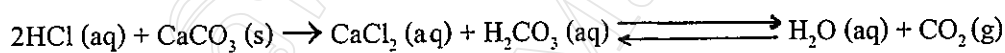


บทที่ 3

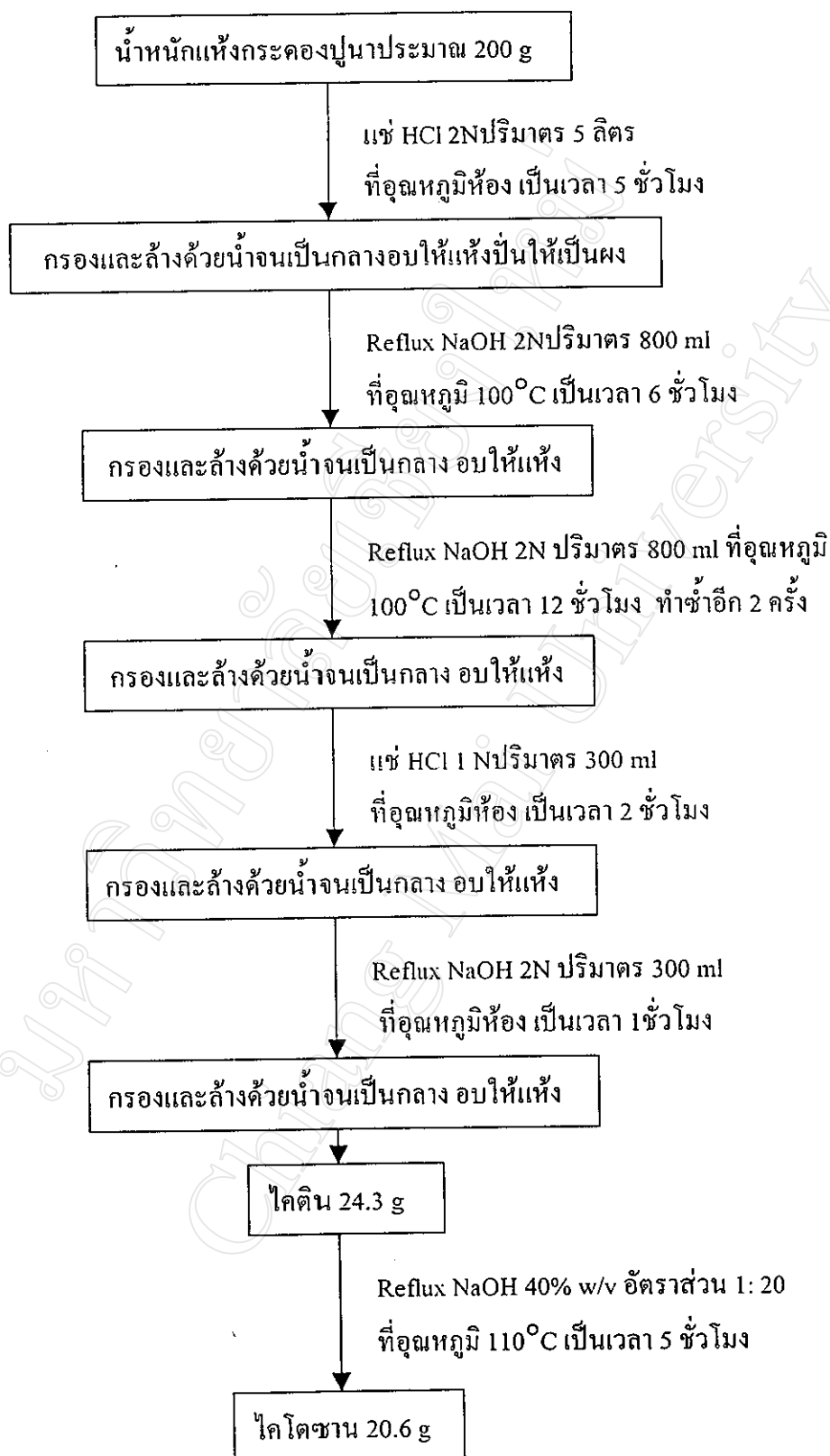
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ได้เตรียมไคตินและไคโตซานจากแหล่งวัตถุดิบ 2 ชนิด คือ กระจงคองปูนาและคราบจักจั่น เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานแบบสุ่ม จากการค้นคว้าวารสารต่างๆ ทั้งภายในและภายนอกประเทศประมาณ 10 ปีซ้อนหลัง พบว่ายังไม่มีผู้นำเอากระจงคองปูนาและคราบจักจั่นมาเตรียมเป็นไคตินและไคโตซาน จากนั้นทำการแยกขนาดโมเลกุลของซัลเฟตไคโตซานแบบสุ่ม ออกเป็น 3 ช่วง ด้วยเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี และหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยด้วยการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง เพื่อนำไปทดสอบสมบัติทางเคมี และสมบัติทางชีวภาพ โดยเปรียบเทียบผลกับการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานแบบสุ่ม และแบบเลือกเข้าในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงจากไคโตซานพาณิชย์ และการสังเคราะห์ซัลเฟตพอลิแอลกอฮอล์

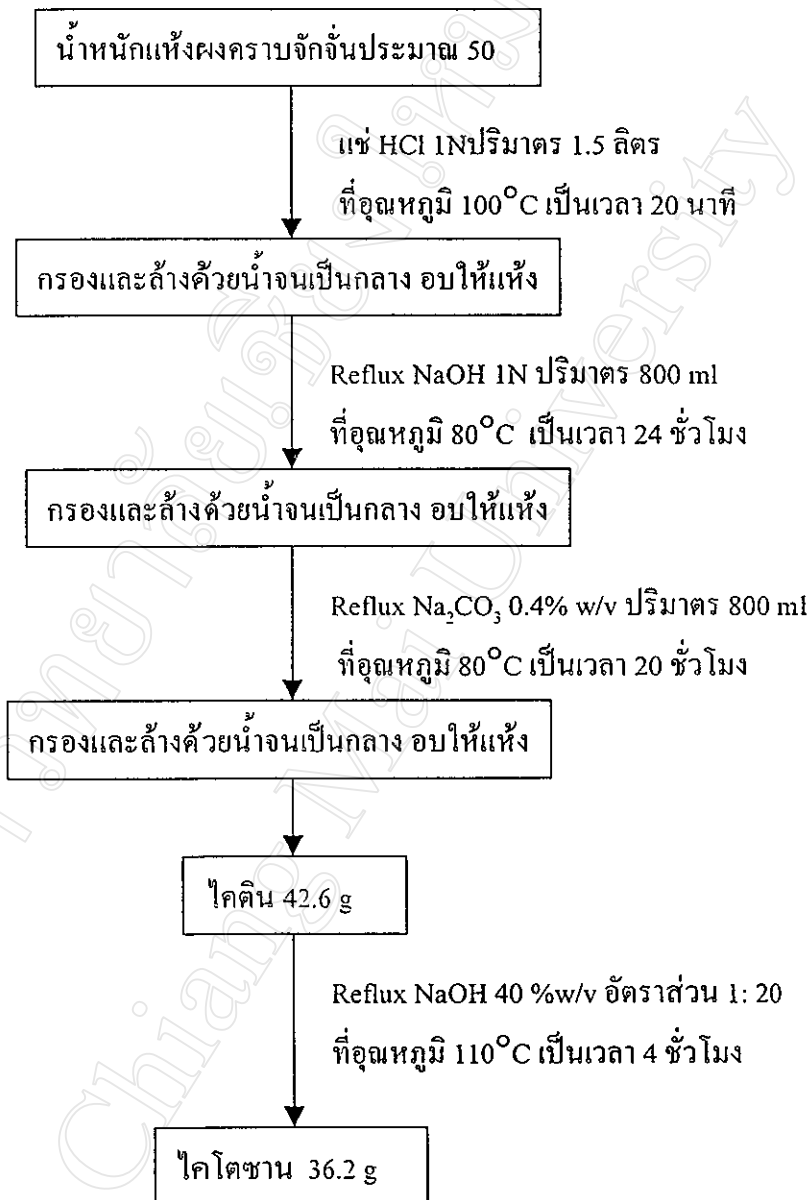
ในการเตรียมไคติน ไคโตซานจากกระจงคองปูนา และคราบจักจั่นโดยใช้วิธีที่พัฒนามาจากวิธีของHackman¹ และ Zhang และคณะ⁴⁰ ซึ่งสรุปขั้นตอนการเตรียม (ดูรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ) จากรูปที่ 3.1 และ 3.2 จะเห็นว่าใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกในการกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนต จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นแคลเซียมคลอไรด์ และกรดคาร์บอนิก แต่เนื่องจากกรดคาร์บอนิกไม่ค่อยเสถียรจึงสลายตัวให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ดังสมการ



