บทที่ 2

การทดลอง และผลการทดลอง

2.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

1. เครื่อง Infrared Spectrometer รุ่น IR-810 ผลิตโดยบริษัท Jusco ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่อง CHNS/O analyzer รุ่น PE 2400 Series 2 ผลิตโดยบริษัท Perkin Elemer ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่อง Polarimeter รุ่นADP 220 ผลิตโดยบริษัทBellingham และ Stanley ประเทศอังกฤษ
4. เครื่อง X-ray Diffractometer รุ่น RAD-2R ผลิตโดยบริษัท Siemens ประเทศสวีเดน
5. เครื่องAtomic Absorption Spectrophotomer รุ่น AA-274 ผลิตโดยบริษัท Varian Tectron ประเทศออสเตเลีย
6. เครื่อง UV-visible Spectrophotomer รุ่น spectronic genesy 5 ผลิตโดยบริษัท Milton Roy ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่อง ^{1}H-NMR Spectometer รุ่น JNM-A500 ผลิตโดยบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น
8. เครื่อง ^{13}C-NMR Spectometer รุ่น DPX-300ผลิตโดยบริษัท Bruker สวิซเซอร์แลนด์
9. เครื่อง Magnetic stirrer รุ่น RCT ผลิตโดยบริษัท Kika Labortechnik ประเทศเยอรมันนี
10. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่นAC 210S ผลิตโดยบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมันนี
11. เครื่อง Lyophilize รุ่น FOC-1 ผลิตโดยบริษัท Martin chirst ประเทศเยอรมันนี
12. Dialysis bag รุ่น Spectra Pore R1 MW cut-off 3500 Dalton ผลิตโดยบริษัท Fisher Chemical ประเทศอังกฤษ
13. Autobalance รุ่น AD-4 ผลิตโดยบริษัท Perkin Elemer ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Oswarld viscometer size C ประเทศอังกฤษ

2.1.2 สารเคมี

1. Dimethylformamide, DMF (C_3H_5NO), A.R grade, 99.8% v/v, Carlo Erba, Italy
2. Pyridine (C_5H_5N), Fluka, Switzerland
3. Hydrochloric acid (HCl), Analytical grade, 35.4%w/v, BHD, England

4. Sodium hydroxide (NaOH), commerial grade, 98%, Thasco, Australia

5.Chitosan from Marine Crab Shells, Sigma Aldrich, Germanny

6.Triphenylchioromethane ($C_{19}H_{15}Cl$), Fluka, Switzerland

7. 4-(Dimethylamino)pyridine,DMAP, ($C_7H_{10}N_2$), Fluka, Switzerland

8.Phthalic anhydride ($C_8H_4O_3$), Fluka, Switzerland

9. Sulfur trioxide pyridine complex ($C_5H_5NO_3S$), Fluka, Switzerland

10. Hydrazine monohydrate (N_2H_6O), Fluka, Switzerland

11. Ethylene glycol ($C_2H_6O_2$), Carlo Erba, Italy

12. Chlorosulfonic acid ($ClSO_3H$), 97%w/v, BDH, England

13. Glacial acetic acid (CH_3COOH), Reagent grade, 99.8%w/v, Merck, Germanny

14. Sodium carbonate (Na_2CO_3), Reagent pure grade, Carlo Erba, Italy

15. Sodium borohydride ($NaBH_4$), A.R grade, Fluka, Switzerland

16. Barium chloride ($BaCl_2$), A.R grade, BDH, England

17. Sodium acetate ($CH_3COONa\ 3H_2O$), A.R grade, BDH, England

18. Sodium chloride (NaCl), A.R grade, ASP Finechem, Australia

19. Phenol red M.W. 357 Dalton, Fluka, Switzerland

20. Blue Dextran M.W. 1000 kiloDalton, Fluka, Switzerland

21. Ninhydrin ($C_9H_6O_4$), A.R grade, BDH, England

22. Phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$), Fluka, Switzerland

23. Polyethyleneglycol (M.W. 16000-24000) Fluka, Switzerland

24. Sepharose, LC-6B, M.W. cut-off 10-1000 kiloDalton, diameter 1.6 cm

25. Dextran sulfate, M.W. 8, 40 and 500 kiloDalton, Sigma Aldrich, Germanny

26. Polyvinyl alcohol (M.W. 15000), Fluka, Switzerland

27. Glycine ($C_2H_5NO_2$), Fluka, Switzerland

28. 1,9-Dimethylmethylene Blue ($C_{18}H_{22}N_3SCl$), Sigma Aldrich, Germanny

29. Silver Capsules foil, Ultra-Clean Pressed 8×5 mm D 203

30. Titrisol, Sodium Standard solution 1000 mgNa/l, E.Merck, Germany

31. Chitin from Marine Crab Shells, Sigma Aldrich, Germany

2.2 แหล่งที่มา และการเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ คือ

2.2.1 กระดองปูนาบด ได้ซื้อตัวอย่างกระดองปูนาจากตลาดประตูเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่โดยนำส่วนที่เป็นกระดองปูมาล้างน้ำให้สะอาด ตากแดดให้แห้งจากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มัล กรองและล้างด้วยน้ำจนเป็นกลาง อบให้แห้ง จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงก่อนที่จะนำไปเตรียมไคตินต่อไป

2.2.2 คราบจักจั่นบด ได้เก็บตัวอย่างคราบจักจั่นจากสวนมะม่วงที่ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร แยกเศษผงออกจากคราบจักจั่นและนำมาอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงก่อนที่จะนำไปเตรียมไคตินต่อไป

2.3 การเตรียมตัวทำละลายและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่ปราศจากน้ำ[52]

เตรียมโดยเติมแคลเซียมไฮไดร์ 1.5 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกลั่นไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ที่อุณหภูมิ 152-154°C แล้วแช่ใน molecular seives ขนาด 3 Å ปริมาณ 50 กรัม เป็นเวลา 3วัน

2.3.2. เตรียมตัวทำละลายพิริดีนที่ปราศจากน้ำ[52]

เตรียมโดยเติมโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 2 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมพิริดีนปริมาตร 300 มิลลิลิตรทำการรีฟลักซ์ 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกลั่นพิริดีนที่อุณหภูมิ 114-116°C แล้วแช่ใน molecular seives ขนาด 3 Å ปริมาณ 50 กรัม เป็นเวลา 3 วัน

2.3.3 สารละลายแอซิเตทบัฟเฟอร์ 4 โมลาร์

1.ชั่งโซเดียมแอซิเตทไตรไฮเดรต 3.497 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และใช้แท่งแก้วคนให้โซเดียมแอซิเตทละลาย

2. เทสารละลายโซเดียมแอซิเตทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3. ปิเปตกรดอะซีติดเข้มข้น 98%w/v ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรในข้อ 2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมกัน

2.3.4 สารละลายมาตรฐาน phenylalanine 1000 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ชั่ง phenylamine1.180 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 1%w/v ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนจน phenylalanine ละลายหมด จากนั้นเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 1%w/v จนครบปริมาตร

2.3.5 การกลั่นกรดคลอโรซัลโฟนิก

เตรียมโดยเทกรดคลอโรซัลโฟนิก ปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นกลั่นกรดคลอโรซัลโฟนิก ที่อุณหภูมิ 148-150°Cสารละลายกรดคลอโร-ซัลโฟนิกที่ได้จากการกลั่นจะใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.6 การเตรียม Farndale reagent[55]

1.ชั่งไกลซีน 0.76 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 0.59 กรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 150 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนสารทั้งสองละลาย

2. เทสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร

3. ชั่ง 1,9-Dimethylmethylene Bule ปริมาณ 4 มิลลิกรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายในข้อ 2 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กจน 1,9-Dimethylmethylene Bule ละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายในข้อ 2 จนครบปริมาตร

2.3.7สารละลายมาตรฐานโซเดียมให้มีความเข้มข้น 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมโซเดียมต่อลิตร

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมจาก stock solution 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 1%w/v ให้ปริมาตรรวมเป็น 25 มิลลิลิตรเขย่าสารละลายให้เข้ากัน

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมจากข้อ 1 ปริมาตร 2.5 5 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 1%w/v จนครบปริมาตร

2.4 การเตรียมไคตินจากกระดองปูนา และครบจักจั่น

วิธีการเตรียมไคตินจากกระดองปูนา และคราบจักจั่น มีดังนี้ คือ

2.4.1 วิธีการเตรียมไคตินจากกระดองปูนา[50]

1.ทำการเตรียมไคตินจากกระดองปูนาด้วยวิธีที่พัฒนาจากวิธีของ Hackman[1] โดยชั่งกระดองปูนาที่อบแห้งแล้ว 200 กรัม ใส่ลงในโหลแก้วขนาดใหญ่

2. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 5 ลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ล้างกระดองปูนาด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้งแล้วปั่นให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า

3. นำกระดองปูนาบดที่แห้ง 37 กรัม มาใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีน จากนั้นกรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 และล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ล้างกระดองปูนาบด ด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง

4. นำกระดองปูนาบดมาทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 3 อีก 3 ครั้ง แต่รีฟลักซ์นานกว่าคือ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดองปูนาบดที่แห้งจากข้อ 4 ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 300 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 และล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ล้างผงกระดองปูนาบดด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง

5. นำกระดองปูนาบดที่แห้งจากข้อ 5 ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 300 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 และล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ล้างกระดองปูนาบดด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง ได้น้ำหนักไคตินจากกระดองปูนา 24.3 กรัม ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2 .1 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักไคตินและไคโตซานที่เตรียมจากกระดองปูนาและคราบจักจั่น

ชนิดของวัตถุดิบ	น้ำหนัก (กรัม)	ไคติน (กรัม)	ไคโตซาน (กรัม)	% ไคติน	% ไคโตซาน
กระดองปูนา	200.0	24.3	20.6	12.2	10.3
คราบจักจั่น	50.0	42.6	36.2.	85.2	72.4

2.4.2 การเตรียมไคตินจากคราบจักจั่น[40]

1.ทำการเตรียมไคตินจากคราบจักจั่นด้วยวิธีของ Zhang และคณะ[40] โดยนำคราบจักจั่นแห้งบด 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 ลิตร

2. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1.5 ลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 และล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ล้างคราบจักจั่นบด ด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง

3. จากนั้นนำคราบจักจั่นบด จากข้อ 2 ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 2 ลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1 ลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 และล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) กรองและอบให้แห้ง ล้างคราบจักจั่นบด ด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง

4. นำคราบจักจั่นบด จากข้อ 3 ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 2 ลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 0.4%w/v ปริมาตร 1 ลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 และล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ล้างคราบจักจั่นบด ด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง ได้น้ำหนักไคตินจากคราบจักจั่น 42.6 กรัม และผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.1)

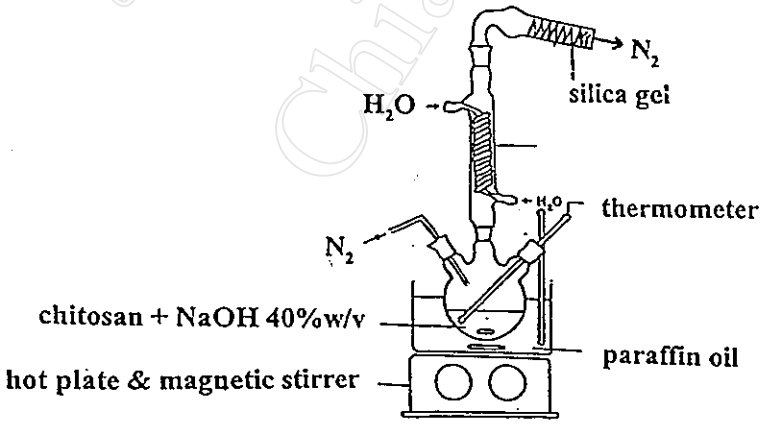
2.5 การเตรียมไคโตซาน

2.5.1 การเตรียมไคโตซานจากไคตินกระดองปูนา[50]

โดยนำผงไคตินจากกระดองปูนา(จากหัวข้อ 2.4.1) 15 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเกล็ดโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.08 กรัม จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 40%w/v ปริมาตร 400 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาขณะทำการรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ดูรูปที่ 2.1) กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 ล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) และล้างด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง นำผงไคโตซานทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกันนี้อีก 2 ครั้ง ได้น้ำหนักไคโตซานจากกระดองปูนา 20.6 กรัม ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.1)

2.5.2 วิธีการเตรียมไคโตซานจากไคตินคราบจักจั่น[40]

โดยนำผงไคตินจากคราบจักจั่น(จากหัวข้อ 2.4.2) 15 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเกล็ดโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.33 กรัม จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 40%w/v ปริมาตร 400 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาขณะทำการรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 ล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) และล้างด้วยเมธานอลอีกครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C ให้แห้ง นำผงไคโตซานทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกันนี้อีก 2 ครั้ง ได้น้ำหนักไคโตซานจากคราบจักจั่น 36.2 กรัม ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การเตรียมไคโตซานโดยรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

2.6 การสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ไคโตซานจากกระดองปูนาและคราบจักจั่น

2.6.1 การสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานแบบสุ่มจากไคโตซานพาณิชย์[47]

ทำการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานแบบสุ่มจากไคโตซานพาณิชย์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นของ Gemzazade[47]

2.6.1 (ก) การเตรียมไคโตซานในรูปเจลที่มีตัวทำละลายผสมอยู่[47]

ชั่งตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์ 5 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 1%w/v ปริมาณ 700 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาจนไคโตซานละลายหมด จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 10%w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนสารละลายเป็นด่างจะเกิดเป็นเจลสีขาว กรองด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์40 ล้างด้วยน้ำสะอาดจนเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) และล้างตะกอนด้วยเมธานอล 3 ครั้ง และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่ปราศจากน้ำอีก 2 ครั้ง

2.6.1 (ข) การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต

ใช้เข็มฉีดยาดูดไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่ปราศจากน้ำ(จากหัวข้อ 2.3.1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นแช่ลงในอ่างน้ำแข็งค่อยๆหยดกรดคลอโรซัลโฟนิก ปริมาตร 45 มิลลิลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิของอ่างน้ำแข็งให้อยู่ในช่วง 0-4°C คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ตัวทำละลายผสมกัน จากนั้นนำอ่างน้ำแข็งออก และคนต่อไปจนอุณหภูมิของตัวทำละลายผสมสูงขึ้นมาอยู่ที่อุณหภูมิห้อง

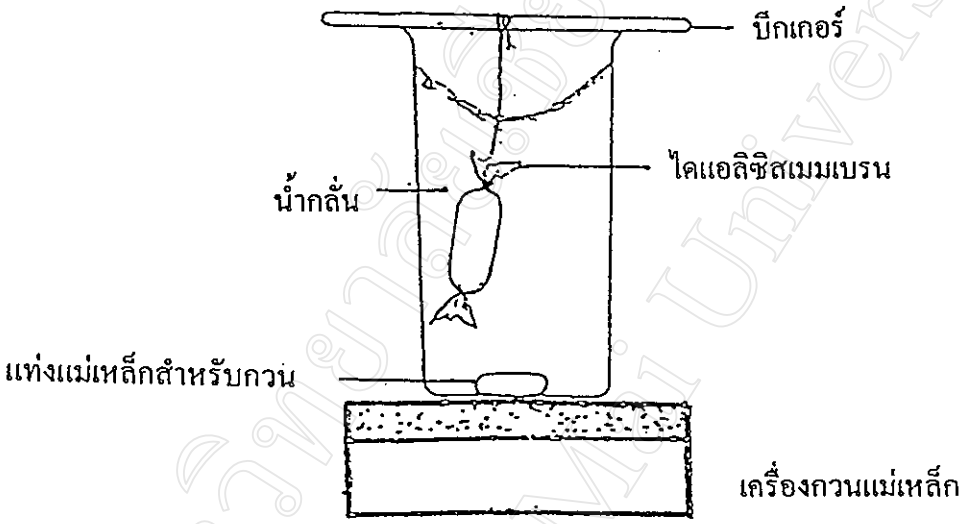
2.6.1 (ค) การสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานในสภาวะ semi-heterogeneous[47]

1.ชั่งไคโตซานในรูปเจลที่มีตัวทำละลายผสมอยู่ (จากหัวข้อ.2.6.1(ก)) 10 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมที่มีสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต (จากหัวข้อ2.6.1.(ข)) จากนั้นปิดด้วย stop cock ไว้ด้านบนซึ่งบรรจุซิลิกาเจลเพื่อป้องกันความชื้น คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2. นำสารละลายจากขวดก้นกลมเทลงในบีกเกอร์ขนาด 3 ลิตร ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำและค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 20%w/v ลงในบีกเกอร์จนสารละลายเป็นกลาง (ตรวจสอบด้วยกระดาษ pH) และคนต่อไปเป็นเวลา 30 นาที

3. จากนั้นเทสารละลายลงในเมธานอล ปริมาตร 3 ลิตร ได้ตะกอนสีขาว คนตะกอนด้วยแท่งแก้วกรองตะกอนด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 ล้างตะกอนด้วยเมธานอล 4-5 ครั้ง นำตะกอนสีขาวใส่ลงไปในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นและใช้แท่งแก้วคนจนตะกอนสีขาวละลายหมด ปิเปตสารละลายใส่ลงในถุงไดแอลิซิส ยาว 20 เซนติเมตรที่มัดปลายด้านหนึ่ง จากนั้นมัดปลายอีกด้านหนึ่งแล้วผูกเชือกให้แน่นแขวนแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 5 ลิตร (ดูรูปที่ 2.2) ทำการเปลี่ยนน้ำกลั่นทุก 6 ชั่วโมง ตรวจสอบน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH ไม่เป็นด่างและไม่พบอนุมูลซัลเฟต (ตรวจสอบความเป็นด่างของน้ำกลั่นด้วยสารละลายฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์ และทดสอบหาอนุมูลซัลเฟตด้วยผงแบเรียมคลอไรด์)[46] โดยใช้เวลาในการไดแอลิซิสประมาณ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 2.2 การไดแอลิซิสสารละลายซัลเฟตเดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์

4.จากนั้นนำสารละลายในถุงไดแอลิซิสไปกำจัดน้ำออก (lyophilized) และชั่งน้ำหนักซัลเฟตเดไคโตซานที่เตรียมได้ 2.9 กรัม ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.2)

สำหรับการสังเคราะห์ซัลเฟตเดไคโตซานจากกระดองปูนาและซัลเฟตเดไคโตซานจากคราบจักจั่น ทำการทดลองเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ซัลเฟตเดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ได้น้ำหนัก 2.6 และ 2.5 กรัม ตามลำดับ ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักซัลเฟเตดไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานจากแหล่งวัตถุดิบต่างๆ ซัลเฟเตดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และซัลเฟเตดพอลิเอธีลีนกลัยโคล

สารตั้งต้น	น้ำหนักสาร (กรัม)	ผลิตภัณฑ์ซัลเฟต (กรัม)	%โดยน้ำหนัก
ไคโตซานพาณิชย์จากกระดองปูทะเล	3.0	2.9	97
ไคโตซานจากกระดองปูนา	3.0	2.6	87
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	3.0	2.5	83
พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	10.0	3.3	33
พอลิเอธีลีนกลัยโคล	10.0	1.5	15

2.6.2 การสังเคราะห์ซัลเฟเตดพอลิแอลกอฮอล์[47]

ในการทดลองนี้ได้สังเคราะห์ซัลเฟเตดพอลิแอลกอฮอล์จากพอลิแอลกอฮอล์ 2 ชนิด คือ

2.6.2(ก) การสังเคราะห์ซัลเฟเตดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์[47]

วิธีการสังเคราะห์ซัลเฟเตดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ใช้วิธีเตรียมในสภาวะ heterogenous โดยชั่งพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (M.W.16000-24000) 10 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต (จากหัวข้อ 2.6.1(ข)) จากนั้นปิดด้วย stop cock ไว้ด้านบนซึ่งบรรจุซิลิกาเจลเพื่อป้องกันความชื้น คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง 60°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการสังเคราะห์ซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ได้น้ำหนัก 3.3 กรัม ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.2) ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์คาร์บอน ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์ เท่ากับ C 18.46, H 2.31, S 24.62 สูตรอย่างง่าย $[C_2H_3(SO_3Na)]_n$ แต่จากการทดลองพบเปอร์เซ็นต์ คาร์บอน ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์ เท่ากับ C 18.02, H 2.38, S 22.99 ตามลำดับ

2.6.2(ข) การสังเคราะห์ซัลเฟเตดพอลิเอธีลีนกลัยโคล[47]

วิธีการสังเคราะห์ซัลเฟเตดพอลิเอธีลีนกลัยโคลใช้วิธีเตรียมในสภาวะ heterogenous โดยนำพอลิเอธีลีนกลัยโคล (M.W.15000) 10 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตรที่มี สารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต (จากหัวข้อ 2.6.1(ข)) จากนั้นปิดด้วย stop cock ไว้ด้านบนซึ่งบรรจุซิลิกาเจลเพื่อป้องกันความชื้น ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C คนจนพอลิเอธีลีน-กลัยโคลละลายหมด และคนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการสังเคราะห์ซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ได้น้ำหนัก 1.5 กรัม ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.2) ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ คาร์บอน ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์ เท่ากับ C 11.97, H 1.71, S 13.68 สูตรอย่างง่าย $[C_2H_4(SO_3Na)_2]_n$ แต่จากการทดลองพบเปอร์เซ็นต์ คาร์บอน ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์ เท่ากับ C 12.54, H 2.06, S 12.80 ตามลำดับ

2.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน และซัลเฟเตดไคโตซาน

2.7.1 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานพาณิชย์ ไคโตซานจากกระดองปูนา และคราบจักจั่น[15]

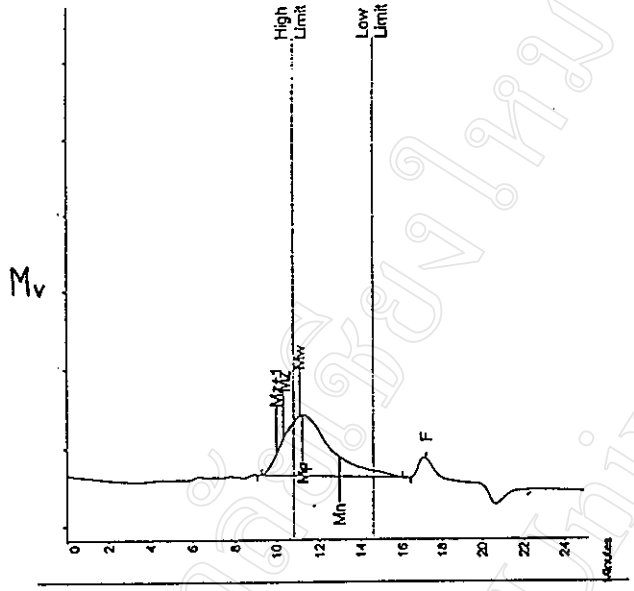
การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานโดยใช้เทคนิค เจลเพอร์มิเอชัน-โครมาโทกราฟี ทำการทดลองโดย

1. ชั่งสารมาตรฐาน pullulan ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอน 4 มิลลิกรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาทิ้งไว้ข้ามคืน

