

บทที่ 1

บทนำ

1.1 แหล่งที่มาและองค์ประกอบของไคติน และไคโตซาน (Source and Occurrence of Chitin and Chitosan)

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตหลายรูปแบบ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot ได้แยกไคตินจากเห็ดและเรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่า fungine ในราวปี ค.ศ. 1823 พอลิเมอร์ชนิดนี้ถูกเรียกว่า ไคติน โดย Oddier คำว่าไคตินมาจากคำว่า “chiton” ในภาษากรีกซึ่งหมายความว่าเกราะหุ้ม¹

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (cellulose) จัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ พอลิเมอร์ทั้งสองนี้ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างป้องกัน และสร้างความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยไคตินจะพบในโครงสร้างปีกของแมลงเปลือกนอกของสัตว์จำพวกกุ้ง ปู หอย แคนปลาหมึก^{2,3} และเปลือกกุ้ง นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของพวกยีสต์ เห็ดรา จุลินทรีย์หลายชนิด และสาหร่ายบางพันธุ์ (ดูตารางที่ 1.1) แสดงแหล่งและองค์ประกอบของไคตินในสิ่งมีชีวิต³⁻⁷ เนื่องจากไคตินเป็นสารธรรมชาติจึงพบอยู่ในรูปของสารประกอบที่ปนอยู่กับสารอื่น เช่น เปลือกหุ้มแข็งของแมลงจะประกอบด้วยไคตินในรูปของไคติน-โปรตีน (chitin-protein complex) ขณะที่เปลือกของสัตว์พวกกุ้ง ปู และหอยจะพบแคลเซียมคาร์บอเนตนอกเหนือจากโปรตีน และในผนังเซลล์ของเห็ดราไคตินจะอยู่ร่วมกับสารอินทรีย์อื่นๆ

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน เตรียมได้จากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่แอซทิล (deacetylation) ของไคติน ถูกค้นพบครั้งแรกโดยบังเอิญในปี ค.ศ. 1859 โดย Rouget ได้ทำการทดลองโดยต้มไคตินในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น⁸

ตารางที่ 1.1 แหล่งและองค์ประกอบของไคตินในสิ่งมีชีวิต

Organism	Structure	Chitin		Other components	
		%Organic fraction	Crystal type	Inorganic	Organic
FUNGI Ascomyceta Basidiomyceta Phycomyceta Imperfecti	cell walls and structural membranes of mycelia stalks and spores	traces-45		--	polysaccharids such as glucans or mannans
ALGAE Chlorophyceae	cell wall	+	-	--	cellulose
PROTOZOA Rhizopoda: Pelomyxa Plagiopyxidae Allogromia Ciliata	cyst wall shell shell cyst wall	+ + + +	- - - -	-- silica iron --	-- -- proteins and lipids proteins

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Organism	Structure	Chitin		Other components	
		%Organic fraction	Crystal type	Inorganic	Organic
CANIDARIA					
Hydrozoa:		3.2-30.3	α	--	proteins and sometimes tanned
Hydroidea	perisarc	+	α	--	--
Milleporina	coenosteum	+	α	CaCO ₃	--
Siphonophora	pneumatophore	+	-	--	proteins
Anthozoa	skeleton	+	-	CaCO ₃	proteins
Acyphozoa	podocyst	+	-	-	proteins
ASCHELMINTHES					
Rotifera	egg envelope (inner	14.6	-	--	proteins
Nematoda	membrane)	16.6	-	--	proteins
Acanthocephala	egg capsule (middle	+	-	--	--
Priapulida	membrane)	+	-	--	tanned proteins
	egg capsule				
	cuticle				

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Organism	Structure	Chitin		Other components	
		%Organic fraction	Crystal type	Inorganic	Organic
ENDOPROCTA	cuticle	+	-	--	tanned proteins
BYOZOA	ectocyst	1.6-6.4	-	CaCO ₃	proteins
PHORONIDA	tubes	13.5	-	--	proteins
BRACHIOPODA Articulata Inarticulata	stalk cuticle	3.8	-	--	--
	stalk cuticle	+	γ	--	collagen
	shell	29.0	β	CaCO ₃	--
ANNELIDA	chaetae	20.0-38.0	β	--	quinone-tanned ,proteins
Polychaeta	jaws (Eunicidae)	0.28	-	unidentified	proteins
Oligochaeta	chaetae;gizzard cuticle	+	β	--	--
All	peritrophic membrane	+	-	--	proteins

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Organism	Structure	Chitin		Other components	
		%Organic fraction	Crystal type	Inorganic	Organic
MOLLUSCA Polyplacophora	shell plates;mantle bristles	12.0	-	CaCO ₃	proteins
	radula	+	-	Iron	proteins
Gastropoda	shell (mother of pearl)	3.0-7.0	-	CaCO ₃	conchiolin
	radula	19.7	-	Fe and Si	tanned proteins
Cephalopoda	jaws	+	-	--	tanned proteins
	stomachal plates	36.8	-	--	tanned proteins
	(Opisthobranchia)	3.5-26.0	β	CaCO ₃	conchiolin
	calcified shell	17.9	β	--	conchagen
	pen (Loligo Octopus)	19.5	α	--	tanned proteins
	jaws and radula	-	γ	--	--
	stomach cuticle				

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Organism	Structure	Chitin		Other components	
		%Organic fraction	Crystal type	Inorganic	Organic
Lamelibranchia	periostracum	0.7-3	-	CaCO ₃	proteins
	prisms	traces-0.2	-	CaCO ₃	conchiolin
	shell mother of pearl	0.1-1.2	-	CaCO ₃	conchiolin
	calciostracum	0.2-8.3	-	CaCO ₃	conchiolin
	gastric shield	17.3	-	--	--
ARTHROPODA					
Crustacea	calcified cuticle	58.0-85.0	α	CaCO ₃	arthropodins+sclerotins (10-32%)
Diplopoda	intersegmental membranes	48.0-80.0	α	--	arthropodins (23-51%)
Insecta	hardened cuticle	20.0-60.0	α	--	arthropodins+sclerotins (40-76%)
Arachnida					

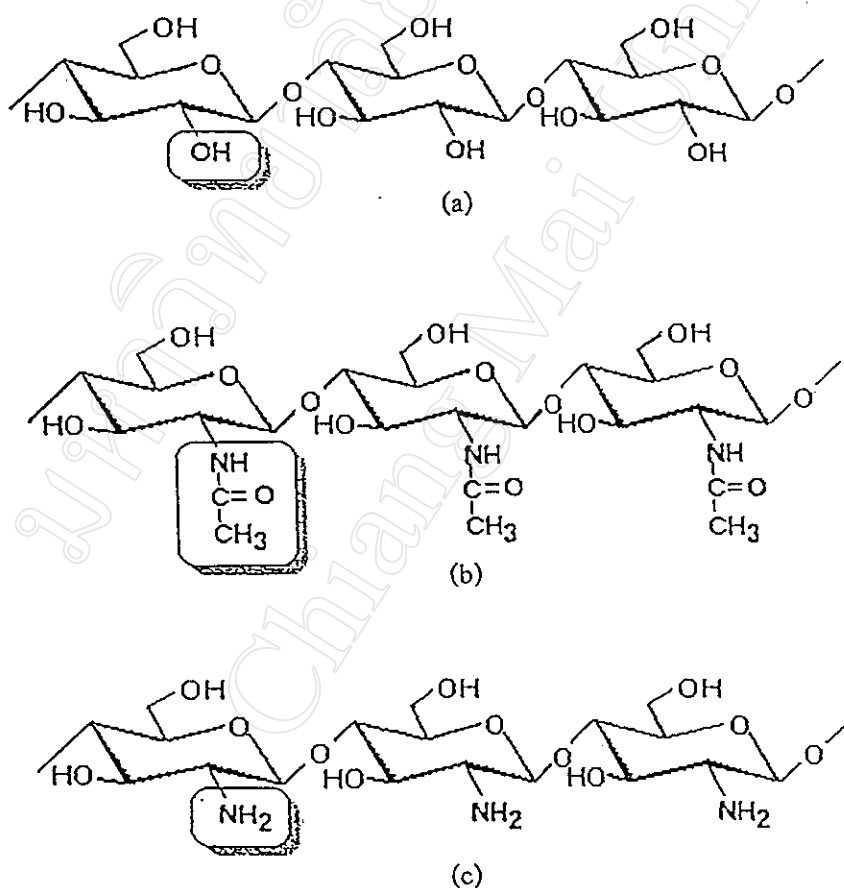
ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Organism	Structure	Chitin		Other components	
		%Organic fraction	Crystal type	Inorganic	Organic
Chilopoda	unhardened cuticle	20.0-60.0	α	--	Arthropodins (in some part) + resilin
All	peritrophic membrane	3.8-22.0	-	--	protein 21-475 + mucins
CHAETOGNATHA	grasping spines	+	-	--	--
POGONOPHORA	tubes	33.0	β	--	proteins (47%)
TUNICATA	peritrophic membrane	+	-	--	--

- + คือ มีแต่ไม่ระบุ % Organic fraction ที่พบ
- คือ ไม่พบชนิดของผลึกที่เป็น α β และ γ
- คือ ไม่พบสาร inorganic หรือ สาร organic

1.2 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน (Chemical structure of Chitin and Chitosan)

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายโซ่ตรงและมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายเซลลูโลส ต่างกันตรงหน่วยย่อย (monomer) ของเซลลูโลสเป็น D-glucose ส่วนหน่วยย่อยของไคติน คือ N-acetyl-D-glucosamine (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกลูโคส โดยชื่อทางเคมีของไคติน คือ poly- β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose ไคโตซานคือไคตินในรูปที่มีปริมาณหมู่แอมิโนเกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่แอมิโนของไคตินด้วยสารละลายด่างเข้มข้น ทำให้โครงสร้างทางเคมีของไคตินเปลี่ยนไป โดยหมู่แอมิโด (-NHCOCH₃) เปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน (-NH₂) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังนั้นไคโตซาน คือ พอลิเมอร์ของ D-glucosamine ที่มีชื่อทางเคมีว่า poly- β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose (ดูรูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ เซลลูโลส (a) ไคติน (b) และไคโตซาน (c)⁹

1.3 สมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของไคติน และไคโตซาน (Chemical and Physical properties of Chiton and Chitosan)

สมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของไคตินและไคโตซานที่สำคัญมีดังนี้ คือ

1.3.1. การละลาย (Solubility)^{1,2,10,11}

ไคตินไม่ละลายน้ำ กรดเจือจาง ค่างเจือจาง ค่างเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่ไคตินสามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น กรดซัลฟิวริกเข้มข้น กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 78-97%w/v กรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ (anhydrous formic acid) และ DMAc-LiCl (N,N-Dimethylacetamide-lithium chloride) เนื่องจากโมเลกุลของไคตินมีลักษณะเป็นสายโซ่ที่อยู่กันอย่างหนาแน่นมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล จากหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เอซีตามิโดจึงทำให้ไคตินละลายในตัวทำละลายต่างๆ ได้ยาก ส่วนกรณีของไคโตซานก็เช่นเดียวกันจะไม่ละลายน้ำ ค่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มีพีเอช (pH) น้อยกว่า 6 เช่น กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิกเป็นกรดที่นิยมใช้ในการละลายไคโตซาน กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก สามารถละลายไคโตซานได้ที่อุณหภูมิไม่สูงมาก นอกจากนี้ หมู่เอมีโนของไคโตซานสามารถที่จะแตกตัวได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pKa) อยู่ในช่วง 6.2-6.8 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุพอลิเมอร์

