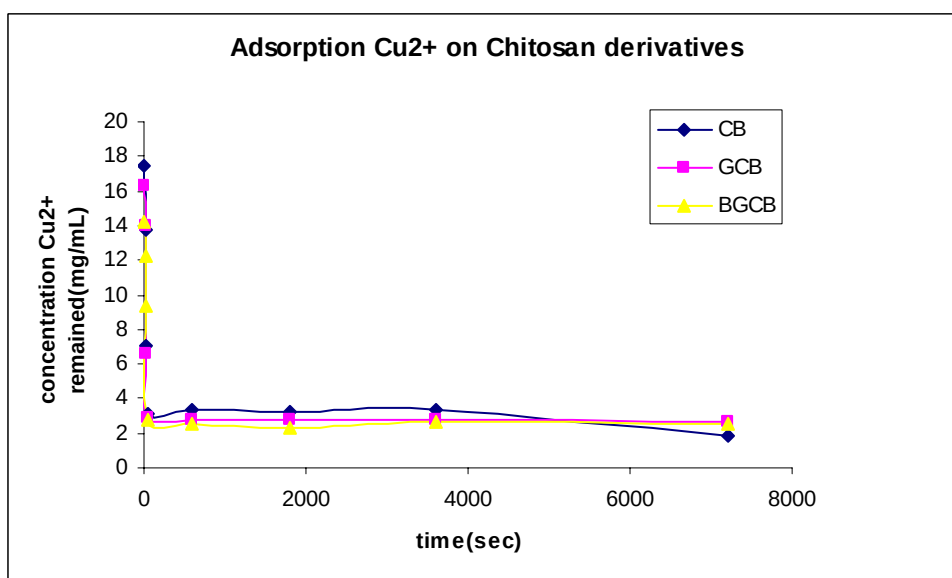
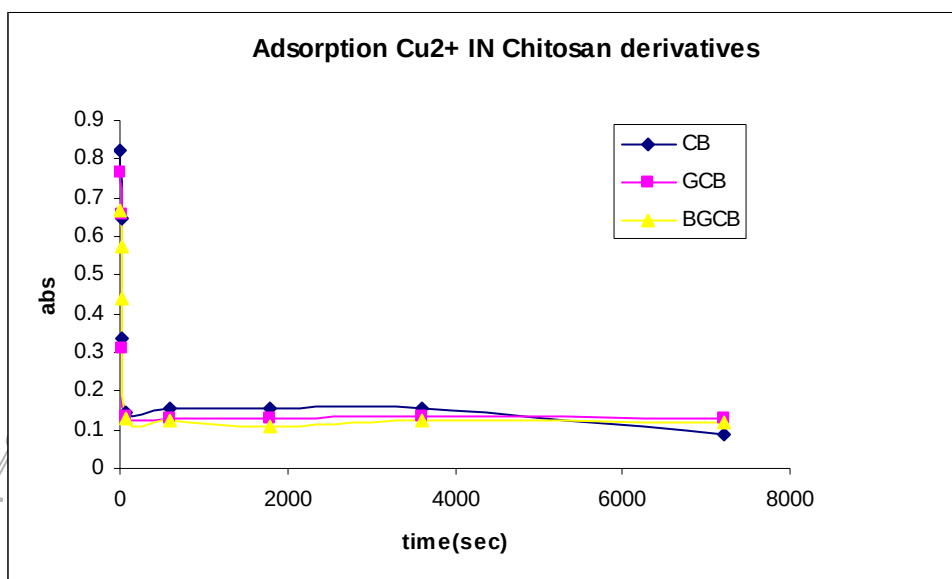
เวลา	ค่า abs	มวลบีสต์	ความเข้มข้นที่ เหลือ
5	0.5992	1.0123	2.921502
10	0.4816	1.0076	2.348123
30	0.2933	1.0017	1.430034
60	0.2617	1.0013	1.275963
120	0.238	1.0011	1.16041



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

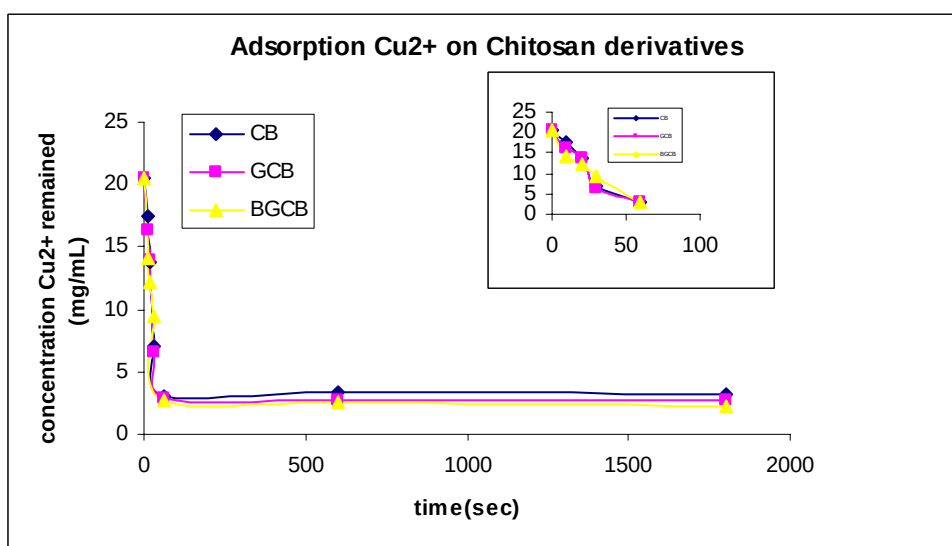
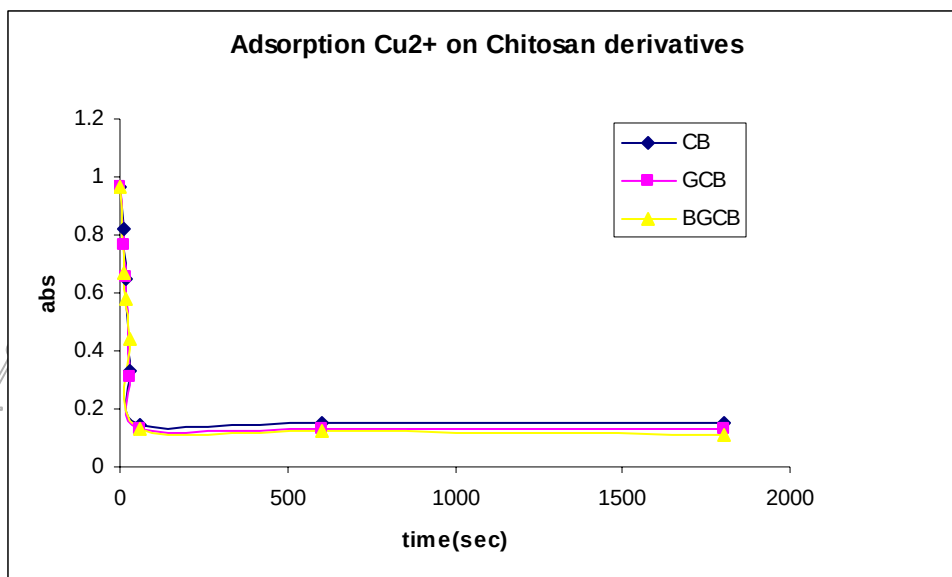
Adsorption Cu²⁺ 794 nm (UV-vis 1600)

	CB			GCB			BGCB		
	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml
10	0.5067	0.822	17.48936	0.5135	0.766	16.29787	0.5032	0.666	14.17021
20	0.5122	0.646	13.74468	0.5001	0.655	13.93617	0.5112	0.576	12.25532
30	0.5111	0.334	7.106383	0.5101	0.311	6.617021	0.5106	0.442	9.404255
60	0.5132	0.144	3.06383	0.5201	0.134	2.851064	0.5221	0.129	2.744681
600	0.5163	0.155	3.297872	0.5064	0.131	2.787234	0.5066	0.122	2.595745
1800	0.5055	0.153	3.255319	0.5035	0.128	2.723404	0.5007	0.108	2.297872
3600	0.5121	0.157	3.340426	0.508	0.133	2.829787	0.5127	0.124	2.638298
7200	0.5164	0.086	1.829787	0.5022	0.127	2.702128	0.5121	0.119	2.531915