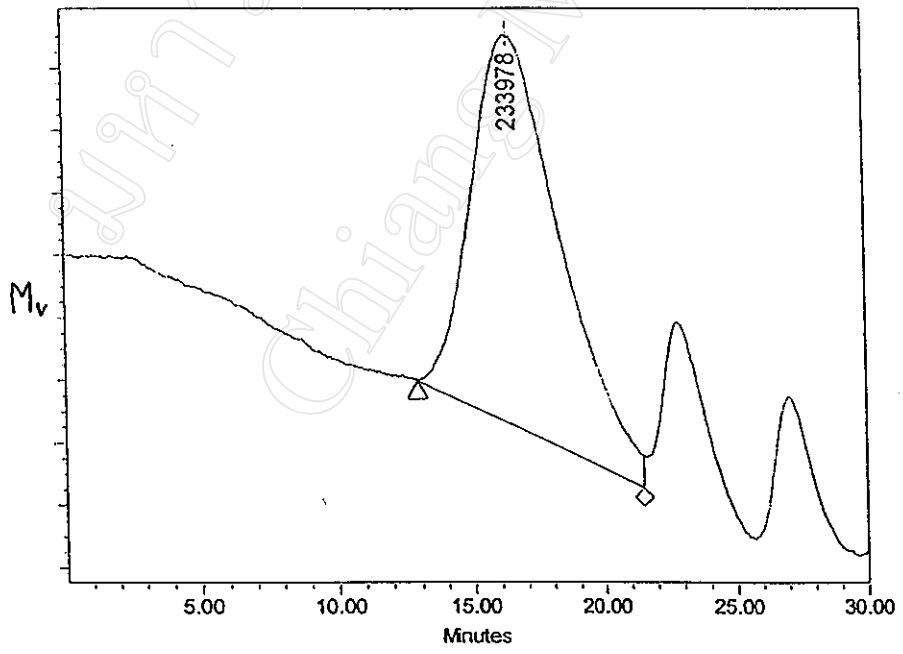
2. จากนั้นเติมสารละลายผสมกรดอะซีติคเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมแอซิเตท 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3. นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปฉีดผ่านคอลัมน์ GPC โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้ อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30°C ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง refractive index จะได้โครมาโทแกรมที่พลอตระหว่างเวลากับน้ำหนักโมเลกุล

สำหรับตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์ ไคโตซานจากกระดองปูนา และคราบจักจั่น เตรียมโดยชั่งตัวอย่างไคโตซาน ปริมาณ 4 มิลลิกรัม และทำการทดลองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน แล้วนำมาอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลจากโครมาโทแกรมที่ได้ ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.3 และ 2.4) และ (ตารางที่ 2.3)



รูปที่ 2.3โครมาโทแกรมที่พลอตระหว่างเวลากับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานพาณิชย์



รูปที่ 2.4โครมาโทแกรมที่พลอตระหว่างเวลากับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจากกราบจักจั่น

ตารางที่2.3ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานโดยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_v) ของซัลเฟตไคโตซานโดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

สารตัวอย่าง	M_n	M_v	M_w
ไคโตซานพาณิชย์	5.1×10^4	5.0×10^5	5.1×10^5
ซัลเฟตไคโตซาน	–	3.2×10^4	–
พีค 1	–	6.8×10^4	–
พีค 2	–	3.6×10^4	–
พีค 3	–	2.0×10^4	–
ไคโตซานจากกระดองปูนา	–	–	–
ซัลเฟตไคโตซาน	–	3.9×10^4	–
พีค 1	–	7.1×10^4	–
พีค 2	–	3.5×10^4	–
พีค 3	–	2.0×10^4	–
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	2.3×10^4	2.3×10^5	4.0×10^5
ซัลเฟตไคโตซาน	–	2.5×10^4	–
พีค 1	–	5.5×10^4	–
พีค 2	–	2.3×10^4	–
พีค 3	–	1.2×10^4	–

<u>หมายเหตุ</u> M_n M_v และ M_w ของไคโตซานโดยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี

M_v ของซัลเฟตไคโตซานโดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.7.2 การแยกขนาดโมเลกุลของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์[55]

1. เท sepharose ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซาไลน์ (phosphate buffer saline, PBS) ที่ pH 7.2 ใช้แท่งแก้วคน และนำไปอุ่นในอ่างน้ำ ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.บรรจุ sepharose ลงในคอลัมน์ขนาด 1.6×120 เซนติเมตร สูง 100 เซนติเมตร โดยค่อยๆเท sepharose จากข้อ 1 ลงในคอลัมน์ จากนั้นใช้สายยางตีด้านนอกของคอลัมน์เป็นระยะๆ เพื่อทำให้ sepharose แพคตัวได้ดี

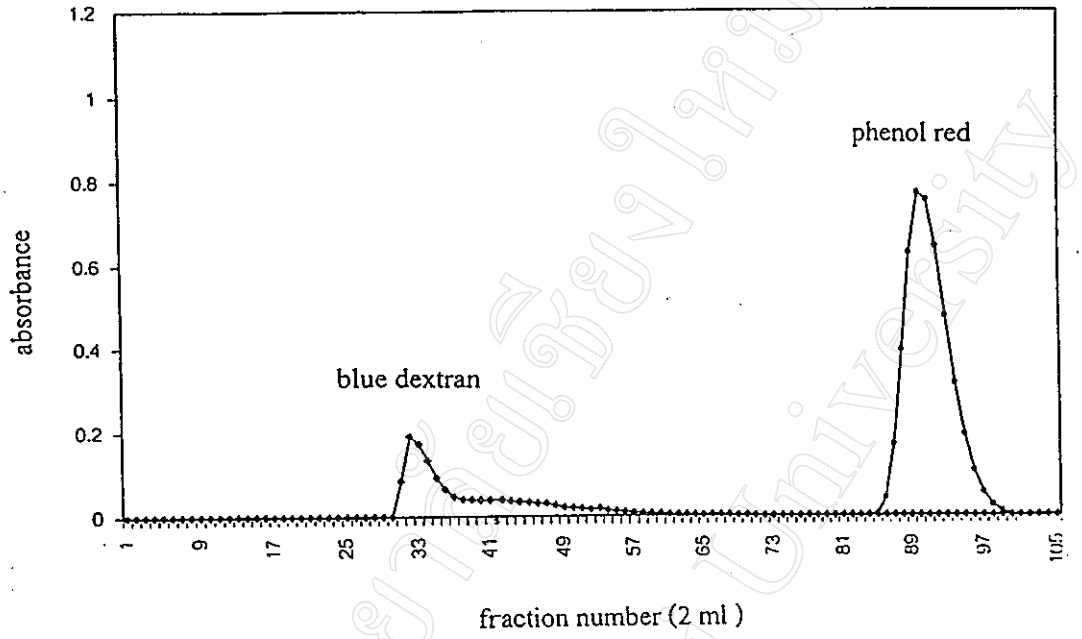
3. ผ่านสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ pH 7.2 ลงในคอลัมน์ โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

4. ทำการ calibrate Vo (void volumn) และ Vt (total volumn of the packed bed) ด้วยสารมาตรฐาน blue dextran และ phenol red โดยปิเปตสารมาตรฐาน blue dextran และ phenol red ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและ 3.5 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ pH 7.2 จนปริมาตรรวมเป็น 2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารมาตรฐานผสมลงในคอลัมน์และชะ(elute) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ทำการเก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำ fraction ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร สำหรับ blue dextran และ 565 นาโนเมตร สำหรับ phenol red ตามลำดับ ทำการพลอตกราฟระหว่าง fraction number กับค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.5)

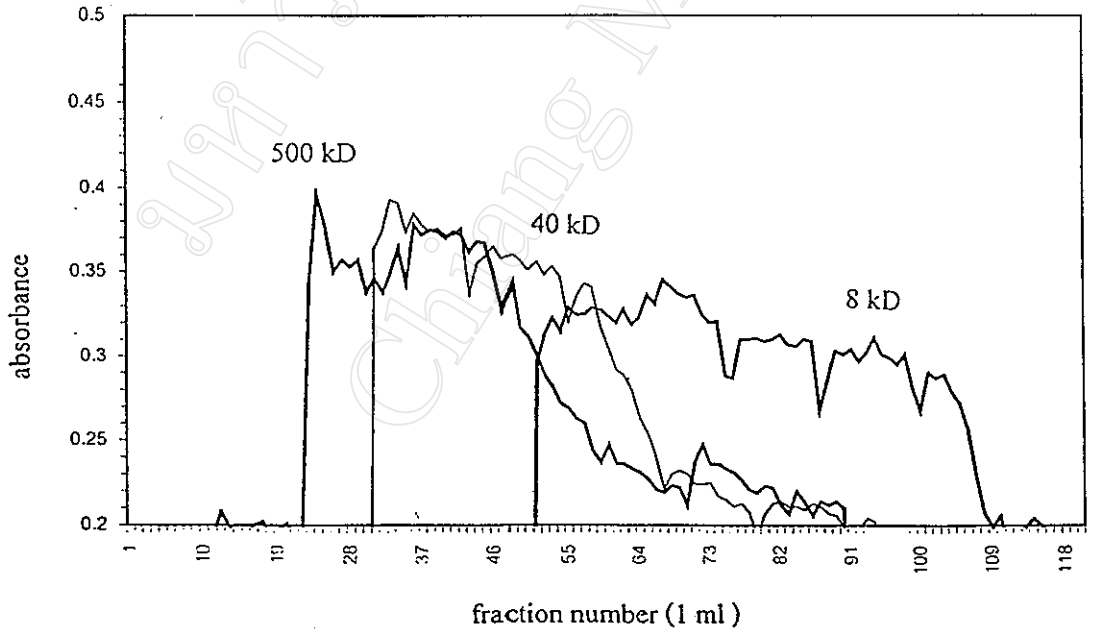
5. เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน dextran sulfate ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8 กิโลดาลตัน โดยชั่งสารมาตรฐาน dextran sulfate ปริมาณ 200 มิลลิกรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้สารมาตรฐานละลาย จากนั้นเทลงในคอลัมน์และชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ทำการเก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร นำแต่ละ fraction ที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ Farndale reagent โดยปิเปตสารละลายแต่ละ fraction ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม Farndale reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการพลอตระหว่าง fraction number กับค่าการดูดกลืนแสง ส่วน dextran sulfate ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 และ 500 กิโลดาลตันทำการทดลองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน dextran sùlfate ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8 กิโลดาลตัน ผลการทดลองนำมาแสดงไว้ในรูปเดียวกัน (ดูรูปที่ 2.6)

6. เตรียมสารละลายตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซานโดยชั่งซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ปริมาณ 200 มิลลิกรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้สารตัวอย่างละลายจากนั้นเทลงในคอลัมน์ และทำ

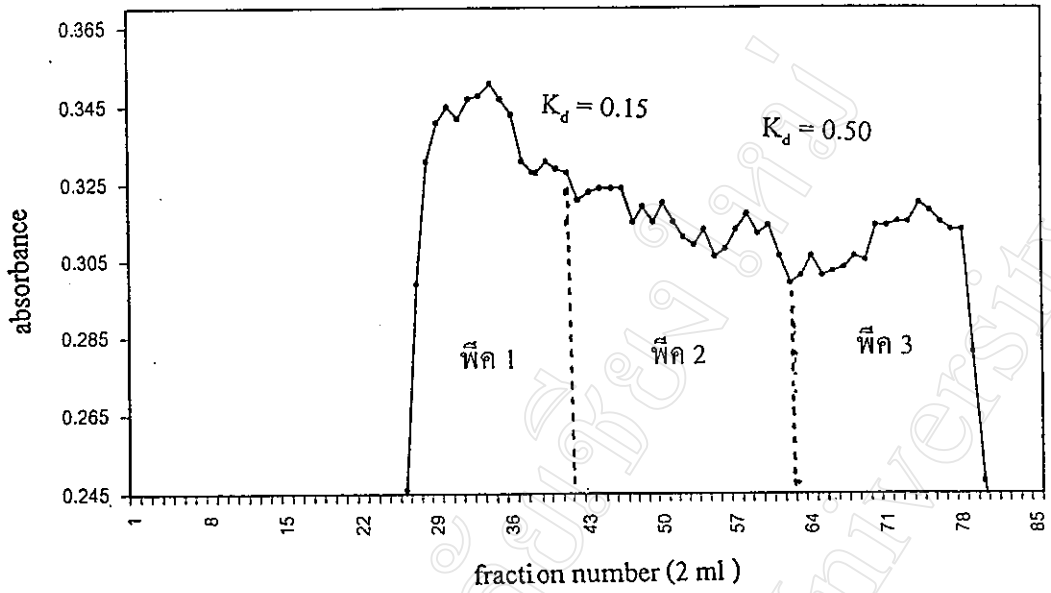
การทดลองเช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน dextran sulfate ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.7) ส่วนซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนาและคราบจักจั่น ทำการทดลองเช่นเดียวกับซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.8 และ 2.9)



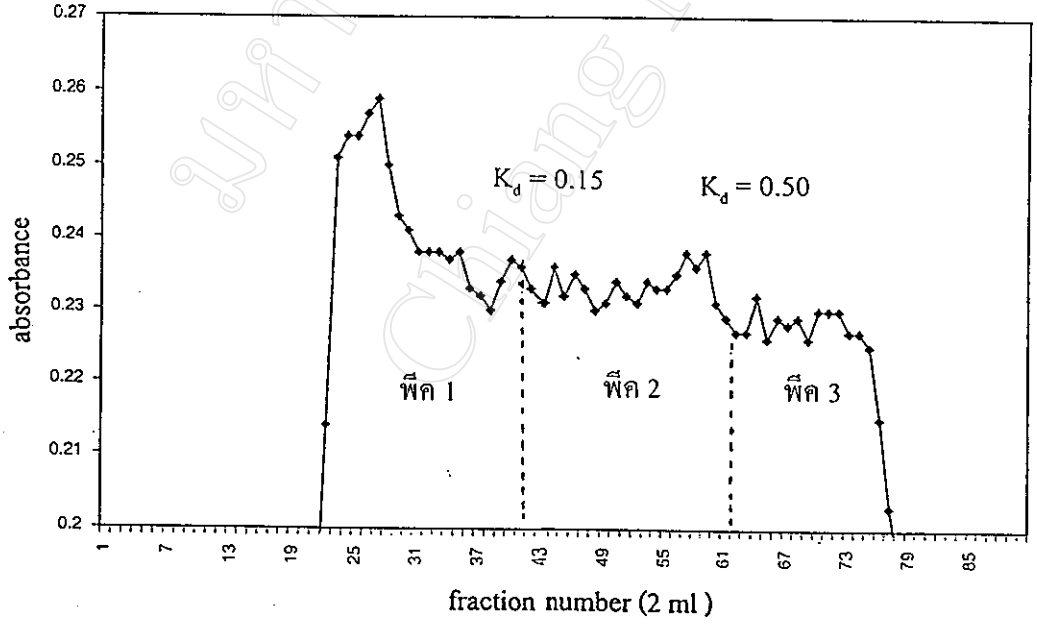
รูปที่ 2.5 กราฟ calibrate sepharose ด้วยสารมาตรฐาน blue dextran และ phenol red



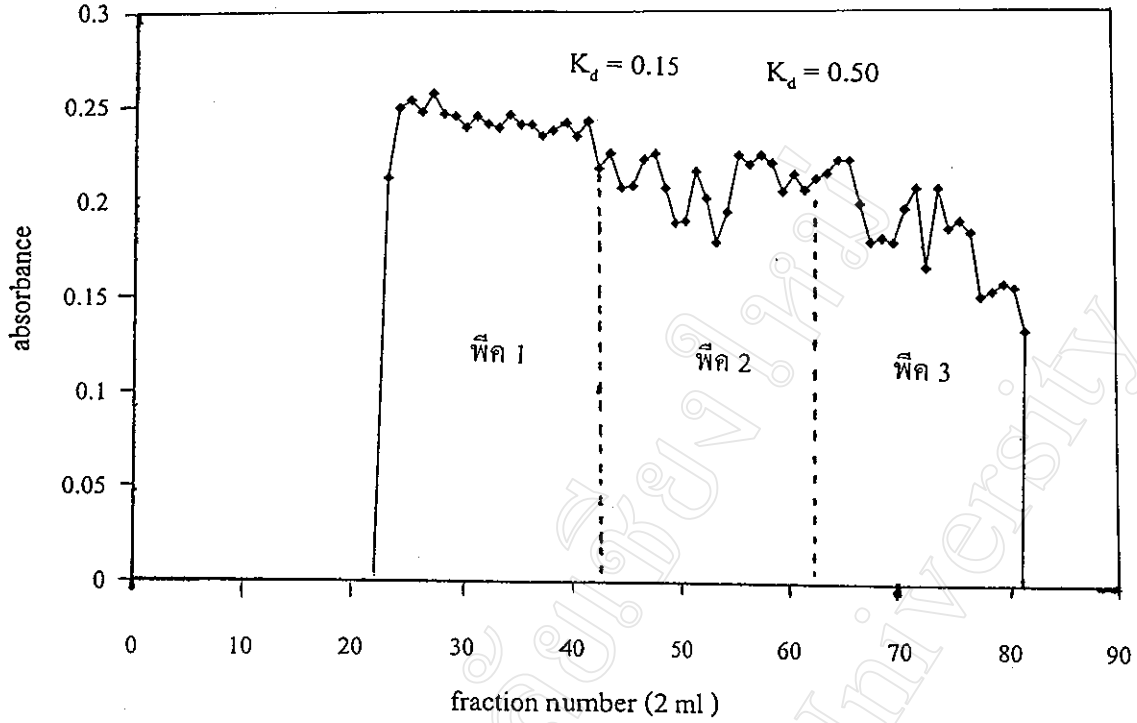
รูปที่ 2.6 กราฟ calibrate sepharose ด้วยสารมาตรฐาน dextran sulfate ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8, 40 และ500 กิโลดาลตัน



รูปที่ 2.7 กราฟแยกขนาดโมเลกุลซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์



รูปที่ 2.8 กราฟแยกขนาดโมเลกุลซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา



รูปที่ 2.9 กราฟแยกขนาดโมเลกุลซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น

จากรูปที่ 2.7 สามารถแบ่งซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ออกเป็น 3 พีค ตามน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย โดยดูจากค่า K_d (distribution coefficient)

จากสมการ $K_d = V_e - V_0 / V_t - V_0$

จากรูป 2.7 พีค 1 จะมี V_e = 84 มิลลิลิตร และจากรูปที่ 2.5 V_0 = 66 มิลลิลิตร V_t = 182 มิลลิลิตร แทนค่า K_d = 84-66 /182-66 = 0.15

จากรูป 2.7 พีค 2 จะมี V_e = 124 มิลลิลิตร และจากรูปที่ 2.6 V_0 = 66 มิลลิลิตร V_t = 182 มิลลิลิตร แทนค่า K_d = 124-66 /182-66 = 0.50

จากค่า K_d จะทำให้ทราบ V_e ของซัลเฟเตดไคโตซานจากแหล่งอื่นๆ จากสมการ $K_d = V_e - V_0 / V_t - V_0$ V_e ที่ได้ต้องหารด้วยปริมาตรของ fraction (2 มิลลิลิตร) ดังนั้นพีค 1 สามารถที่จะเก็บที่หลอด 42 และ พีค 2 เก็บที่หลอด 62

ส่วนตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา และคราบจักจั่นก็ทำการเก็บ fraction เช่นเดียวกับซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ โดยพีค 1 เก็บที่หลอด 42 และ พีค 2 เก็บที่หลอด 62 ตามลำดับ

2.7.3 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ไคโตซานจากกระดองปูนา และคราบจักจั่น โดยใช้เทคนิคการวัดความหนืดของละลายเจือจาง[17-20]

1. ชั่งตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ปริมาณ 0.4 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กจนซัลเฟเตดไคโตซานละลายหมด ถ้ามีตะตอนให้กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน

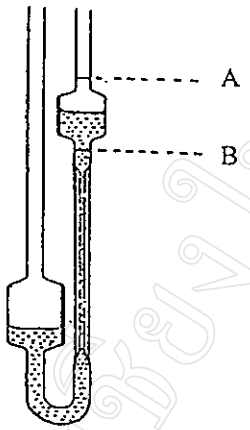
2. เตรียมสารละลายซัลเฟเตดไคโตซานให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 g/dl โดยปิเปตสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 6.2, 12.5 และ 18.7 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนปริมาตรรวมเป็น 25 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน

3. ปิเปตสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงใน Oswarld viscometer ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25$\pm$0.1°C จากนั้นดูดสารละลายให้ขึ้นมาให้อยู่เหนือระดับ A (ดูรูปที่ 2.10) และค่อยๆปล่อยสารละลายให้ไหลลงมาเมื่อสารละลายถึงระดับ A ให้เริ่มจับเวลาในหน่วยวินาทีจนสารละลายไหลลงมาถึงระดับ B จึงหยุดจับเวลา

4. ทำการปิเปตสารละลายซัลเฟเตดไคโตซานที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 g/dl ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงใน Oswarld viscometer ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25$\pm$0.1°C จากนั้นทำการเช่นเดียวกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์

5. จากเวลาในหน่วยวินาทีในข้อ 3 และ 4 สามารถนำไปคำนวณหาค่าความหนืดที่แท้จริง (intrinsic viscosity, $[\eta]$) จากการพลอตกราฟระหว่างค่าความหนืดลด (reduce viscosity) และค่าความหนืดอินฮีเรนท์ (inherent viscosity) กับความเข้มข้น ซึ่งสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.11, 2.12, 2.13 และ 2.14) และ(ตารางที่ 2.4, 2.5, 2.6 และ 2.7)

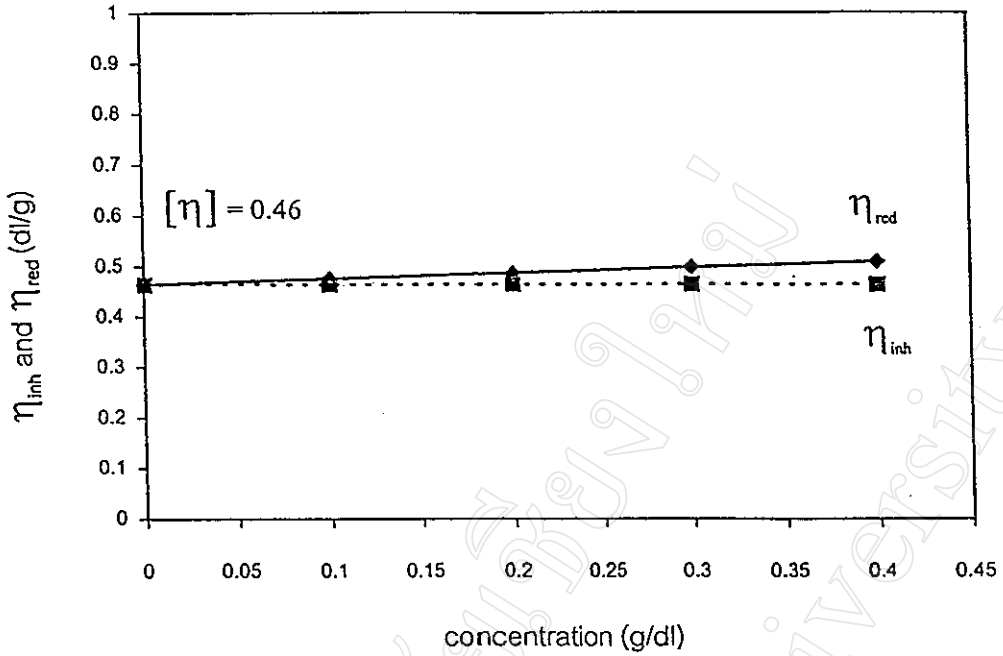
สำหรับการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนาและซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ผลการทดลอง(ดูรูปที่ 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.19, 2.20, 2.21 และ 2.22) และ (ตารางที่ 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14 และ 2.15)