1.3.2 การหมุนจำเพาะ (Specific rotation)^{1,11,12}

ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เริ่มแรกไคตินมีค่าการหมุนจำเพาะเป็น -14° จากนั้นค่านี้จะเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเป็น $+56^\circ$ การเปลี่ยนแปลงนี้บ่งชี้ถึงลักษณะของการเชื่อมต่อนพันธะแบบ β -D-linkage ตรง anomeric carbon การหมุนระนาบของแสงโพลาไรซ์ (polarized light) เป็นมุมเล็กหรือใหญ่นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่อไปนี้

1. โครงสร้างโมเลกุลของอิแนนทิโอเมอร์ (enantiomer)
2. อุณหภูมิ
3. ความยาวคลื่น(λ)
4. จำนวนโมเลกุลตามทางที่แสงเดินทางผ่าน

ความยาวของคลื่นแสงที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือ $5,893 \text{ \AA}$ ซึ่งเป็นแสงจากหลอดแสงโซเดียม ค่าการหมุนจำเพาะมีสัญลักษณ์เป็น $[\alpha]$ คือ จำนวนองศาของมุมที่เปลี่ยนไปเมื่อแสงโพลาไรซ์ผ่านสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในหลอดโพลาไรมิเตอร์ยาว 1 เดซิเมตร การคำนวณค่าการหมุนจำเพาะมีสูตร ดังนี้ คือ

$$[\alpha] = \alpha \text{ (จากการทดลอง)} / c \times l$$

เมื่อ α คือ จำนวนองศาของมุมที่อ่านได้จากการทดลอง

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย มีหน่วยเป็นกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

l คือ ความยาวของหลอดโพลาไรมิเตอร์ มีหน่วยเป็นเดซิเมตร

เนื่องจากการหมุนจำเพาะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความยาวของคลื่นแสง ดังนั้นการวัดค่าการหมุนจำเพาะต้องระบุอุณหภูมิ และความยาวคลื่นแสงด้วย

1.3.3 ความร้อนในการกระตุ้นให้เกิดการสลายพันธะแบบไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Heat of Activation)

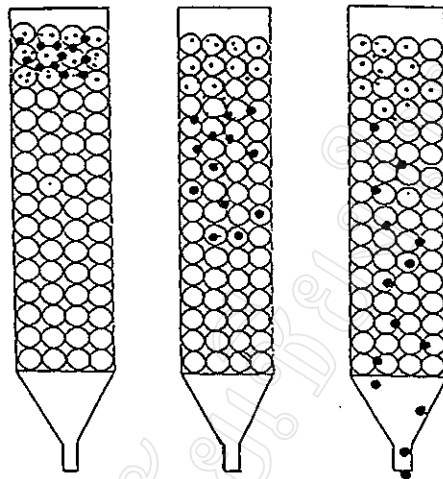
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นปฏิกิริยาการสลายพันธะที่มีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้องโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สายโซ่ของพอลิเมอร์ของไคตินมีลักษณะเช่นเดียวกันกับเซลลูโลส คือเป็นพันธะ glycosidic linkage แบบ β -(1 $\rightarrow$ 4) ดังนั้นความร้อนในการกระตุ้นให้เกิดการสลายพันธะแบบไฮโดรไลซิส ของไคตินมีค่าประมาณ 29 กิโลแคลอรี

1.3.4 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

ในธรรมชาติไคตินจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า 1×10^6 ในขณะที่โมเลกุลของไคโตซานจะมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 1×10^5 - 1.2×10^6 ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการผลิต เนื่องจากไคตินและไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยเล็กๆที่เหมือนกัน (repeat unit) ต่อกันหลายๆหน่วย และเรียกจำนวนหน่วยเล็กๆที่เหมือนกันทั้งหมดว่า “Degree of Polymerisation” (DP) ดังนั้นจึงทำให้เกิดการกระจายของหน่วยเล็กๆที่เหมือนกันในสายโซ่โมเลกุล ซึ่งทำให้น้ำหนักโมเลกุลเกิดกระจายตามไปด้วย สำหรับวิธีที่ใช้น้ำหนักโมเลกุลของไคตินและไคโตซาน มีด้วยกันหลายวิธี เช่น HPLC (High Performance Liquid Chromatography)¹³, Light scattering¹⁴, GPC (Gel-Permeation Chromatography)¹⁵, Electrophoresis¹⁶ และ Viscometry¹⁷⁻²⁰ แต่วิธีที่นิยมใช้น้ำหนักโมเลกุลของไคตินและไคโตซาน คือวิธี GPC และ viscometry

สำหรับวิธี GPC นี้เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีประสิทธิภาพที่เพิ่งจะนำมาพัฒนาใช้กับการแยกลำดับส่วนของพอลิเมอร์ โดยใช้หลักการของ molecular sieving เครื่องมือประกอบด้วยคอลัมน์บรรจุเจลซึ่งมักจะเป็นพอลิस्टาไรีนแบบร่างตาข่ายอึดตัวด้วยตัวทำละลาย ทำให้มีลักษณะพองเพราะดูดซึมตัวทำละลายไว้ทำให้เกิดมีช่องว่างภายในที่จะสามารถเก็บกักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่จะผ่านคอลัมน์ สารละลายของพอลิเมอร์จะแยกลำดับส่วน โดยผ่านคอลัมน์ลงไปยังโมเลกุลของพอลิเมอร์สามารถที่จะซึมผ่านเข้าไปภายในเจลแต่ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ และขนาดช่องว่างภายในเจล ส่วนใหญ่แล้วโมเลกุลขนาดใหญ่ๆจะมีโอกาสซึมผ่านเข้าไปได้น้อยจึงมักจะผ่านคอลัมน์ออกมาเร็ว

โมเลกุลมีขนาดเล็กกว่าจะถูกเก็บกักไว้ภายในเจลได้มากกว่าจึงผ่านคอลัมน์ออกมาทีหลัง (ดูรูปที่ 1.2) ดังนั้นจึงทำให้สามารถแยกโมเลกุลขนาดต่างๆออกจากกันได้



รูปที่ 1.2 การแยกของพอลิเมอร์โดยผ่าน GPC คอลัมน์²⁰

ส่วนวิธี viscometry เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกกว่าวิธีอื่น ซึ่งเป็นการวัดความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (dilute-solution viscometry) ในการวัดความหนืดจะจับเวลาการไหลผ่านในท่อขนาดเล็ก (capillary) ของของเหลวที่มีปริมาตรคงที่ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่าวิสโคมิเตอร์ (viscometer) ซึ่งมีด้วยกันหลายแบบ ส่วนใหญ่จะใช้แบบ Ubbelohle viscometer และ Ostwald viscometer นอกจากปริมาตรคงที่แล้วอุณหภูมิก็มีผลต่อความหนืด ดังนั้นในการทดลองอุณหภูมิจะต้องคงที่โดยมีความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วง $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ จากเวลาที่สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นต่างๆที่มีปริมาตรคงที่เคลื่อนผ่านท่อขนาดเล็ก เรียกว่า flow time

เมื่อกำหนดให้ flow time ของตัวทำละลาย เป็น t_s

flow time ของสารละลายพอลิเมอร์เป็น t

และความเข้มข้นของสารละลาย พอลิเมอร์เจือจาง เป็น C

ดังนั้นสามารถที่จะคำนวณหาความหนืดในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

$$\text{ความหนืดสัมพัทธ์ (relative viscosity, } \eta_{\text{rel}}) = t/t_s \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{ความหนืดจำเพาะ (specific viscosity, } \eta_{\text{sp}}) = (t - t_s)/t_s \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{ความหนืดลด (reduce viscosity, } \eta_{\text{red}}) = \eta_{\text{sp}}/C \quad \dots\dots\dots(3)$$

ความหนืดอินฮีเรนต์ (inherent viscosity, η_{inh}) = $\ln \eta_{rel} / C$ (4)

จากค่า η_{red} และ η_{inh} นั้นจะสัมพันธ์กับค่าความหนืดแท้จริง (intrinsic viscosity, $[\eta]$) ซึ่งเป็นความหนืด ณ ความเข้มข้นเท่ากับศูนย์จากสมการของ Huggins จะได้

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / C = [\eta] + k [\eta]^2 C \text{(5)}$$

และจากสมการของ Kraemer จะได้

$$\eta_{inh} = (\ln \eta_{rel} / C) = [\eta] + k [\eta]^2 C \text{(6)}$$

เมื่อ k และ k เป็นค่าคงที่ขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ ชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่กำหนด

จากสมการของ Huggins และ Kraemer เมื่อสร้างกราฟระหว่าง η_{sp}/C กับ C และ $\ln \eta_{rel}/C$ กับ C จะได้ $[\eta]$ จากการทำ extrapolation ของกราฟทั้งสองไปยังความเข้มข้นเท่ากับศูนย์ (ดูรูปที่ 1.3) จากค่า $[\eta]$; Staudinger เป็นคนแรกที่เชื่อว่าจะสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย ต่อมา Mark-Houwink Sakurada เสนอความสัมพันธ์ซึ่งอยู่ในรูปสมการดังนี้

$$[\eta] = k M_v^a \text{(7)}$$

เมื่อ M_v คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยวิสกอสซิตี (viscosity – average molecular weight)

k คือ ค่าคงที่ขึ้นอยู่กับชนิดพอลิเมอร์ ชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่กำหนด

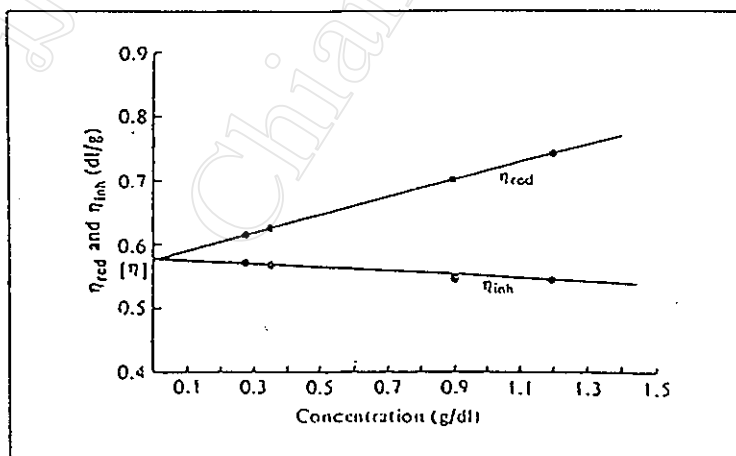
a คือ ค่าคงที่ แสดงถึงแรงที่กระทำระหว่างพอลิเมอร์กับตัวทำละลาย