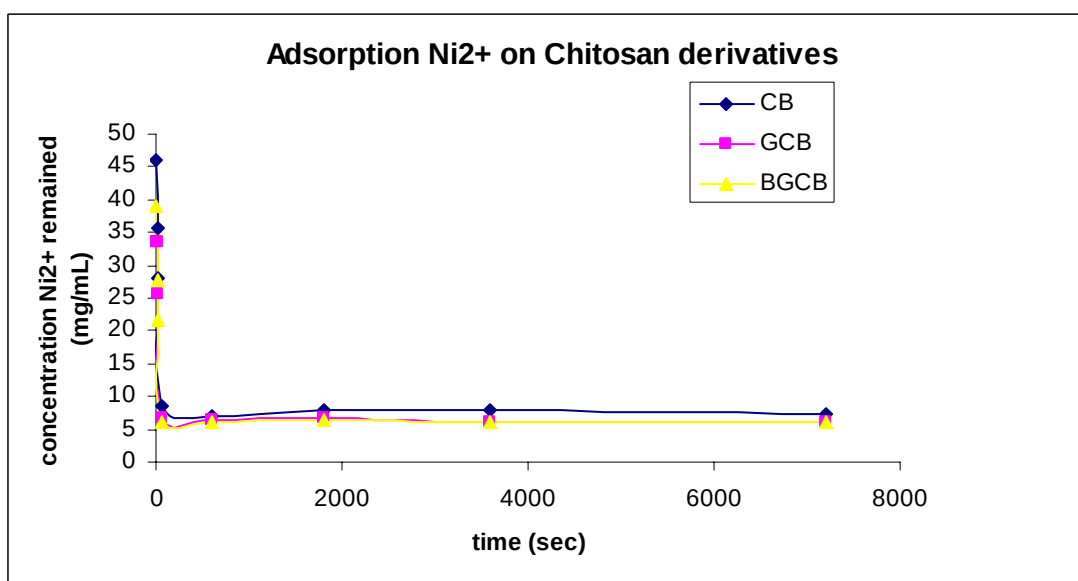
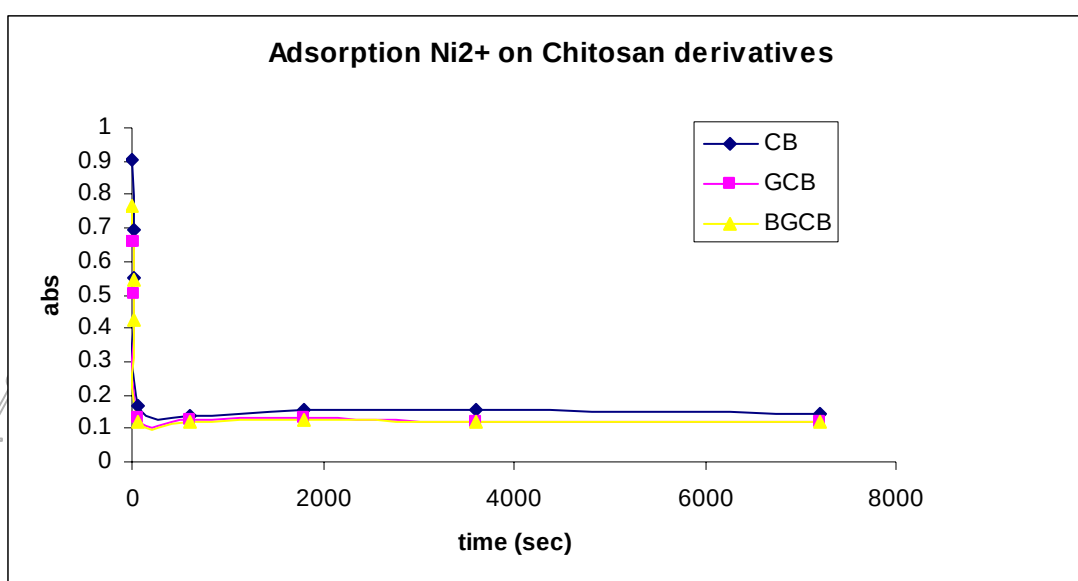
Adsorption Cu²⁺ 794 nm (UV-vis 1600)

	CB			GCB			BGCB		
	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml
0		0.963	20.48936		0.963	20.48936		0.963	20.48936
10	0.5067	0.822	17.48936	0.5135	0.766	16.29787	0.5032	0.666	14.17021
20	0.5122	0.646	13.74468	0.5001	0.655	13.93617	0.5112	0.576	12.25532
30	0.5111	0.334	7.106383	0.5101	0.311	6.617021	0.5106	0.442	9.404255
60	0.5132	0.144	3.06383	0.5201	0.134	2.851064	0.5221	0.129	2.744681
600	0.5163	0.155	3.297872	0.5064	0.131	2.787234	0.5066	0.122	2.595745
1800	0.5055	0.153	3.255319	0.5035	0.128	2.723404	0.5007	0.108	2.297872



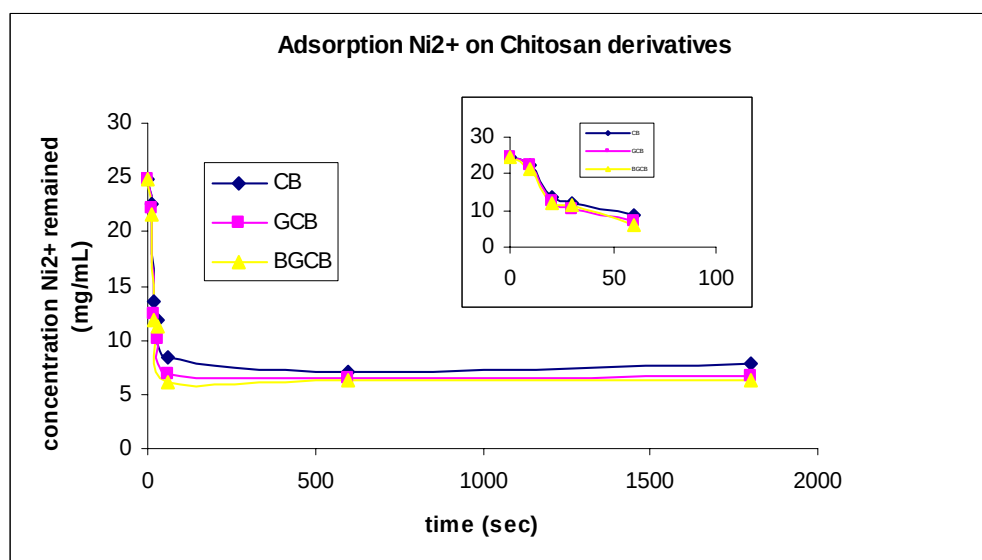
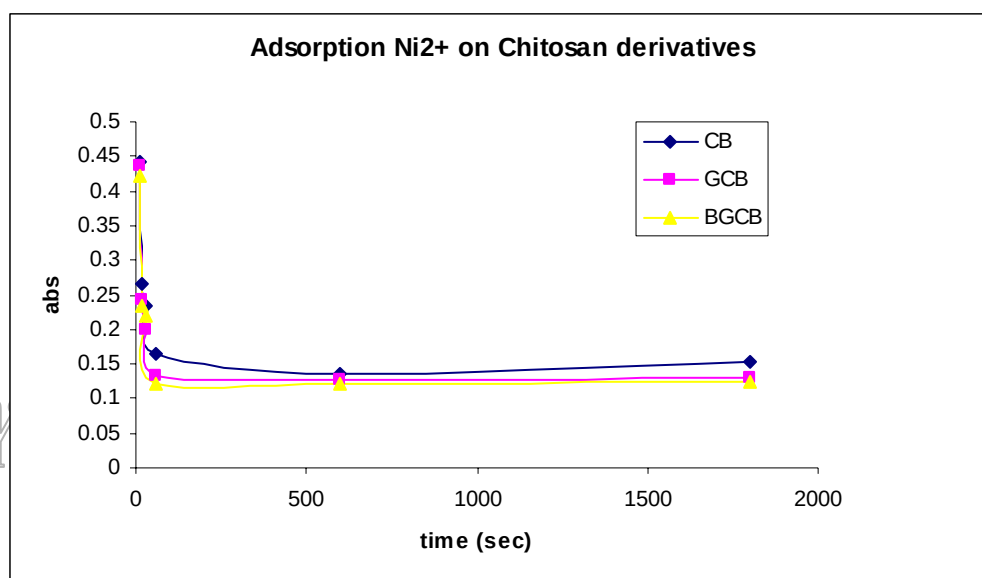
Adsorption Ni²⁺ (UV-vis 1600)