ใช้สารละลายไฮเดรียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดโปรตีน และใช้เอธานอลในการกำจัดสี จากผลการทดลอง (ดูตารางที่ 3.1) พบว่าสามารถเตรียมไคตินจากกระจงคองปูนาได้ 12.2% ไคโตซาน 10.3% และเตรียมไคตินจากคราบจักจั่นได้ 85.2% ไคโตซาน 72.4% จากตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบไคตินและไคโตซานจากคราบจักจั่นมีมากกว่าในกระจงคองปูนา เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เตรียมไคตินและไคโตซานมีองค์ประกอบต่างกัน โดยเฉพาะในกระจงคองปูนามีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแคลเซียมคาร์บอเนต และโปรตีน ดังนั้นเมื่อเทียบน้ำหนักของไคตินและไคโตซานต่อน้ำหนักวัตถุดิบจึงมีน้อยกว่าคราบจักจั่น⁴⁸ นอกจากนี้การเตรียมไคติน และไคโตซานจากกระจงคองปูนายังใช้สภาวะที่รุนแรงกว่า และใช้เวลาในการกำจัดหมู่แอซิทิลนานกว่า⁴⁰ (ดูรูปที่ 3.1 และ 3.2) เมื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่แอซิทิลในตัวอย่างไคโตซานโดยวิธีนินไฮดริน (ดูตารางที่ 2.17) ซึ่งนินไฮดรินเป็นสารออกซิไดส์เชิงเอเจนต์ (oxidizing agent) สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนให้สารสีน้ำเงินม่วงของ "diketohydrinlylde-diketohydrinlamine"³⁵ ซึ่งสามารถแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา (ดูรูปที่ 1.8)



รูปที่ 3.1 สรุปขั้นตอนการเตรียมไคติน และไคโตซานจากกระดองปูนา



รูปที่ 3.2 สรุปขั้นตอนการเตรียมไคติน และไคโตซานจากดราบบจกจัน

จากผลการทดลองพบว่า ไคโตซานจากกระดองปูนา มีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลเท่ากับ 76 และไคโตซานจากคราบจักจั่น มีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลเท่ากับ 80 ดังนั้นปฏิบัติการกำจัดหมู่เอซิติลในไคตินจากคราบจักจั่นจะง่ายกว่าการกำจัดหมู่เอซิติลในไคตินจากกระดองปูนา

ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบวิธีการหาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติล (ดูตารางที่ 2.18) โดยวิธี ninhydrin และ potentiometric titration พบว่าเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของหมู่เอซิติล โดยวิธีนินไฮดรินมีค่าใกล้เคียงกับวิธีของ potentiometric titration ซึ่งวิธีนินไฮดรินเป็นการหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีโนอิสระในสายโซ่ไคโตซาน⁴⁵ เมื่อทราบเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของธาตุ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ก็จะทราบเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลจากเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีโนอิสระหารด้วยเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด ส่วนในตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์เท่านั้น ที่มีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลต่ำกว่าปกติมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างไคโตซานพาณิชย์มีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลไม่เท่ากันทั้งหมด ดังนั้นการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์จะเลือกเฉพาะผงเล็กๆ เพื่อง่ายต่อการละลาย อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่สุ่มมาวิเคราะห์จะมีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของการกำจัดหมู่เอซิติลต่ำ (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

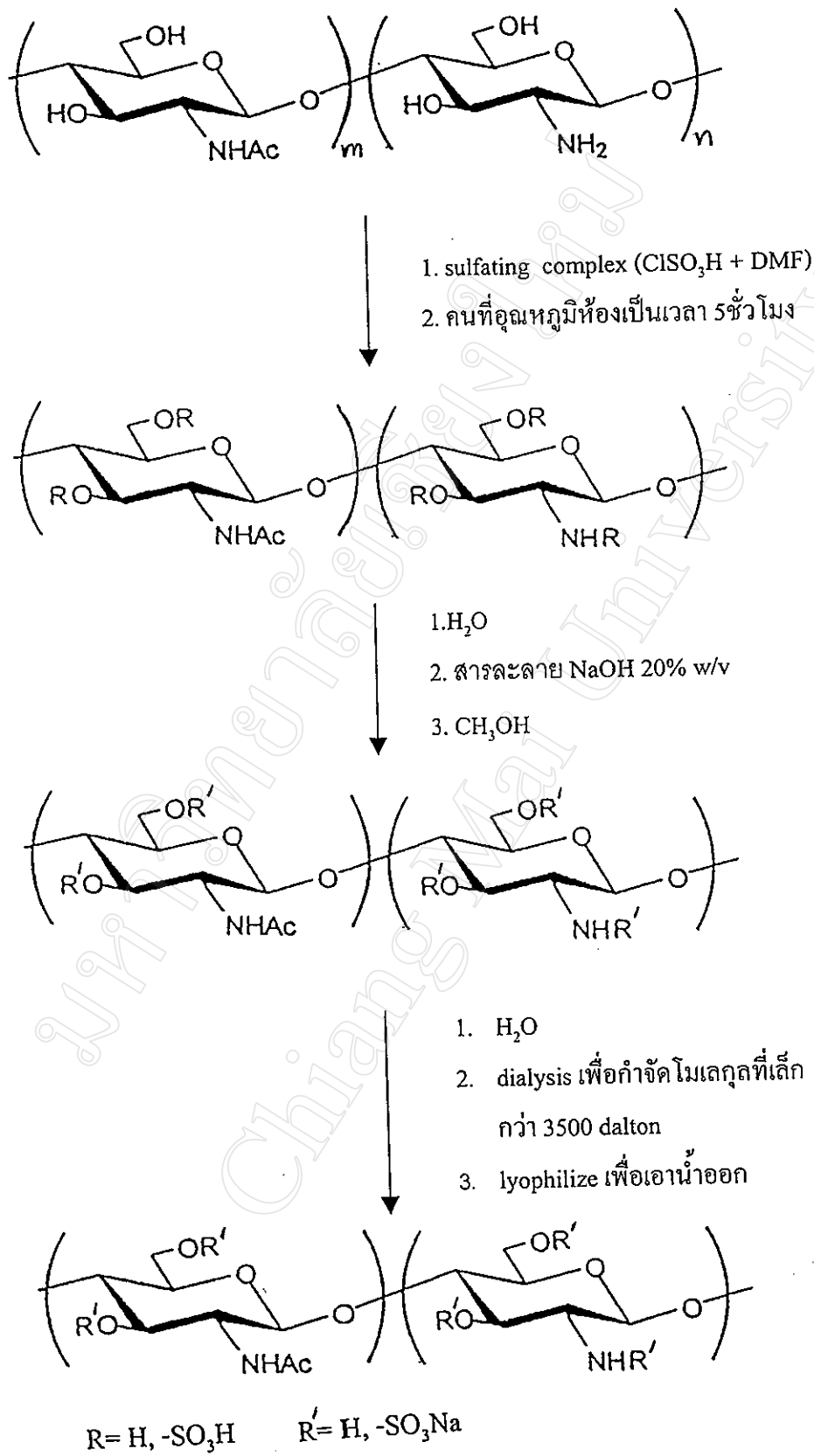
จากการศึกษา IR spectrum ของไคติน และไคโตซาน (ดูรูปที่ 2.25 และ 2.26) และ (ตารางที่ 2.21 และ 2.22) จะพบว่าไคตินจากกระดองปูนาจะมีพีคที่ 1650 และ 1625 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของเอไมด์ และพีคที่ 1550 cm^{-1} เป็น N-H bending ของเอไมด์ ส่วนไคโตซานจะมีพีคที่ 1570 cm^{-1} เป็น N-H bending ของเอมีน สำหรับไคตินจากคราบจักจั่นจะมีพีคที่ 1655 และ 1625 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของเอไมด์ และไคโตซานจะมีพีคที่ 1590 cm^{-1} เป็น N-H bending ของเอมีน และจากการศึกษา solid state CP-MAS ^{13}C -NMR spectroscopy ของไคโตซาน³³ (ดูรูปที่ 2.34) และ (ตารางที่ 2.28) พบว่าไคโตซานจากกระดองปูนา มี δ ที่ (174.01, C=O), (104.49, C-1), (83.16, C-4), (75.77, C-3, C-5), (61.09, C-6), (57.08, C-2) และ (22.83, CH_3) ppm ตามลำดับ