ซึ่งค่า a จะทำให้พอลิเมอร์มีการจัดรูปโมเลกุลในลักษณะต่างๆ ได้แก่

$a = 0.1-0.4$ (weak interaction) เป็นวงกลม

$a = 0.5-0.7$ (middle interaction) เป็นแบบสุ่ม

และ $a = 0.8-1.0$ (good interaction) เป็นแบบเส้นตรง



รูปที่ 1.3 กราฟจากการทำ extrapolation ระหว่างกราฟ η_{sp}/C กับ C และ $\ln \eta_{rel}/C$ กับ C ไปยังความเข้มข้นเท่ากับศูนย์

จากสมการที่ (1)–(6) สามารถที่จะคำนวณค่า $[\eta]$ ได้จากการพลอตกราฟระหว่าง η_{red} และ η_{inh} กับความเข้มข้น ดังนั้นสามารถคำนวณหาหน้าหนักโมเลกุลเฉลี่ย โดยการแทนค่า $[\eta]$ ลงในสมการที่ (7) เมื่อทราบค่า K และ a จากสถานะที่ใช้ในหนังสืออ้างอิง และในการทดลองนี้ได้คำนวณหาหน้าหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไคโตซานด้วยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี และคำนวณหาหน้าหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตไคโตซานด้วยวิธีวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

1.3.5 องศาของการกำจัดหมู่แอซิติล (Degree of Deacetylation, DDA)

ความแตกต่างระหว่างไคติน และไคโตซานสามารถบ่งชี้ได้จาก องศาของการกำจัดหมู่แอซิติล เนื่องจากไคตินและไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างสองโมโนเมอร์ คือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่รวมกันของโมโนเมอร์แรกมากกว่า คือมีค่าองศาของการกำจัดหมู่แอซิติลต่ำ จะแสดงสมบัติเด่นของไคตินแต่ถ้าสัดส่วนที่อยู่รวมกันของโมโนเมอร์ที่สองมากกว่า คือมีค่าองศาของการกำจัดหมู่แอซิติลสูงจะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน ดังนั้นการหาค่าองศาของการกำจัดหมู่แอซิติลของไคโตซานจึงมีความจำเป็นในการเริ่มต้นใช้สารไคติน และไคโตซาน เนื่องจากองศาของการกำจัดหมู่แอซิติลที่ต่างกันจะให้สมบัติพื้นฐานบางประการที่แตกต่างกันออกไป เช่น สมบัติการละลาย องศาของการกำจัดหมู่แอซิติล สมบัติการสร้างพันธะไฮโดรเจนและสมบัติในเชิงการเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งวิธีคำนวณหาองศาของการกำจัดหมู่แอซิติล มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น tritration method²², colloidal tritration^{23,24}, pyrolysis mass spectroscopy²⁵, pyrolysis gas chromatography²⁶, elemental analysis²⁷, IR spectroscopy²⁸, GPC²⁹, UV spectrophotometry³⁰, enzyme method³¹, ¹H-NMR spectroscopy^{28,30}, solid state ¹³C-NMR spectroscopy^{32,33} และวิธี ninhydrin^{19,34,35} ตัวอย่างของการหาค่าองศาของการกำจัดหมู่แอซิติล มีดังนี้ คือ

1.3.5.1 การไทเทรตไคโตซานในรูปของเกลือไฮโดรโบไมด์และเกลือไฮโดรคลอไรด์

วิธีไทเทรตเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระในตัวอย่างไคโตซาน โดยทำให้หมู่อะมิโนอยู่ในรูปของเกลือไฮโดรโบไมด์ หรือไฮโดรคลอไรด์ และทำการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระหรือองศาของการกำจัดหมู่แอซิติลของไคโตซานได้จากสูตร

$$\% \text{ Degree of deacetylation} = (C \times V_1 \times V_2 \times MW \times 100) / 1000 \times V_3 \times W$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในหน่วยโมลต่อลิตร

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายไคโตซานไฮโดรโบไมด์ หรือไฮโดรคลอไรด์

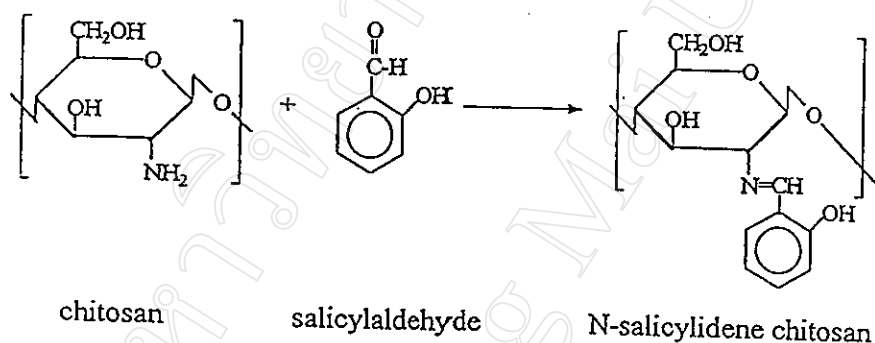
MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานไฮโดรโบรไมด์หรือไฮโดรคลอไรด์ในหนึ่งหน่วยที่ซ้ำกัน

V_3 คือ ปริมาตรของสารละลายไคโตซานไฮโดรโบรไมด์หรือไฮโดรคลอไรด์ที่ใช้ในการไทเทรต

W คือ น้ำหนักในหน่วยกรัมของไคโตซานไฮโดรโบรไมด์ หรือไฮโดรคลอไรด์ที่ละลายใน V_2

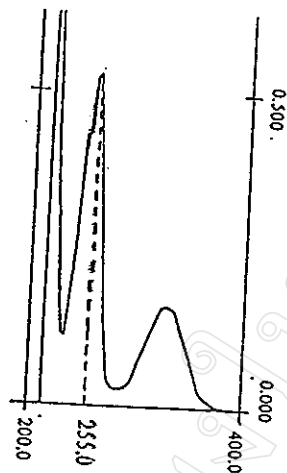
1.3.5.2 อัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมทรี (Ultraviolet Spectrophotometry, UV)

G.D.Julian และคณะได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของหมู่อะมีโนอิสระในไคโตซานด้วยวิธีทางอัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมทรี เนื่องจากไคโตซานมีหมู่อะมีโนในสายโซ่พอลิเมอร์ สามารถที่จะทำปฏิกิริยากับคีโตนหรือแอลดีไฮด์ให้อนุพันธ์ alkylidene และมีรายงานว่า salicyldehyde สามารถทำปฏิกิริยากับไคโตซานให้ผลิตภัณฑ์ N-salicylidene (ดูรูปที่ 1.4)



รูปที่ 1.4 ปฏิกิริยาของไคโตซานกับคีโตนหรือแอลดีไฮด์ให้อนุพันธ์ alkylidene

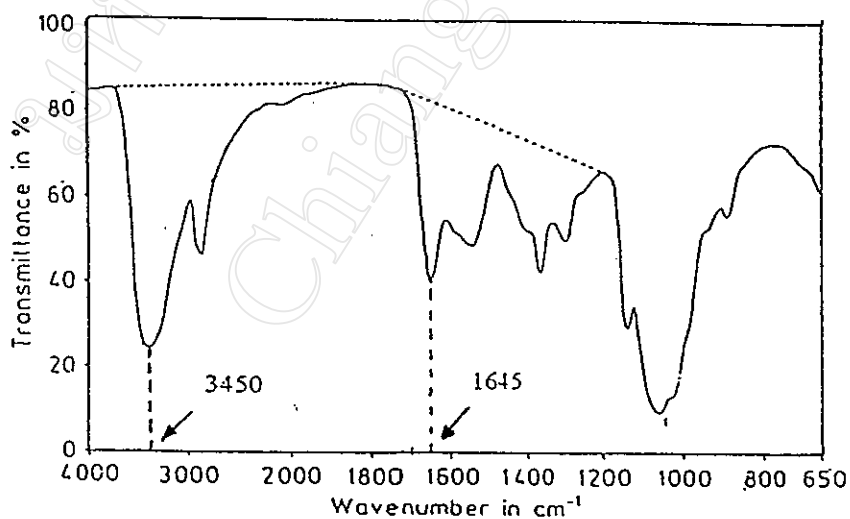
เมื่อใช้ปริมาณของ salicyldehyde มากเกินไปจะทำปฏิกิริยากับไคโตซานปริมาณที่เหลือของ salicyldehyde ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสามารถหาได้เนื่องจากปริมาณ salicyldehyde ดูดกลืนแสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 255 นาโนเมตร (ดูรูปที่ 1.5) ดังนั้นวิธีนี้สามารถที่จะหาองค์ประกอบของการกำจัดหมู่แอซิทิลของไคโตซานได้



รูปที่ 1.5 ยูวีสเปกตรัมของ salicylaldehyde

1.3.5.3 ฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

วิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโคปีสามารถใช้หาองค์ประกอบของการกำจัดหมู่แอซิติลของโคโคซานได้ เนื่องจากโคโคลินและโคโคซานมีความแตกต่างกันของหมู่เอมีนและหมู่แอซิติลโคโคโดยเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปของ dry film หรืออัดให้เป็นแผ่นด้วยเทคนิค KBr disc ซึ่งวิธีนี้เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของพื้นที่พีค หรือความสูงของพีคแถบเอไมด์ที่ 1655 cm^{-1} เทียบกับพื้นที่หรือความสูงของพีคที่คงที่ ได้แก่ พีคแถบไฮดรอกซิลที่ 3450 cm^{-1} เป็น internal standard ของตัวอย่างโคโคซาน (ดูรูปที่ 1.6)



รูปที่ 1.6 baseline ของอินฟราเรดสเปกตรัมในการวิเคราะห์ระดับความเป็นโคโคซานในรูปแบบของ Roberts

แม้ว่าการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโคปีจะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่การเลือกพีกที่วิเคราะห์จะต้องทำให้เหมาะสม เช่น วิธีของ Roberts ใช้กับองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลที่ต่ำกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ วิธีของ Miya เหมาะที่จะใช้กับตัวอย่างที่มีองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และวิธีของ Sannan เหมาะที่จะใช้กับตัวอย่างที่มีองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลเปอร์เซ็นต์ต่ำๆ

สำหรับตัวอย่างการคำนวณหาองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลของ Robert แสดงดังสมการ

$$\% \text{ Degree of deacetylation} = [1 - (A_{1655}/A_{3450}) \times (1/1.33)] \times 100$$