รูปที่ 2.10 ระยะการจับเวลาของ Oswarld viscometer ที่ระดับ A ไปยังระดับ B

ตารางที่ 2.4 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.20	–	–	–	–
0.10	40.46	1.047	0.047	0.475	0.464
0.20	42.55	1.097	0.097	0.485	0.463
0.30	44.54	1.149	0.149	0.496	0.463
0.40	46.61	1.202	0.202	0.507	0.462



รูปที่ 2.11 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟตเดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย(M_v)ของซัลเฟตเดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์

$$[\eta] = (\eta_{red})_{c=0} = (\eta_{inh})_{c=0} = 0.46 \text{ dl/g}$$

จากรูปที่ 2.11 ค่า $[\eta] = 0.46$ dl/g

จากสมการ $[\eta] = KM_v^a$

$K = 1.75\times10^{-5}$

$a = 0.98$

$[\eta] = 0.46$ dl/g

แทนค่า

$$0.46 = 1.75\times10^{-5}M_v^{0.98}$$

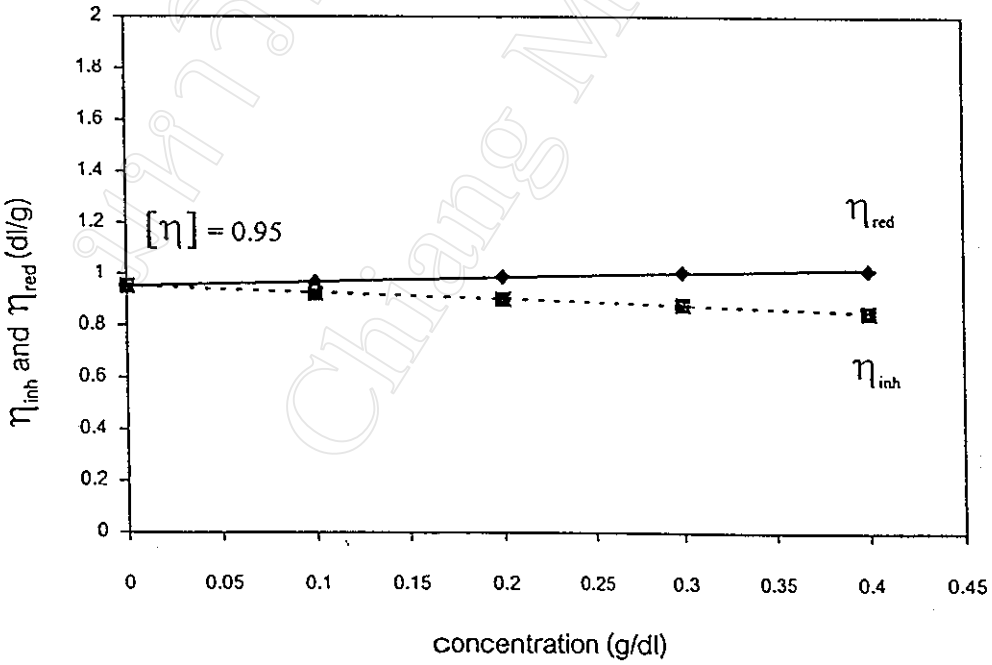
$$4.51 = \log M_v$$

$$M_v = 3.2\times10^4$$

ส่วนการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตเดไคโตซานจากกระดองปูนาและคราบจักจั่น คำนวณเช่นเดียวกับซัลเฟตเดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์

ตารางที่ 2.5 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ พีค 1 โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

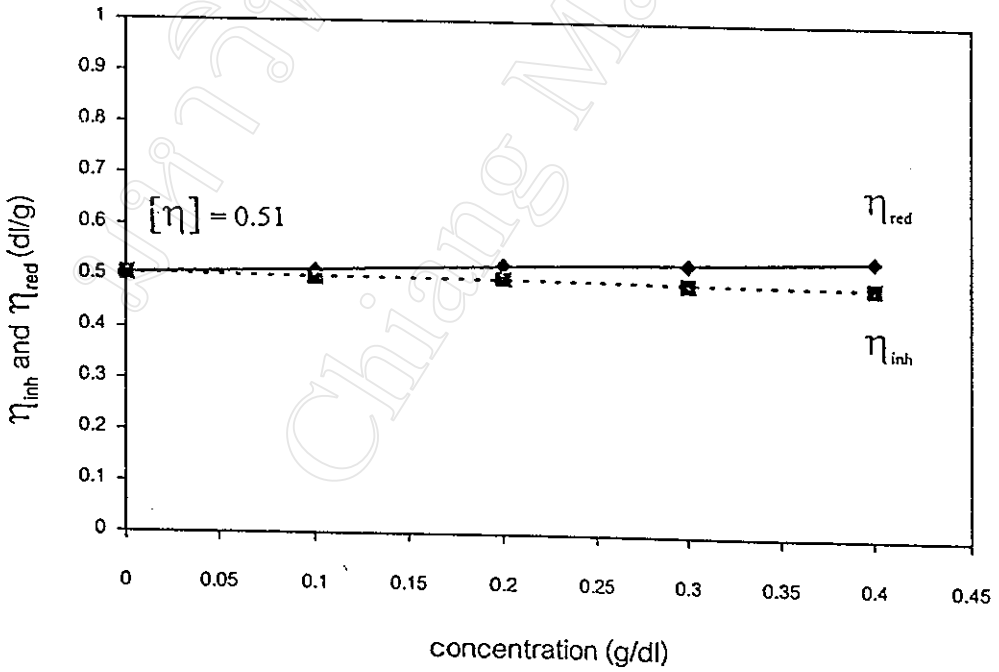
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.86	–	–	–	–
0.10	42.57	1.096	0.096	0.967	0.923
0.20	46.44	1.197	0.197	0.986	0.900
0.30	50.44	1.301	0.301	1.005	0.878
0.40	54.41	1.404	0.404	1.011	0.849



รูปที่ 2.12 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ พีค 1

ตารางที่ 2.6 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ พีค 2โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

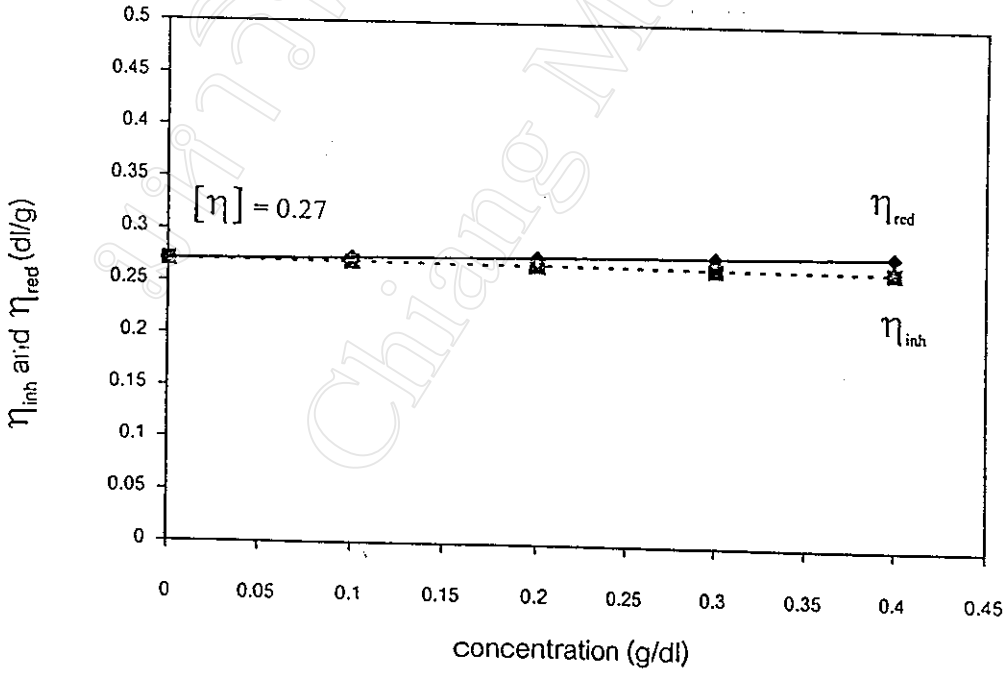
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.84	–	–	–	–
0.10	40.01	1.051	0.051	0.513	0.500
0.20	42.87	1.105	0.105	0.525	0.499
0.30	44.94	1.159	0.159	0.530	0.492
0.40	47.14	1.216	0.216	0.540	0.489



รูปที่ 2.13 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ พีค 2

ตารางที่ 2.7 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ พีค 3 โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

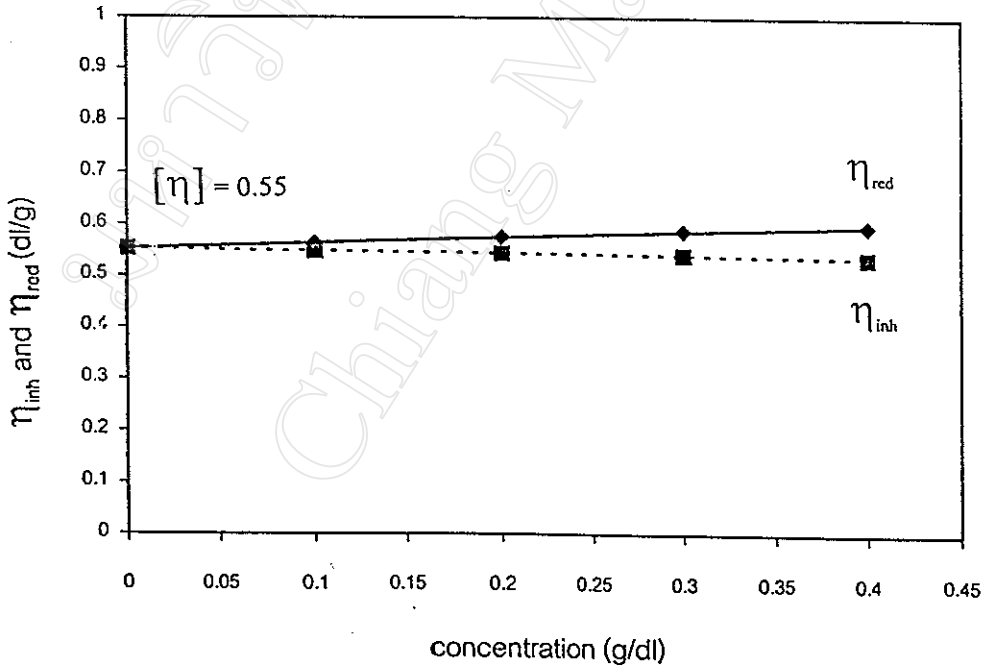
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.81	–	–	–	–
0.10	39.85	1.027	0.027	0.273	0.270
0.20	40.92	1.055	0.055	0.275	0.268
0.30	42.00	1.083	0.083	0.278	0.267
0.40	43.12	1.112	0.112	0.280	0.266



รูปที่2.14 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ พีค 3

ตารางที่ 2.8 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

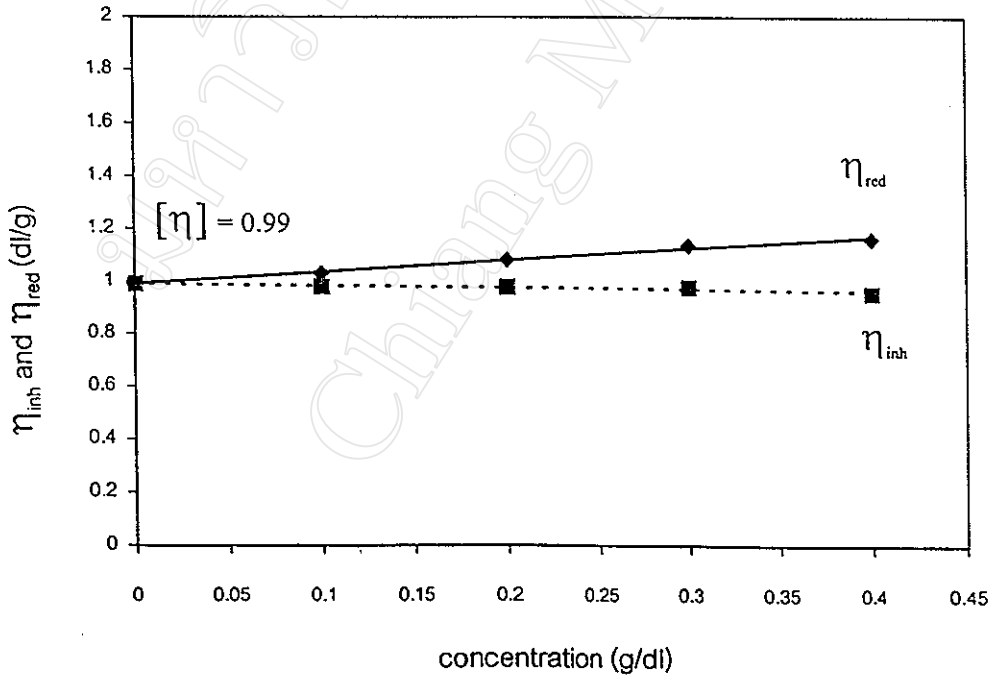
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.84	–	–	–	–
0.10	41.00	1.056	0.056	0.563	0.548
0.20	43.26	1.115	0.115	0.575	0.544
0.30	45.61	1.176	0.176	0.587	0.541
0.40	48.00	1.238	0.238	0.596	0.535



รูปที่ 2.15 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา

ตารางที่ 2.9 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟตเตดไคโตซานจากกระดองปูนา พืด 1โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

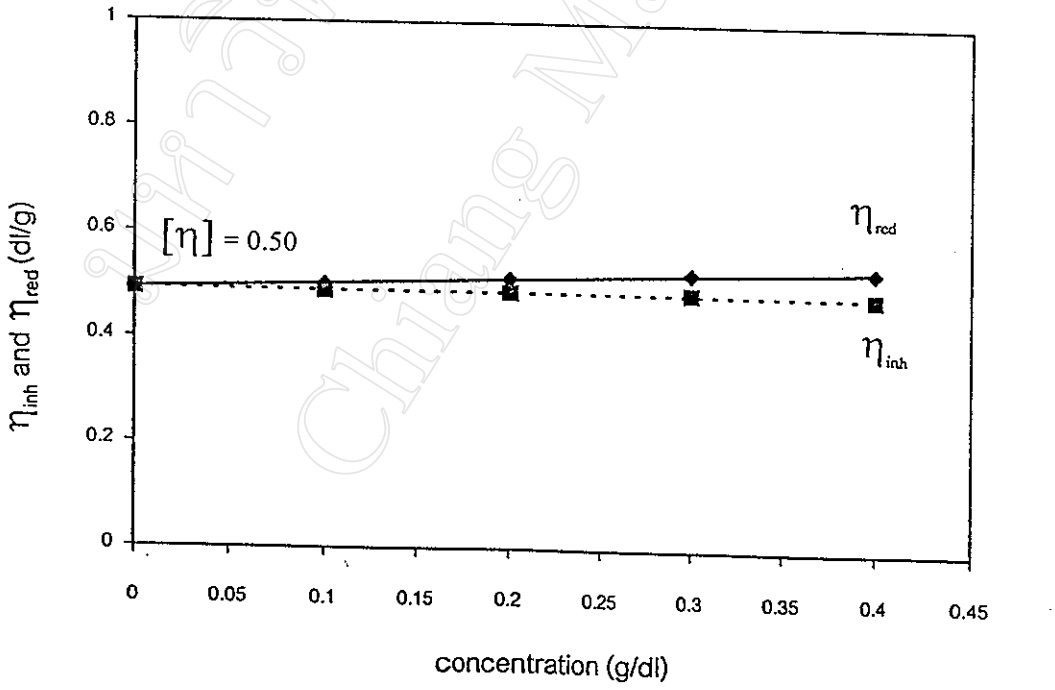
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.06	–	–	–	–
0.10	41.93	1.102	0.102	1.028	0.979
0.20	46.19	1.216	0.216	1.080	0.977
0.30	50.56	1.340	0.340	1.133	0.975
0.40	55.53	1.464	0.464	1.160	0.953



รูปที่ 2.16 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟตเตดไคโตซานจากกระดองปูนา พืด 1

ตารางที่ 210 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา พืค 2โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

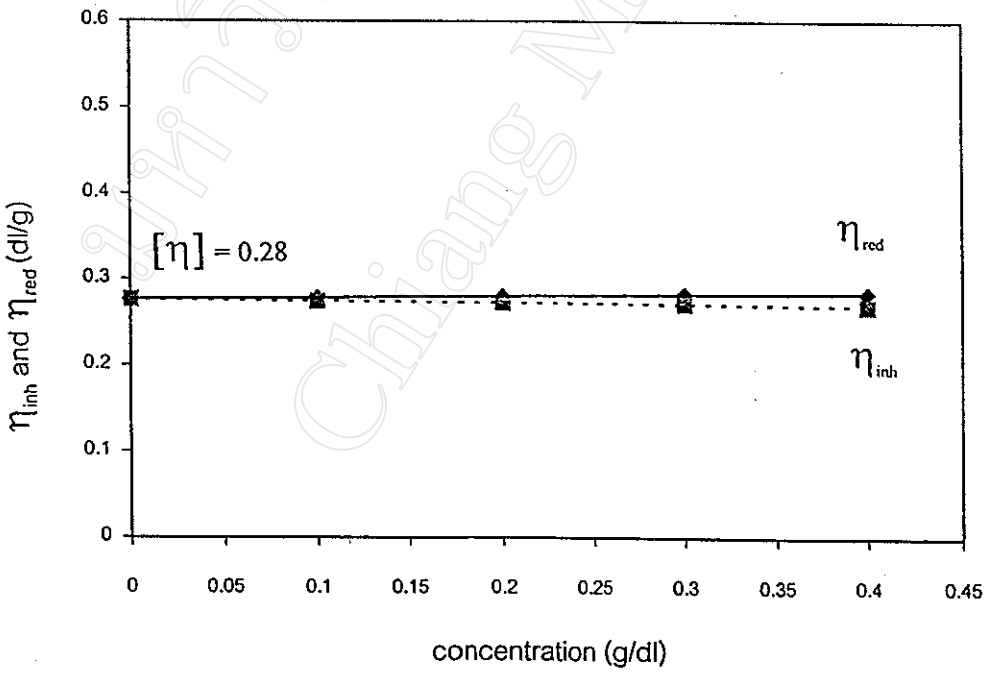
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.70	–	–	–	–
0.10	40.62	1.050	0.050	0.501	0.489
0.20	42.64	1.102	0.102	0.513	0.489
0.30	44.75	1.157	0.157	0.526	0.488
0.40	46.86	1.213	0.213	0.532	0.483



รูปที่ 2.17 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา พืค 2

ตารางที่ 2.11 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟตเดดไคโตซานจากกระดองปูนา พืด 3โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

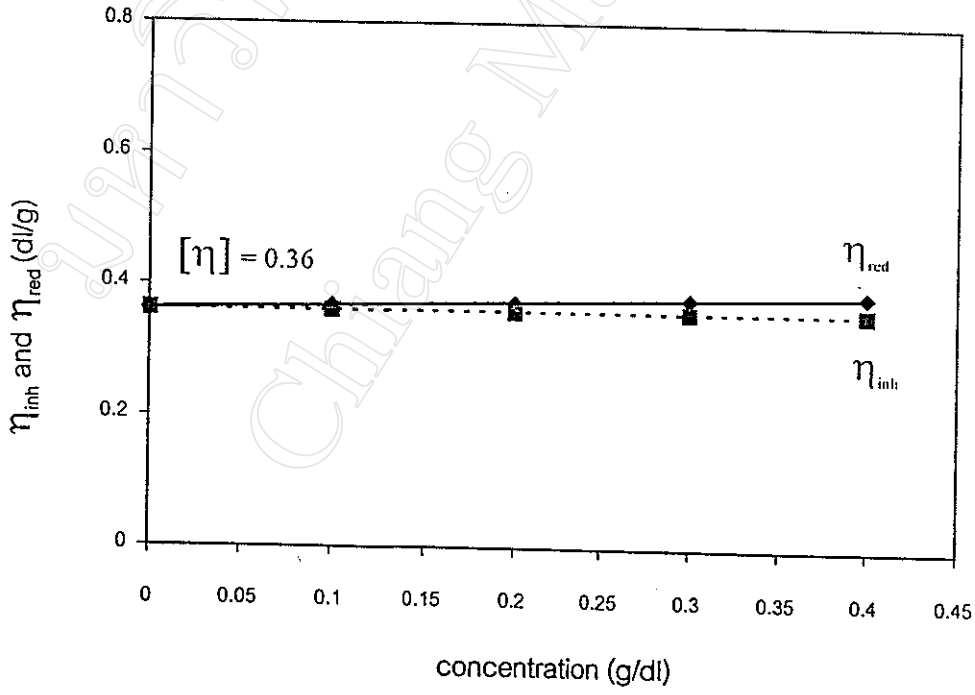
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.06	_	_	_	_
0.10	39.11	1.027	0.027	0.278	0.274
0.20	40.17	1.056	0.056	0.280	0.072
0.30	41.25	1.084	0.084	0.282	0.271
0.40	42.34	1.113	0.113	0.283	0.269



รูปที่ 2.18 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟตเดดไคโตซานจากกระดองปูนา พืด 3

ตารางที่ 2.12 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น โดยวิธีการวัดความหนืดสารของละลายเจือจาง

concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.06	–	–	–	–
0.10	39.45	1.036	0.036	0.368	0.361
0.20	40.87	1.074	0.074	0.373	0.360
0.30	42.35	1.114	0.114	0.380	0.359
0.40	43.89	1.154	0.154	0.386	0.359

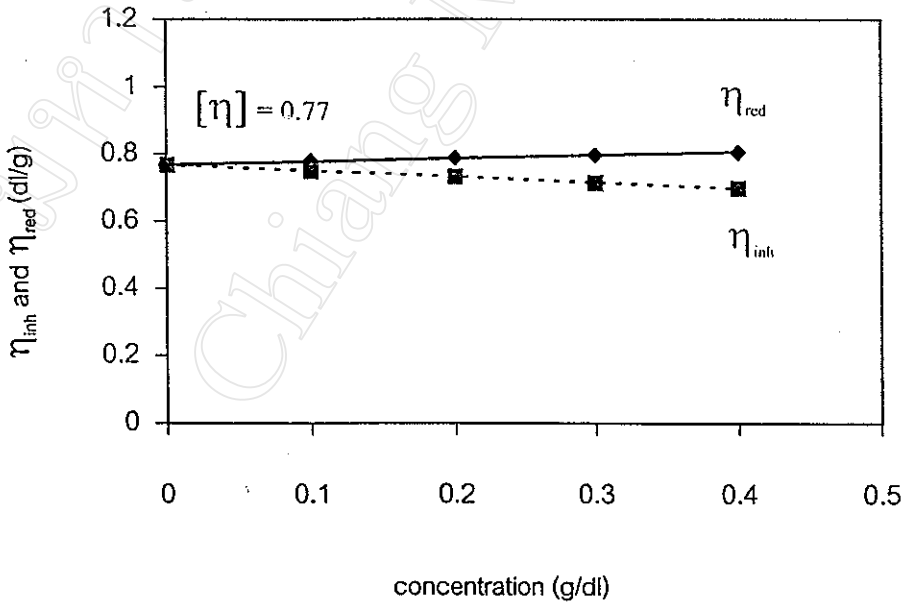


รูปที่ 2.19 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 2.13 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น พืค 1โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