	CB			GCB			BGCB		
	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml
10	0.5067	0.905	46.17347	0.5135	0.657	33.52041	0.5032	0.766	39.08163
20	0.5122	0.697	35.56122	0.5001	0.66	33.67347	0.5112	0.544	27.7551
30	0.5111	0.55	28.06122	0.5101	0.503	25.66327	0.5106	0.427	21.78571
60	0.5132	0.166	8.469388	0.5201	0.134	6.836735	0.5221	0.12	6.122449
600	0.5163	0.137	6.989796	0.5064	0.127	6.479592	0.5066	0.122	6.22449
1800	0.5055	0.153	7.806122	0.5035	0.13	6.632653	0.5007	0.125	6.377551
3600	0.5121	0.153	7.806122	0.508	0.118	6.020408	0.5127	0.117	5.969388
7200	0.5164	0.146	7.44898	0.5022	0.12	6.122449	0.5121	0.119	6.071429



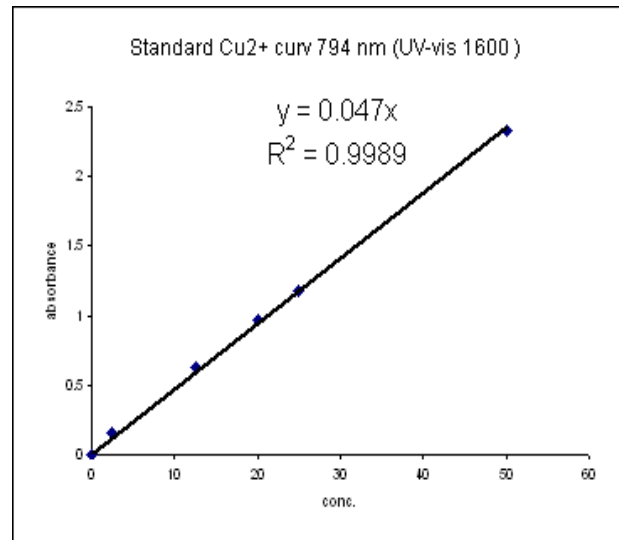
Adsorption Ni²⁺ (UV-vis 1600)

	CB			GCB			BGCB		
	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml	g	abs	mg/ml
0		0.486	24.79592		0.486	24.79592		0.486	24.79592
10	0.5067	0.441	22.5	0.5135	0.435	22.19388	0.5032	0.422	21.53061
20	0.5122	0.267	13.62245	0.5001	0.244	12.44898	0.5112	0.233	11.88776
30	0.5111	0.233	11.88776	0.5101	0.199	10.15306	0.5106	0.22	11.22449
60	0.5132	0.166	8.469388	0.5201	0.134	6.836735	0.5221	0.12	6.122449
600	0.5163	0.137	6.989796	0.5064	0.127	6.479592	0.5066	0.122	6.22449
1800	0.5055	0.153	7.806122	0.5035	0.13	6.632653	0.5007	0.125	6.377551



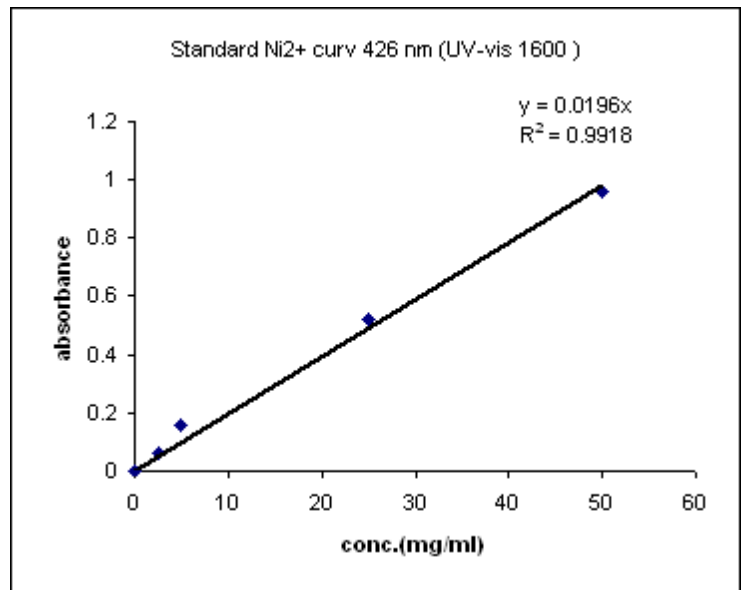
Standard Cu²⁺ curv 794 nm (UV-vis 1600)แน้น
45

Conc.	Abs
mg/ml	
0	0
2.5	0.157
12.5	0.626
20	0.963
25	1.172
50	2.33



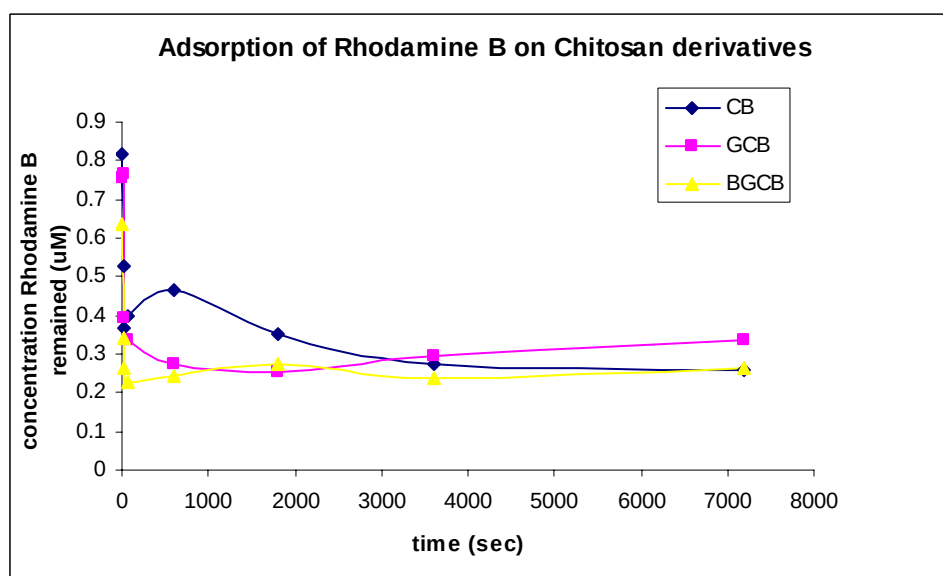
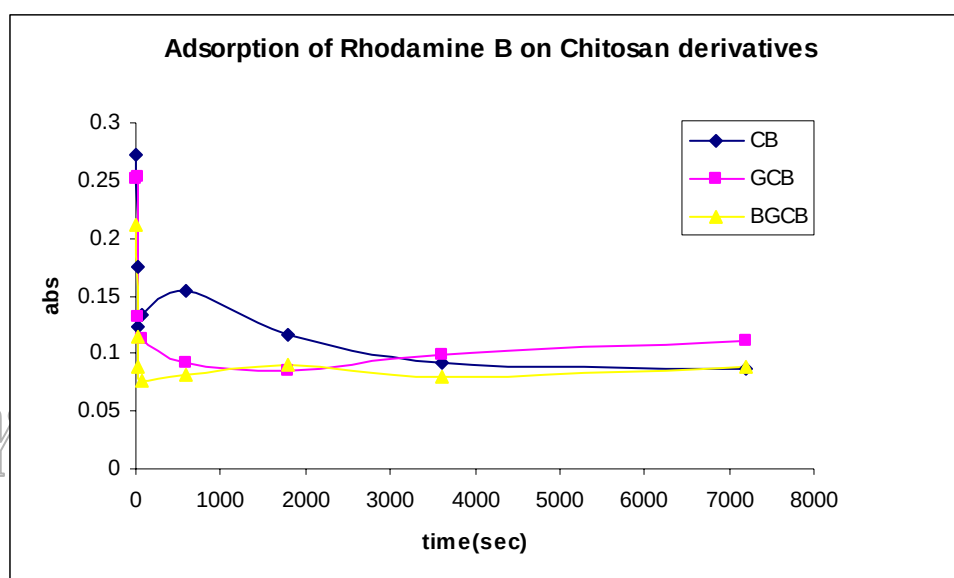
Standard Ni²⁺ curv 426 nm (UV-vis 1600)