จากการศึกษาค่าหมุนจำเพาะของไคโตซานจากกระดองปูนา และคราบจักจั่น^{45,51} โดยนำไคโตซานมาละลายในสารละลายกรดอะซิติก แล้ววัดค่าการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ (ดูตารางที่ 2.16) พบว่าไคโตซานจากกระดองปูนาและคราบจักจั่นจะอยู่ใน β -D-(-)-form โดยไคโตซานจากกระดองปูนา และคราบจักจั่นจะมีค่าการหมุนจำเพาะ $[\alpha]_D^{28}$ เท่ากับ -19° และ -22.8° ตามลำดับ

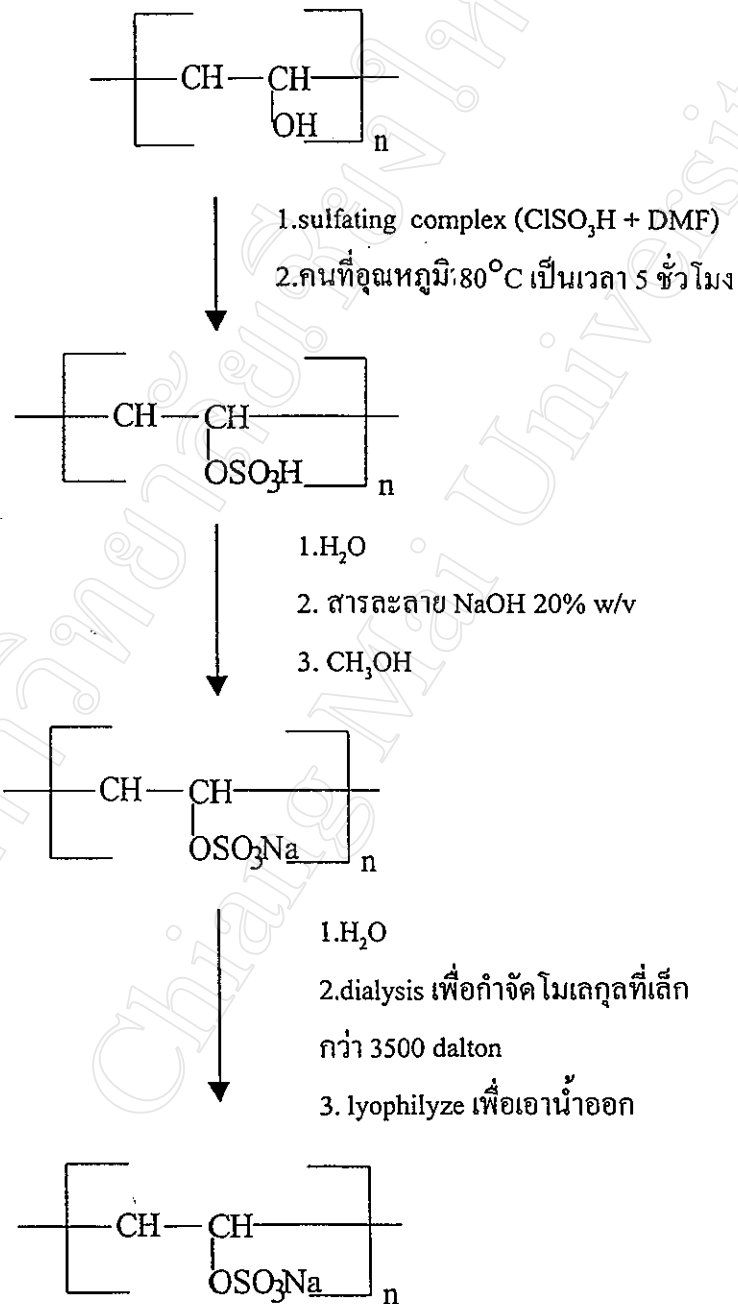
จากการศึกษาโครงสร้างผลึกของไคติน และไคโตซานด้วยเทคนิค X-ray diffraction spectrometry⁵⁷ (ดูรูปที่ 2.31 และ 2.32) และ (ตารางที่ 2.27) จะพบว่าการเปลี่ยนโครงสร้างจากไคตินเป็นไคโตซานโดยปฏิกิริยาการกำจัดหมู่แอมิโนด้วยสารละลายด่างเข้มข้นนั้น จะทำให้ความเป็นผลึกลดลงโดยดูจากพีคที่ 2θ พบว่าความเข้มของพีคสูงสุดเป็น 19.17° (d-spacing = 4.62) และ 19.26° (d-spacing = 4.62) สำหรับไคตินจากกระดูกงูปูนา และคราบจึกจัน โดยความเข้มของพีคที่ 2θ จะลดลง และจะ broad มากขึ้นจึงมีผลทำให้ d-spacing ลดลง โดยที่ 2θ พบพีคที่ 19.47° (d-spacing = 4.55) และ 19.75° (d-spacing = 4.49) สำหรับไคโตซานจากกระดูกงูปูนา และคราบจึกจัน นอกจากนี้ความเป็นผลึกยังมีผลต่อความสามารถในการละลายของไคตินและไคโตซานจากการทดลองจะเห็นว่าไคตินจะมีความเป็นผลึกมากกว่าไคโตซาน ดังนั้นไคตินจึงมีความสามารถในการละลายได้ในตัวทำละลายหรือสารละลายต่างๆ ได้น้อยกว่าไคโตซาน ซึ่งทำให้การนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางกว่าไคติน

ในการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิษฐ์ สรุปขั้นตอนการเตรียมซัลเฟตไคโตซาน (ดูรูปที่ 3.3) ส่วนซัลเฟตไคโตซานจากกระดูกงูปูนา และคราบจึกจันทำการทดลองเช่นเดียวกับซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิษฐ์ และการสังเคราะห์ซัลเฟตพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิเอธีลีนไกล์คอลแบบสุ่ม สรุปขั้นตอนการเตรียม (ดูรูปที่ 3.4 และ 3.5) โดยใช้วิธีของ Gemzazade และคณะ⁴⁷ จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ซัลเฟตที่สังเคราะห์ได้จากไคโตซานพาณิษฐ์มากกว่าไคโตซานจากกระดูกงูปูนา และคราบจึกจัน พอลิเอธีลีนไกล์คอล และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ

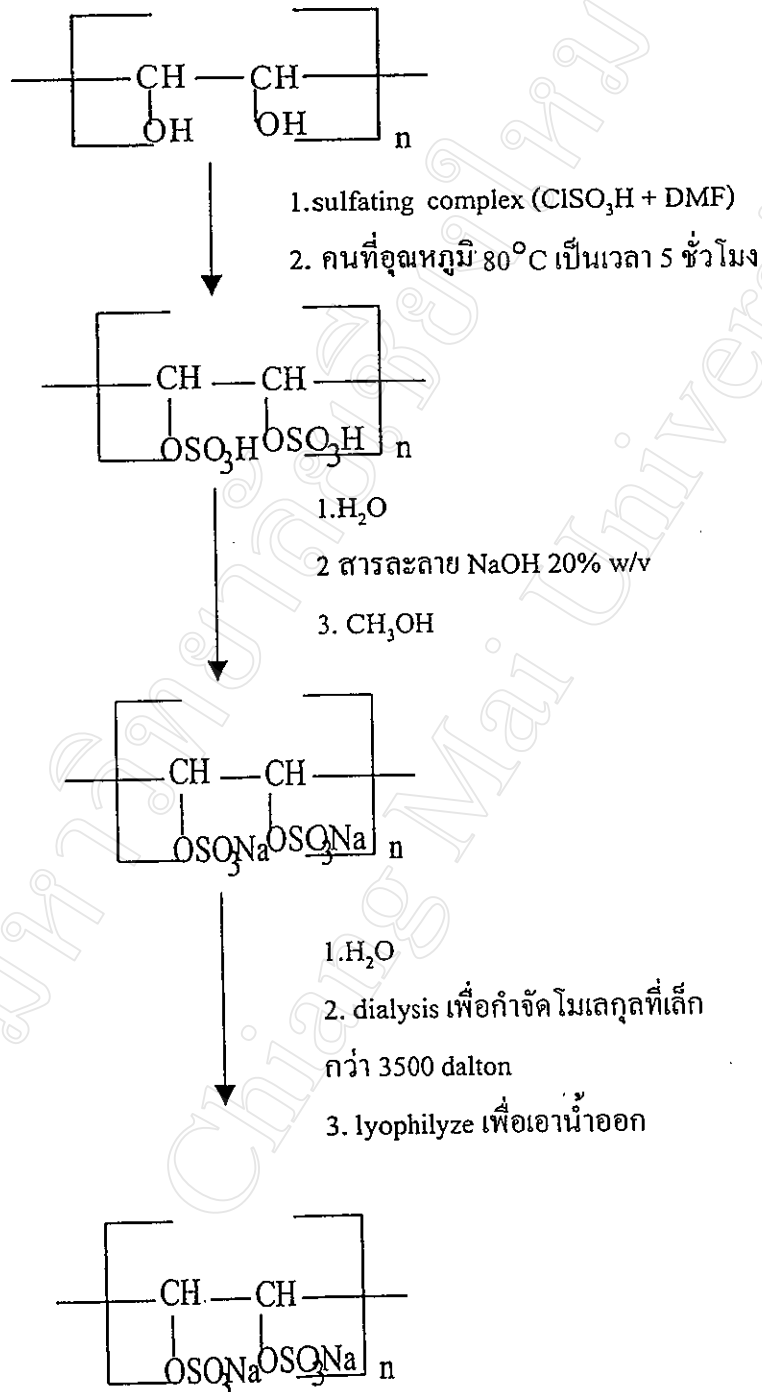
สำหรับขั้นตอนการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานจะต้องเตรียมไคโตซานให้อยู่ในรูปเจลที่มีตัวทำละลายผสมอยู่เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจน โครงสร้างผลึกในสายโซ่ไคโตซาน และเพิ่มความสามารถในการละลายในสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต ซึ่งในการทดลองนี้ใช้กรดคลอโรซัลฟอนิกในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (CISO_3H ใน DMF) โดยจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต ซึ่งมีกลไกดังนี้ (ดูรูปที่ 3.6)



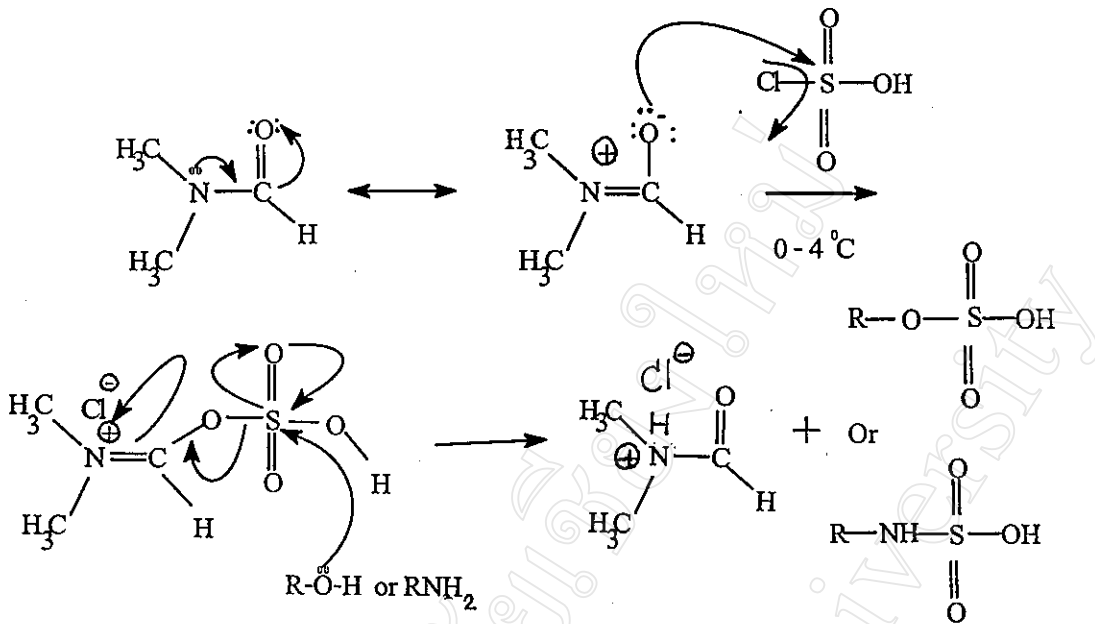
รูปที่ 3.3 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์



รูปที่ 3.4 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ซัลเฟตพอลิไวนิลแอลกอฮอล์



รูปที่ 3.5 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ซัลเฟตพอลิเอรีตีนกลัยโคล



รูปที่ 3.6 แสดงกลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต^{46,59}

นอกจากนี้สารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟตที่ใช้จะเสถียรที่อุณหภูมิต่ำ จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับไคโตซานในรูปเจลที่มีตัวทำละลายผสมอยู่ในสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้การเติมหมู่ซัลเฟตเกิดขึ้นได้ดีในสายโซ่ไคโตซาน ส่วนการสังเคราะห์ซัลเฟตเตคพอลิแอลกอฮอล์ สารตัวอย่างไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต ดังนั้นจึงต้องให้ความร้อนเพื่อให้สารตัวอย่างสามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟต ซึ่งทำให้พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิเอธีลีนกลัยโคลเกิดการเสื่อมสลายของสายพอลิเมอร์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยกว่าการสังเคราะห์จากไคโตซาน