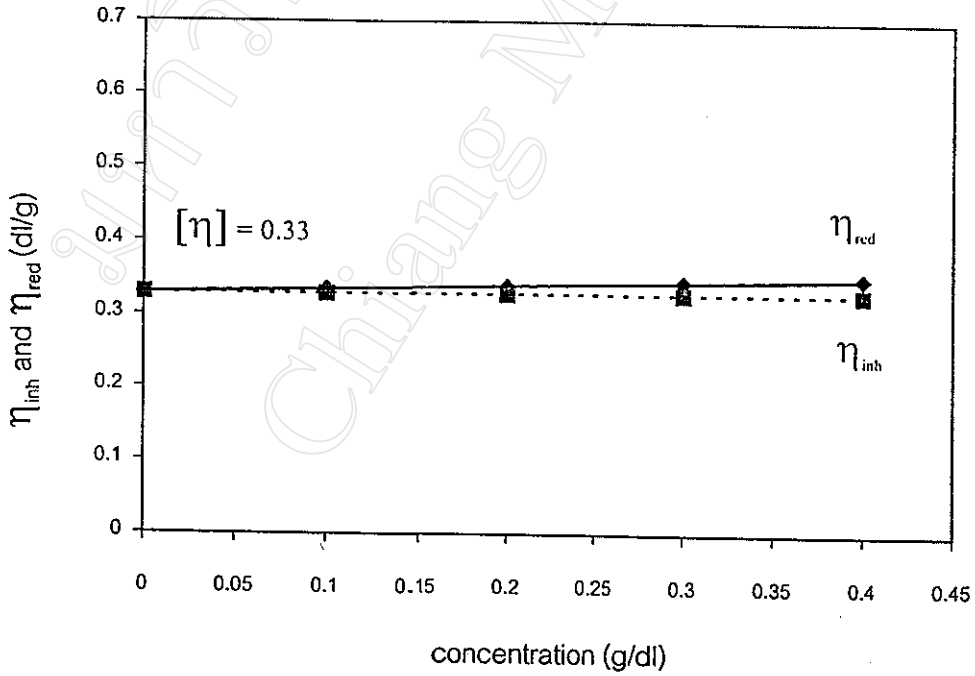
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.86	_	_	_	_
0.10	41.85	1.077	0.077	0.778	0.749
0.20	44.92	1.157	0.157	0.788	0.731
0.30	48.05	1.238	0.238	0.796	0.714
0.40	51.24	1.322	0.322	0.805	0.698



รูปที่ 2.20 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น พืค 1

ตารางที่ 2.14 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่นพืด 2โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

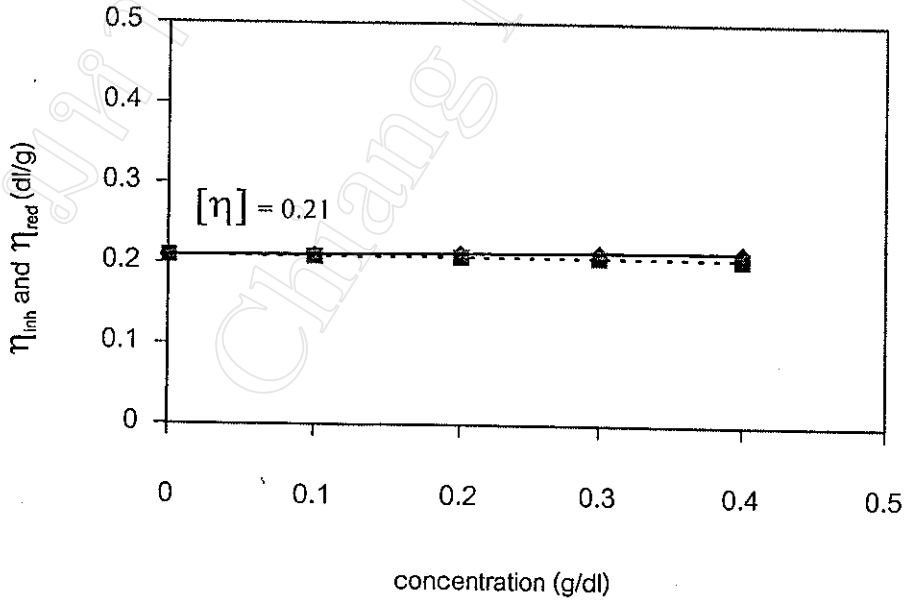
concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.86	_	_	_	_
0.10	40.15	1.033	0.033	0.333	0.328
0.20	41.47	1.067	0.067	0.338	0.327
0.30	42.83	1.103	0.103	0.344	0.327
0.40	44.23	1.139	0.139	0.349	0.327



รูปที่ 2.21 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น พืด 2

ตารางที่ 2.15 ผลการคำนวณหาค่าความหนืดแบบต่างๆของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น พีค 3โดยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง

concentration (g/dl)	flow time (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{red} (g/dl)	η_{inh} (g/dl)
0	38.86	–	–	–	–
0.10	39.67	1.021	0.021	0.210	0.208
0.20	40.50	1.042	0.042	0.212	0.208
0.30	41.34	1.064	0.064	0.214	0.207
0.40	42.18	1.086	0.086	0.215	0.207



รูปที่ 2.22 กราฟความหนืดลด และความหนืดอินฮีเรนท์กับความเข้มข้นของซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น พีค 3

2.8 การศึกษาสมบัติทางเคมีของไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซาน

2.8.1 การหาค่าการหมุนจำเพาะ[51]

ชั่งตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์ 0.125 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2%v/v ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาจนไคโตซานละลายหมด เทลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2 %v/v จนครบปริมาตร แล้วนำไปวัดค่าการหมุนระนาบแสงด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ ที่อุณหภูมิ 28°C โดยใช้หลอดใส่สารตัวอย่างยาว 21 เซ็นติเมตร ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.16) สำหรับตัวอย่างไคโตซานจากกระดองปูนาและคราบจักจั่น ทำการทดลองเช่นเดียวกับไคโตซานจากพาณิชย์ ส่วนตัวอย่างซัลเฟตไคโตซานทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจากสารละลายกรดอะซีติคเป็นน้ำกลั่นแทน ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.16)

ตารางที่ 2.16 ผลของการหาค่าการหมุนจำเพาะ ในตัวอย่างไคโตซานและซัลเฟตไคโตซาน

สารตัวอย่าง	α	$[\alpha]^{28}_{D}$
ไคโตซานพาณิชย์	-0.15	-14.3
ไคโตซานจากกระดองปูนา	-0.20	-19.0
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	-0.24	-22.8
ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์	-0.08	-7.6
ซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา	-0.10	-9.5
ซัลเฟตไคโตซานจากคราบจักจั่น	-0.11	-10.5

คำนวณหาค่า $[\alpha]^{28}_{D}$ จากสมการ $[\alpha]^{28}_{D} = \alpha$(จากการทดลอง)/ c×l

จากตารางที่ 2.16 ตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์ มีค่า α = -0.1 c = 0.005 g/cm^3 l = 2.1 dm^2

แทนค่า $[\alpha]^{28}_{D} = -0.15/ 0.005 \times 2.1$

$[\alpha]^{28}_{D} = -14.3$

ส่วนตัวอย่างไคโตซานจากกระดองปูนา จากคราบจักจั่นและซัลเฟตไคโตซานคำนวณหาค่า $[\alpha]^{28}_{D}$ เช่นเดียวกับตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์

2.8.2 การหาค่าองศาของการกำจัดหมู่เมอซิทิล (Degree of deacetylation,DDA)

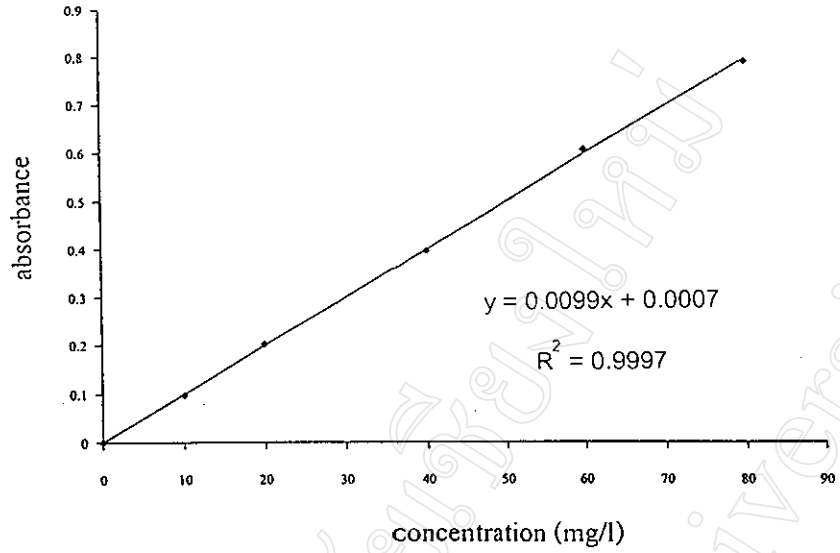
โดยวิธีนินไฮดริน[19,34,35]

1.ชั่งตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์ 0.01-0.05 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2%v/v ปริมาตร 40 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาจนไคโตซานละลายหมด ถ้ามีตะตอนให้กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42 และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2%v/v จนครบปริมาตร

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (จากข้อ 1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายแอซิเตทบัฟเฟอร์ 4 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 2%w/v ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าสารละลายให้ผสมกัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมเอธานอลเข้มข้น 50%v/v ลงในหลอดทดลองจนปริมาตรรวมเป็น 25 มิลลิลิตร และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เทียบกับแบลงค์โดยใช้สารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 2%v/v แทนสารละลายตัวอย่าง และทำการทดลองเช่นเดียวกัน คำนวณหาปริมาณหมู่อะมีโนอิสระในตัวอย่างไคโตซานโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.ทำกราฟมาตรฐานโดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน phenylalanine ที่มีปริมาณไนโตรเจน 10, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายแอซิเตทบัฟเฟอร์ 4 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 2%w/v ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าสารละลายให้ผสมกัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.23) และ (ตารางที่ 2.17และ 2.18)



รูปที่ 2.23 กราฟมาตรฐาน phenylalanine ที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ในช่วง 10-80 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.17 ผลการหาค่าองศาของการกำจัดหมู่เอซิทิลในตัวอย่างไคโตซานโดยวิธีนินไฮดริน

สารตัวอย่าง	ครั้งที่	น้ำหนัก (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง	%N เฉลี่ย ($-NH_2$)	%total N*	%DDA ($-NH_2$)/N
ไคโตซานพาณิชย์	1	0.0129	0.605	5.94	7.62	78.0
	2	0.0139	0.655			
ไคโตซานจากกระดองปูนา	1	0.0103	0.462	5.62	7.52	76.0
	2	0.0103	0.456			
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	1	0.0128	0.612	6.05	7.42	80.0
	2	0.0137	0.658			

*(จาก CHNS/O analyzer)

ตารางที่ 2.18 เปรียบเทียบผลของการหาค่าองศาของหมู่แอซิทิลในตัวอย่างไคโตซานโดยวิธี ninhydrin และ potentiometric titration

สารตัวอย่าง	% DDA ninhydrin method	% DDA potentiometric titration method*
ไคโตซานพาณิชย์	78.0	88.0
ไคโตซานจากกระดองปูนา	76.0	79.0
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	80.0	80.0

<u>หมายเหตุ</u>* คือวิธีที่เปรียบเทียบในการหา %DDA โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัทแห่งหนึ่ง

2.8.3. การหาค่าองศาของหมู่ซัลเฟต (Degree of sulfation, DS) โดยวิธีนินไฮดริน[45]

1. ชั่งตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ ปริมาณ 0.10 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาจนซัลเฟเตดไคโตซานละลายหมด ถ้ามีตะตอนให้กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (จากข้อ 1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองเติมสารละลายแอซิเตทบัฟเฟอร์ 4 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 2%w/v ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าสารละลายให้ผสมกัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับ (หัวข้อ 2.8.2 ดังข้อ 3 และ 4) เพื่อหาปริมาณหมู่อะมีโนส่วนที่เหลือที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา จากการหาค่าองศาของการกำจัดหมู่แอซิทิลของไคโตซานทำให้ทราบองศาของหมู่อะมิโนทั้งหมด และจากข้อมูลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ สามารถที่จะคำนวณหาค่าองศาของหมู่ซัลเฟตในตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซานได้ ส่วนตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนาและคราบจักจั่น ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ (ดูรูปที่ 2.23) และ(ตารางที่ 2.19)

ตารางที่ 2.19 ผลการหาองศาของหมู่ซัลเฟตในตัวอย่างซัลเฟตไคโตซาน

สารตัวอย่าง	ครั้งที่	น้ำหนัก (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง	% N ($-NH_2$)	% total N*	% total S*	$-SO_3Na$ ($-NH_2$)	$-SO_3Na$ (-OH)	degree of sulfation (DS)
ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์	1	0.0507	0.055	0.27	7.62	15.64	0.85	1.45	2.30
	2	0.0510	0.052						
ซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา	1	0.0509	0.051	0.25	7.42	15.72	0.75	1.55	2.30
	2	0.0510	0.053						
ซัลเฟตไคโตซานจากคราบจักจั่น	1	0.0500	0.055	0.29	7.52	13.44	0.75	1.22	1.97
	2	0.0509	0.062						

(* จาก CHNS/O analyzer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.8.4. การพิสูจน์เอกลักษณ์

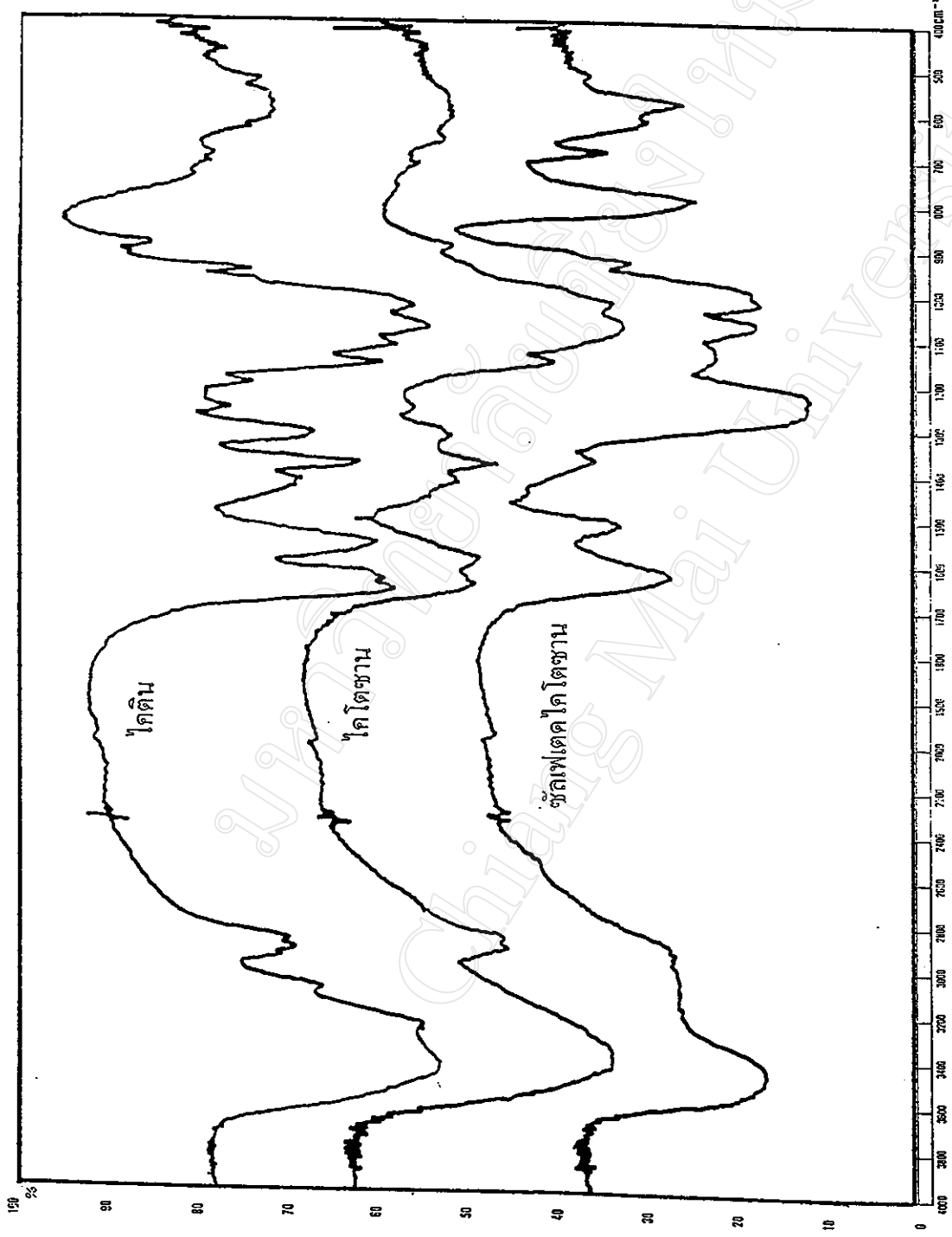
1. อินฟราเรดสเปคโทรสโคปี

บดสารตัวอย่างที่เป็นไคติน ไคโตซาน พอลิแอลกอฮอล์ ซัลเฟเตดไคโตซาน หรือซัลเฟเตดพอลิแอลกอฮอล์ที่แห้งในโกร่งอะเกทผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ที่อบแห้งในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ใส่ลงในเครื่องพิมพ์ (die) ที่ต่อกับปั้มสุญญากาศ จากนั้นจึงอัดสารผสมในเครื่องพิมพ์โดยใช้เครื่องอัด (press) ที่ความดันประมาณ 10 ตันต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2-3 นาที หลังการอัดจะเป็นแผ่นกลมบาง และโปร่งใส แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปคโทรมิเตอร์ในช่วงคลื่น 400-4000 cm^{-1} สเปคตรัมที่ได้ (ดูรูปที่ 2.24, 2.25, 2.26, 2.27 และ 2.28) และ (ตารางที่ 2.20, 2.21, 2.22, 2.23 และ 2.24)

ตารางที่ 2.20 การแปลผล IR spectrum ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์

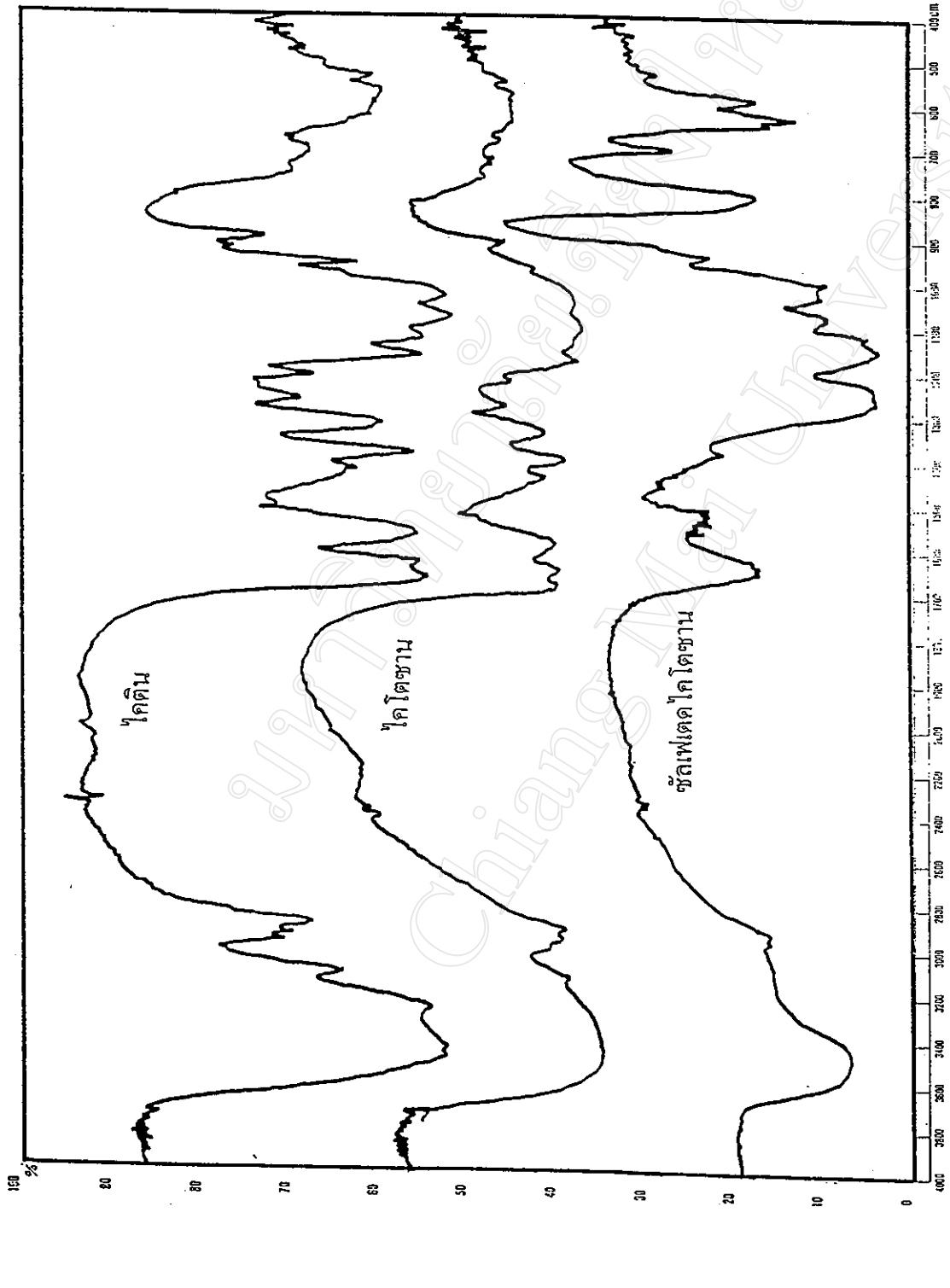
สารตัวอย่าง	ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (การสั่น)[28,50]
ไคตินพาณิชย์	3200-3500	O-H และ N-H stretching
	2890,2910	C-H stretching
	1660,1640	C=O stretching (amide)
	1550	N-H bending (amide)
	1425	CH_2 bending
	1381	C-H bending
ไคโตซานพาณิชย์	1565	N-H bending (amine)
ซัลเฟเตดไคโตซาน	1240	S=O stretching (sulfate)
จากไคโตซานพาณิชย์	800	S-O stretching (sulfate)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูปที่ 2.24 IR spectrum ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ (KBr)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