ซึ่ง A_{1655} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 1655 cm^{-1}

A_{3450} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 3450 cm^{-1}

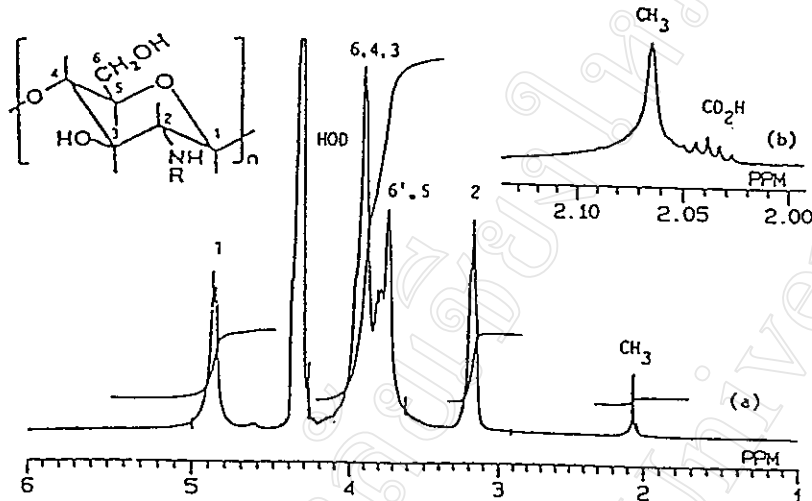
แถบการดูดกลืนแสงของ internal standard ที่ 3450 cm^{-1} ถูกตรวจวัดจากช่วง $3837\text{-}1902 \text{ cm}^{-1}$ ขณะที่แถบการดูดกลืนแสงของเอไมด์ 1655 cm^{-1} ถูกตรวจวัดจากช่วง $1902\text{-}1277 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งจาก baseline จะได้อัตราส่วนเป็น 1.33

1.3.5.4 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

การใช้วิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี หาค่าองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลของไคโตซานจะนิยมวิเคราะห์สารตัวอย่างเป็นสารละลาย ในบางกรณีที่เครื่องมือวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์สารของแข็งได้ เช่น solid state ^1H -NMR spectroscopy พบว่าความแรงของสนามแม่เหล็กและอุณหภูมิมีผลต่อพีกที่ได้อาจจะ broad หรือการแยกของพีกไม่ดี เนื่องจากที่อุณหภูมिन้อยกว่าหรือเท่ากับ 80°C มีผลทำให้สายโซ่โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น glass transition temperature (T_g) จะลดลงความสามารถในการละลายของไคโตซานจะเพิ่มขึ้น สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ละลายไคโตซาน คือ $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ หรือ $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ การหาค่าองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลทำได้โดย integral intensity, I_{CH_3} ของหมู่เอซิทิล($-\text{COCH}_3$) และผลรวม integral intensity ของโปรตอน $I_{\text{H}_2\text{-H}_6}$ ของ H2, H3, H4, H5, H6 และ H6' แสดงดังสมการและ(รูปที่ 1.7)

$$\% \text{ Degree of deacetylation} = [1 - (I_{\text{CH}_3}/3) / (I_{\text{H}_2\text{-H}_6}/6)] \times 100$$

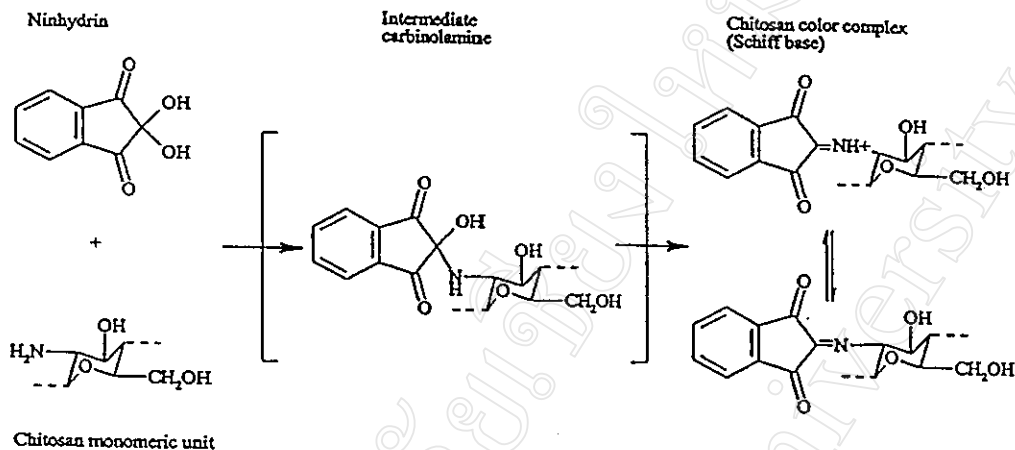
สำหรับ solid state ^{13}C -NMR spectroscopy การคำนวณองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลของไคโตซานทำเช่นเดียวกับ solid state ^1H -NMR spectroscopy แต่เปลี่ยน integral intensity ของโปรตอนเป็นการเปรียบเทียบพื้นที่ของ CH_3 resonances ของหมู่เอซิทิลกับ resonances ของ glucose carbons



รูปที่ 1.7 ^1H -NMR spectrum ของไคโตซานใน $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ ที่อุณหภูมิ 70°C

1.3.5.5 วิธีนินไฮดริน (Ninhydrin)

นินไฮดริน เป็นสาร oxidizing agent จะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน (amino acid) ให้สารสีน้ำเงินม่วง การตรวจสอบนี้ไม่ได้จำเพาะต่อกรดอะมิโนเท่านั้น โปรตีนหรือสารอื่นที่มีหมู่ อะมิโนอิสระก็จะให้ผลบวกเหมือนกัน เช่น primary amine เกิดปฏิกิริยาได้ แต่ไม่ให้ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ จากหลักการดังกล่าวสามารถที่จะวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของ ไคโตซานได้และเป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่แพง และเหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ประเภท routine โดย อาศัยการเกิดปฏิกิริยาของ ninhydrin กับ primary amino groups ของไคโตซานจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี น้ำเงินม่วงของ diketohydrinlylidine-diketohydrinlamine เรียกว่า “ **Ruheman's purple** ” ดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ดูรูปที่ 1.8) วิธีหาองค์ของการกำจัดหมู่ แอซิทิลของไคโตซาน มีด้วยกันหลายวิธีอย่างไรก็ตามแต่ละวิธีจะมีข้อจำกัดซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณ ของหมู่อะมิโน แต่ในการทดลองนี้ได้หาองค์ของการกำจัดหมู่แอซิทิลโดยวิธีนินไฮดริน เนื่องจาก เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดใช้เครื่องมือที่มีราคาถูก



รูปที่ 1.8 แสดงกลไกของการเกิดปฏิกิริยาโคโตซานกับนินไฮดริน¹⁹

1.3.6 ความหนืด (Viscosity)¹¹

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติล น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น ionic strength ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของไคโตซานในกรดอะซิติก จะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมี pH ลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริกจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น

1.3.7 ความสามารถในการตกตะกอน (Coagulation ability)¹¹

ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอน และตัวตกตะกอน (flocculant and coagulating agent) ที่ดี เนื่องจากการมีหมู่อะมิโนจำนวนมากที่สามารถให้ประจุบวกเมื่อเป็นเกลือ และจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น โปรตีน สีย้อม และพอลิเมอร์อื่นๆ นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับโลหะหนักได้โดยไนโตรเจนที่หมู่อะมิโนของไคโตซานจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้ไอออนของโลหะสามารถสร้างพันธะเชิงซ้อนกับหมู่อะมิโนได้ และยังพบอีกว่าหมู่อะมิโนในไคโตซานมีประสิทธิภาพในการจับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่เอซิติลในไคติน ดังนั้นไคโตซานที่มีองค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลสูงจะมีอัตราการดูดซับ หรือความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะสูง

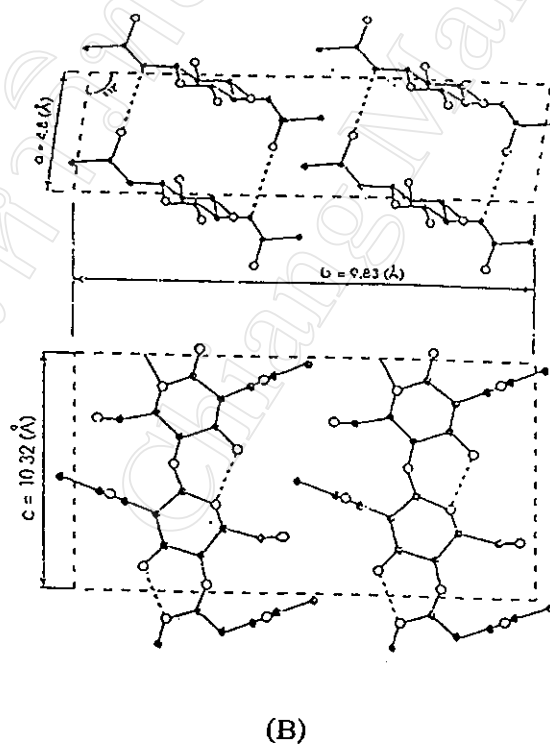
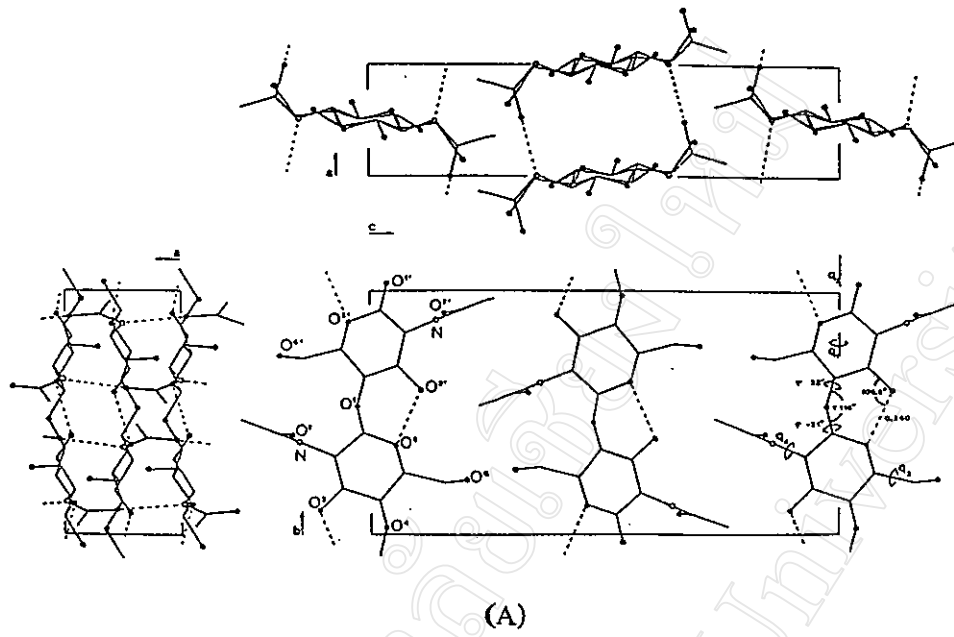
ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของไคโตซานยังขึ้นกับอีกหลายปัจจัย เช่น ความสามารถในการดึงดูน้ำของไคโตซาน