จากการศึกษา IR spectrum ของซัลเฟตเตคไคโตซาน และซัลเฟตเตคพอลิแอลกอฮอล์ (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) พบว่าซัลเฟตเตคไคโตซานทั้ง 3 ชนิด และซัลเฟตเตคพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ มีพีคที่ 1240 cm^{-1} เป็นของ $\text{S}=\text{O}$ stretching และพีคที่ 800 cm^{-1} เป็นของ $\text{S}-\text{O}$ stretching ของหมู่ซัลเฟต ส่วนซัลเฟตเตคพอลิเอธีลีนกลัยโคลมีพีคที่ 1120 cm^{-1} เป็นของ $\text{S}=\text{O}$ stretching และพีคที่ 590 cm^{-1} เป็นของ $\text{S}-\text{O}$ stretching ของหมู่ซัลเฟต และเป็นที่น่าสนใจว่าพีค $\text{N}-\text{H}$ bending ของเอมีนของไคโตซานทั้ง 3 ชนิดที่อยู่ในช่วง $1570-1590\text{ cm}^{-1}$ หายไป แสดงว่าจาก IR-spectrum สามารถที่จะบอกได้ว่าการแทนที่ของหมู่ซัลเฟตเกิดขึ้นที่ตำแหน่งของหมู่เอมีนในสายโซ่ไคโตซาน นอกจากนี้ยังทราบจากการใช้วิธีนินไฮดรินทดสอบหาปริมาณของหมู่เอมีนอิสระที่เหลืออยู่ในตัวอย่างซัลเฟตเตค

ไคโตซาน พบว่าปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระลดลงอย่างมาก แสดงว่าการแทนที่ของหมู่ซัลเฟตเกิดขึ้นที่ตำแหน่งของหมู่อะมิโนจริง นอกจากนี้วิธีนินไฮดรินยังเป็นวิธีที่ใช้หาองศาของหมู่ซัลเฟต (DS) ในตัวอย่างไคโตซานที่ตำแหน่งหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) (ดูตารางที่ 2.19) จากผลการทดลองพบว่า องศาของหมู่ซัลเฟตของไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ กระดองปูนา และคราบจึกจัน มีค่าเท่ากับ 2.30 2.30 และ 1.97 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าในหนึ่งหน่วยไคโตซานจะมีหมู่ซัลเฟตอยู่ 2.30 2.30 และ 1.97 หมู่ แต่ตามทฤษฎีถ้าการแทนที่ของหมู่ซัลเฟตเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จะมีค่าเท่ากับ 3 โดยข้อดีของวิธีนี้ คือ ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ไม่แพงและใช้เครื่องมือทางสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐาน และมีราคาถูก

จากการศึกษา 1H -NMR spectrum ของซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ (ดูรูปที่ 2.37) และ (ตารางที่ 2.29) ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย พบว่าที่ δ (4.92, H-1), (4.56, H-3S), (4.25, H-4, H-5), (3.97, H-6S), (3.69, H-6), (3.45, H-2S), (3.15, H-2), และ (2.05, CH_3) ppm ตามลำดับ ซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา (ดูรูปที่ 2.38) และ (ตารางที่ 2.30) ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย พบว่าที่ δ (4.97, H-1), (4.60, H-3S), (4.35-4.23, H-4, H-5), (4.01, H-6S), (3.92, H-6), (3.41, H-2S), (3.18, H-2), และ (2.05, CH_3) ppm ตามลำดับ และซัลเฟตไคโตซานจากคราบจึกจัน (ดูรูปที่ 2.39) และ (ตารางที่ 2.31) ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย พบว่าที่ δ (4.95, H-1), (4.59, H-3S), (4.37-4.22, H-4, H-5), (4.00, H-6S) (3.38, H-2S), และ (2.05, CH_3) ppm ตามลำดับ

ในการแปลผล 1H -NMR spectrum ของซัลเฟตไคโตซาน สามารถที่จะทราบตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตในสายโซ่ไคโตซาน เนื่องจากโปรตอนที่เกี่ยวข้องกับอะตอมคาร์บอนที่มีหมู่ซัลเฟตมาเกาะจะมีค่า δ มากกว่าปกติ (คือค่า δ จะเลื่อนไปในทิศทางสนามแม่เหล็กที่ต่ำกว่าปกติ) ทั้งนี้เนื่องมาจากอิทธิพลของ inductive effect ของหมู่ซัลเฟต จากรายงานของ Gamzazade และคณะ⁴⁷ พบว่าในการแปลผล 1H -NMR spectrum ของซัลเฟตไคโตซาน พีก H-3S จะอยู่ที่ตำแหน่ง δ 4.6 ppm และพีก H-6S จะอยู่ที่ตำแหน่ง δ 4.0 ppm นอกจากนี้ Holme และ Perlin⁴⁹ พบว่าพีก H-2S จะอยู่ที่ตำแหน่ง δ 3.15 ppm และพีก H-2 จะอยู่ที่ตำแหน่ง δ 2.74 ppm

จากการศึกษา ^{13}C -NMR spectrum ของซัลเฟตไคโตซานจากไคโตซานพาณิชย์ (ดูรูปที่ 2.35) และ (ตารางที่ 2.28) ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย พบว่าที่ δ (100.21, C-1), (58.20, C-2S), (80.97, C-3S), (79.62, C-4), (75.62, C-5), (69.53, C-6S), (177.50, C=O), (25.27, CH_3) ppm ตามลำดับ ซัลเฟตไคโตซานจากกระดองปูนา (ดูรูปที่ 2.36) และ (ตารางที่ 2.28) ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลายพบที่ δ (99.63, C-1), (57.99, C-2S), (78.87, C-3S), (75.52, C-4) และ (75.52, C-5), (69.51, C-6S) ในการแปลผล ^{13}C -NMR spectrum ของซัลเฟตไคโตซานสามารถที่จะทราบตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตในสายโซ่ไคโตซานได้โดยใช้หลักการเดียวกับ 1H -NMR spectroscopy

เนื่องจากคาร์บอนที่มีหมู่ซัลเฟตมาเกาะจะมีค่า δ มากกว่าปกติ (คือค่า δ จะเลื่อนไปในทิศทางสนามแม่เหล็กที่ต่ำกว่าปกติ)

จากการศึกษา X-ray diffractogram ของซัลเฟตโคโคซาน (ดูรูปที่ 2.30 2.31 และ 2.32 และตารางที่ 2.27) จะเห็นว่าไม่พบความเป็นผลึกของซัลเฟตโคโคซาน โดยสังเกตจากพีคที่ 2θ ที่ประมาณ 19° ซึ่งเป็นพีคที่บอกความเป็นผลึกของโคโคซานจะหายไป มีผลทำให้ซัลเฟตโคโคซานละลายน้ำได้ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเติมหมู่ซัลเฟตลงไปในสายโซ่โคโคซานทำให้โคโคซานสูญเสียความเป็นผลึกไป โดยอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมซัลเฟต ซึ่งในการทดลองนี้ได้หาปริมาณโซเดียมด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมทรี⁵⁶ ดังนั้นข้อดีของซัลเฟตโคโคซานคือสามารถที่จะละลายน้ำได้ดีเมื่อเทียบกับโคโคซานและโคโคซานที่ไม่ละลายน้ำจึงเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ และด้านอื่นๆต่อไป

จากการศึกษาค่าการหมุนจำเพาะของซัลเฟตโคโคซาน (ดูตารางที่ 2.16) จะพบว่าซัลเฟตโคโคซานจะอยู่รูป β -D-(-)-form เช่นเดียวกับโคโคซาน และค่าการหมุนจำเพาะ $[\alpha]_D^{28}$ จะลดลงโดยมีค่าเท่ากับ -7.6° -9.5° และ -10.5° สำหรับซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพามิซัยกระดองปูนา และคราบจักจั่นตามลำดับ