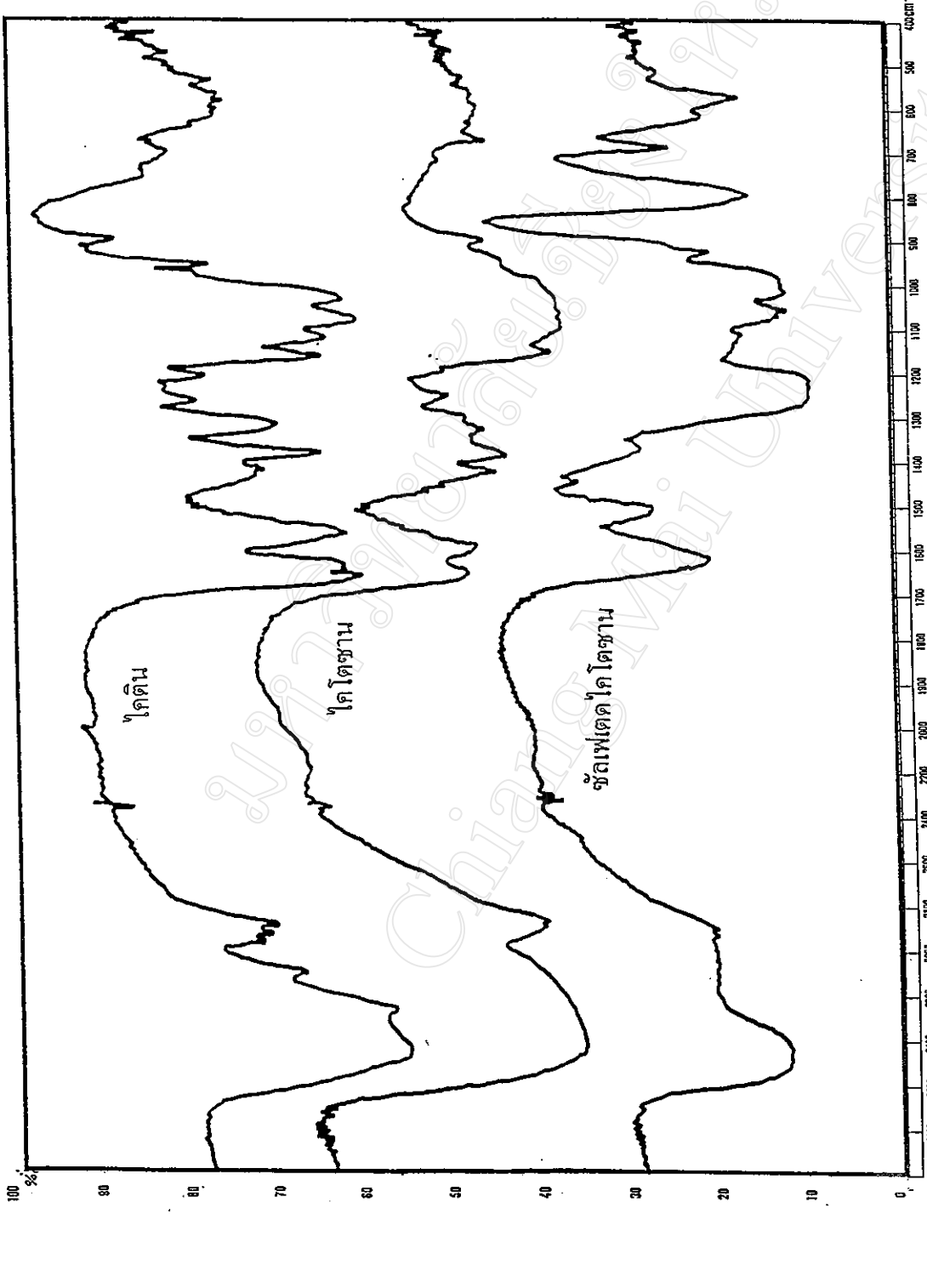
รูปที่ 2.25 IR spectrum ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา (KBr)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางที่ 2.21 การแปลผล IR spectrum ของไคตินไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา

สารตัวอย่าง	ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (การสั่น)[28,50]
ไคตินจากกระดองปูนา	3200-3500	O-HและN-H stretching
	2891,2940	C-H stretching
	1650,1625	C=O stretching (amide)
	1550	N-H bending (amide)
	1420	CH_2 bending
	1375	C-H bending
ไคโตซานจากกระดองปูนา	1570	N-H bending (amine)
ซัลเฟตไคโตซาน จากกระดองปูนา	1240	S=O stretching (sulfate)
	800	S-O stretching (sulfate)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

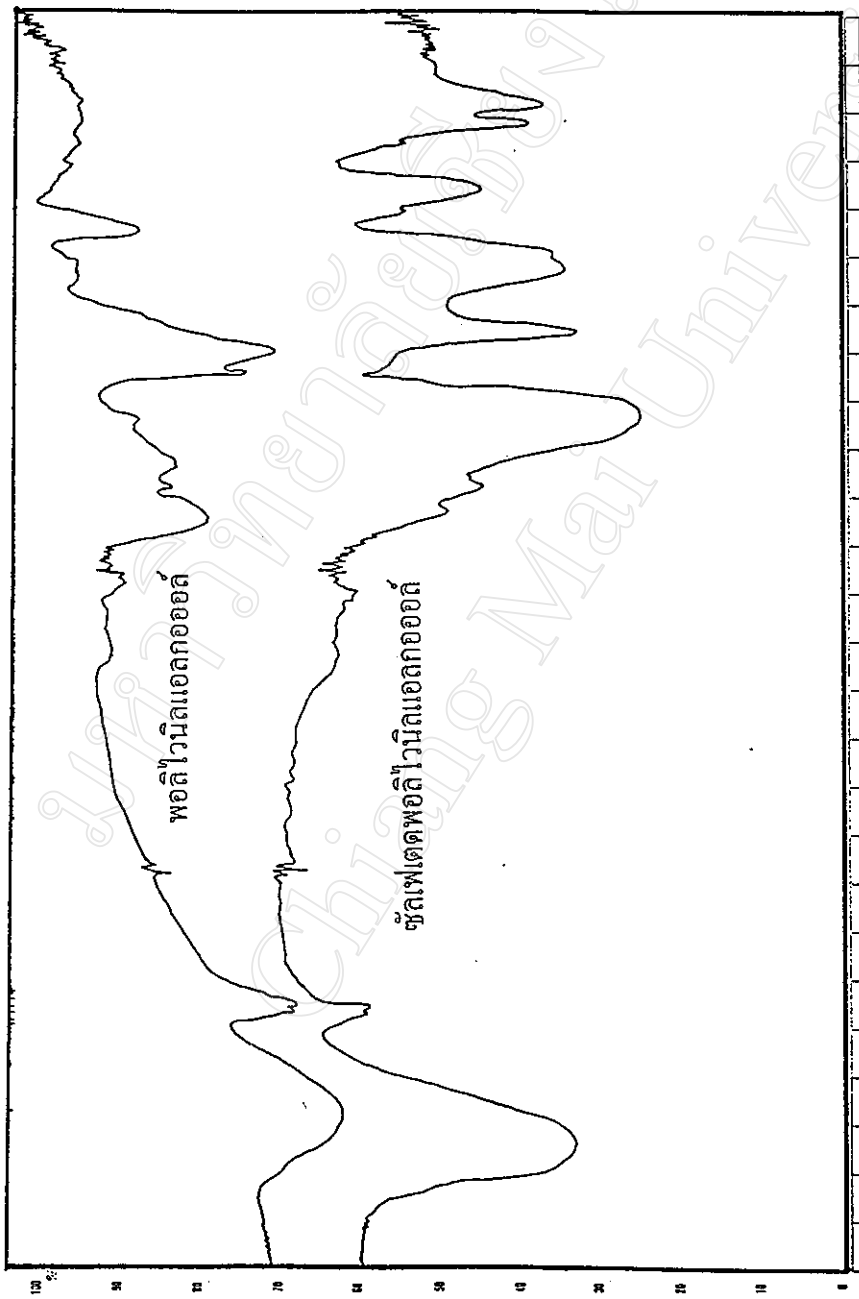


รูปที่ 2.26 IR spectrum ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากครามจักจั่น (KBr)

ตารางที่ 2.22 การแปลผล IR spectrum ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากคราบจักจั่น

สารตัวอย่าง	ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (การสั่น)[28,50]
ไคตินจากคราบจักจั่น	3200-3500	O-HและN-H stretching
	2890,2920	C-H stretching
	1655,1625	C=O stretching (amide)
	1560	N-H bending (amide)
	1420	CH_2 bending
	1380	C-H bending
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	1590	N-H bending (amine)
ซัลเฟตไคโตซาน	1240	S=O stretching (sulfate)
จากคราบจักจั่น	800	S-O stretching (sulfate)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



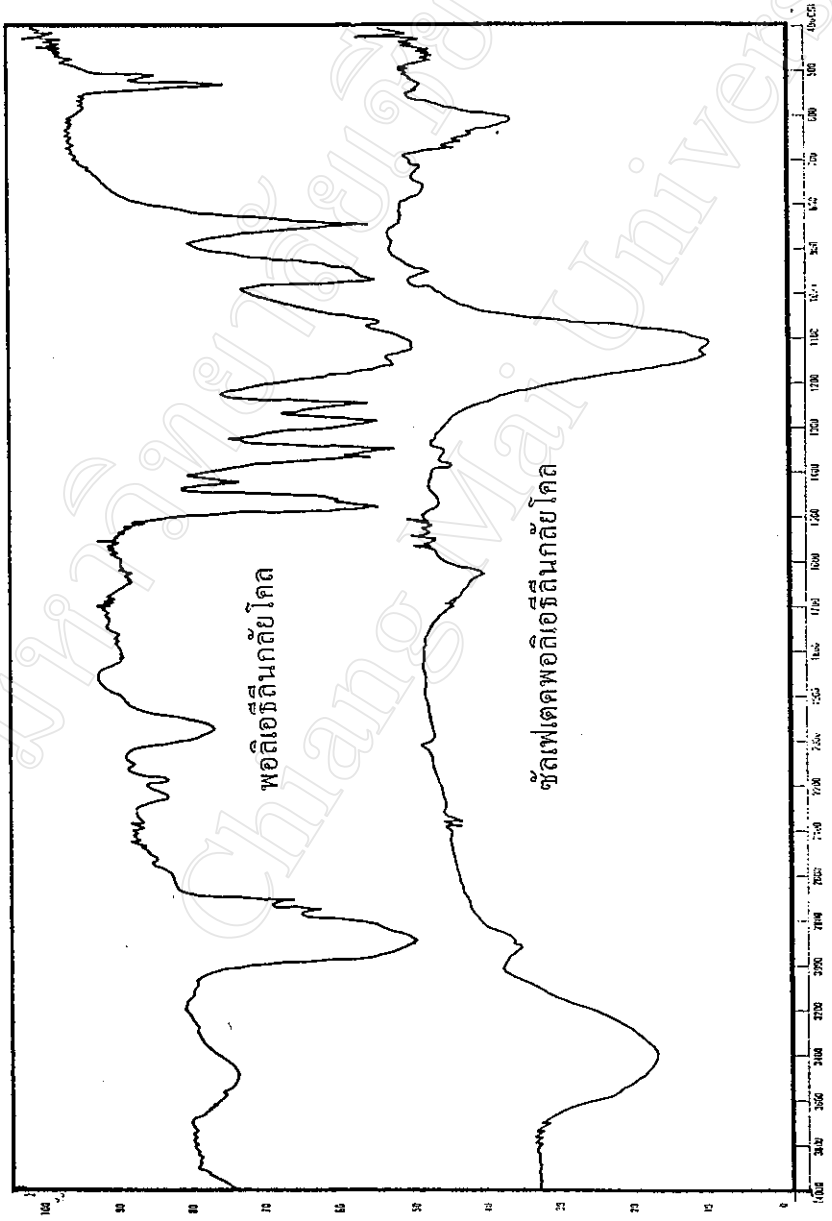
รูปที่ 2.27 IR spectrum ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และซัลเฟตดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (KBr)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง 2.23 การแปลผล IR-spectrum ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และซัลเฟตพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

สารตัวอย่าง	ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (การสั่น)[20]
พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	3400	O-H stretching (alcohol)
	2940, 2900	C-H stretching
	1445	O-H, C-H bending
	1430	CH_2 bending
ซัลเฟตพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	1240	S=O stretching (sulfate)
	785	S-O stretching (sulfate)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูปที่ 2.28 IR spectrum ของพอลิเอธีลีนกลัยโคลและซัลเฟเดพอลิเอธีลีนกลัยโคล (KBr)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง 2.24 การแปลผล IR-spectrum ของพอลิเอธีลีนกลัยโคล และซัลเฟเตดพอลิเอธีลีนกลัยโคล

สารตัวอย่าง	ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (การสั่น)[20]
พอลิเอธีลีนกลัยโคล	3400	O-H stretching (alcohol)
	2900	C-H stretching
	1445	O-H, C-H bending
	1370	CH_2 bending
ซัลเฟเตดพอลิเอธีลีนกลัยโคล	1120	S=O stretching (sulfate)
	590	S-O stretching (sulfate)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2. เครื่องวิเคราะห์ธาตุ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์/ออกซิเจน (CHNS/O Analyzer)

ชั่งสารมาตรฐาน L-Cystine ปริมาณ 1.5-2.0 มิลลิกรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในกระดาษฟอยด์ ใช้คีบพับกระดาษฟอยด์ให้เป็นก้อนเล็กๆใส่ลงในจานหลุม แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง CHNS/O analyzer ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานทำการทดลองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 2.25)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางที่ 2.25 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และโซเดียม ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซาน

สารตัวอย่าง	% calculation					% found					สูตรอย่างง่าย
	C	H	N	S	Na	C	H	N	S	Na	
— ไคตินพาณิชย์	36.55	7.61	7.11	-	-	42.09	6.45	6.20	-	-	— $C_8H_{13}O_5N{\cdot}H_2O$
— ไคโตซานพาณิชย์	40.22	7.26	7.82	-	-	40.02	7.20	7.62	-	-	— $C_6H_{11}O_4N{\cdot}H_2O$
— ซัลเฟตไคโตซาน จากไคโตซานพาณิชย์	15.83	3.34	3.08	16.18	11.63	16.99	3.07	3.12	15.64	11.33	— $C_6H_8O_4N(C_2H_3O)_{0.12}$ $(SO_3Na)_{2.30}(H)_{0.58}3.30{\cdot}H_2O$
— ไคตินจากกระดองปูนา	43.44	6.79	6.33	-	-	42.96	6.85	6.59	-	-	— $C_8H_{13}O_5N{\cdot}H_2O$
—ไคโตซานจากกระดองปูนา	40.22	7.26	7.82	-	-	40.31	6.90	7.42	-	-	— $C_6H_{11}O_4N{\cdot}H_2O$
— ซัลเฟตไคโตซาน จากกระดองปูนา	16.59	2.94	3.22	16.95	12.19	17.45	3.01	3.23	15.72	11.26	— $C_6H_8O_4N(C_2H_3O)_{0.24}$ $(SO_3Na)_{2.30}(H)_{0.46}2.15{\cdot}H_2O$
— ไคตินจากคราบจักจั่น	36.55	7.61	7.11	-	-	40.85	6.75	6.26	-	-	— $C_8H_{13}O_5N{\cdot}H_2O$
— ไคโตซานจากคราบจักจั่น	40.22	7.26	7.82	-	-	40.86	7.26	7.52	-	-	— $C_6H_{11}O_4N{\cdot}H_2O$
— ซัลเฟตไคโตซาน จากคราบจักจั่น	16.55	3.90	3.22	14.49	10.42	16.99	3.10	3.18	13.44	9.66	— $C_6H_8O_4N(C_2H_3O)_{0.20}$ $(SO_3Na)_{1.97}(H)_{0.83}4.07{\cdot}H_2O$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

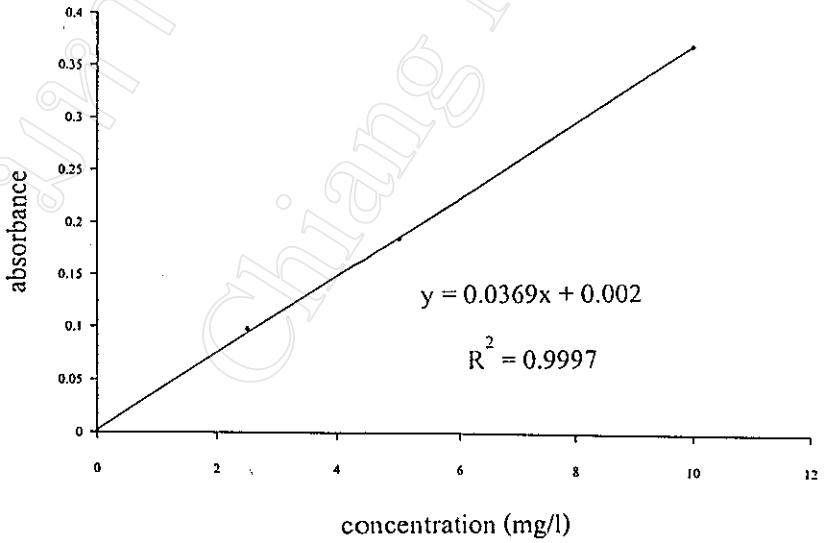
3. การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมในตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซาน[56]

3.1 ชั่งตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซาน 0.01 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) เทลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37%w/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

3.3 นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 80°C บนเตาไฟฟ้า เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างตะกอน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 250 มิลลิลิตร

3.4 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียม ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 589.0 นาโนเมตร (ใช้กระแสไฟฟ้า 5 มิลลิแอมแปร์ และใช้เปลวไฟชนิดอากาศ/อะเซทิลีน) คำนวณหาปริมาณโซเดียมในสารละลายตัวอย่างซัลเฟเตดไคโตซาน โดยเทียบกับกราฟที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.29) และ(ดูตารางที่ 2.26)



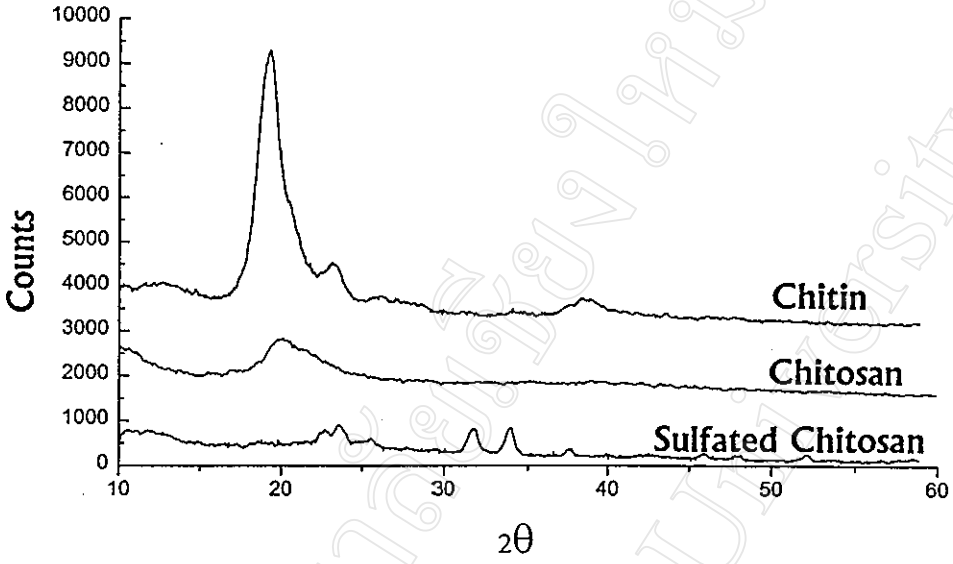
รูปที่ 2.29 กราฟการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโซเดียมในช่วงความเข้มข้น 2.5, 5 และ10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.26 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมในตัวอย่างซัลเฟตเดไคโตซาน

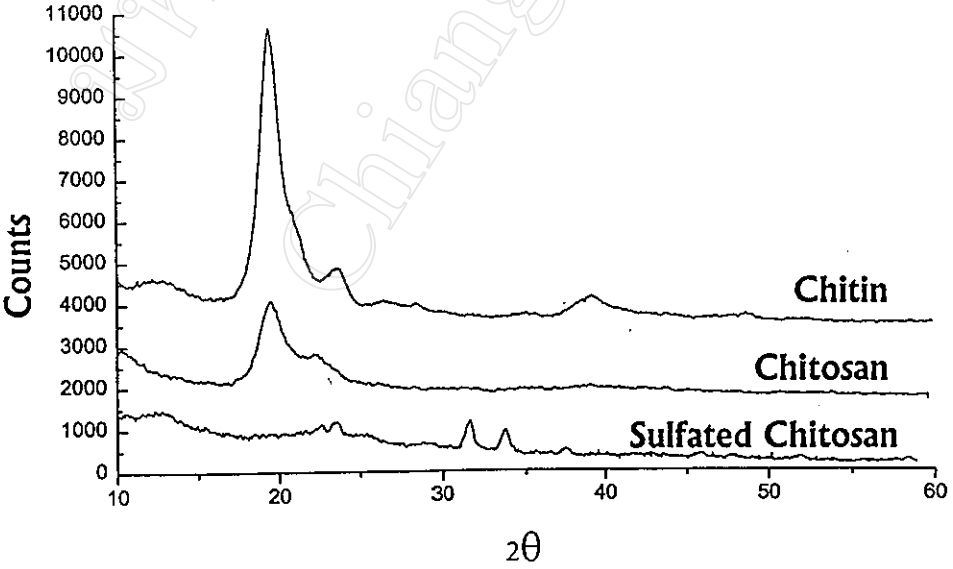
สารตัวอย่าง	ครั้งที่	น้ำหนัก (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Na เฉลี่ย
ซัลเฟตเดไคโตซาน	1	0.0103	0.185	11.33
จากไคโตซานพาณิชย์	2	0.0102	0.168	
ซัลเฟตเดไคโตซาน	1	0.0109	0.179	11.26
จากกระดองปูนา	2	0.0110	0.196	
ซัลเฟตเดไคโตซาน	1	0.0107	0.149	9.66
จากคราบจักจั่น	2	0.0110	0.170	

4.ศึกษาการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray Diffraction Spectrometry)[38,57]

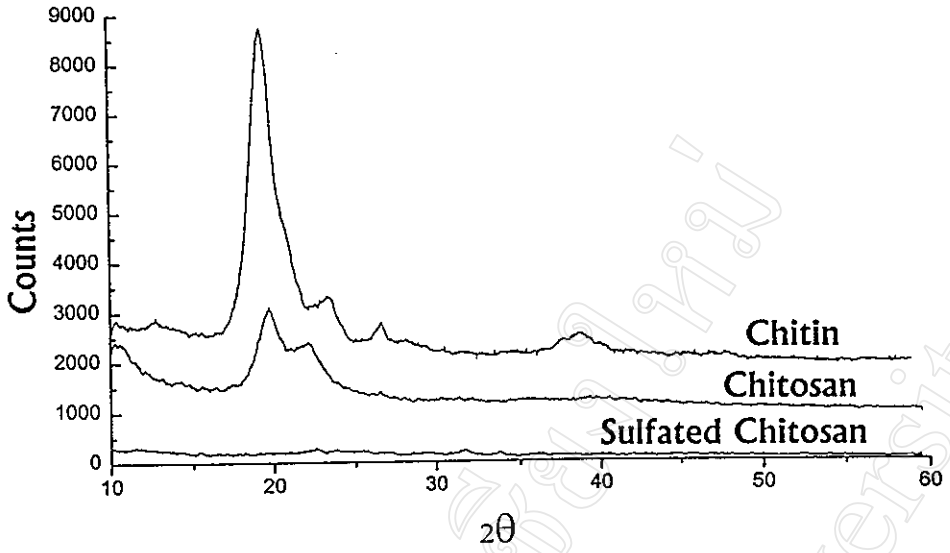
ชั่งสารตัวอย่างที่เป็น ไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตเดไคโตซานที่แห้ง ปริมาณ 0.50 กรัม ใส่ลงในเครื่องพิมพ์ที่ต่อกับปั๊มสุญญากาศ จากนั้นจึงอัดสารตัวอย่างในเครื่องพิมพ์โดยใช้เครื่องอัดที่ความดันประมาณ 10 ตันต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2-3 นาที หลังการอัดจะเป็นแผ่นกลมบางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร หนา 0.2 เซนติเมตร แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer ที่ความต่างศักย์ 35 กิโลโวลล์และใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 2.30, 2.31 และ 2.32) และ(ตารางที่ 2.27)