1.3.8 โครงรูปโมเลกุล (Molecular Conformation)^{4,6,11}

ไคตินมีโครงสร้างของผลึกที่แข็งแรงและมีองศาของผลึก (degree of crystallinity) สูง Muzzarelli ได้เสนอรูปแบบผลึกของไคตินไว้เป็น 3 ลักษณะ คือ แอลฟาไคติน (α -chitin) เบต้าไคติน (β -chitin) และแกมมาไคติน (γ -chitin) แต่ละลักษณะแตกต่างกันที่การเกิดของระบบผลึก (crystal system) และปัจจัยของการเกิดแลตติซผลึก (crystal lattice) ของหน่วยเซลล์ (cell unit) ภายในโครงสร้างผลึก ความแตกต่างนั้นเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลในแลตติซผลึก สายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคตินจะมีการเรียงตัวเป็นแผ่นซ้อนทับกัน (pleated sheet) ในแลตติซผลึกของหน่วยเซลล์ ซึ่งอาจเรียงตัวกันได้สองแบบ คือ แบบขนานที่มุ่งไปในทิศทางเดียวกัน (parallel pattern) และแบบที่โครงสร้างเรียงตัวกันแบบสวนทางกัน (anti-parallel pattern)

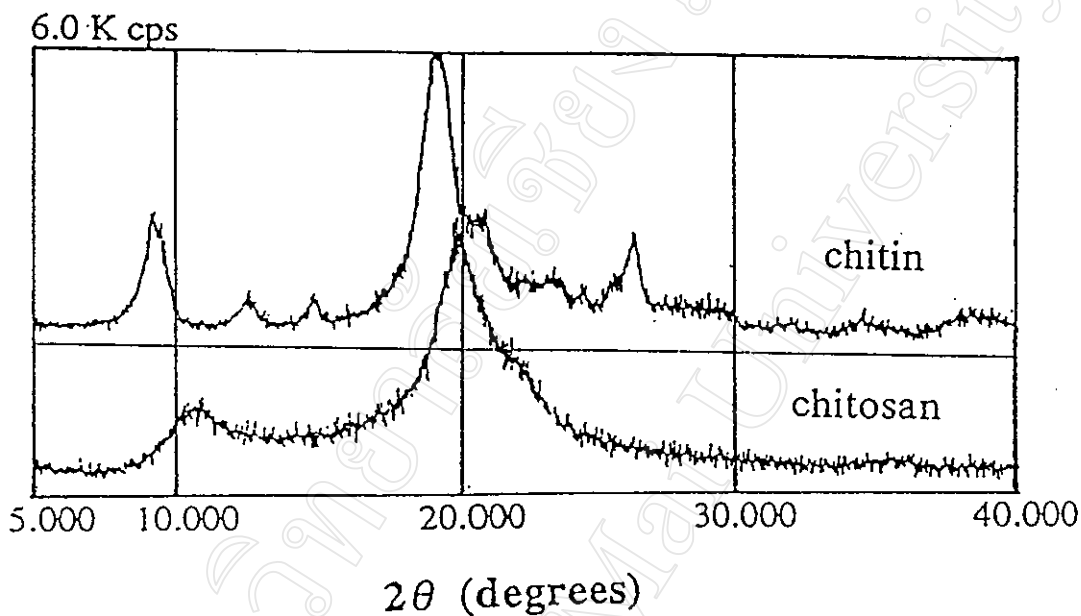
แอลฟาไคตินมี unit cell เป็น orthorhombic ลักษณะของโครงสร้างมีการเรียงตัวแบบสวนทางกันสลับไปมาซ้อนกัน การจัดตัวแน่นและมีความแข็งแรงสูงสุดพบมากในเปลือกของแมลง กุ้ง และปู ส่วนไคตินที่พบในแกนของปลาหมึก (squid pens) และมารีนไดอะตอม (marine diatoms) จะมีโครงสร้างการเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกันเกิดเป็น เบต้าไคติน ซึ่งมี unit cell เป็น monoclinic และการจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลแบบแกมมาไคตินนั้น เกิดจากโครงสร้างเรียงสลับกันระหว่างสองแบบที่กล่าวมาแล้วจะพบใน cocoon ptinus tectus และ phynchaenus fagi

โดยธรรมชาติจะพบรูปแบบแอลฟาไคตินมากกว่าเบต้าและแกมมา ทั้งนี้เพราะแอลฟาไคตินมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (intramolecular and intermolecular chian) มากกว่าจึงทำให้เสถียรภาพทางเคมีมากกว่าแบบอื่น เบต้าไคตินมีเสถียรภาพรองลงมาจากแอลฟาไคติน ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า การมีเสถียรภาพน้อยทำให้มันมีความสามารถในการละลายและ swelling ได้ดีกว่าแอลฟาไคติน นอกจากนี้มีรายงานว่า เบต้าไคตินแสดงสมบัติ high reactivity กว่าแอลฟาไคตินในระหว่างขั้นตอนการกำจัดหมู่แอซิติล จากสมบัติดังกล่าวเบต้าไคตินมีโอกาที่จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโครงสร้างจากรูปแบบเบต้าไปเป็นรูปแบบแอลฟาในสารละลายกรดแก่ นอกจากนี้ยังมีโอกาสจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวรเป็นไคตินที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrate) ได้อีกทางหนึ่ง โครงสร้างลักษณะผลึกของแอลฟาไคติน และเบต้าไคติน (ดูรูปที่ 1.9)^{11,37}



รูปที่ 1.9 โครงสร้างผลึกของแอลฟาไคติน (A) และเบต้าไคติน (B)

โครงสร้างทางกายภาพด้านผลึกนี้สามารถศึกษาโดยการตกผลึกของไคโตซานและวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ผลึกเดี่ยว แต่เนื่องจากไคตินและไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงจึงไม่สามารถที่จะเตรียมผลึกเดี่ยวได้ วิธีการหนึ่งที่ใช้คือการศึกษาด้วยการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction) ที่ตกกระทบในตัวอย่าง รูปแบบของการหักเหของแสงที่เกิดขึ้นหลังจากตกกระทบจะเป็นนัยบ่งถึงโครงสร้างผลึกของสายพอลิเมอร์ (ดูรูปที่ 1.10)



รูปที่ 1.10 การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของไคติน และไคโตซานด้วยเทคนิค X-ray diffraction spectrometry³⁸

ไคโตซานเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์ประเภทบวก(cationic polyelectrolyte) เนื่องจากในสารละลายกรดหมู่อะมิโนในสายโซ่โมเลกุลจะรับโปรตอนแล้วอยู่ในรูป(-NH_3^+) โครงสร้างของโมเลกุลไคโตซานในสารละลายสามารถบ่งชี้โดยค่า Mark-Houwink exponent (ค่า a) มีค่าประมาณ 0.5-0.8 และ 1.8 บ่งชี้ว่าพอลิเมอร์ขดตัวเป็นทรงกลม (sphere) มีลักษณะเป็น random coil และมีลักษณะเป็นแท่ง (rod) ตามลำดับ โครงสร้างของโมเลกุลไคโตซานที่แตกต่างกันในสารละลายขึ้นอยู่กับ ionic strength ค่า pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของยูเรียที่เติมลงไป น้ำหนักโมเลกุล และองศาของการกำจัดหมู่แอซิติล

1.3.9 การสลายตัว (Degradation)^{11,38,39}

ไคตินและไคโตซานก็เหมือนกับพอลิเมอร์หรือพอลิแซ็กคาไรด์อื่นทั่วไป คือเมื่อเกิดการเสื่อมสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดเรียกว่า โมโนเมอร์ (monomer) หรือโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) โอลิโกเมอร์/โอลิโกแซ็กคาไรด์ของไคตินและไคโตซาน คือ N-acetylchitooligosaccharide และ chitooligosaccharide ตามลำดับ ส่วนโมโนเมอร์/โมโนแซ็กคาไรด์ของไคตินและไคโตซาน คือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ

1.3.9.1 การสลายโดยวิธีปฏิกิริยาเคมี

การสลายโดยวิธีปฏิกิริยาเคมีจะเกิดขึ้นได้ง่ายเช่นในกรด (acid hydrolysis) เป็นการสลายสภาพสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานแบบสุ่ม (random) ผลผลิตที่ได้ คือโอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และโมโนเมอร์ขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพอลิเมอร์โดยไคตินจะสามารถต้านทานต่อการสลายโดยกรดได้ดีกว่าไคโตซาน ส่วนการเสื่อมสลายโดยด่าง (alkaline degradation) ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในกระบวนการนำโปรตีนออกจากโครงสร้างแข็งและในปฏิกิริยากำจัดหมู่เอซิทิล การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ในด่างจะเริ่มจากปลายสุดของสายโซ่โมเลกุล เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า peeling reaction

1.3.9.2 การสลายโดยคลื่นเสียง (Degradation by sonication)

การสลายโดยการสั่นด้วยคลื่นเสียงควบคู่กับการใช้กรดมีผลให้ได้โอลิโกเมอร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าการสลายโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว แต่กลไกของการตัดสายโซ่โมเลกุลยังไม่เป็นที่แน่ชัด Wang และคณะ ได้รายงาน ว่า มวลโมเลกุลของไคโตซานจะลดลงขณะที่เปอร์เซ็นต์ของสายโซ่เอซิทิลไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อไคโตซานถูกกระตุ้นด้วยพลังงานจากการสั่นโดยคลื่นเสียง

1.3.9.3 การสลายโดยวิธีฉายรังสี (Radiation degradation)

จากการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยของ Chirachanchai พบว่าการฉายรังสีสามารถลดปริมาณมวลโมเลกุลได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปริมาณรังสี 25 กิโลเกรย์ โดยไม่ทำให้โครงสร้างของหน่วยไคตินหรือไคโตซานเปลี่ยนแปลง

1.3.9.4 การสลายโดยเอนไซม์ (Enzyme degradation)

ในธรรมชาติกระบวนการย่อยสลาย หรือตัดสายไคตินและไคโตซานเกิดจากเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาดังนี้ การเสื่อมสลายโดยเอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า สถานะที่ใช้ไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายให้ผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะ และให้ของเสียจากการผลิตต่ำ มีความเป็นพิษน้อย

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินและไคโตซานแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ไคตินเนส (chitinase) เฮกโซซามิไนเดส (hexosaminidase) และไคโตซานเนส (chitosanase) แต่ละกลุ่มจะมีสมบัติและการทำงานที่แตกต่างกันออกไป จะพบในพืชและสัตว์แต่มีปริมาณไม่มาก และสกัดออกมาใช้ได้ยาก แต่เอนไซม์จากพวกแบคทีเรีย และรา นั้นกลับมีศักยภาพสูงกว่า จากการศึกษพบว่าแบคทีเรียหลายตระกูลที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายไคตินและไคโตซาน ได้แก่ *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, *Serratia spp.* และ *Pseudomonas spp.* เป็นต้น ส่วนพวกราและยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เหล่านี้ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus spp.*, *Trichoderma spp.* และ *Acremonium* เป็นต้น แต่การใช้เอนไซม์นั้นยังไม่ค่อยเป็นที่นิยม เนื่องจากปัจจุบันเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไคตินและไคโตซานยังมีราคาแพง และหาได้ค่อนข้างยาก

1.3.9.5 การสลายโดยความร้อน (Thermal degradation)