จากการแยกขนาดโมเลกุลของซัลเฟตโคโคซาน โดยใช้เจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟีสามารถแบ่งขนาดโมเลกุลเป็น 3 ช่วง ตามค่า K_d โดยพีค 1 จะมีค่า K_d เท่ากับ 0.15 และพีค 2 จะมีค่า K_d เท่ากับ 0.50 (ดูรูปที่ 2.7 2.8 และ 2.9) โดยทำการเก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร และทดสอบซัลเฟตโคโคซานที่ถูกชะด้วย 1,9-Dimethylmethyle Blue ให้สารละลายสีม่วงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 540 นาโนเมตร และหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตโคโคซานและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตโคโคซานที่แยกตามขนาดโมเลกุลทั้ง 3 ช่วง ด้วยวิธีการวัดความหนืดของสารละลายเจือจาง โดยใช้สภาวะจากเอกสารอ้างอิงดังนี้⁵¹ ใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ จากตารางที่ 2.4 ถึงตารางที่ 2.15 และรูปที่ 2.11 ถึงรูปที่ 2.22 สามารถที่จะคำนวณหาความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$) จากนั้นนำไปแทนค่าในสมการของ Mark-Houwink Sukurada⁵¹

$$[\eta] = 1.75 \times 10^{-5} M_v^{0.98}$$

ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตโคโคซาน จากการทดลองพบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตโคโคซานมีค่าอยู่ในช่วง 1.2×10^4 ถึง 7.1×10^4 ดาลตัน

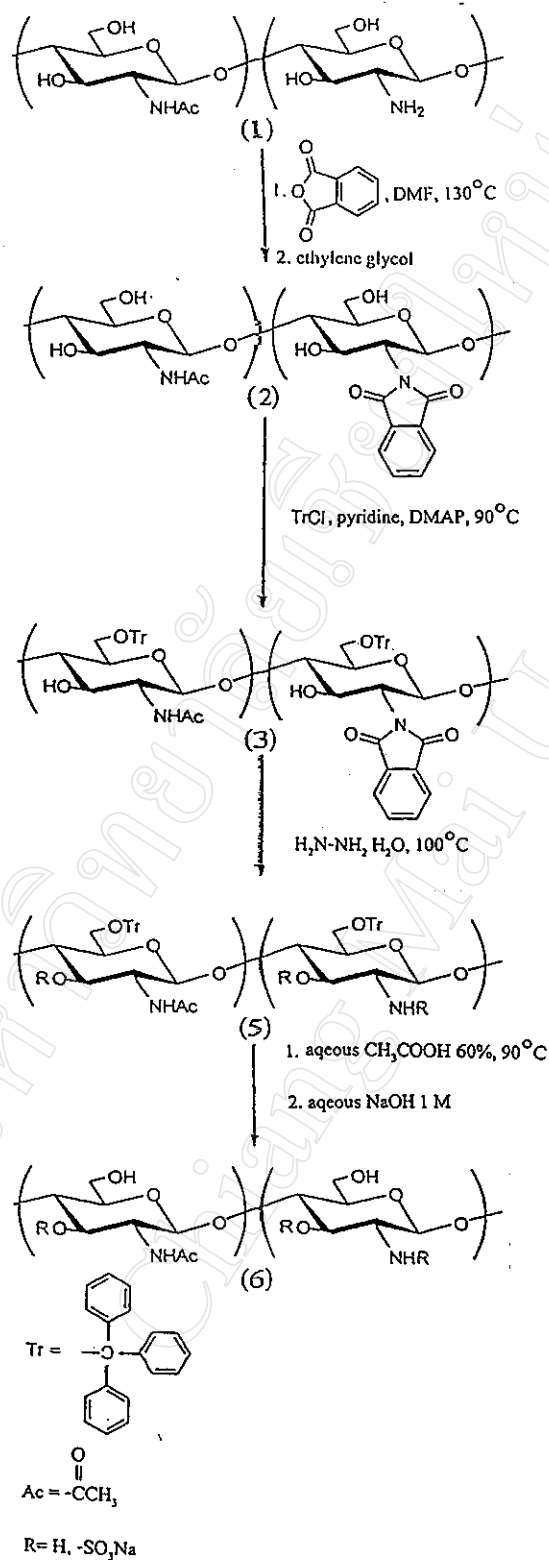
ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตโคโตซาน จากการทดลองพบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของซัลเฟตโคโตซานมีค่าอยู่ในช่วง 1.2×10^4 ถึง 7.1×10^4 คาลตัน

การสังเคราะห์ซัลเฟตโคโตซานจากโคโตซานพาคิซแบบเลือกเข้าในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง โดยใช้วิธีของ Nishimura และคณะ^{38,52} ในการสังเคราะห์นี้เป็นการเติมหมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 สรุปลขั้นตอนการสังเคราะห์ (ดูรูปที่ 3.7)

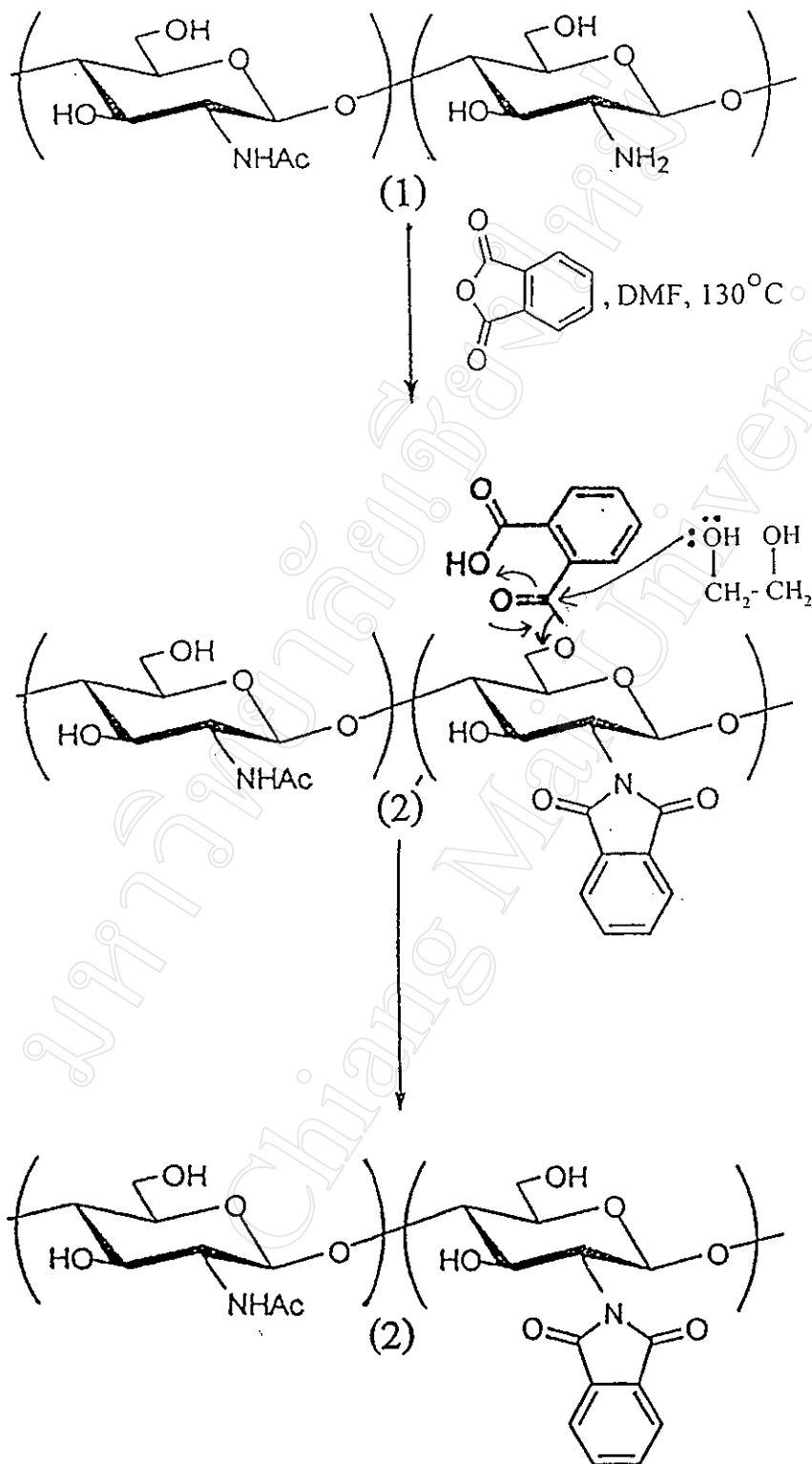
ในการสังเคราะห์อนุพันธ์โคโตซาน (2) โดยการเติมพาทาลิกแอนไฮไดรด์ และเอธิลีนกลัยโคลในตัวอย่างโคโตซานพาคิซ (1) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่ปราศจากน้ำ ที่อุณหภูมิ 130°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล 3.87 กรัม (46.0% yield) จากการศึกษา IR spectrum (ดูรูปที่ 2.41) และ (ตารางที่ 2.32) พบว่าพีกที่ 1770 และ 1710 cm^{-1} เป็น $\text{C}=\text{O}$ stretching ของอิมไมด์ (imide)