รูปที่ 2.30 X-ray diffractogram ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์



รูปที่ 2.31 X-ray diffractogram ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา



รูปที่ 2.32 X-ray diffractogram ของไคติน ไคโตซาน และซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น

ตารางที่ 2.27 ผลการวิเคราะห์ X-ray diffraction spectrometry ที่ 2θ ในตัวอย่างไคโตซาน และซัลเฟเตดไคโตซาน

ตัวอย่าง	I/I_0	d-spacing	2θ
ไคตินพาณิชย์	100	4.95	19.31
ไคโตซานพาณิชย์	100	4.48	19.80
ซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์	100	3.77	23.55
ไคตินจากกระดองปูนา	100	4.62	19.17
ไคโตซานจากกระดองปูนา	100	4.55	19.47
ซัลเฟเตดไคโตซานจากกระดองปูนา	80	3.77	23.56
ไคตินจากคราบจักจั่น	100	4.60	9.26
ไคโตซานจากคราบจักจั่น	100	4.49	19.75
ซัลเฟเตดไคโตซานจากคราบจักจั่น	86	3.94	22.55

<u>หมายเหตุ</u>

I_0 คือ ความเข้มของลำแสงที่ตกกระทบ

I คือ ความเข้มของลำแสงที่ผ่านออกมา

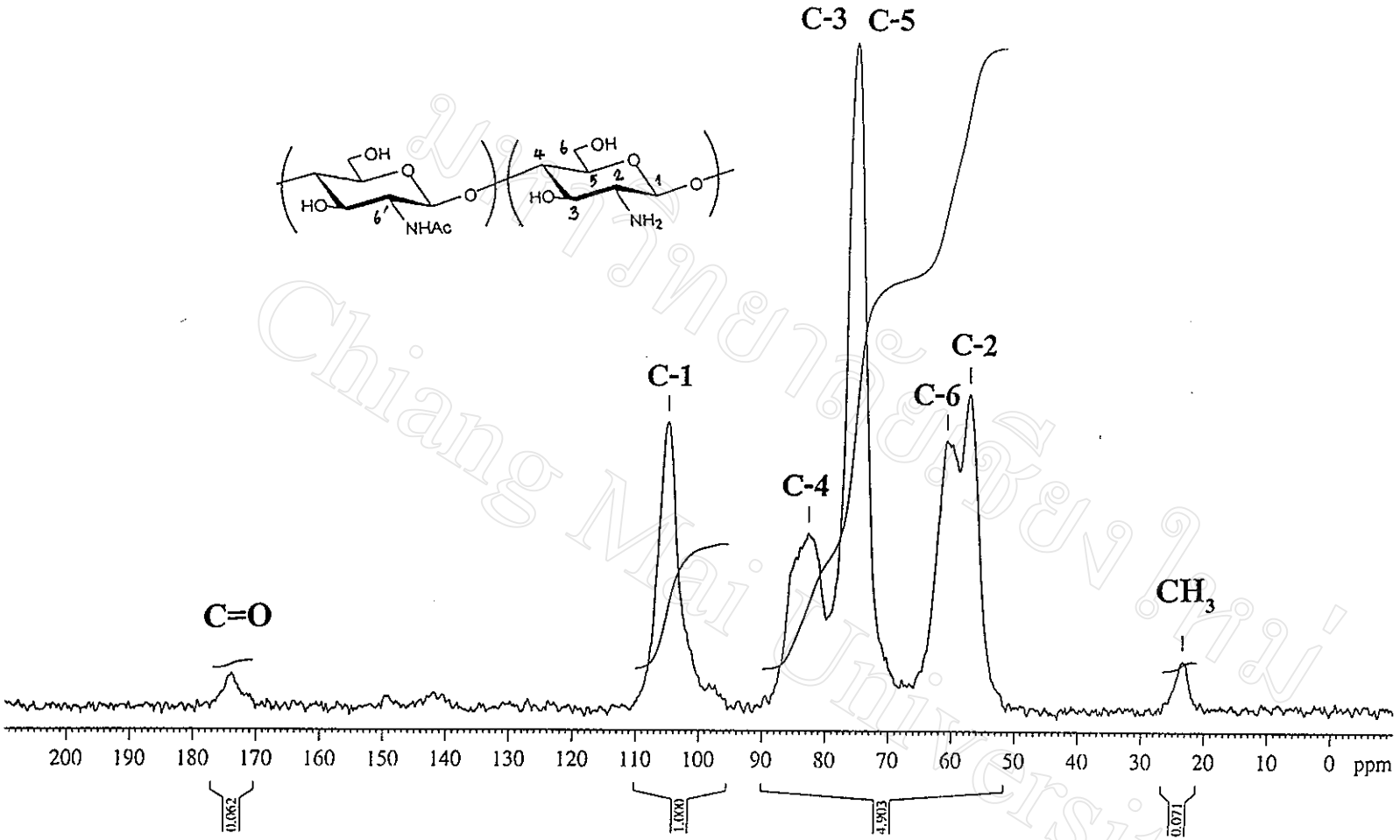
d-spacing คือ ระยะห่างของชั้นผลึก

5. คาร์บอนสิบสาม และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์สเปคโทรสโคปี

(^{13}C-NMR Spectroscopy และ ^{1}H-NMR Spectroscopy)

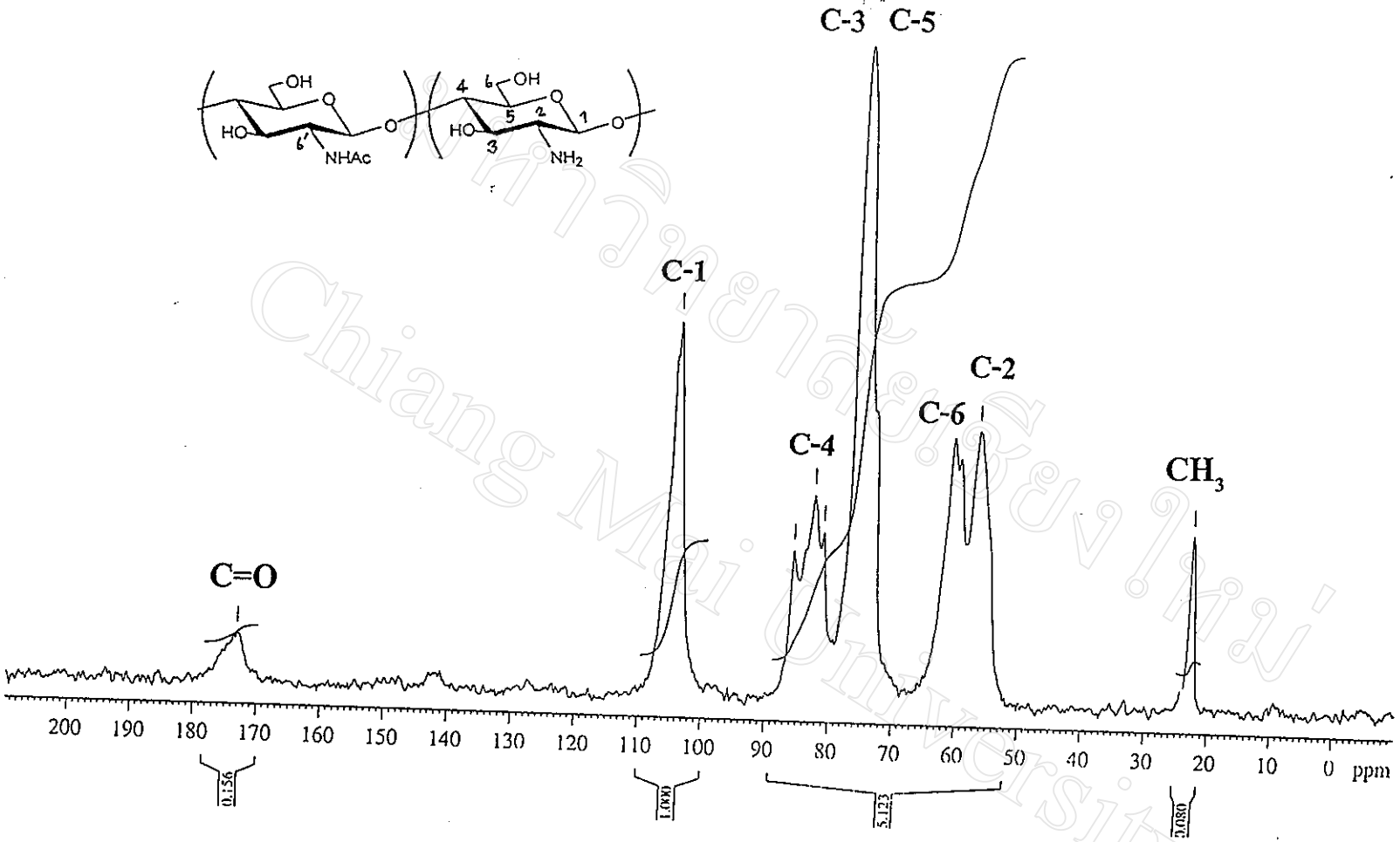
เป็นวิธีที่ใช้พิสูจน์โครงสร้างของไคโตซาน อนุพันธ์ของไคโตซาน และบอกตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตในสายโซ่ไคโตซาน (ดูรูปที่ 2.33, .2.34, 2.35, 2.36, 2.37, 2.38 และ 2.39) และ (ดูตารางที่ 2.28, 2.29, 2.30 และ 2.31)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



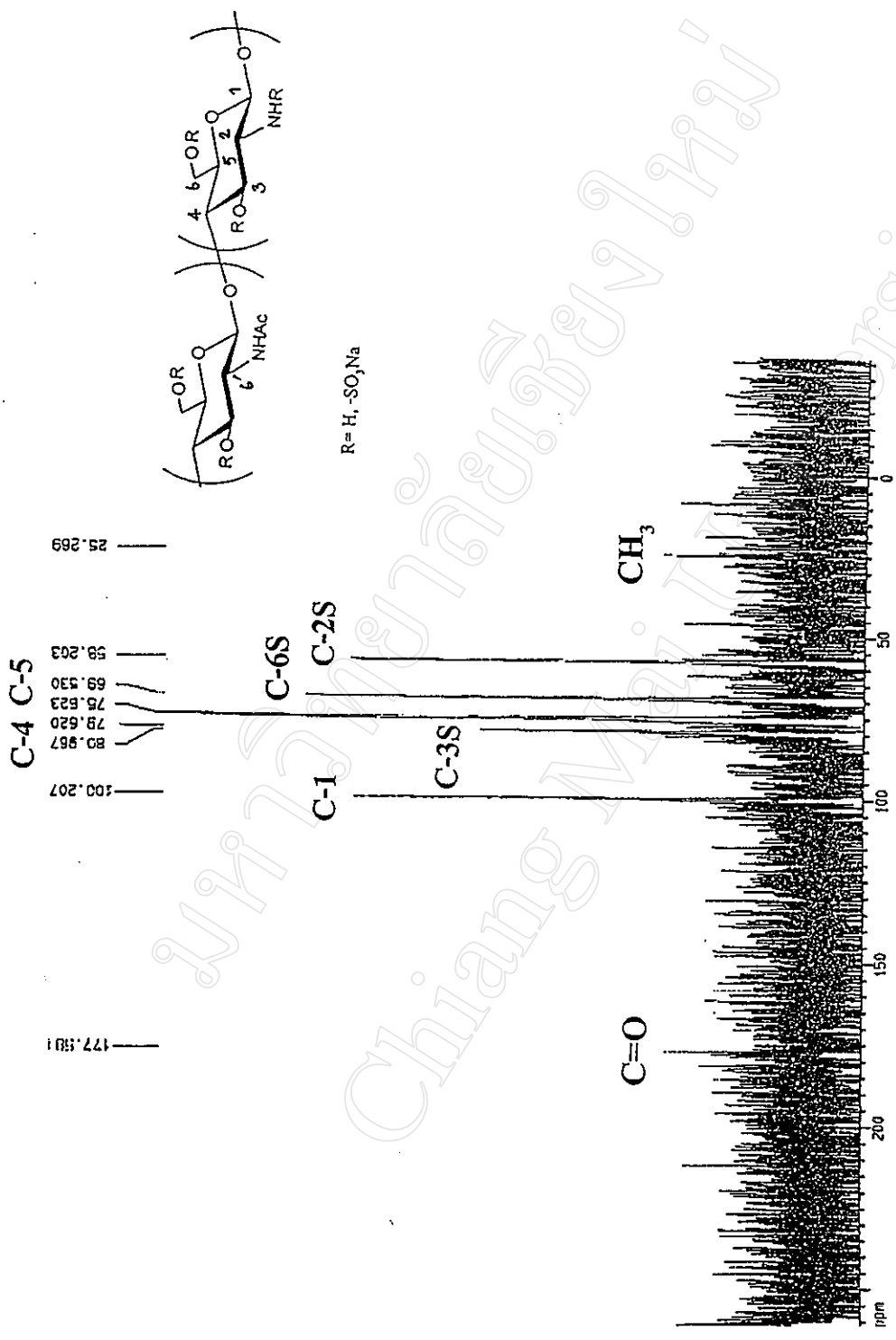
รูปที่ 2.33 solid state CP-MAS ^{13}C-NMR spectrum ของไคโตซานพาณิชย์[32,33]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



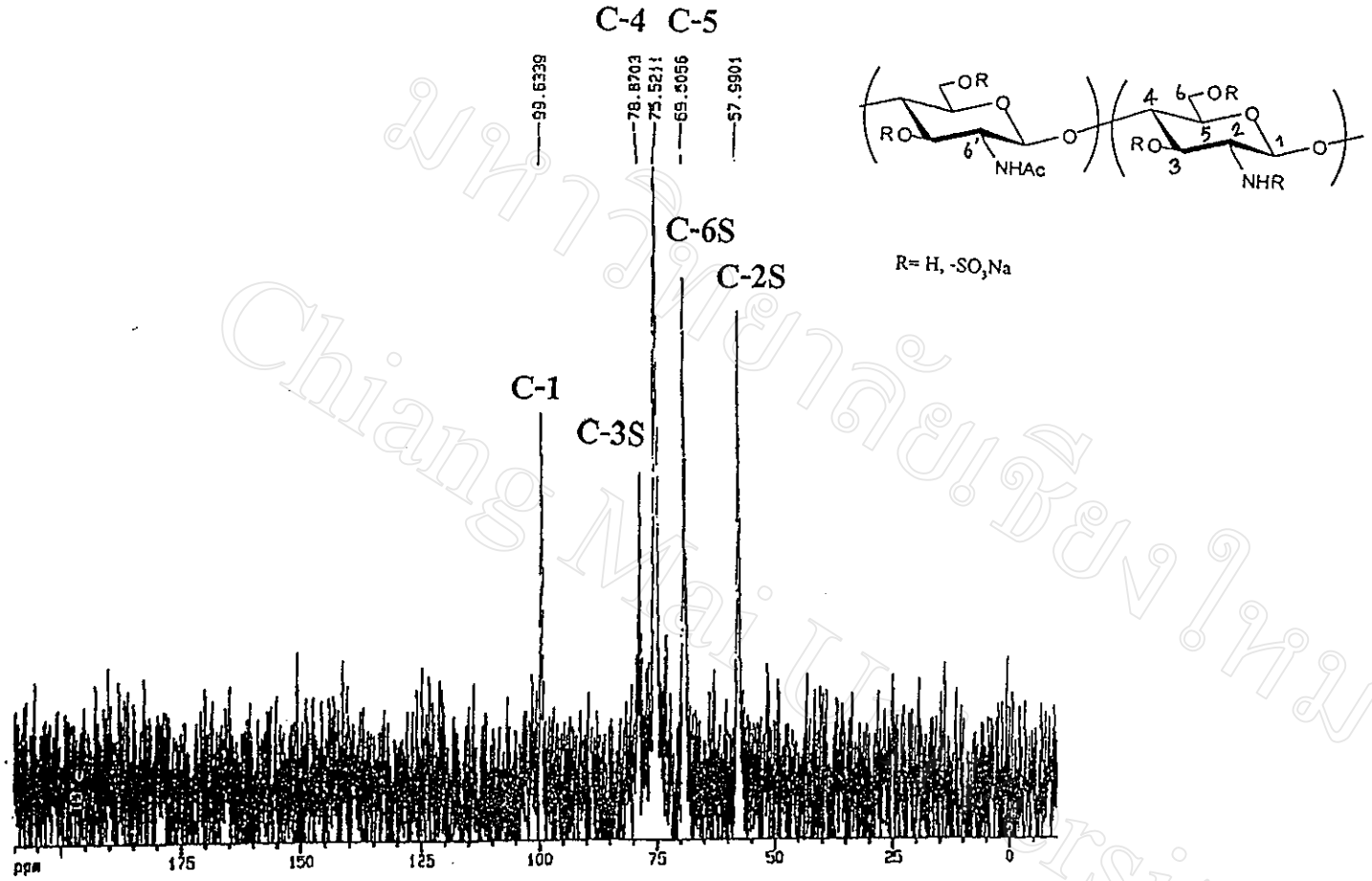
รูปที่ 2.34 solid state CP-MAS ^{13}C-NMR spectrum ของไคโตซานจากกระดองปูนา[32,33]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 2.35 ^{13}C-NMR spectrum ของซัลเฟตเดค ไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ โดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย[38,47]

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูปที่ 2.36 ^{13}C-NMR spectrum ของซัลเฟตเดดไคโตซานจากกระดองปูนาโดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย[38,47]

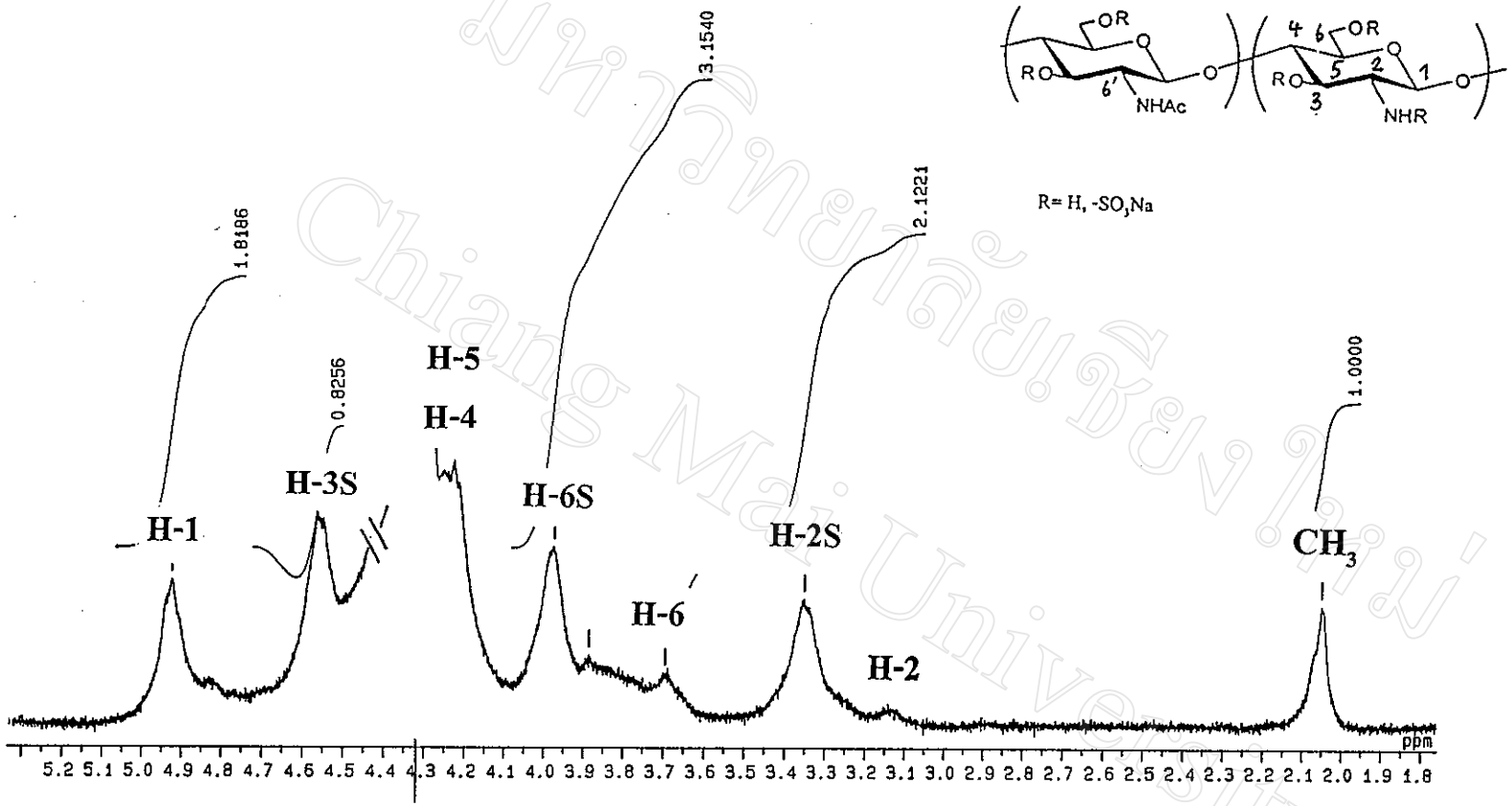
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางที่ 2.28 การแปลผล solid state CP-MAS ^{13}C-NMR spectrum สำหรับตัวอย่างไคโตซาน และ ^{13}C-NMR spectrum สำหรับซัลเฟตไคโตซาน

สารตัวอย่าง	chemical shift (ppm)							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C=O	CH_3
ไคโตซานพาณิชย์	105.27	57.34	75.24	82.86	75.24	60.96	175.02	23.54
ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์	100.21	**58.20***	**80.97***	79.62	75.62	**69.53***	177.50	25.27
ไคโตซานจากกระดองปูนา	104.49	57.08	75.77	83.66	75.77	61.09	174.01	22.83
ซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา	99.63	**57.99***	**78.87***	75.52	75.52	**69.51***	-	-

(* ตำแหน่งของคาร์บอนที่มีหมู่ซัลเฟตมาเกาะ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