Conc.	Abs
mg/ml	
0	0
2.5	0.06
5	0.16
25	0.518
50	0.958



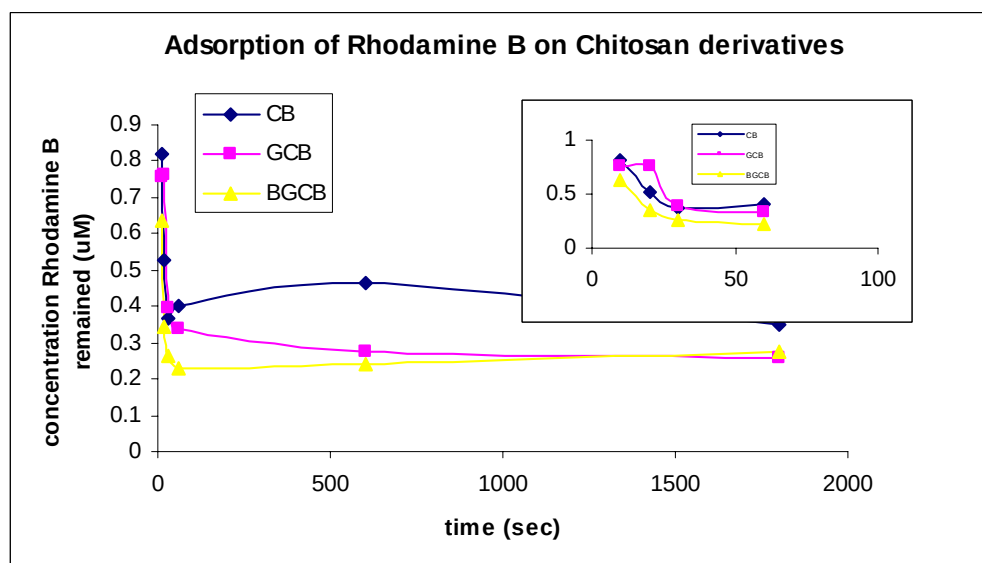
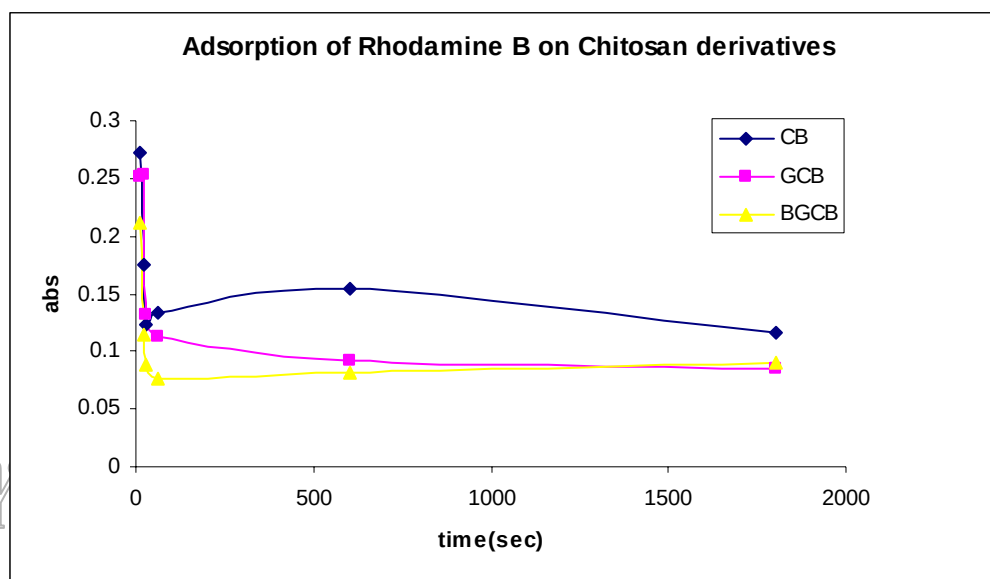
Adsorption Rh 543 nm (UV-vis
1600)

	CB			GCB			BGCB		
	g	abs	conc.(uM)	g	abs	conc.(uM)	g	abs	conc.(uM)
10	0.5107	0.272	0.81755	0.5201	0.252	0.75744	0.5131	0.212	0.63721
20	0.5135	0.175	0.526	0.5021	0.254	0.76345	0.5135	0.114	0.34265
30	0.5067	0.123	0.3697	0.5055	0.131	0.39375	0.5035	0.088	0.2645
60	0.5164	0.133	0.39976	0.5101	0.112	0.33664	0.5088	0.076	0.22843
600	0.5135	0.155	0.46589	0.5122	0.092	0.27653	0.5055	0.081	0.24346
1800	0.5049	0.117	0.35167	0.5076	0.085	0.25549	0.5163	0.091	0.27352
3600	0.5067	0.092	0.27653	0.508	0.098	0.29456	0.5111	0.079	0.23745
7200	0.5074	0.086	0.25849	0.5127	0.111	0.33363	0.5132	0.088	0.2645



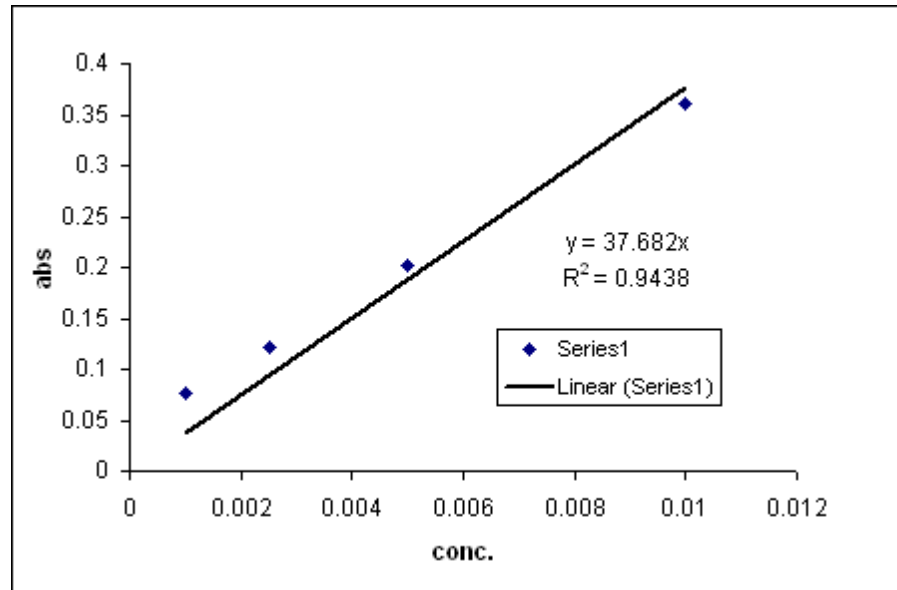
Adsorption Rh 543 nm (UV-vis
1600)

	CB			GCB			BGCB		
	g	abs	conc.(uM)	g	abs	conc.(uM)	g	abs	conc.(uM)
10	0.5107	0.272	0.81755	0.5201	0.252	0.75744	0.5131	0.212	0.63721
20	0.5135	0.175	0.526	0.5021	0.254	0.76345	0.5135	0.114	0.34265
30	0.5067	0.123	0.3697	0.5055	0.131	0.39375	0.5035	0.088	0.2645
60	0.5164	0.133	0.39976	0.5101	0.112	0.33664	0.5088	0.076	0.22843
600	0.5135	0.155	0.46589	0.5122	0.092	0.27653	0.5055	0.081	0.24346
1800	0.5049	0.117	0.35167	0.5076	0.085	0.25549	0.5163	0.091	0.27352
3600	0.5067	0.092	0.27653	0.508	0.098	0.29456	0.5111	0.079	0.23745
7200	0.5074	0.086	0.25849	0.5127	0.111	0.33363	0.5132	0.088	0.2645



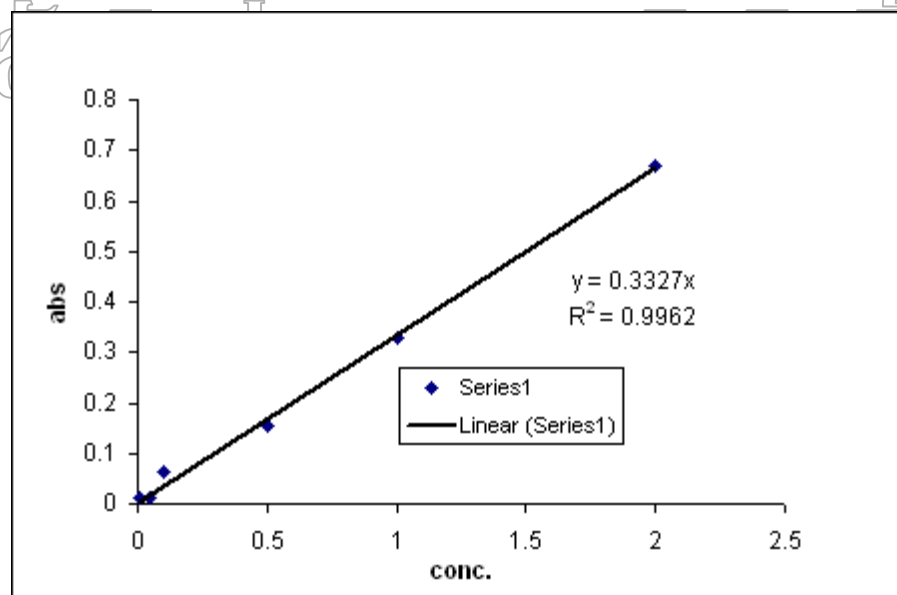
Standard Rh curv 543 nm (UV-vis 1600)

Conc. um	Abs
0.001	0.076
0.0025	0.121
0.005	0.201
0.01	0.36
0.05	0.59
0.1	



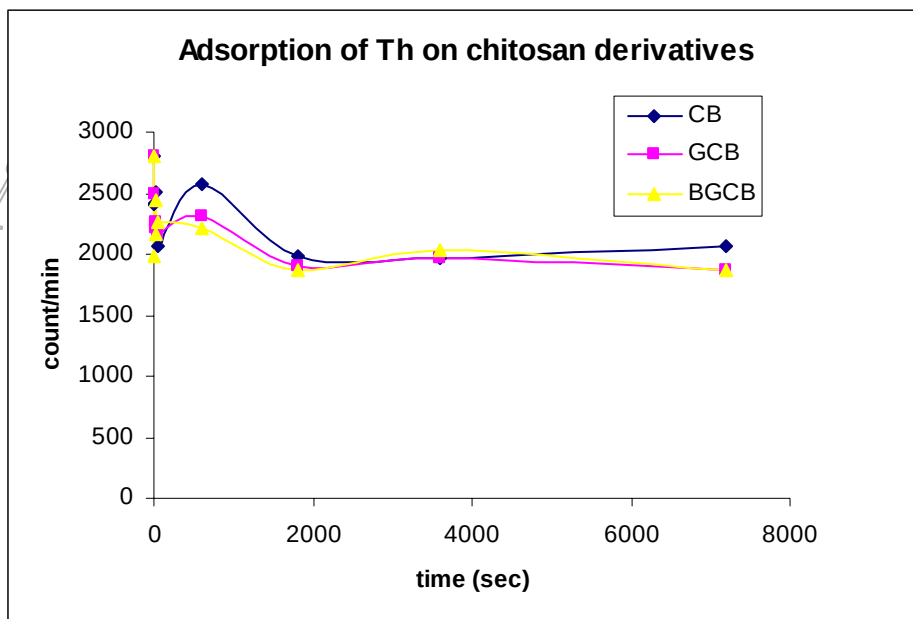
Standard Rh curv 543 nm (UV-vis 1600)

Conc. um	Abs
0.01	0.01
0.05	0.01
0.1	0.064
0.5	0.154
1	0.327
2	0.67



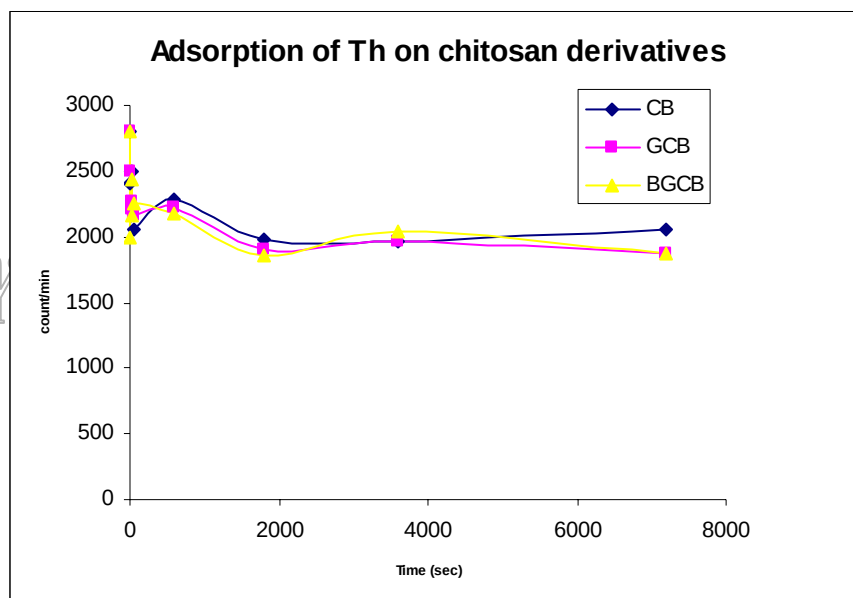
ผลการทดลอง การดูดซับ Thoriunnitrate ของไคโตซาน

เวลาในการ ดูดซับ	CB			GCB			BGCB		
	(g)	CPMA	CPMB	(g)	CPMA	CPMB	(g)	CPMA	CPMB
0	0.2073	2886	2809	-	2886	2809		2886	2809
10	0.208	2466	2402	0.2075	2560	2496	0.2028	2046	1989
20	0.2131	2571	2503	0.2079	2484	2212	0.2057	2510	2436
30	0.2061	2269	2207	0.2152	2329	2267	0.212	2235	2160
60	0.2067	2114	2061	0.2068	2222	2164	0.2061	2321	2256
600	0.2067	2640	2573	0.2185	2326	2312	0.2049	2327	2211
1800	0.2031	2010	1982	0.206	1992	1897	0.2087	1932	1865
3600	0.2131	2000	1966	0.2056	2010	1970	0.2064	2102	2040
7200	0.2064	2115	2061	0.2049	1922	1871	0.2088	1928	1875