จากการศึกษา $^1\text{H-NMR}$ spectrum (ดูรูปที่ 2.43) และ (ตารางที่ 2.35) ใช้ DMSO-d_6 เป็นตัวทำละลาย พบว่าที่ δ (7.76-7.31, aromatic ring), (5.16, H-1), (4.75, H-3), (4.14, H-5) และ (3.80-3.10, H-2, H-4, H-6, H-6) ppm ตามลำดับ

จากการศึกษา X-ray diffractogram (ดูรูปที่ 2.42) และ (ตารางที่ 2.33) พบว่าอนุพันธ์โคโตซาน (2) มีพีกที่ 2θ เท่ากับ 13.49° (d-spacing = 6.57) เมื่อเทียบกับโคโตซานพาคิซ (1) จะเห็นว่าอนุพันธ์โคโตซาน (2) จะสูญเสียความเป็นผลึกจากการเติมหมู่พาทาลิไมด์ในสายโซ่โคโตซาน ทำให้อนุพันธ์โคโตซาน (2) สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น พิริดีน ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดเมทิลซัลโฟไซด์ เป็นต้น⁵² แต่เนื่องจากในสายโซ่โคโตซานมีหมู่ไฮดรอกซี ที่สามารถเกิด O-phthaloylation ได้^{60,61} แต่จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์อนุพันธ์โคโตซาน (2) ที่สังเคราะห์ได้จะไม่เกิด O-phthaloylation หรือเกิดเป็นวง (cyclization) ไม่สมบูรณ์ที่ตำแหน่งไนโตรเจนของโคโตซาน โดยดูจาก IR spectrum (ดูรูปที่ 2.41) และ (ตารางที่ 2.32) จะไม่พบพีกที่ความถี่ $2700\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ เป็น O-H stretching ของ free carboxyl และพีกที่ความถี่ $1290, 1260\text{ cm}^{-1}$ เป็น C-O stretching ของเอสเทอร์ แต่ในการทดลองได้เติมเอธิลีนกลัยโคลลงไปในปฏิกิริยาเพื่อป้องกันการเกิด O-phthaloylation โดยเอธิลีนกลัยโคลจะทำปฏิกิริยา transesterification ให้ N-phthalimido chitosan เท่านั้น³⁸ โดยปฏิกิริยาจะเกิดผ่าน phthalamic acid ซึ่งแสดงกลไก (ดูรูปที่ 3.8)⁶¹



รูปที่ 3.7 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ 2-Deoxy-2-sulfoamino-3-O-sulfo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranan (6)



รูปที่ 3.8 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา transesterification โดยเอซีตีนกลัยโคล⁶¹

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโดซาน (3) โดยการเติมสาร 4-ไคเมทิลอะมีโนฟิรดิน และ คลอโรไครฟีนิลมีเทนในอนุพันธ์ไคโดซาน (2) ในตัวทำละลายฟิรดินที่ปราศจากน้ำ ที่อุณหภูมิ 90°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปฏิกิริยาจะเกิดที่หมู่ไฮดรอกซ์ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 เท่านั้น เนื่องจากหมู่ไครฟีนิลมีเทนเป็นหมู่มีขนาดใหญ่และมีความ เกะกะมาก⁵² ดังนั้นจึงไม่เกิดปฏิกิริยาที่หมู่ไฮดรอกซ์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน 6.94 กรัม (73.5% yield) จากการศึกษา IR spectrum (ดูรูปที่ 2.41) และ (ตารางที่ 2.32) พบว่าพีคที่ $750, 710$ และ $690\text{ cm}^{-1}\text{ m}^{-1}$ เป็น =C-H bending out of plane ของวงเบนซีน

จากการศึกษา $^1\text{H-NMR}$ spectrum (ดูรูปที่ 2.44) และ (ตารางที่ 2.36) ใช้ DMSO-d_6 เป็นตัว ทำละลายพบว่าที่ δ (7.78-6.99, aromatic ring), (4.92, H-1), (4.77, H-3), (3.75, H-5) และ (3.48-2.88, H-2, H-4, H-6, H-6) ppm ตามลำดับ

จากการศึกษา X-ray diffractogram (ดูรูปที่ 2.42) และ (ตารางที่ 2.33) พบว่าอนุพันธ์ ไคโดซาน (3) มีพีคที่ 2θ เท่ากับ 19.73° (d-spacing = 4.49) เมื่อเทียบกับไคโดซานพาคิซซ์ (1) จะ เห็นว่าอนุพันธ์ไคโดซาน (3) ความเป็นผลึกจะลดลงจากการเติมหมู่ไครฟีนิลมีเทนในสายโซ่ไคโด ซานทำให้อนุพันธ์ไคโดซาน (3) สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดเช่นเดียวกับ อนุพันธ์ไคโดซาน (2)

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโดซาน (4) โดยการกำจัดหมู่พาทาลิไมโดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของอนุพันธ์ไคโดซาน (3) ให้เป็นหมู่อะมีโนด้วยไฮดราซีนโมโนไฮเดรตและน้ำ ที่อุณหภูมิ 100°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว 3.35 กรัม (73.0% yield) จากการศึกษา IR spectrum (ดูรูปที่ 2.41) และ (ตารางที่ 2.36) พบว่าพีคที่ 1600 cm^{-1} เป็น N-H bending ของเอมีน

จากการศึกษา $^1\text{H-NMR}$ spectrum (ดูรูปที่ 2.45) และ (ตารางที่ 2.37) ใช้ DMSO-d_6 เป็นตัว ทำละลายที่ δ (7.76-7.21, aromatic ring), (4.70, H-1, H-3) และ (4.06-3.06, H-2, H-4, H-5, H-6, H-6) ppm ตามลำดับ