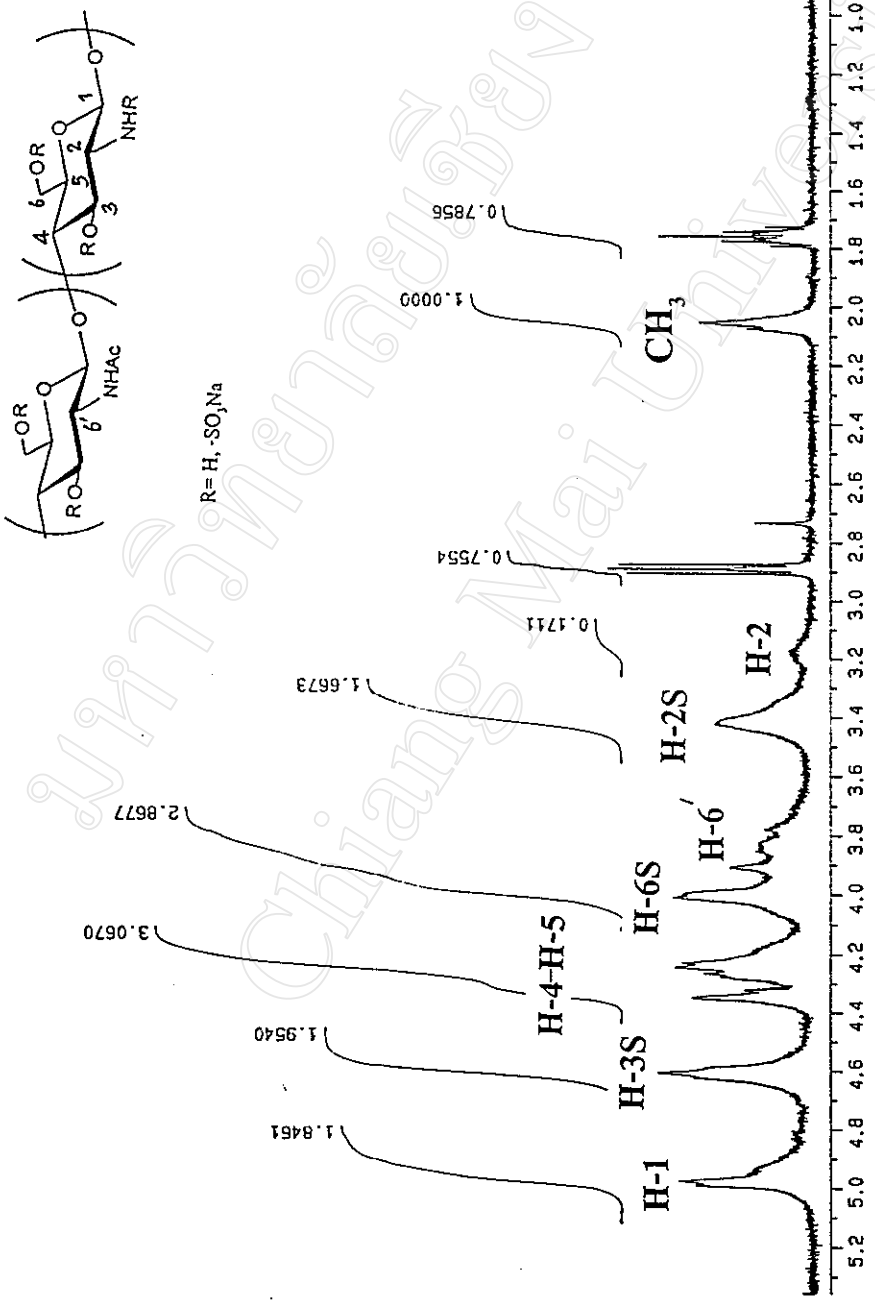
รูปที่ 2.37 ^{1}H-NMR spectrum ของซัลเฟตเดดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ โดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 2.29 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของซัลเฟเตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล[47.49]
ซัลเฟเตดไคโตซาน	4.92	1H, broad doublet, H-1
จากไคโตซานพาณิชย์	4.56	1H, broad triplet, H-3S
	4.25	2H, multiplet, H-4,H-5
	3.97	2H, broad doublet, H-6S
	3.69	1H, broad triplet, H-6
	3.45	1H, broad triplet, H-2S
	3.15	1H, broad triplet, H-2
	2.05	3H, singlet, CH_3

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

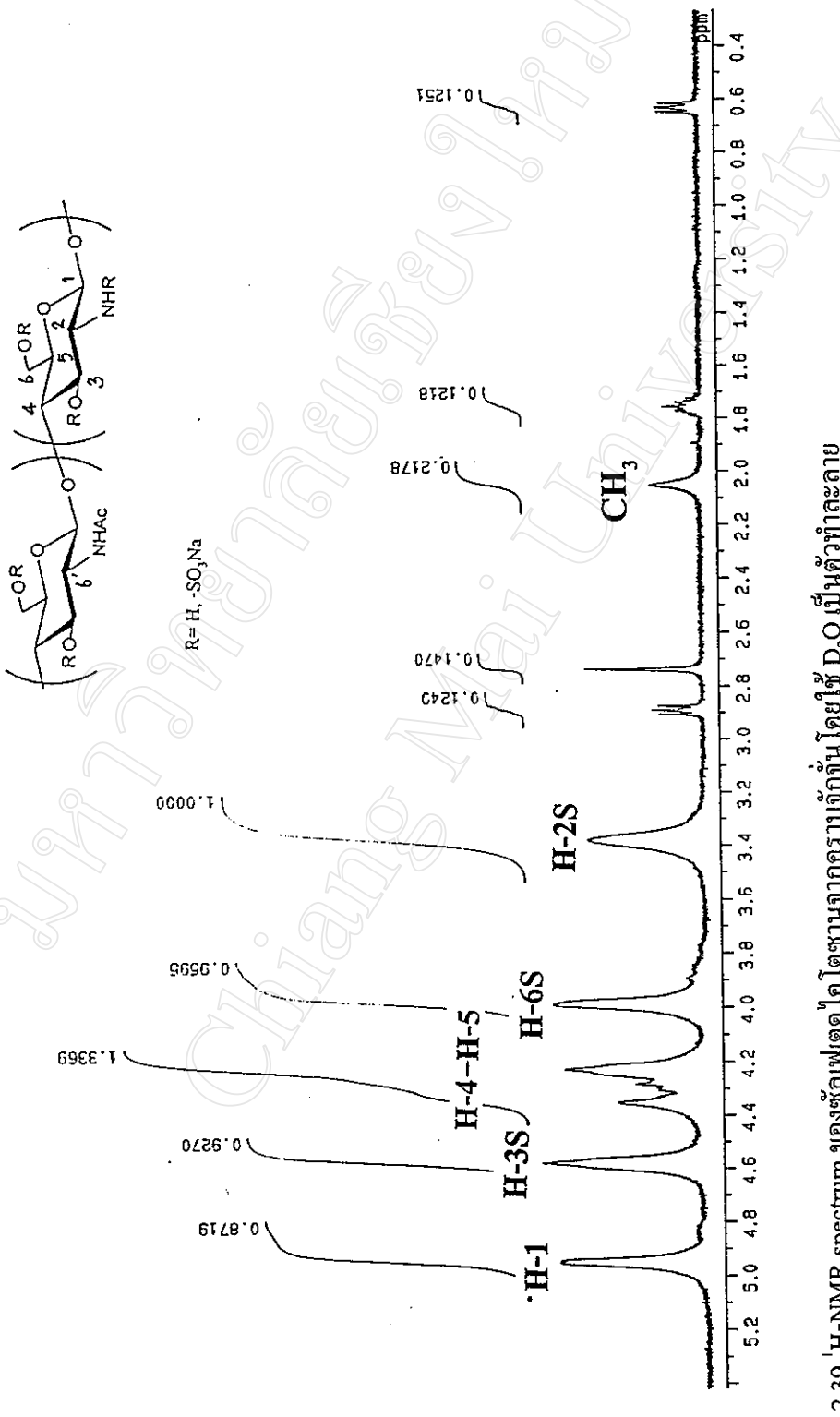


รูปที่ 2.38 ^{1}H-NMR spectrum ของซัลเฟตดีเคโตซานจากกระดองปูนาโดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 2.30 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของซัลเฟตดไคโตซานจากกระดองปูนา

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล[47-49]
ซัลเฟตดไคโตซานจากกระดองปูนา	4.98	1H, broad doublet, H-1
	4.60	1H, broad triplet, H-3S
	4.35-4.23	2H, multiplet, H-4, H-5
	4.01	2H, broad doublet, H-6S
	3.92	1H, broad triplet, H-6
	3.41	1H, broad triplet, H-2S
	3.18	1H, broad triplet, H-2
	2.05	3H, singlet, CH_3

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูปที่ 2.39 ^{1}H-NMR spectrum ของซัลเฟตไดโซแซกคาไรด์จันโดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

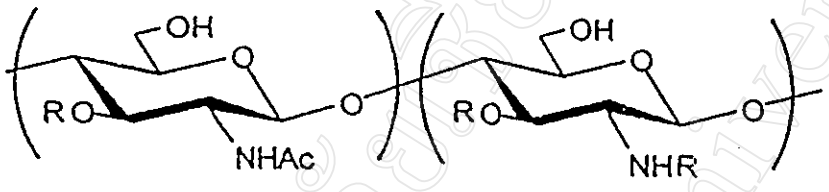
ตารางที่ 2.31 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของซัลเฟตดไคโตซานจากคราบจักจั่น

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล47[47-49]
ซัลเฟตดไคโตซานจากคราบจักจั่น	4.95	1H, broad doublet, H-1
	4.59	1H, broad triplet, H-3S
	4.37-4.22	2H, multiplet, H-4, H-5
	4.00	2H, broad doublet, H-6S
	3.38	1H, broad triplet, H-2S
	2.05	3H, singlet, CH_3

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.9 การสังเคราะห์ซัลเฟตดไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์แบบเลือกเข้าในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง (Regioselective)[38,52]

ในการทดลองนี้เป็นการสังเคราะห์ 2-Deoxy-2-sulfoamino-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan (6) (ดูรูปที่ 2.40)



(6)

R= H, $-SO_3Na$

รูปที่ 2.40โครงสร้างของ 2-Deoxy-2-sulfoamino-3-O-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan (6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.9.1 การสังเคราะห์ 2-Deoxy-2-phthalimido-(1→4)-β-D-glucopyranan (2)

1.ใช้เข็มฉีดยาดูดไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่ปราศจากน้ำ (จากตามหัวข้อ 2.3.1) ปริมาตร60 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม 3 คอขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการไล่อากาศออกโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ประมาณ 10 นาที แล้วยกหลอดนำก๊าซไว้เหนือผิวตัวทำละลาย

2. เติมไคโตซานพาณิชย์ ที่มีองศาของการกำจัดหมู่แอซิทิล 88.0% จำนวน 5.0 กรัม (0.03 โมล) จากนั้นเติมพาทาลิกแอนไฮไดร์ 46.0 กรัม (0.31โมล)

3. เติมเอธีลีนกลัยโคลปริมาตร 0.34 มิลลิลิตร (0.06โมล) โดยรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 130°C และคนตลอดเวลาภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

4.นำเอาของเหลวสีน้ำตาลที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อกรองไคโตซานบางส่วนที่ไม่ละลายออกไป ส่วนที่กรองผ่านจะหยดลงไปบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำเย็นและน้ำแข็งอยู่ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะได้ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน

5.กรองตะกอนด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 40 ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 2-3 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำ soxhlet extraction ด้วยเอธานอล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดพาทาลิกแอนไฮไดร์ที่เหลือออก (ดูพีคจาก IR spectrum รูปที่ 2.41)

6. อบตะกอนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ใส่ใน desiccator เพื่อดูดความชื้น ได้สาร(2) 3.87 กรัม (46.0%yield) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย IR spectroscopy, X-ray diffraction spectrometry, CHNS/O analyser และ ^{1}H-NMR spectroscopy (ผลการทดลองดูรูปที่ 2.41, 2.42, 2.43) และ (ตารางที่ 2.32, 2.33, 2.34 และ 2.35 ตามลำดับ)

2.9.2 การสังเคราะห์ 2-Deoxy-2-phthalimido-6-O-(triphenylmethyl)-(1→4)-β-D-glucopyranan (3)

1.ใช้เข็มฉีดยาดูดพิริดีนที่ปราศจากน้ำ(เตรียมตามหัวข้อ 2.3.2) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการไล่อากาศออกโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในพิริดีน ประมาณ 10 นาที แล้วยกหลอดนำก๊าซไว้เหนือผิวของตัวทำละลาย

2. เติม 4-ไดเมทิลอะมีโนพิริดีน 15.0 กรัม (0.12 โมล) คนตลอดเวลา

3.จากนั้นเติมสาร (2) 5.0 กรัม (0.018โมล) คนตลอดเวลาจนสาร (2) ละลาย และเติมคลอโรไตรเมทิลมีเทน 50.0 กรัม (0.18โมล) โดยรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 90°C และคนตลอดเวลาภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.ทิ้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติม เอธานอล ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ได้ตะกอนสีเทา กรองตะกอนด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์40 ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 2-3 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ใส่ใน desiccator เพื่อดูดความชื้น ได้สาร (3) 6.94 กรัม (73.5% yield) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย IR spectroscopy, X-ray diffraction spectrometry, CHNS/O analyser และ ^{1}H-NMR spectroscopy (ผลการทดลองดูรูปที่ 2.41, 2.42, 2.44) และ (ตารางที่ 2.32 , 2.33, 2.34 และ 2.36 ตามลำดับ)

2.9.3 การสังเคราะห์ 2-Amino-2-Deoxy-6-O-(triphenyl methyl)-(1→4)-β-D-glucopyranan (4)

1.เติมไฮดราซีนโมโนไฮเดรต ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม 3 คอ ปริมาตร 250 มิลลิลิตรจากนั้นผ่านก๊าซไนโตรเจนลงบนผิวของตัวทำละลาย

2.เติมสาร (3) 4.70 กรัม(0.01โมล) แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 53 มิลลิลิตร โดยรีฟลักซ์ ที่อุณหภูมิ 100°C และคนตลอดเวลา ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และให้ความร้อนเพื่อระเหยน้ำออก

3.ทำซ้ำข้อ 1-2 อีก 2 ครั้ง กรองตะกอนด้วยกรวยบุชเนอร์โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์40 ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 2-3 ครั้ง จะได้ตะกอนสีขาว อบตะกอนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และใส่ใน desiccator เพื่อดูดความชื้น ได้สาร (4) 3.35 กรัม (73.0% yield) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย IR spectroscopy, X-ray diffraction spectrometry, CHNS/O analyser และ ^{1}H-NMR spectroscopy (ผลการทดลอง ดูรูปที่ 2.41, 2.42, 2.44) และ (ตารางที่ 2.32 , 2.33, 2.34 และ 2.37 ตามลำดับ)

2.9.4 การสังเคราะห์ 2-Deoxy-2-sulfoamino-3-sulfo-6-O-(triphenyl methyl)-(1→4)-β-D-glucopyranan (5)

1.ใช้เข็มฉีดยาดูดพิริดีนที่ปราศจากน้ำ (จากตามหัวข้อ 2.3.2) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 250 มิลลิลิตรทำการไล่อากาศออกโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในพิริดีน ประมาณ 10 นาที แล้วยกหลอดนำก๊าซไว้เหนือผิวของตัวทำละลาย

2. เติมสาร (4) 2.0 กรัม (0.004โมล) คนตลอดเวลาจนสาร(4) ละลาย จากนั้นเติมซัลเฟอร์ไตรออกไซด์-พิริดีน (sulfur trioxide pyridine complex) 7.0 กรัม (0.04 โมล) คนต่อไปจนสารผสมละลาย

3. รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายลงในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมเอธานอล ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะได้ตะกอนวุ้นสีขาวทิ้งให้ตกตะกอน

4. รินส่วนสารละลายที่ใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปแช่ในอ่างน้ำแข็งให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 0-5°C

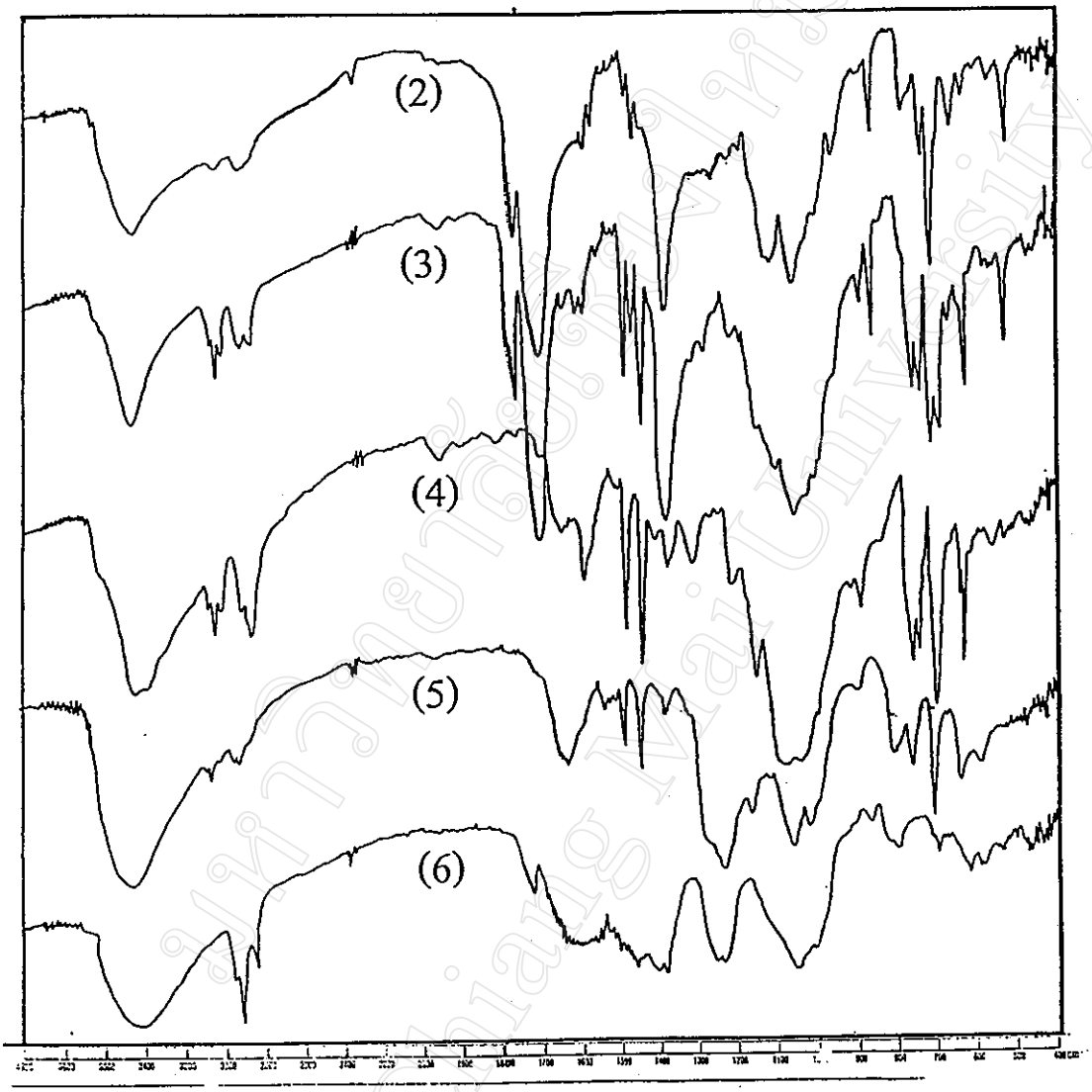
5. เติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ จนสารละลายเป็นด่าง (pH ประมาณ 8-9 ทดสอบด้วยกระดาษ pH) นำสารละลายที่ได้ไปไดแอลิซิสด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 วัน และนำสารละลายไปกำจัดน้ำออก จะได้ตะกอนสีขาว 0.24 กรัม (9.88% yield) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย IR spectroscopy, CHNS/O analyser และ ^{1}H-NMR spectroscopy (ผลการทดลองดูรูปที่ 2.41, 2.45) และ (ตารางที่ 2.32 และ 2.38 ตามลำดับ)

2.9.5 การสังเคราะห์ 2-Deoxy-2-sulfoamino-3-sulfo-(1→4)-β-D- glucopyranan (6)

1.นำสาร (5) 0.2 กรัม (0.0003โมล)ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดอะซีติคเข้มข้น 60%v/v ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วเติมเอธานอลปริมาตร150 มิลลิลิตร จะได้ตะกอนวุ้นสีขาวทิ้งให้ตกตะกอน

2. รินส่วนสารละลายที่ใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปแช่ในอ่างน้ำแข็งให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 0-5°C

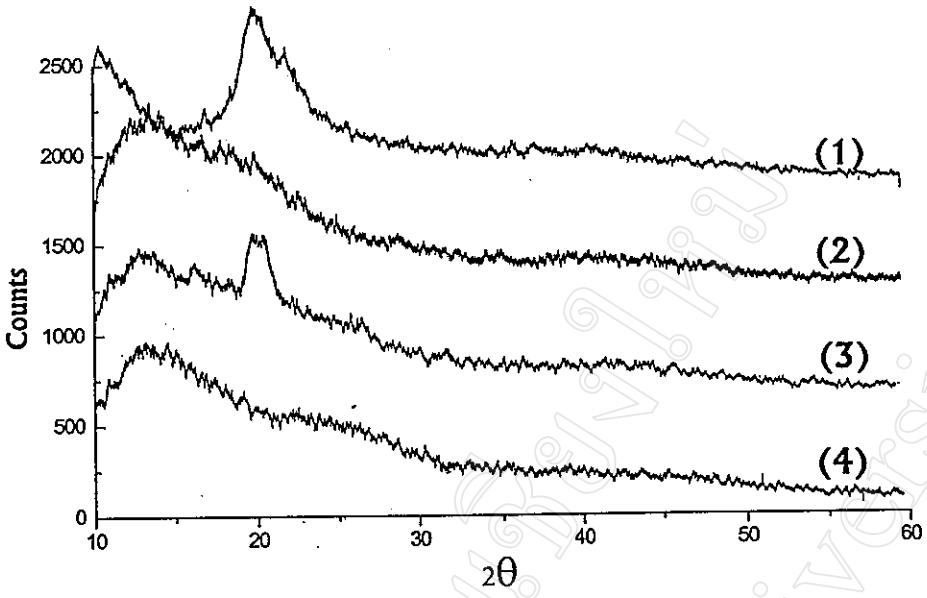
3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ จนสารละลายเป็นด่าง (pH ประมาณ 8-9 ทดสอบด้วยกระดาษ pH) นำสารละลายที่ได้ไปไดแอลิซิสด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 วัน และนำสารละลายไปกำจัดน้ำออก จะได้ตะกอนสีขาว 0.05 กรัม (41.67% yield) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย IR spectroscopy, CHNS/O analyser และ ^{1}H-NMR spectroscopy (ผลการทดลอง ดูรูปที่ 2.41, 2.46) และ (ตารางที่ 2.32 และ 2.39 ตามลำดับ)



รูปที่ 2.41 IR-spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2), (3), (4), (5) และ (6) (KBr)

ตารางที่ 2.32 ผลการวิเคราะห์ IR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2), (3), (4), (5) และ (6)