ความร้อนมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน จากการวิจัยพบว่า ความร้อนจากเตาอบซึ่งเป็นความร้อนแบบแห้ง (dry heat) ที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 80°C มีผลทำให้สายโซ่โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น T_g ลดลงความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ส่วนความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิสูงมีผลทำให้ไคโตซานเกิดสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ระยะเวลาที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 120°C ความสามารถในการละลายของไคโตซานจะลดลง ที่อุณหภูมิ 160°C เวลานานกว่าหรือเท่ากับ 2 ชั่วโมง ไคโตซานจะไม่ละลายในกรดอะซิติก (0.2M)/โซเดียมแอซิเตท (0.1M) สำหรับการอบแห้งแบบใช้ความร้อนจากไอน้ำ (saturated steam) ไคโตซานจะไม่สามารถละลายหลังจากการอบที่อุณหภูมิ 115°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การอบที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 120°C ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน

1.4 การเตรียมไคตินและไคโตซาน (Preparation of Chitin and Chitosan)^{1,11,38}

ไคตินและไคโตซาน สามารถจะสกัดได้จากเปลือกแข็งของสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู หอย และ แก่นปลาหมึก นอกจากนี้ยังรวมไปถึงเปลือกแข็งของพวกแมลงและผิวหนังของเชื้อราต่างๆ โดยเปลือกแข็งของสัตว์พวกนี้มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ไคติน ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่อยู่เป็นชั้นปะปนในชั้นของเกลื้อแร่ ส่วนใหญ่เป็นหินปูน (CaCO_3) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างที่แข็งแรงของเปลือกสัตว์ทะเล นอกจากนี้องค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือรงควัตถุสีแดงจำพวก แคโรทีน ได้แก่ astaxanthin และ zeaxanthin หรือ β -carotene เป็นต้น เนื่องจากไคตินและไคโตซานเป็นสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติคุณภาพของวัตถุดิบจึงไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางธรรมชาติที่ยากแก่การควบคุมได้แก่ ชนิดของสัตว์และฤดูกาลรวมทั้งกระบวนการเตรียมไคติน อย่างไรก็ตามมีสมบัติอย่างหนึ่งที่เราเห็นได้อย่างชัดเจนว่า แหล่งกำเนิดของวัตถุดิบมีผลต่อสมบัติของไคตินและไคโตซานที่ได้ คือ ลักษณะ โครงสร้างผลึก

กระบวนการเตรียมไคติน และไคโตซานประกอบด้วยหลักการที่สำคัญ 4 ขั้นตอน คือ

1. การกำจัดโปรตีน (deproteination)
2. การกำจัดเกลื้อแร่ (demineralization)
3. การกำจัดรงควัตถุ (decoloration)
4. การกำจัดหรือลดหมู่แอซิติล (deacetylation)

สำหรับกระบวนการเตรียมไคติน และไคโตซานทั้งสี่ขั้นตอนนี้สามารถทำได้โดยกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ แต่ในการทดลองนี้จะกล่าวถึงการเตรียมไคตินและไคโตซานโดยกระบวนการทางเคมีซึ่งมีผู้ศึกษาวิจัยด้วยวิธีต่างๆดังนี้

Hackman (1954)¹ ได้เตรียมไคตินโดยล้างขั้วกระดูกของปูทะเลด้วยน้ำ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100°C จากนั้นนำเปลือกปู 220 กรัม ย่อยด้วยสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนต กรองและนำมาล้างน้ำจนเป็นกลางทำให้แห้ง และบดเป็นผงละเอียด ชั่งผงที่ได้ 91 กรัม แช่ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 0°C คนเป็นครั้งคราว นำมาล้างน้ำจนเป็นกลางและแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 500 มิลลิลิตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100°C คนเป็นครั้งคราว (เพื่อกำจัดโปรตีนและไม่ทำให้สายโซ่ขาด) จากนั้นแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ซ้ำอีก 4 ครั้ง ได้ผงไคตินมี 37.4 กรัม

Porter และ Hackman (1957)¹ ได้เตรียมโคตินโดยนำเปลือกนอกของสัตว์ทะเลโดยเติม “ethylenediaminetetraacetic acid” (EDTA) ที่ pH 9 เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ผงที่มีขนาด 1-10 ไมโครเมตร จะถูกกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตภายใน 15 นาที จากนั้นนำมาเติม EDTA ที่ pH 3.0 และนำมาสกัดด้วยเอธานอล เพื่อกำจัดสี จากนั้นสกัดไขมันด้วยอีเทอร์ส่วนที่เหลือคือโคติน

Horowitz Roseman และ Blumenthal (1957)¹ ได้เตรียมโคตินโดยนำเปลือกกุ้ง lobster ที่กำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตมา 10 กรัม เขย่ารวมกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 10%w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง กรองและล้างส่วนที่ติดกระดาษกรองด้วยน้ำจนเป็นกลาง จากนั้นนำมาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10%w/v ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บนอ่างไอน้ำ เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เปลือกกุ้ง lobster ที่กำจัดแคลเซียมคาร์บอเนต 60-70 เปอร์เซ็นต์

Whistler และ BeMiller (1962)¹ ได้เตรียมโคตินโดยล้างเปลือกกุ้งแล้วอบให้แห้งในตู้อบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50°C นำเปลือกที่อบแล้วมา 500 กรัม แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%w/v เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ใหม่มาเปลี่ยนทุกวัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่กำจัดโปรตีน จากนั้นนำมวลน้ำจนเป็นกลาง และล้างด้วยเอธานอล 95%w/v ประมาณ 6 ลิตร เพื่อล้างสีออกไป แล้วล้างด้วยเอซิโตน 1 ลิตร เอธานอล 2.5 ลิตร และอีเทอร์ 500 ลิตร จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ขาวอบให้แห้งโดยการลดความดัน และนำไปแช่ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้น ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และล้างซ้ำอีกครั้ง จะได้ผงโคตินเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์

Zhang และคณะ (2000)⁴⁰ วิธีนี้เหมาะสำหรับการเตรียมโคตินจากเปลือกแมลง โดยนำ beetle larvae และ exuviae ของ silkworm pupae มาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด และอบให้แห้งในตู้อบสุญญากาศให้เป็นผงขนาด 150 mesh เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัลให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัด catechols และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัลให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 36 หรือ 24 ชั่วโมง จากนั้นรีฟลักซ์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.4 %w/v เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีน นำส่วนที่เหลือมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง และอบให้แห้งได้โคติน 15-20 เปอร์เซ็นต์

1.5 วิธีการเตรียมไคโตซาน

สำหรับวิธีการเตรียมไคโตซานมีด้วยกันหลายวิธี สามารถทำได้โดยการกำจัดหมู่แอซิติลของไคตินดังนี้

Horowitz Roseman และ Blumenthal (1957) Horton และ Lineback (1965)¹ ได้เตรียมไคโตซานโดยการนำไคติน 30 กรัม หลอมรวมกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 150 กรัม ในเบ้านิกเกิลและคนที่อุณหภูมิ 180°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่หลอมได้เทลงในเอธานอล ล้างตะกอนด้วยน้ำจนเป็นกลาง จากนั้นทำไคโตซานให้บริสุทธิ์โดยละลายในกรดฟอร์มิกเข้มข้น 5%w/v และตกตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่ากำจัดหมู่แอซิติลได้ 95 เปอร์เซ็นต์

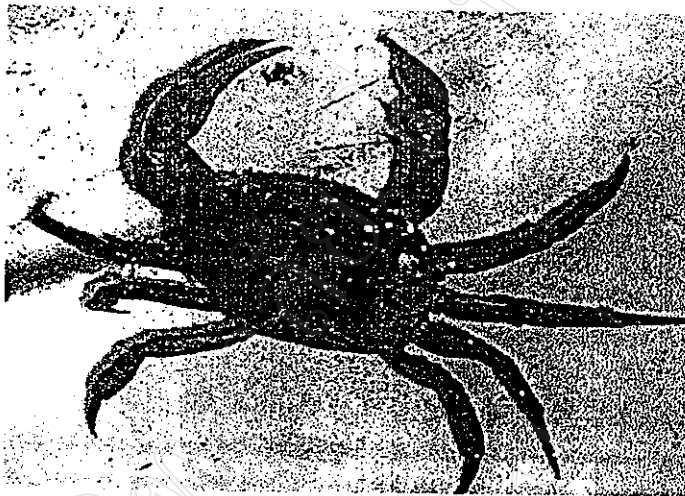
Rigby (1936) Wolfrom Maher และ Chaney Wolfrom และ Shen-Han (1958)¹ ได้เตรียมไคโตซานโดยการนำไคติน 50 กรัม มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 70%w/v ปริมาตร 2.4 ลิตร ที่อุณหภูมิ 175°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน หลังจากนั้นทำให้เย็นกรอง และล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง สามารถกำจัดหมู่แอซิติลได้ 82 เปอร์เซ็นต์

Broussignac (1968)⁴ ได้เตรียมไคโตซานโดยใช้รีเอเจนต์ผสมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50%w/v เอธานอล 25%w/v ก่อน จากนั้นเติมโมโนเอธิลีนกลัยคอล 25 %w/v แล้วจึงเติมไคตินทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120°C หลังจากนั้นกรอง และล้างด้วยน้ำจนเป็นกลางอบให้แห้ง พบว่าหมู่แอซิติลถูกกำจัดออกไป 82 เปอร์เซ็นต์

Kurita (1993)¹¹ ได้เตรียมไคโตซานโดยการผสมไคตินในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40%w/v ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน บางครั้งอาจจะเติม reducing agent เช่น โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride, NaBH₄) เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยา end-peeling ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของสายพอลิเมอร์ในด่างเข้มข้น

1.6 ปูนา (Rice-Field Crab)^{42,43}

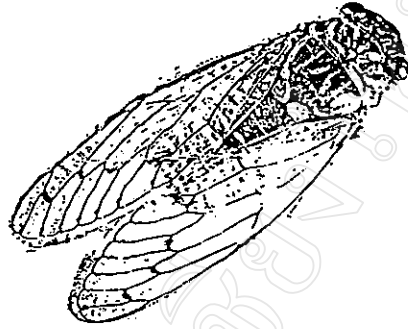
ปูนามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Somanniathelphusa* species จัดอยู่ในไฟลัม arthropoda ชั้น crustacean เป็นปูน้ำจืดมีลักษณะกระดองเรียบสีน้ำตาล ก้ามทั้งสองข้างมีลักษณะไม่เท่ากันตัวผู้มักก้ามใหญ่กว่าตัวเมีย อาศัยอยู่ตามทุ่งนาโดยขุดรูอยู่ตามท้องนาที่ลุ่ม ชอบกัดกินคันข้าว และเศษซากพืชซากสัตว์ต่างๆ มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วบริเวณแหล่งที่ลุ่มของภาคต่างๆ (ดูรูปที่ 1.11)



รูปที่ 1.11 ปูนาซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมไคดินและไคโตซาน

1.7 จักจั่น (Cicada)^{43,44}

จักจั่นจัดอยู่ในไฟลัม arthropoda ชั้น hexapoda วงศ์ cicadidac เป็นแมลงขนาดใหญ่มีลำตัวยาวตั้งแต่ 2-10 เซนติเมตร มีมากกว่า 1,500 ชนิด มีลักษณะหัวและอกกว้างมีปีกบางใส 2 คู่ เนื้อปีกเหมือนกันตลอดปีกเมื่อพับจะเป็นรูปหลังคาคลุมตัวมีปากชนิดเจาะดูด ตาโตเห็นได้ชัดอยู่ตรงมุม 2 ข้างของหัว ตัวผู้มีอวัยวะพิเศษสำหรับทำเสียงได้ปล้องแรกของส่วนท้องหรืออก ตัวอ่อนอาศัยอยู่ใต้ดินเป็นเวลานาน (ประมาณ 1 ปี) ส่วนใหญ่พบในเขตเมืองร้อน (ดูรูปที่ 1.12) สำหรับส่วนที่นำมาเตรียมไคดินและไคโตซานคือคราบจักจั่น (ดูรูปที่ 1.13)



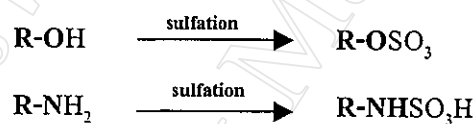
รูปที่ 1.12 แมลงจักจั่น



รูปที่ 1.13 คราบจักจั่นซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมไคดินและไคโดซาน

1.8 การสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซาน (Synthesis of Sulfated Chitosan)

ไคโตซานประกอบด้วย 3 หมู่ฟังก์ชันที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ หมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หมู่ primary alcohol ($\text{-CH}_2\text{OH}$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 หมู่ secondary alcohol (-CHOH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมี (chemical modification) ของทั้งสามหมู่ฟังก์ชันสามารถก่อให้เกิดวัสดุต่างๆในการใช้งานที่แตกต่างกันมากมาย ซึ่งทำให้ไคโตซานเป็นสารที่มีเอกลักษณ์โดดเด่นเฉพาะตัว เป็นวัสดุทางชีวภาพ (biomaterials) ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) อีกทั้งยังย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) และไม่มีความเป็นพิษ ดังนั้นจึงปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์และไม่เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เจล เม็ด เส้นใย และคอลลอยด์ ไคโตซานมีหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารอนุพันธ์ (derivatives) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จากสมบัติดังกล่าวจึงง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในหลายๆด้าน ซึ่งการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานนั้นจะอาศัยปฏิกิริยาพื้นฐานในการเตรียมเอสเตอร์ของซัลเฟต (sulfate ester) โดยการเติมหมู่ซัลเฟต (sulfation) ที่หมู่ฟังก์ชันของไคโตซานคือหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะมิโน ดังสมการ^{45,46}

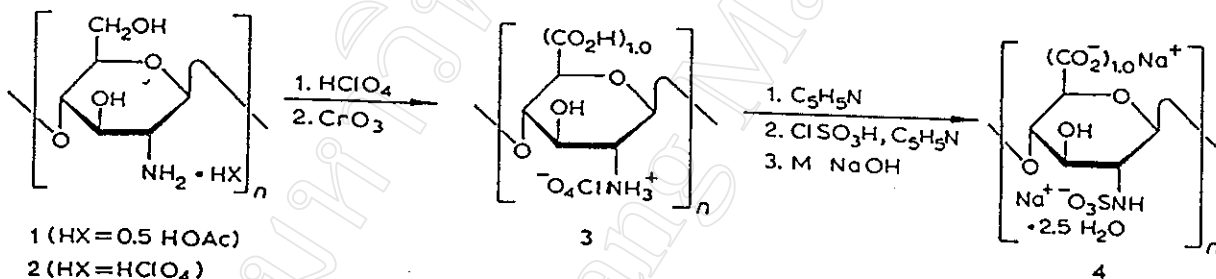


เมื่อ R คือหน่วยของกลูโคส

สำหรับรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเติมหมู่ซัลเฟตเพื่อเตรียมซัลเฟตไคโตซานนั้น มีด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ กรดคลอโรซัลโฟนิก-พริดีน⁴⁵ ซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์⁴⁷ ซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-พริดีน⁴⁸ และไตรเมทิลลามีน-ซัลเฟอร์ไตรออกไซด์⁴⁹ เป็นต้น เนื่องจากรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเติมหมู่ซัลเฟตมีมากมาย ดังนั้นการที่จะเลือกใช้รีเอเจนต์ตัวใดนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและสถานะที่ใช้ จึงได้มีผู้ศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานมากมายพอสรุปได้ดังนี้

Wolfson และ Shen Han (1959)⁴⁵ ได้สังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานที่มีองค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิทิล 90 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบการใช้รีเอเจนต์ในการเติมหมู่ซัลเฟต 2 ชนิด คือ กรดคลอโรซัลโฟนิค-ฟิรดิน และซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ พบว่าซัลเฟตไคโตซานที่ได้เป็นอสัณฐานและมีค่าการหมุนจำเพาะเป็นลบ ผลิตภัณฑ์ซัลเฟตไคโตซานของวิธีกรดคลอโรซัลโฟนิค-ฟิรดินมีค่าองศาของการเกิดพอลิเมอร์มากกว่าวิธีของซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ นอกจากนี้ซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์มีข้อดีหลายอย่าง คือสารละลายมีความเสถียรและมีความเหมาะสมในสภาวะ homogeneous ที่อุณหภูมิต่ำ

Horton และ Just (1973)⁴⁶ ได้สังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซาน โดยเตรียมไคโตซานให้อยู่ในรูปของไคโตซานเอซิดेट ด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10%w/v จากนั้นออกซิไดซ์ด้วยกรดเปอร์คลอริกในกรดอะซิติก ได้ผลิตภัณฑ์เปอร์คลอเรตและคาร์บอกซิเลตไคโตซาน จากนั้นเติมหมู่ซัลเฟตด้วยกรดคลอโรซัลโฟนิค-ฟิรดิน และทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-sulfated-carboxylated chitosan มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_v) 4.3×10^5 คาลตัน โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง ขั้นตอนการเตรียม (รูปที่ 1.14)



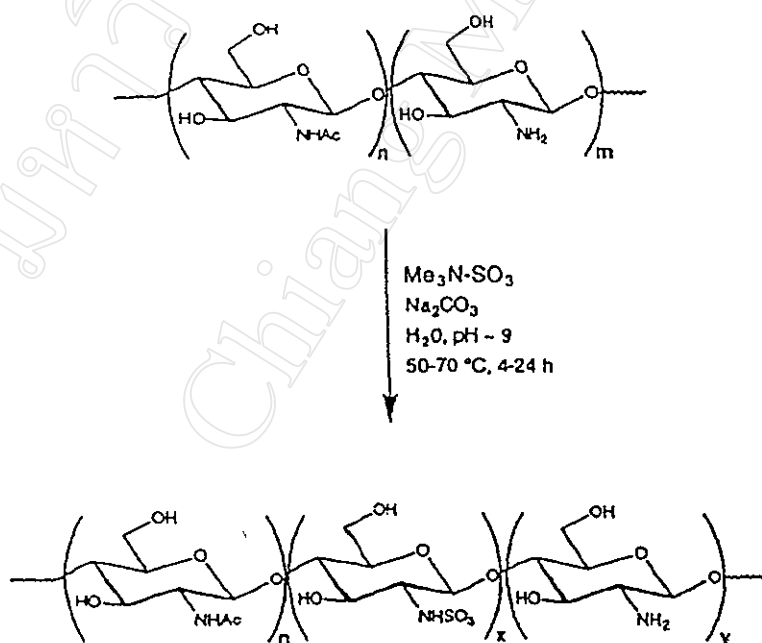
รูปที่ 1.14 ขั้นตอนการเตรียมซัลเฟตไคโตซานของ Horton และ Just

Hirono และคณะ (1985)⁵⁰ ได้ศึกษาซัลเฟตไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่าง ๆ กันเปรียบเทียบกับเฮพาริน โดยเตรียมซัลเฟตไคโตซานด้วยซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และแยกน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยวิธีเจลโครมาโทกราฟี จากการเตรียมซัลเฟตไคโตซานได้ผลิตภัณฑ์เป็น N,O-sulfated chitosan, O-sulfated chitosan N-acetyl chitosan, sulfated-O-carboxymethyl chitosan, และ O-sulfated chitosan

Nishimura และ Tokura (1986)⁵¹ ได้เตรียมซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานที่มีกิ่งสาขาของการกำจัดหมู่แอสทิลเป็น 45 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเติมหมู่ซัลเฟตด้วยซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ หมู่ซัลเฟตจะเข้าที่หมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6

Nishimura, Kohgo และ Kurata (1991)⁵² ได้สังเคราะห์พาทาลิมิโดโคโคซาน (phthalimido chitosan) จากโคโคซานที่มีกิ่งสาขาของการกำจัดหมู่แอสทิลเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยทำปฏิกิริยากับพาทาลิกแอนไฮไดรด์ (phthalic anhydride) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ที่อุณหภูมิ 130°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าโคโคซาน นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมอนุพันธ์ของโคโคซานชนิดอื่นๆ เพื่อสังเคราะห์ซัลเฟตโคโคซานให้มีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งหมู่ซัลเฟตในอนุพันธ์ของโคโคซาน

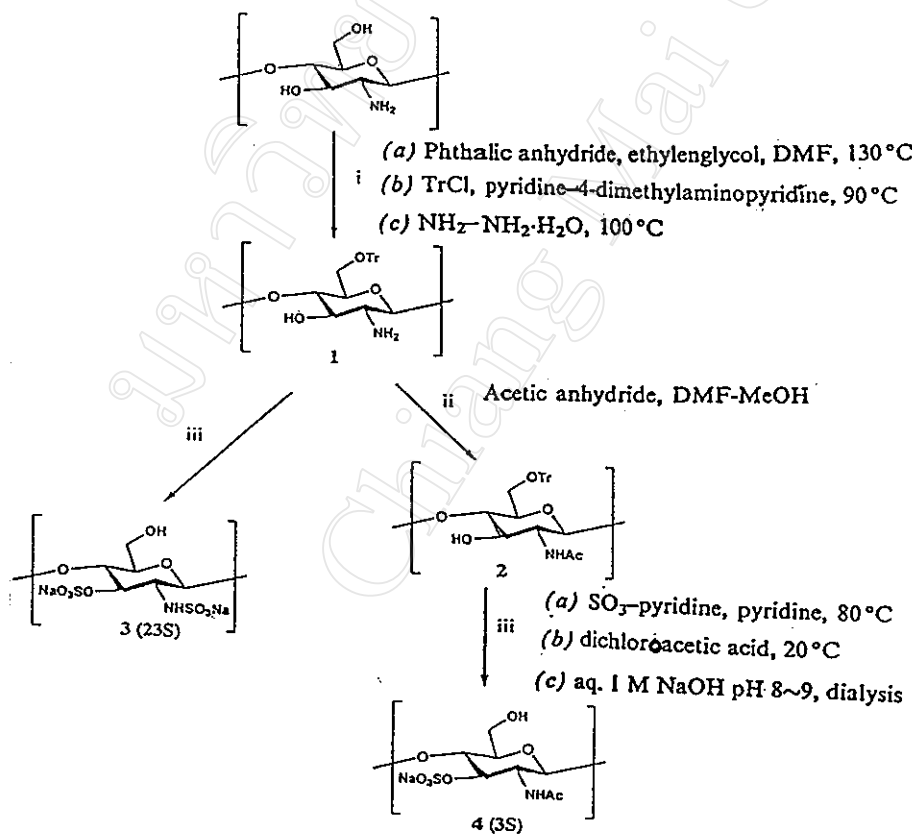
Holme และ Perlin (1997)⁴⁹ ได้สังเคราะห์ซัลเฟตโคโคซาน (N-sulfated chitosan) ด้วยไตรเมทิลามีน-ซัลเฟอร์ไตรออกไซด์ ($\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$) และได้ศึกษาผลของ ionic strength และ pH ต่อการละลายของซัลเฟตโคโคซานโดยเปรียบเทียบกับ polyelectrolytes อื่นๆ ขั้นตอนการเตรียม (ดูรูปที่ 1.15)



รูปที่ 1.15 ขั้นตอนการเตรียมซัลเฟตโคโคซานของ Holme และ Perlin

Gamzazade และคณะ (1997)¹⁷ ได้สังเคราะห์ซัลเฟตโคโตซานด้วยวิธีต่างๆ 3 วิธี เพื่อศึกษาผลของสภาวะที่มีผลต่อตำแหน่งของหมู่ซัลเฟต และองศาของหมู่ซัลเฟตโดยสภาวะที่ใช้ในการเตรียมของซัลเฟตโคโตซาน ได้แก่ pseudo-homogeneous, homogeneous และ semi-heterogeneous condition ตามลำดับโดยเติมหมู่ซัลเฟตด้วยกรดคลอโรซัลฟอนิก-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ในอัตราส่วน(4.5:30 v/v) ผลลัพธ์ที่ได้ภายใต้สภาวะ semi-homogeneous จะมีลักษณะเฉพาะมากกว่าสภาวะ heterogeneous โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีหมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 เพียงหมู่เดียวและมีหมู่ซัลเฟต 2 หมู่ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 6 จำนวนเล็กน้อย ในขณะที่สภาวะ semi-heterogeneous ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จะมีหมู่ซัลเฟต 3 หมู่เช่นเดียวกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 จะมีหมู่ซัลเฟตจำนวนมากพอๆกัน

Nishimura และคณะ (1998)³⁸ ได้สังเคราะห์ซัลเฟตโคโตซานโดยสามารถเลือกตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตให้มีความจำเพาะเจาะจงในโคโตซานซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ 2-acetamido-2-deoxy-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan และ 2-deoxy-2-sulfoamido-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan ขั้นตอนการเตรียม (รูปที่ 1.16)

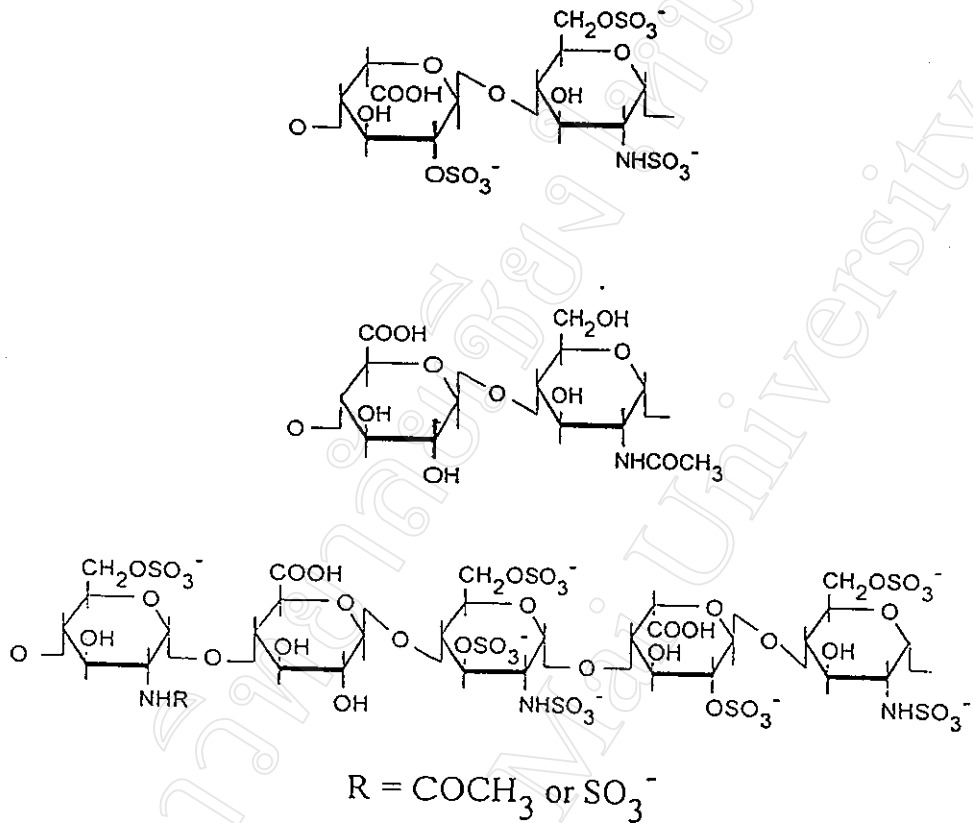


รูปที่ 1.16 ขั้นตอนการเตรียมซัลเฟตโคโตซานของ Nishimura และคณะ

Baumann และ Faust (2001)⁵³ ได้ปรับปรุงวิธีการใหม่ในการสังเคราะห์พอลิไมโดโคโตซานและอนุพันธ์โคโตซานอื่นๆ จากวิธีของ Nishimura Kohgo และ Kurita (1991) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ คือ 150 กิโลดาลตัน โดยใช้โคโตซานที่มีกิ่งสาขาของการกำจัดหมู่แอซิติล 72 เปอร์เซนต์ และปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์ซัลเฟตโคโตซานโดยเลือกตำแหน่งจำเพาะเจาะจงให้หมู่ซัลเฟตเข้าไปในโคโตซานให้มากที่สุด จากวิธีของ Nishimura และคณะ (1998) พบว่าผลิตภัณฑ์ 2-acetamido-2-deoxy-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan ถูกเตรียมจากการนำเอาหมู่ซัลเฟตออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (6-desulfation) ของสาร 3,6-O-disulfochitosan จากปฏิกิริยา desulfonation ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3

1.9 การประยุกต์ใช้ซัลเฟตโคโตซาน

ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าวิจัยและนำอนุพันธ์โคโตซานไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ซัลเฟตโคโตซานเป็นอนุพันธ์หนึ่งของโคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ดี และมีความสำคัญมากในการนำไปใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจากซัลเฟตโคโตซานมีความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (blood anti-coagulant) และความสามารถในการปลดปล่อยไลโปโปรตีนไลเปส (lipoprotein lipase, LPL) ซึ่งแต่เดิมจะใช้สารเฮพารินเป็นสารที่ทางการแพทย์นำไปใช้ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด โดยเฮพารินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่แบบเส้นตรงประกอบด้วยหน่วยที่ซ้ำๆ กันของไดแซ็กคาไรด์ของ α-D-glucosamine กับ uronic acid หรือ α-L-iduronic acid (ดูรูปที่ 1.17)



รูปที่ 1.17 โครงสร้างของเฮพาริน⁵⁴

เฮพารินสามารถแยกได้จากตับในปี 1918 แต่เนื่องจากมีราคาแพงและแยกได้ปริมาณน้อย โดยหมู่ฟังก์ชันที่มีบทบาทสำคัญคือหมู่ซัลเฟต (N-sulfate group) ของเฮพาริน ดังนั้นจึงได้มีการสังเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ ที่สามารถให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดมาทดแทนสารเดิมในส่วนของซัลเฟตโคโคซาน พบว่าหมู่ซัลเฟต (N-sulfate และ O-sulfate groups) มี activity เป็น 15-45 เปอร์เซ็นต์ ของเฮพารินในหลอดทดลอง และเมื่อเพิ่มหมู่ซัลเฟตตรงตำแหน่งออกซิเจนจะมีการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นสัดส่วนกับการเพิ่มอัตราส่วนของซัลเฟต ดังนั้นซัลเฟตโคโคซานจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นสารยับยั้งการแข็งตัวของเลือด และกระบวนการฟอกเลือด นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากมายที่มีรายงานการนำเอาซัลเฟตโคโคซานมาใช้ประโยชน์ดังนี้

Wolfson และ Shen Han (1959)⁴⁵ ผลิตภัณฑ์ซัลเฟตไคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์เปรียบเทียบกัน 2 วิธี พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 56 และ 50 I.U./mg. ตามลำดับ นอกจากนี้ความเป็นพิษต่ำสุดที่ทำให้หนูทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2 เท่าของเฮพารินสำหรับวิธีแรก และเท่ากับเฮพารินสำหรับวิธีที่สอง

Horton และ Just (1973)⁴⁸ ผลิตภัณฑ์ซัลเฟตไคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ (1→4)-deoxy-2-sulfoamino-β-D-glucopyranuronic sodium salt พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว L-1210 ในหลอดทดลอง น้อยกว่าสารเฮพาริน

Hirono และคณะ (1985)⁵⁰ ผลิตภัณฑ์ซัลเฟตไคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ N,O-sulfated chitosan (1), O-sulfated chitosan N-acetyl chitosan(2), sulfated-O-carboxymethyl chitosan (3) และ O-sulfated chitosan (4) พบว่าผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ น้ำหนักโมเลกุล 26,000 (2), เฮพาริน, น้ำหนักโมเลกุล 21,000 (1), น้ำหนักโมเลกุล 12,000 (3) และน้ำหนักโมเลกุล 540,000 (4) คาลตัน ตามลำดับ

Nishimura และ Tokura (1986)⁵¹ ผลิตภัณฑ์ซัลเฟตไคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์จากไคโตซานที่มีกิ่งสาขาของการกำจัดหมู่แอซิติล (DAC) 45, 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดมีลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ S-DAC 70, S-DAC 45 และ S-DAC 95 ตามลำดับ

Nishimura และคณะ (1998)³⁸ ผลิตภัณฑ์ซัลเฟตไคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ 2-acetamido-2-deoxy-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan และ (1→4)-2-deoxy-2-sulfoamido-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดและยับยั้ง HIV-1 ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 และ/หรือ 3 จะแสดงผลยับยั้ง HIV-1 ได้สูงกว่าซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 แต่สามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้น้อยกว่า

1.10 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์ซัลเฟตโคโคซานจากแหล่งโคตินธรรมชาติบางชนิดได้แก่ กระดองปูนา และคราบจักจั่น เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่เหมาะสม ในการใช้ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด
2. เพื่อสังเคราะห์พอลิเมอร์ซัลเฟตอื่นๆจากพอลิเมอร์ที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิเอธิลีนกลัยคอล เป็นต้น และทำการทดลองการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด
3. เพื่อศึกษาผลขององศาซัลเฟต (degree of sulfation) น้ำหนักโมเลกุล และตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตที่มีผลต่อสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด โดยเปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานที่เตรียมได้จากกระดองปูนา คราบจักจั่น และโคโคซานพาณิชย์จากกระดองปูทะเล