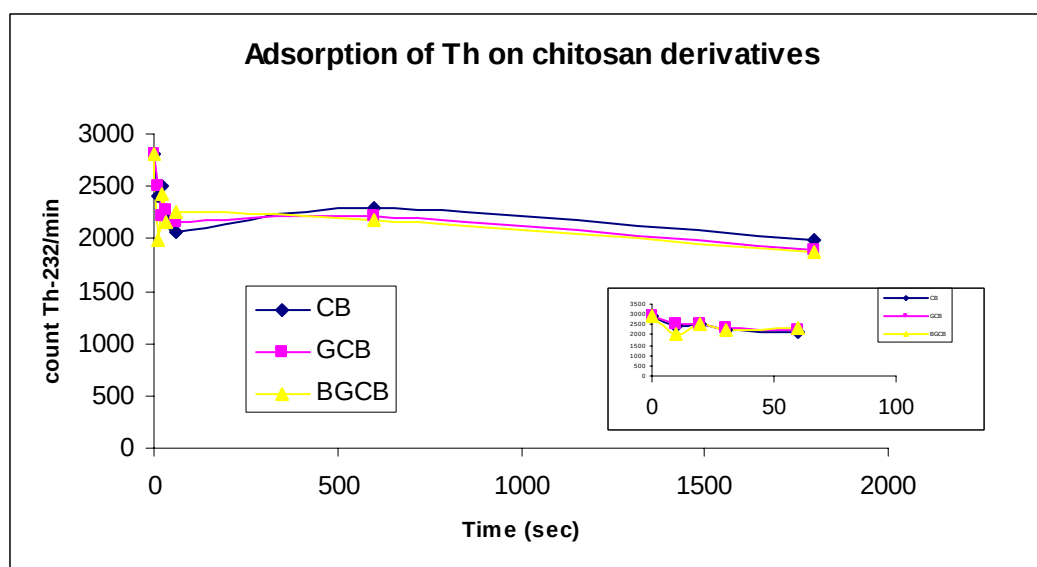
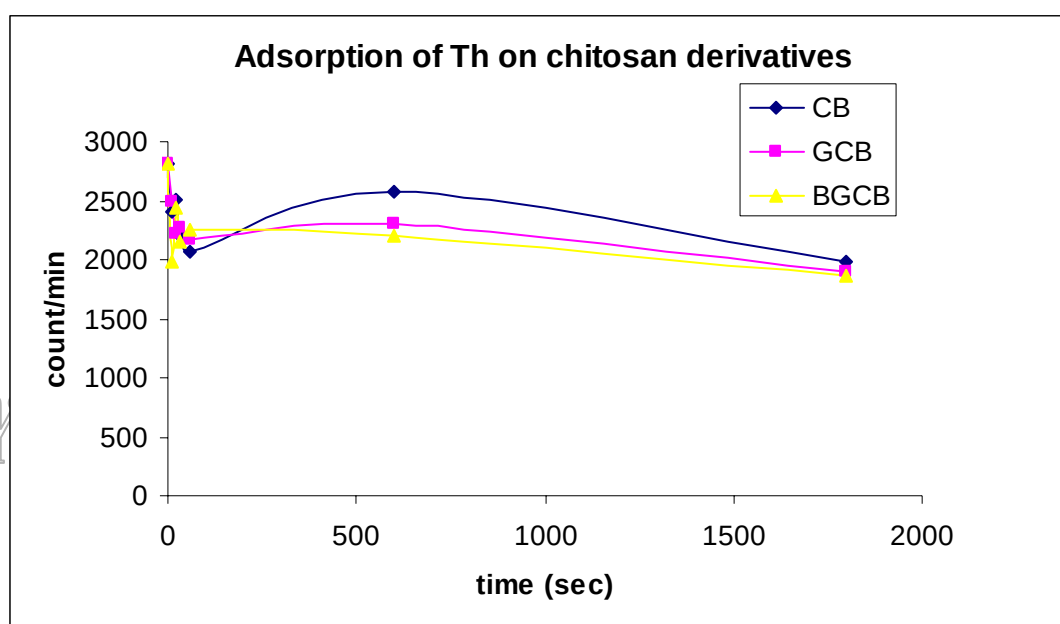
ผลการทดลอง การดูดซับ Thoriunnitrate ของไคโตซาน

เวลาในการดูดซับ	CB			GCB			BGCB		
	(g)	CPMA	CPMB	(g)	CPMA	CPMB	(g)	CPMA	CPMB
0	0.2073	2886	2809	-	2886	2809		2886	2809
10	0.208	2466	2402	0.2075	2560	2496	0.2028	2046	1989
20	0.2131	2571	2503	0.2079	2484	2212	0.2057	2510	2436
30	0.2061	2269	2207	0.2152	2329	2267	0.212	2235	2160
60	0.2067	2114	2061	0.2068	2222	2164	0.2061	2321	2256
600	0.2067	2640	2284	0.2185	2326	2222	0.2049	2327	2182
1800	0.2031	2010	1982	0.206	1992	1897	0.2087	1932	1865
3600	0.2131	2000	1966	0.2056	2010	1970	0.2064	2102	2040
7200	0.2064	2115	2061	0.2049	1922	1871	0.2088	1928	1875



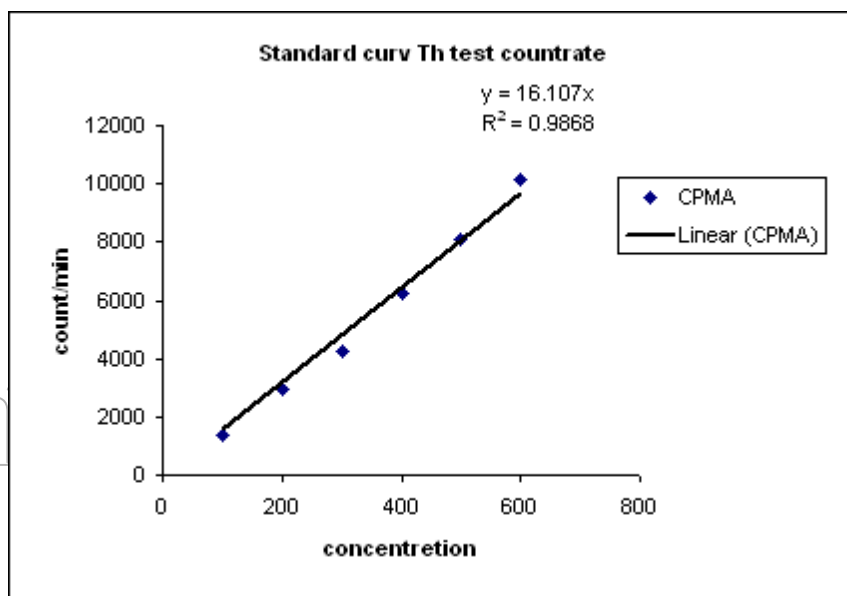
ผลการทดลอง การดูดซับ Thoriunnitrate ของไคโตซาน

เวลาในการดูดซับ	CB (g)	CPMA	CPMB	GCB (g)	CPMA	CPMB	BGCB (g)	CPMA	CPMB
0	0.2073	2886	2809	-	2886	2809		2886	2809
10	0.208	2466	2402	0.2075	2560	2496	0.2028	2046	1989
20	0.2131	2571	2503	0.2079	2484	2212	0.2057	2510	2436
30	0.2061	2269	2207	0.2152	2329	2267	0.212	2235	2160
60	0.2067	2114	2061	0.2068	2222	2164	0.2061	2321	2256
600	0.2067	2640	2573	0.2185	2326	2312	0.2049	2327	2211
1800	0.2031	2010	1982	0.206	1992	1897	0.2087	1932	1865

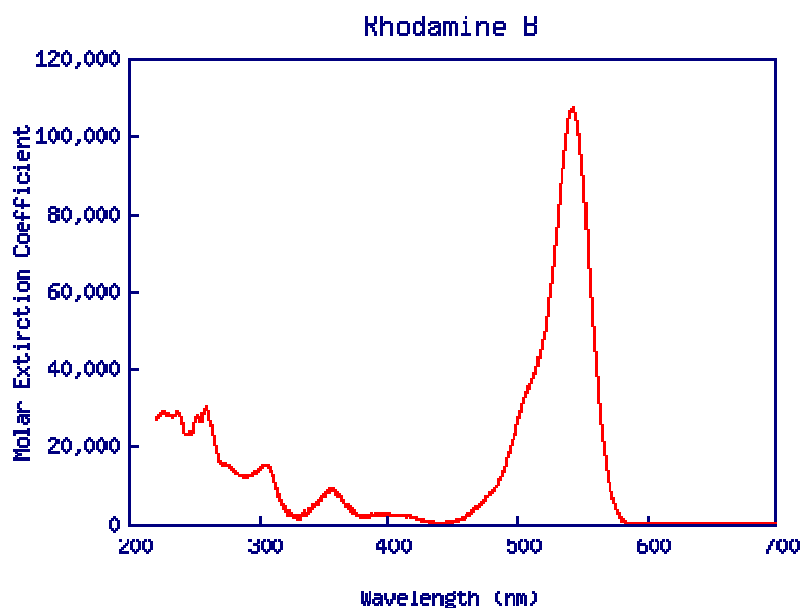


Standard curv Th test countrate

Stock Th 1g/5ml micro Lit	cocktail ml	CPMA	CPMB
100	5	1361.8	1328.8
200	5	2981.6	2852.6
300	5	4285	4266
400	5	6236.6	6072
500	5	8091.8	7881.4
600	5	10164.6	9917.2



Absorption



This is a graph of the molar extinction coefficient of Rhodamine B dissolved in ethanol. It was measured by R. A. Fuh on 6/20/95 [[H. Du, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey, "PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry," *Photochemistry and Photobiology*, 68, 141-142, 1998](#)]. Rhodamine B has a molar extinction coefficient of 106,000 M⁻¹cm⁻¹ at 542.75 nm [anonymous, "Eastman Laboratory Chemicals Catalog No," 1993].

The fluorescence yield is reported to be 0.65 in basic ethanol [R. F. Kubin and A. N. Fletcher, "Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes.," *J. Luminescence*, 27, 455-462, 1982], 0.49 in ethanol [K. G. Casey and E. L. Quitevis, "Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols," *J. Phys. Chem.*, 92, 6590-6594, 1988], 1.0 [R. E. Kellogg and R. G. Bennett, "Radiationless intermolecular energy transfer. III. Determination of phosphorescence efficiencies," *J. Chem. Phys.*, 41, 3042-3045, 1964], and 0.68 in 94% ethanol [M. J. Snare, F. E. Treloar, K. P. Ghiggino, and P. J. Thistlethwaite, "The photophysics of rhodamine B.," *J. Photochem.*, 18, 335-346, 1982]. The fluorescence yield is temperature dependent [T. Karstens and K. Kobs, "Rhodamine B and Rhodamine 101 as reference substances for fluorescence quantum yield measurements.," *J. Phys. Chem.*, 84, 1871-1872, 1980].

ABSTRACT SUBMISSION

Presentation

Both oral and poster presentations are welcome. The official language of the Congress is English. Submission of an abstract is required in the same format for oral and poster presentations.

Oral presentations

Time limits of 15 minutes will be strictly enforced: 12 minutes for presentation and 3 minutes for questions. Computers, overhead and LCD projectors will be provided. If you are making a Powerpoint presentation, please bring a CD with your presentation on it to the staff. We will load your file onto a computer to ensure that it works.

Poster presentations

Posters will be on display for the duration of the Congress. Maximum size of poster is 1.0 m (h) by 0.7 m (w). The following guidelines are offered for preparation of posters:

- Information should be mainly visual;
- Posters should include the title, author(s) names & organizations;
- Methods should be kept to a minimum;
- Objectives and conclusions must be clear; and Text should be kept to a minimum

Abstract Submission

Preparation of Abstracts

Abstracts must be submitted in the required format, which can be downloaded from the website:

<http://www.biology.sc.chula.ac.th/bsgc11>

An example is enclosed below.

- Abstracts must be written in **English** (use **.doc** file format).
- The format is a single A4 page, with 2.5 cm margins
- Abstract must not exceed **300 words**.
- Use font **Times New Roman 11 pt.** and single-space throughout the whole document.
- **Underline** the name and email address of presenting author.
- No references should be cited in the abstract.

Submission

The abstract format can be downloaded from the website. Abstracts will not be included in the Book of Abstracts unless they are accompanied by a complete and paid registration fee, and submitted electronically in the required format by **September 30, 2006**.

Abstracts will not be accepted after the deadline.

Abstract should be submitted by e-mail to the Congress secretariat: **bsgc11@yahoo.com**.

I am submitting an abstract for the 11th Biological Science Graduate Congress.

Title: *Derivatization of Chitosan with Benzaldehyde and Its Use in Removing Copper(II) and Phosphate from Water*

Authors (include full list): **Sang-urai, S., Kamolchote, K., and Pewnim, T.**

I prefer my presentation to be: Oral x Poster Session: _____

I need special audio/ visual equipment-
specify: _____

(All Congress rooms will have standard equipment for Powerpoint and Overhead transparencies)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ABSTRACT SUBMISSION FORM

(Please use **11 pt. Times New Roman** font. Follow example below)

Name: Sarawoot Sang-urai

Education (degree/field/institution): M.Sc. in Chemical Education, Silpakorn University

Present Research Topic(s): Isolation of a biopolymer from crustaceans, its derivatization and uses in adsorption of some chemicals

Contact Address: Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, 7300, Thailand

Title: **Derivatization of Chitosan with Benzaldehyde and Its Use in Removing Copper(II) and Phosphate from Water**

Sang-urai, S.¹, Kamolchote, K.¹, and Pewnim, T.¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, 7300, Thailand research.sensei@gmail.com

Text: **Maximum 300 words.**

Derivatization of Chitosan with Benzaldehyde and Its Use in Removing Copper(II) and Phosphate from Water

Sang-urai, S.¹, Kamolchote, K.¹, and Pewnim, T.¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, 7300, Thailand research.sensei@gmail.com

Chitin is a natural biopolymer found abundantly as a major constituent of the exoskeleton of crustaceans and insects. Deacetylation of chitin into chitosan results in a modified polymer having wide applications. These include agriculture, food industry, biotechnology, pharmaceutical industry, textiles, polymers, and water treatment. Once the acetyl group is removed from each building block of chitin, the N-acetyl- β -glucosamine, the new polymer has a large number of amino groups available for derivatization. In this study chitosan was first dissolved in 1.0 % (w/v) acetic acid before being forced to drop from a syringe tip into a solution of 0.2M NaOH to obtain chitosan beads (CB). The size of chitosan beads could be controlled by using different syringe sizes as well as varying the speed in which chitosan flowed from the syringe. The polymers of chitosan beads were cross-linked using glutaraldehyde, whereby one aldehyde group of glutaraldehyde formed a covalent bond to an amino group of chitosan while another aldehyde group of the glutaraldehyde formed another covalent bond to another amino group of chitosan. Scanning electron microscopy revealed that the glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (GCB) were more compact. Some of the GCB beads were further derivatized using benzaldehyde to form benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB). In this case the aldehyde groups of benzaldehyde molecules formed covalent bonds to the remaining amino groups of chitosan, leaving the many aromatic groups protruding out from the polymer chains. When CB, GCB, and BGCB were tested for their abilities to remove copper(II) and phosphate ions from water it was found that BGCB could remove both ions relatively well while CB and GCB had little effect. This result implicated the role of an additional functional group in chitosan for the removal of copper(II) and phosphate ions.



Derivatization of Chitosan with Benzaldehyde and Its Use in Removing Copper(II) and Phosphate from Water

Sang-urai, S., Kamolchote, K. and Pewnim, T.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, 73000, Thailand. E-mail: research.sensei@gmail.com

Chitin is a natural biopolymer found abundantly as a major constituent of the exoskeleton of crustaceans and insects. Deacetylation of chitin into chitosan results in a modified polymer having wide applications. These include agriculture, food industry, biotechnology, pharmaceutical industry, textiles, polymers, and water treatment. Once the acetyl group is removed from each building block of chitin, the N-acetyl- β -glucosamine, the new polymer has a large number of amino groups available for derivatization. In this study chitosan was first dissolved in 1.0 % (w/v) acetic acid before being forced to drop from a syringe tip into a solution of 0.2M NaOH to obtain chitosan beads (CB). The size of chitosan beads could be controlled by using different syringe sizes as well as varying the speed in which chitosan flowed from the syringe. The polymers of chitosan beads were cross-linked using glutaraldehyde, whereby one aldehyde group of glutaraldehyde formed a covalent bond to an amino group of chitosan while another aldehyde group of the glutaraldehyde formed another covalent bond to another amino group of chitosan. Scanning electron microscopy revealed that the glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (GCB) were more compact. Some of the GCB beads were further derivatized using benzaldehyde to form benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB). In this case the aldehyde groups of benzaldehyde molecules formed covalent bonds to the remaining amino groups of chitosan, leaving the many aromatic groups protruding out from the polymer chains. When CB, GCB, and BGCB were tested for their abilities to remove copper(II) and phosphate ions from water it was found that BGCB could remove both ions relatively well while CB and GCB had little effect. This result implicated the role of an additional functional group in chitosan for the removal of copper(II) and phosphate ions.



Derivatization of Chitosan with Benzaldehyde and Its Use in Removing Copper(II) and Phosphate from Water

Sang-urai, S.¹, Kamolchote, K.¹, and Pewnim, T.¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, 73000, Thailand, research.sensei@gmail.com

Abstract : Chitin is a natural biopolymer found abundantly as a major constituent of the exoskeleton of crustaceans and insects. Deacetylation of chitin into chitosan results in a modified polymer having wide applications. These include agriculture, food industry, biotechnology, pharmaceutical industry, textiles, polymers, and water treatment. Once the acetyl group is removed from each building block of chitin, the N-acetyl- β -glucosamine, the new polymer has a large number of amino groups available for derivatization. In this study chitosan was first dissolved in 1.0 % (w/v) acetic acid before being forced to drop from a syringe tip into a solution of 0.2M NaOH to obtain chitosan beads (CB). The size of chitosan beads could be controlled by using different syringe sizes as well as varying the speed in which chitosan flowed from the syringe. The polymers of chitosan beads were cross-linked using glutaraldehyde, whereby one aldehyde group of glutaraldehyde formed a covalent bond to an amino group of chitosan while another aldehyde group of the glutaraldehyde formed another covalent bond to another amino group of chitosan. Scanning electron microscopy revealed that the glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (GCB) were more compact. Some of the GCB beads were further derivatized using benzaldehyde to form benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB). In this case the aldehyde groups of benzaldehyde molecules formed covalent bonds to the remaining amino groups of chitosan, leaving the many aromatic groups protruding out from the polymer chains. When CB, GCB, and BGCB were tested for their abilities to remove copper(II) and phosphate ions from water it was found that BGCB could remove both ions relatively well while CB and GCB had little effect. This result implicated the role of an additional functional group in chitosan for the removal of copper(II) and phosphate ions.

Introduction : Chitin, the source material of chitosan, can be extracted from shell of crabs, shrimps or arthropods. Unlike chitin, chitosan is soluble in acidic solutions. Chitosan contains primary amino groups which are useful for modifications. Chitosan has an interesting property in being able to bind several transition metal and alkaline-earth metal ions.

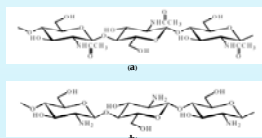


Fig. 1 Structure of (a) Chitin (b) Chitosan

The adsorption of these ions strongly depends on the pH values of the solutions. It was also reported that chitosan has a high chelating ability comparing to other natural polymers generated from wastes occurred in seafood processing. Therefore, much attention has been drawn to this polymer in order to improve its properties.

Methodology

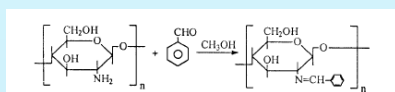


Fig. 2 Preparation of a chitosan derivative with benzaldehyde

Chitosan was first dissolved in 1.0 % (w/v) acetic acid before being forced to drop from a syringe tip into a solution of 0.2M NaOH to obtain chitosan beads. The polymers of chitosan beads were cross-linked using glutaraldehyde resulted in glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (GCB). A portion of GCB was further derivatized by benzaldehyde to form benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB) as shown in Fig.2. Normal chitosan beads (CB), GCB, and BGCB were examined under scanning electron microscope (SEM). CB, GCB, and BGCB were tested for their abilities to adsorb Cu(II) and phosphate ions.

Results, Discussion and Conclusion :



Fig. 3 Characteristics of chitosan derivatives: (a) chitosan beads, CB (b) glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, GCB and (c) benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, BGCB.

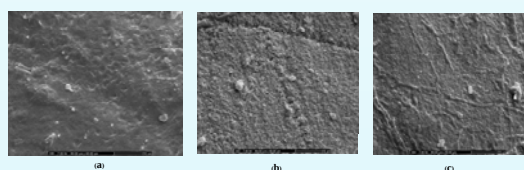


Fig. 4 Surface morphology of chitosan derivatives taken by SEM: (a) chitosan beads, CB (b) glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, GCB and (c) benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, BGCB.

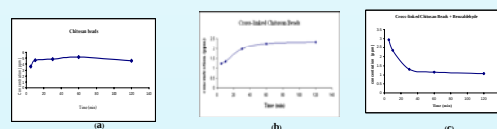


Fig. 5 Removal of phosphate ions from water by chitosan beads at pH 6.5 and at room temperature: (a) Chitosan beads, CB (b) Glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, GCB (c) Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, BGCB.

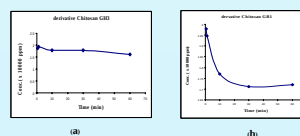


Fig. 6 Removal of Cu(II) ions from water by chitosan beads at pH 6.5 and at room temperature: (a) Glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, GCB (b) Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, BGCB.

Surface morphology of chitosan derivatives as shown in Fig.4 revealed that the cross-linked by glutaraldehyde (GCB) must have brought chains of chitosan polymers close to one another. The matrix of the polymers in GCB seemed to be more compact than CB. The degree of compactness appeared to increase when the GCB is further derivatized using benzaldehyde (BGCB). This increase in the degree of compactness is most likely due to the additional phenyl groups filling the spaces of polymer matrix. The findings that BGCB could bind copper(II) and phosphate ions much better than CB and GCB could also be explained by the tightness of the polymer matrix. We can, therefore, implicate the role of this additional functional group in increasing the physical adsorption of the phosphate and Cu(II) ions in water. Further works should be carried out to explore the potential of BGCB in water treatments.

References

- Becker, T.Schlaak, M.Strasdeit, H. *Reactive and Polymers* 44 (2000)289-298
- Y. Baba, H. Noma, R. Nakayama and Y. Matsushita. *Analytical Science*, 18(2002) 359-361
- R. Juang, F. Wu, R. Tseng. *Advances in Environmental Research*, 6 (2002) 171-177

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ

นายศราวุธ แสงอุไร

วัน เดือน ปีเกิด

7 กุมภาพันธ์ 2517

สถานที่เกิด

จังหวัดราชบุรี

ประวัติการศึกษา

อนุปริญญาวิทยาศาสตร สาขาเคมีปฏิบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ วิทยาลัยครูหมู่บ้านจอมบึง พ.ศ. 2537

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2540

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์