สารตัวอย่าง	ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังชันก์ (ความถี่)[38.52.61]
2-Deoxy-2-phthalimido-(1→4)-β-D-glucopyranan (2)	3200-3500	O-Hและ N-H stretching
	3050	=C-H stretching (aromatic)
	2860, 2930	C-H stretching
	1770,1710	C=O stretching (imide)
	1440,1495	C=C stretching (aromatic)
	1390	C-H bending
	720	=C-H bending out of plane (aromatic)
2-Deoxy-2-phthalimido-6-(triphenylmethyl)-(1→4)-β-D-glucopyranan (3)	1440	CH_2 bending
	750,720, 690	=C-H bending out of plane (aromatic)
2-Amino-2-deoxy-6-O-(triphenylmethyl)-(1→4)-β-D-glucopyranan (4)	1650	N-H bending (amide)
	1600	N-H bending (amine)
	1420	CH_2 bending
	1380	C-H bending
	700	=C-H bending out of plane (aromatic)
2-Deoxy-2-sulfoamino-3-sulfo-6-(triphenylmethyl)- (1→4)-β-D-glucopyranan (5)	1640	N-H bending (amide)
	1450,1499	C=C stretching (aromatic)
	1380	C-H bending
	1240	S=O stretching(sulfate)
	800	S-O stretching(sulfate)
	700	=C-H bending out of plane (aromatic)
2-Deoxy-2-sulfoamino-3-sulfo-(1→4)-β-D-glucopyranan (6)	1240	S=O stretching(sulfate)
	800	S-O stretching(sulfate)



รูปที่ 2.42 X-ray diffractogram ที่ 2θ ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2), (3) และ (4)

ตารางที่ 2.33 ผลการวิเคราะห์ X-ray diffractogram ที่ 2θ ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2), (3) และ (4) เปรียบเทียบกับไคโตซานพาณิชย์ (1)

สารตัวอย่าง	I/I_0	d-spacing	2θ
(2)	100	6.57	13.46
(3)	100	4.49	19.73
(4)	100	6.70	13.20

I_0 คือ ความเข้มของลำแสงที่ตกกระทบ

I คือ ความเข้มของลำแสงที่ผ่านออกมา

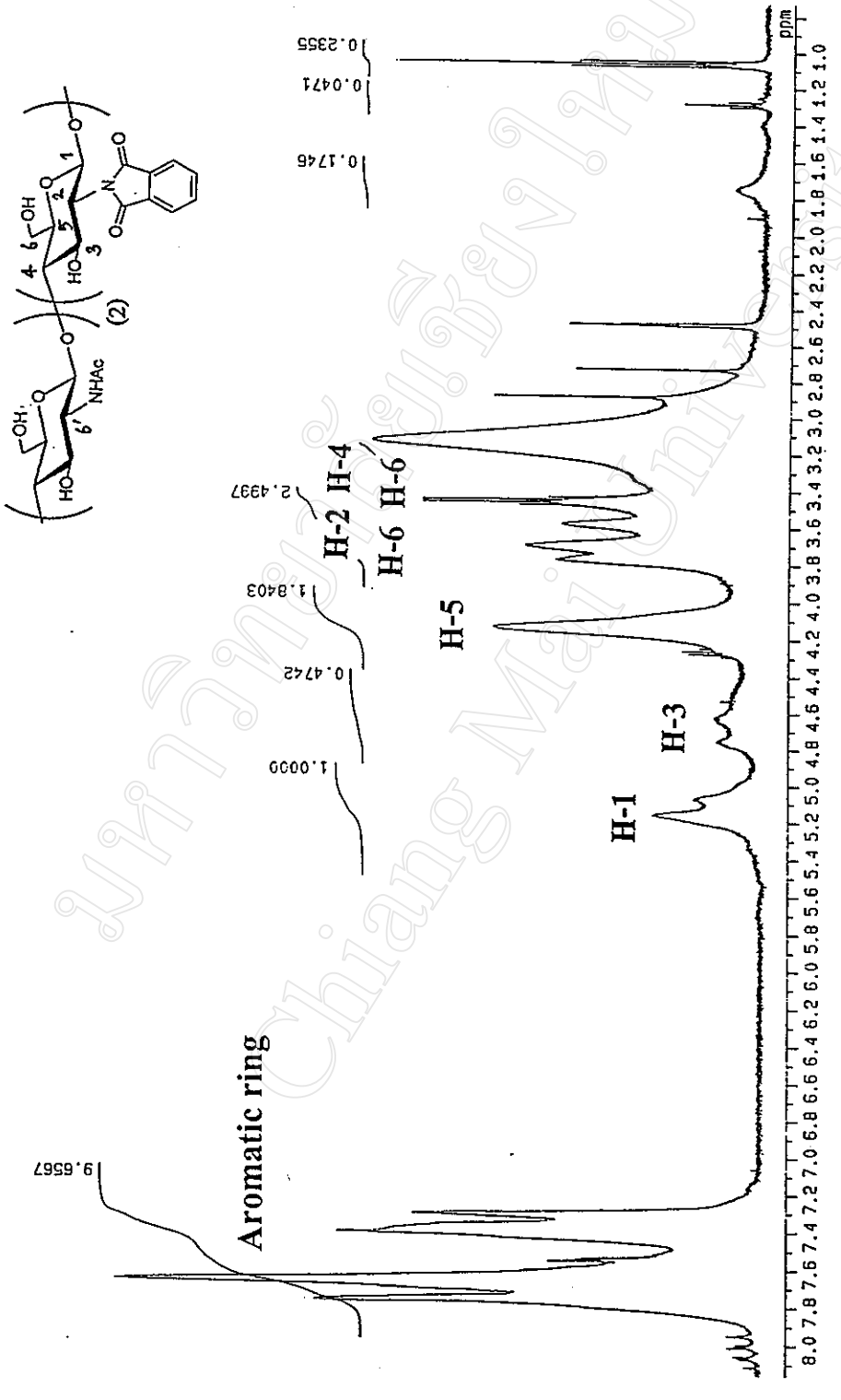
d-spacing คือ ระยะห่างของชั้นผลึก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 2.34 ผลการวิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์ คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2), (3) และ (4)

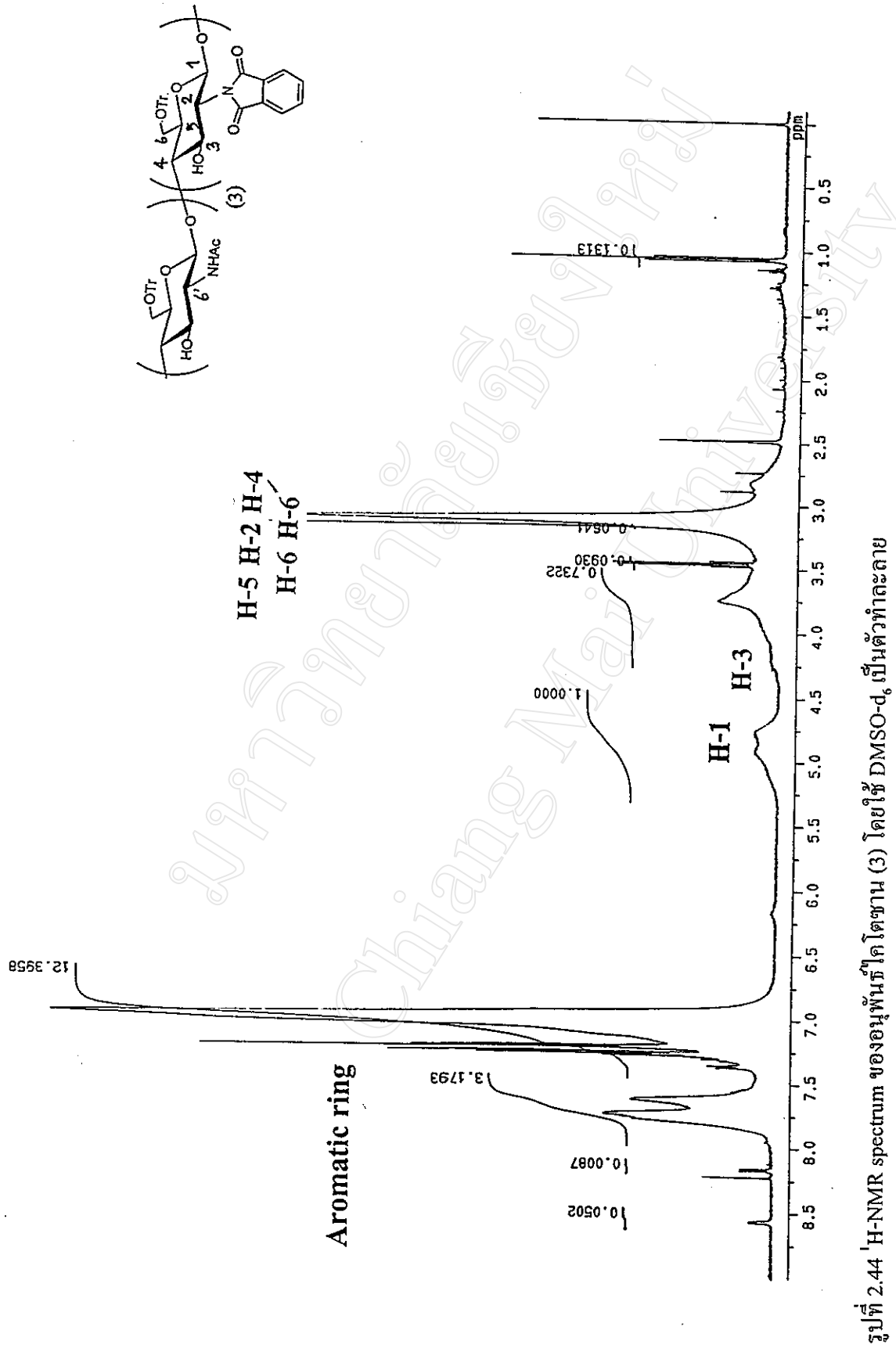
สารตัวอย่าง	% calculation			% found			สูตรอย่างง่าย
	C	H	N	C	H	N	
(2)	54.37	4.89	4.53	55.94	4.34	3.49	$(C_8H_{13}O_5N)_{0.12}C_{14}H_{13}O_6N{\cdot}H_2O$
(3)	74.28	5.10	2.63	72.42	5.37	2.61	$(C_8H_{13}O_5N)_{0.12}C_{33}H_{27}O_6N$
(4)	71.24	6.46	3.32	67.38	6.71	3.97	$(C_8H_{13}O_5N)_{0.12}C_{25}H_{25}O_4N{\cdot}H_2O$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



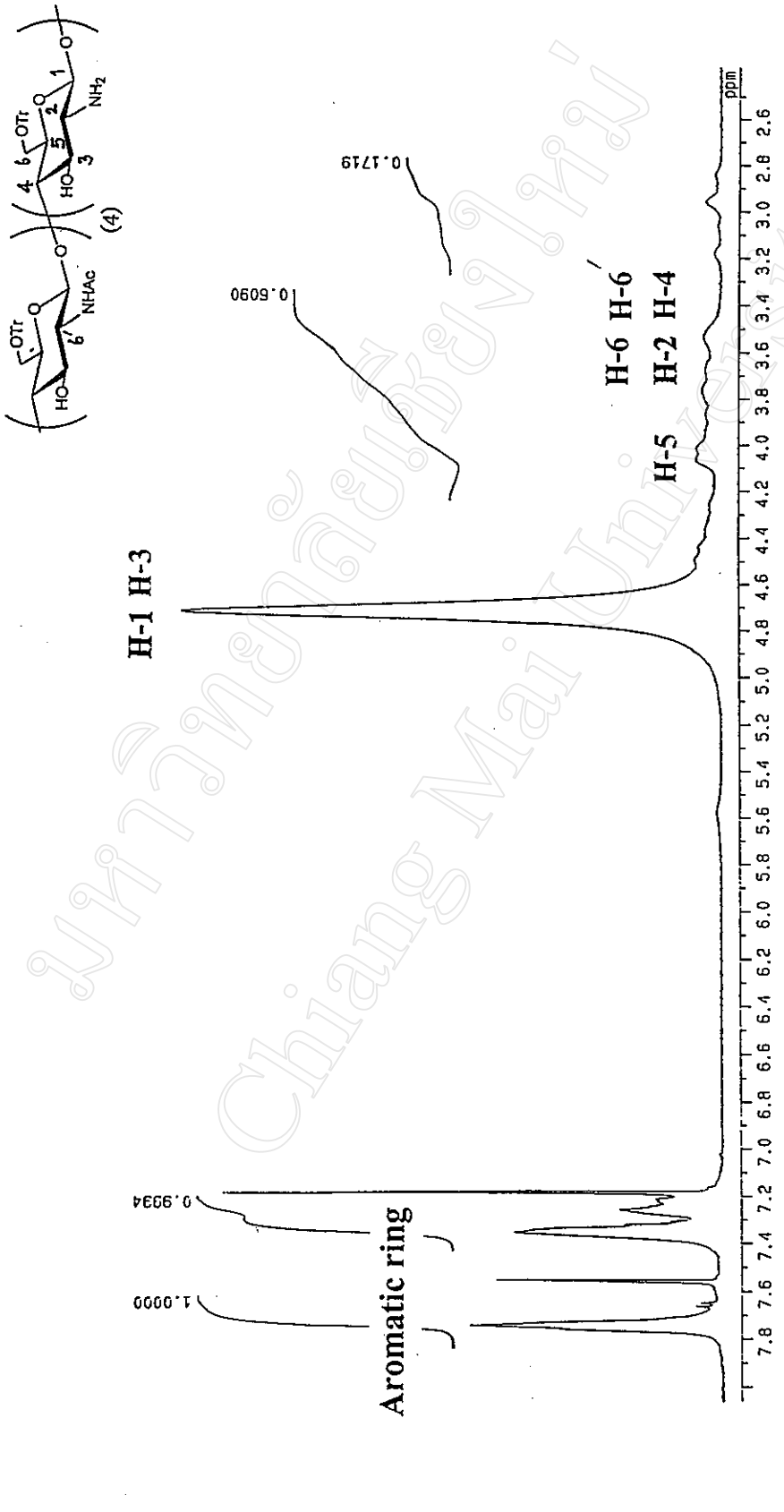
รูปที่ 2.43 ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2) โดยใช้ DMSO-d_6 เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



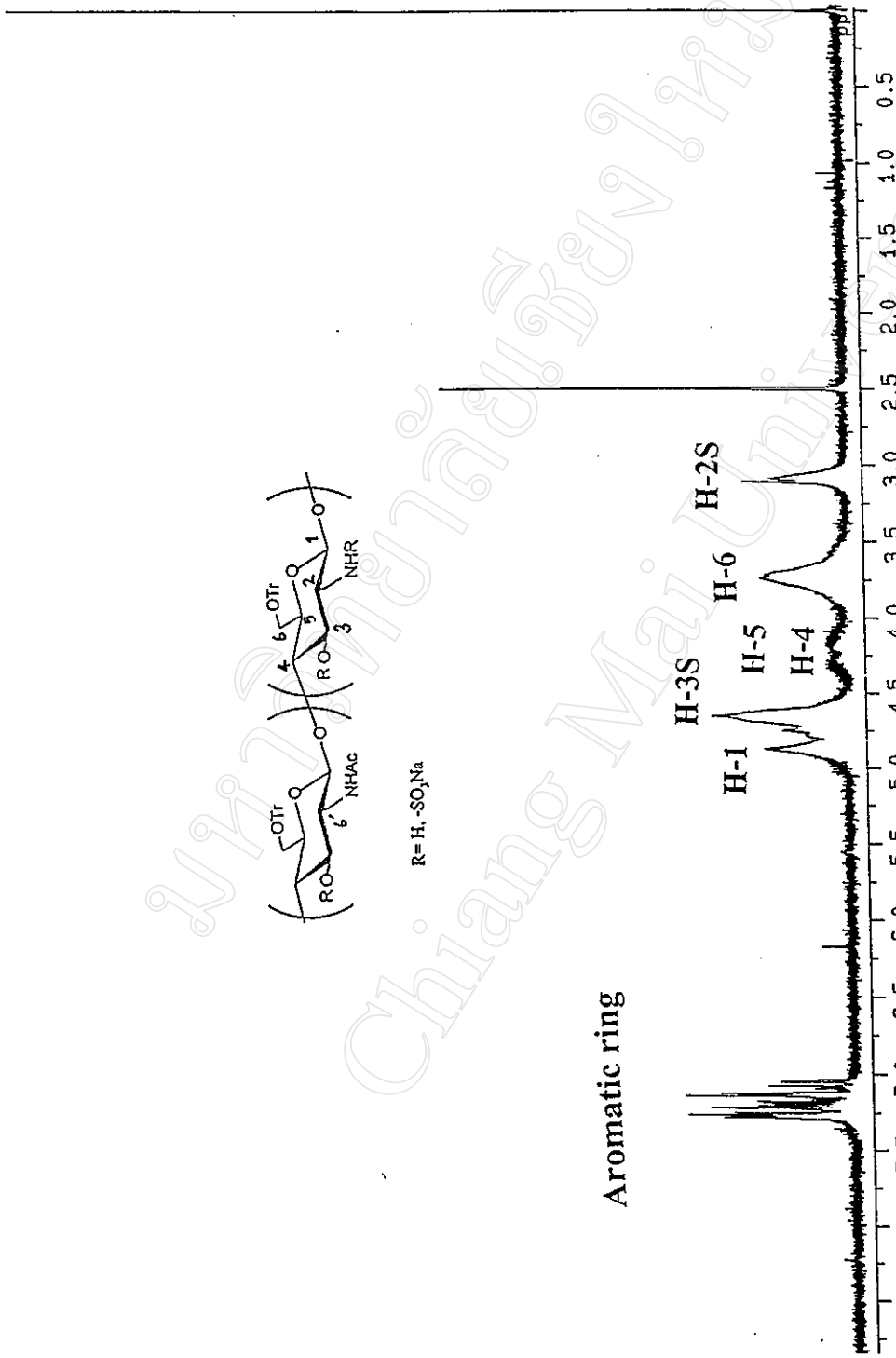
รูปที่ 2.44 ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (3) โดยใช้ DMSO-d_6 เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



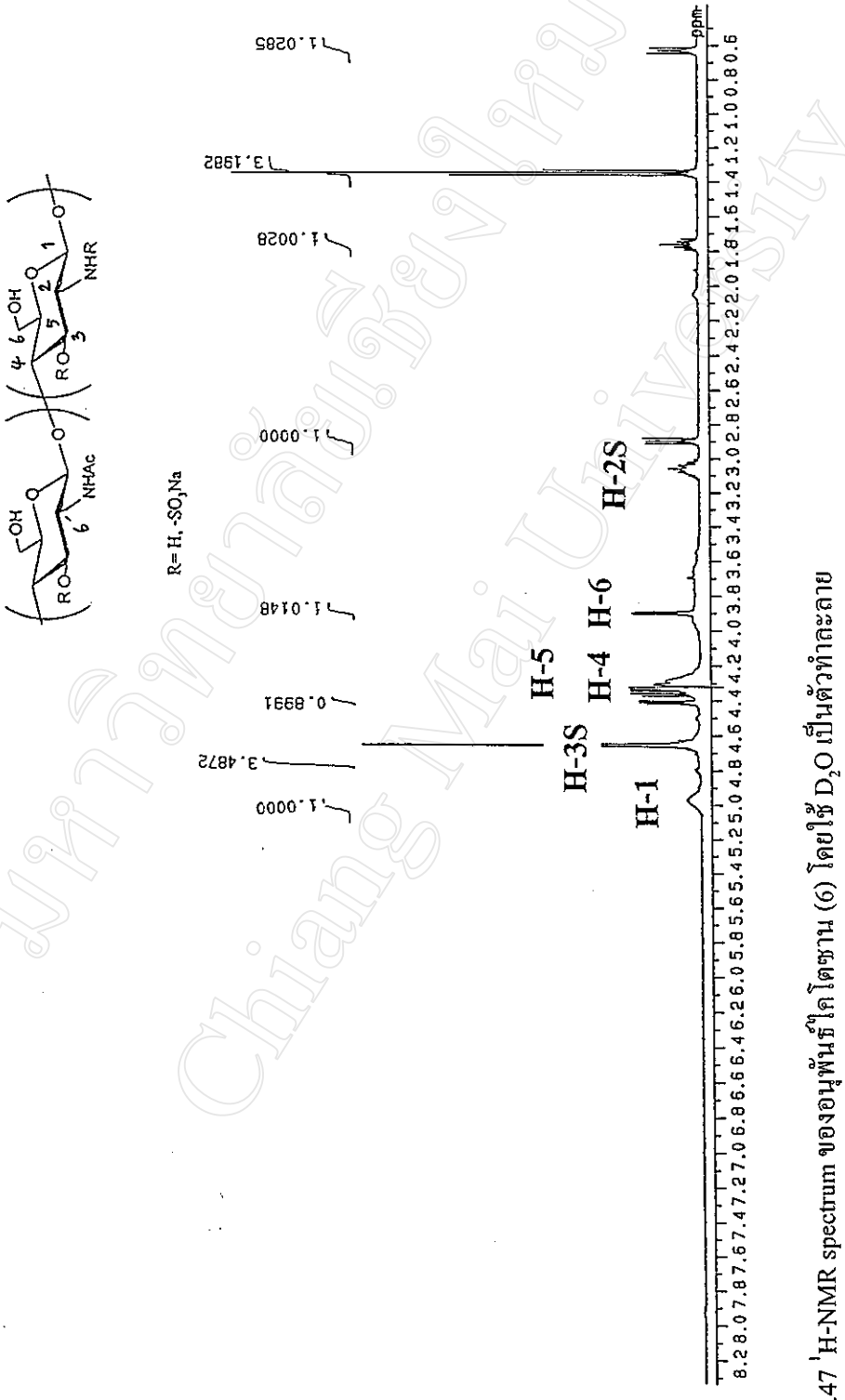
รูปที่ 2.45 ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (4) โดยใช้ pyridine-d_5 เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูปที่ 2.46 ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (5) โดยใช้ DMSO-d_6 เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 2.47 ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์คาโดษาน (6) โดยใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 2.35 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (2)

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล
(2)	7.76-7.66	2H, doublet, Ph
	7.40-7.31	2H, doublet, Ph
	5.16	1H, broad doublet, H-1
	4.75	1H, broad doublet, H-3
	4.14	1H, broad doublet, H-5
	3.78-3.10	4H, multiplet, H-2, H-4, H-6, H-6

ตารางที่ 2.36 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (3)

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล
(3)	7.78-6.99	19H, mulitiphet,Ph
	4.92	1H, broad doublet, H-1
	4.77	1H, broad doublet, H-3
	3.75	1H, broad doublet, H-5
	3.48-2.88	4-H, multiplet, H-2, H-4, H-6, H-6

ตารางที่ 2.37 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (4)

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล
(4)	7.76-7.21	15H, multiplet, Ph
	4.70	2H, broad singlet, H-1, H-3
	4.06-3.06	4H, multiplet, H-2, H-4, H-6, H-6

ตารางที่ 2.38 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (5)

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล
(5)	7.36-7.10	15H, multiplet, Ph
	4.85	1H, broad doublet, H-1
	4.63	1H, broad triplet, H-3S
	4.36	2H, broad multiplet, H-4, H-5
	3.72	2H, broad doublet, H-6
	3.15	1H, broad triplet, H-2S

ตารางที่ 2.39 การแปลผล ^{1}H-NMR spectrum ของอนุพันธ์ไคโตซาน (6)

สารตัวอย่าง	สัญญาณ (δ) (ppm)	การแปลผล
(6)	4.98	1H, broad doublet, H-1
	4.68	1H, broad triplet, H-3S
	4.40-4.28	2H, broad multiplet, H-4, H-5
	3.90	2H, broad doublet, H-6
	3.08	1H, broad triplet, H-2S

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University