จากการศึกษา X-ray diffractogram (ดูรูปที่ 2.42) และ (ตารางที่ 2.33) พบว่าอนุพันธ์ ไคโดซาน (4) มีพีคที่ 2θ เท่ากับ 13.20° (d-spacing = 6.70) เมื่อเทียบกับไคโดซานพาคิซซ์ (1) จะเห็นว่าอนุพันธ์ไคโดซาน (4) จะสูญเสียความเป็นผลึกจากการกำจัดหมู่พาทาลิไมโดในสายโซ่ ไคโดซาน ทำให้อนุพันธ์ไคโดซาน (4) สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เฉพาะฟิรดิน เท่านั้น เนื่องจากโครงสร้างกลับมาเป็นไคโดซาน

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์โคโคซาน (5) โดยการเติมหมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในอนุพันธ์โคโคซาน (4) ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนซัลเฟอร์ไดรอกไซด์-ฟิรดินในตัวทำละลายฟิรดินที่ปราศจากน้ำ ที่อุณหภูมิ 80°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนในเอทานอลและนำตะกอนมาละลายน้ำกลั่นทำให้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมซัลเฟต ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หลังจากไดเอลิซิสและขจัดน้ำออก พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะคล้ายสาหร่ายสีน้ำตาล 0.24 กรัม (9.88% yield) จากการศึกษา IR spectrum (ดูรูปที่ 2.41 และตารางที่ 2.36) พบว่าพีคที่ 1450 และ 1499 cm^{-1} เป็น $=\text{C}-\text{H}$ bending out of plane ของวงเบนซีน และพีคที่ 1240 และ 800 cm^{-1} เป็น $\text{S}=\text{O}$ stretching และ $\text{S}-\text{O}$ stretching ของหมู่ซัลเฟต

จากการศึกษา $^1\text{H-NMR}$ spectrum (ดูรูปที่ 2.46) และ (ตารางที่ 2.38) ใช้ $\text{DMSO}-d_6$ เป็นตัวทำละลายที่ δ (7.36-7.10, aromatic ring), (4.85, H-1), (4.36, H-4, H-5), (4.63, H-3S), (3.72, H-6) 3.15, H-2S) ppm ตามลำดับ

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์โคโคซาน (6) เมื่อเติมหมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในอนุพันธ์โคโคซาน (5) แล้วจะต้องนำหมู่ไตรฟีนิลมีเทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ออก ด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 60%v/v ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนในเอทานอลและนำตะกอนมาละลายน้ำกลั่นทำให้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมซัลเฟต ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หลังจากไดเอลิซิสและขจัดน้ำออก พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะคล้ายสาหร่ายสีน้ำตาล 0.05 กรัม (41.67% yield) จากการศึกษา IR spectrum (ดูรูปที่ 2.41) และ (ตารางที่ 2.36) พบว่าพีคที่ 1240 และ 800 cm^{-1} เป็น $\text{S}=\text{O}$ stretching และ $\text{S}-\text{O}$ stretching ของหมู่ซัลเฟต

จากการศึกษา $^1\text{H-NMR}$ spectrum (ดูรูปที่ 2.47) และ (ตารางที่ 2.39) ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลายที่ δ (4.98, H-1), (4.68, H-3S), (4.40-4.28, H-4, H-5), (3.90, H-6), (3.08, H-2S) ppm ตามลำดับ

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ของผลิตภัณฑ์ซัลเฟตโคโคซาน และซัลเฟตพอลิแอลกอฮอล์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเฮพาริน ซึ่งทำการทดลองโดยอาจารย์ปริยานาถ วงศ์จันทร์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากผลการทดลองพบว่า ที่ปริมาตร 2 นาโนกรัมของซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพาณิชย์ พีค 1 พีค 2 และ พีค 3 ให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 0.06, 0.13, 0.20 และ 0.12 (IU/ml) ของเฮพารินตามลำดับ ซัลเฟตโคโคซานจากกระดองปูนา พีค 1 พีค 2 และ พีค 3 ให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 0.05, 0.06, 0.06 และ 0.06 (IU/ml) ตามลำดับ

ซัลเฟตโคโคซานจากคราบจกจัน พิค 1 พิค 2 และ พิค 3 ให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 0.05, 0.03, 0.05 และ 0 (IU/ml) ของเฮพาริน ตามลำดับ ซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพาคิซึที่เลือกเข้าในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง (6) ให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 0.03 (IU/ml) ของเฮพาริน และซัลเฟตพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และซัลเฟตพอลิเอธิลีนกลัยคอลไม่มีผลต่อการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

จากผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดสามารถอธิบายผลการทดลองดังนี้ ถ้าค่า (IU/ml) ของเฮพารินมีค่ามาก แสดงถึงความสามารถในยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้นานกว่าเลือดจะแข็งตัว ซึ่งกลไกการทำงานของสารที่สมบัตคล้ายเฮพาริน สามารถที่จะเร่งการทำงานของ antithrombin III (AT III) ซึ่งในธรรมชาติจะเป็นตัวยับยั้งการแข็งตัวของเลือดแต่มีปริมาณน้อยในการยับยั้ง factor Xa ซึ่งเป็น coagulant factor เรียกการยับยั้งนี้ว่า "neutralization" จะทำให้เลือดแข็งตัวช้าลง

จากผลการทดลองจะพบว่า ซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพาคิซึให้ผลยับยั้งการแข็งตัวของเลือดดีกว่าซัลเฟตโคโคซานจากกระดูกงู และคราบจกจัน และเมื่อศึกษาขนาดโมเลกุลของซัลเฟตโคโคซานจะพบว่า ช่วงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 2.3×10^4 ถึง 3.6×10^4 คาลตัน จะให้ผลยับยั้งการแข็งตัวของเลือดสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากขนาดโมเลกุลอาจมีผลต่อการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ซึ่งขนาดใหญ่มากเกินไปและเล็กเกินไปก็ให้ผลที่ไม่ดี⁵⁰ เนื่องจากการสังเคราะห์ซัลเฟตโคโคซานนี้ เพื่อเลียนแบบสารที่มีสมบัตคล้ายเฮพารินที่มีในธรรมชาติ ดังนั้นถ้าขนาดใหญ่มากเกินไปอาจไปขวางหรือเกิดความเกะกะ ถ้าขนาดเล็กเกินไปก็ไม่เพียงพอที่จะไปทำปฏิกิริยาในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

จากการศึกษาผลขององศาของหมู่ซัลเฟต^{51,62} พบว่าซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพาคิซึ และกระดูกงูที่มีองศาของหมู่ซัลเฟตเท่ากับ 2.30 จะให้ผลยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้ดีกว่าซัลเฟตโคโคซานจากคราบจกจันที่มีองศาของหมู่ซัลเฟตเท่ากับ 1.97 ส่วนการที่ซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพาคิซึให้ผลยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้ดีกว่าซัลเฟตโคโคซานจากกระดูกงูนั้น อาจเนื่องมาจากผลของตำแหน่งของหมู่ซัลเฟต

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากการสังเคราะห์ซัลเฟตโคโคซานจากโคโคซานพาคิซึแบบสุ่ม และแบบเลือกเข้าในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง พบว่าซัลเฟตโคโคซานแบบเลือกเข้าในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง จะให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดน้อยกว่าเนื่องจากผลของตำแหน่งของหมู่ซัลเฟต ซึ่ง Nishimura และคณะ³⁸ ได้รายงานไว้ว่า หมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของโคโคซานจะให้ผลยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้ดีกว่าหมู่ซัลเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3

ส่วนซัลเฟตพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และซัลเฟตพอลิเอธีลีนกลัยคอลไม่ให้ผลการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด สามารถอธิบายได้ว่าซัลเฟตพอลิแซ็กการไรด์เท่านั้น ที่มีสมบัติในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ซึ่งขณะนี้ยังไม่มีรายงานว่า พบสารซัลเฟตของพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่พอลิแซ็กการไรด์ และมีสมบัติในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด