การผลิตกลูโคซามีนและการวัดจลนพลศาสตร์ต่อเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

Glucosamine Production and Kinetic Measurement to Liver Cancer Cell Hep G2

พรประภา หุ่นสุวรรณ
สิริประภา ทองมาก

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GLUCOSAMINE PRODUCTION AND KINETIC MEASUREMENT TO LIVER CANCER CELL HEP G2

PORNPRAPA HOONSUWAN
SIRIPRAPA TONGMAK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตกลูโคซามีนและการวัดจลนพลศาสตร์ต่อเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 Glucosamine Production and Kinetic Measurement to Liver Cancer Cell Hep G2
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรประภา หุ่นสุวรรณ รหัสนักศึกษา 58050790 นางสาวสิริประภา ทองมาก รหัสนักศึกษา 58050827
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ดร. ภานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
ผศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกลูโคซามีนและการวัดจลนพลศาสตร์ต่อเซลล์มะเร็งตับ Hep G2
ชื่อนักศึกษา นางสาวพรประภา หุ่นสุวรรณ รหัสนักศึกษา 58050790
นางสาวสิริประภา ทองมาก รหัสนักศึกษา 58050827
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อผลิตกลูโคซามีนขึ้นมา 3 รูปแบบ ได้แก่ กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟตจากไคตินของเปลือกกุ้ง ซึ่งจะผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ขึ้นเป็นอันดับแรกจากการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยใช้เทคนิคการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย Glycosidic Linkage และ N-Acetyl Linkage เกิดเป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ โดยมีค่าผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 31.16 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเปลี่ยนกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ให้เป็นกลูโคซามีนซัลเฟตและกลูโคซามีนฟอสเฟต และเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 สรุปผลการทดลองกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่า K_m เท่ากับ 0.035 มิลลิโมลาร์ ค่า V_{max} เท่ากับ 2.53 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที กลูโคซามีนซัลเฟตมีค่า K_m เท่ากับ 0.186 มิลลิโมลาร์ ค่า V_{max} เท่ากับ 2.98 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที ส่วนกลูโคซามีนฟอสเฟตไม่สามารถคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ต่อเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ได้ ซึ่งกลูโคซามีนซัลเฟตมีค่า K_m น้อยกว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 สามารถนำเข้ากลูโคซามีนซัลเฟตได้ดีกว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

คำสำคัญ : กลูโคซามีน กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต กลูโคซามีนฟอสเฟต เซลล์มะเร็งตับ Hep G2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Glucosamine Production and Kinetic Measurement to Liver Cancer Cell Hep G2	
Students	Ms. Pornprapa Hoonsuwan	Student ID 58050790
	Ms. Siriprapa Tongmak	Student ID 58050827
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2018	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj	
Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim	

Abstract

This special project was conducted to produce 3 types of glucosamine : glucosamine hydrochloride, glucosamine sulfate and glucosamine phosphate from chitin of shrimp skeleton. First, glucosamine hydrochloride was produced by the hydrolysis of chitin with hydrochloric acid using the reflux technique at 85 $^{\circ}$C for 6 hours. The product after degradation of glycosidic linkage and N-acetyl linkage is glucosamine hydrochloride and yield of the product is 31.16%. Then glucosamine hydrochloride was changed to glucosamine sulfate and glucosamine phosphate. Comparison of kinetic parameters of sugar that used in liver cancer cells, Hep G2, was investigated. Summary of this special project, K_m value of glucosamine hydrochloride was 0.035 mM and V_{max} was 2.53 nmol / 10^5 cell / min. K_m value of glucosamine sulfate was 0.186 mM and V_{max} was 2.98 nmol / 10^5 cell / min. Only glucosamine phosphate could not be concluded from this study. Glucosamine sulfate has K_m value lower than glucosamine hydrochloride standard shows that Hep G2 can be imported glucosamine sulfate better than glucosamine hydrochloride.

Keywords : Glucosamine, Glucosamine Hydrochrolide, Glucosamine Sulfate, Glucosamine Phosphate, Liver Cancer Cell Hep G2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับการสนับสนุน กำลังใจ ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ และ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เป็นอย่างยิ่งที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานพิเศษนี้ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องทำให้โครงงานนี้เสร็จสมบูรณ์และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ และ ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติๆ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ปริญญาโททุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจเสมอมา ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้

หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้สำเร็จล่วงไปด้วยดี

พรประภา หุ่นสุวรรณ
สิริประภา ทองมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 การผลิตกลูโคซามีน 3
2.1.1 การย่อยสลาย 4
2.1.2 เทคนิคการรีฟลักซ์ 4
2.2 การทดสอบเพื่อยืนยันผลกลูโคซามีน 4
2.2.1 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test) 4
2.2.2 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method) 6
2.2.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Absorption Spectrophotometer) 7
2.2.4 การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method) 8
2.3 การหาความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ 8
2.3.1 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC) 8
2.3.2 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) 9
2.4 การทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 10
2.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian Culture Media Preparation) 10
2.4.2 การนับจำนวนเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Quantitation of Mammalian Cells in Culture) 10
2.4.3 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin Reaction) 14
2.5 การนำไปใช้ประโยชน์ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 18
3.1 สารเคมี 18
3.2 วัสดุอุปกรณ์ 19
3.3 การผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จากเปลือกกุ้ง 20
3.3.1 การย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยเทคนิคการรีฟลักซ์ (Acid Hydrolysis) 20
3.3.2 การตกผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (Recrystallization) 20
3.4 การทดสอบเพื่อยืนยันผลกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 21
3.4.1 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test) 21
3.4.2 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method) 21
3.4.3 การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method) 22
3.5 การหาความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 22
3.5.1 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC) 22
3.5.2 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) 22
3.6 ทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 23
3.6.1 การเตรียมเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ให้เป็นเซลล์แขวนลอย 23
3.6.2 เตรียมตัวอย่างกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน กลูโคซามีนไฮโดคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต 23
3.6.3 การหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์และ Saturation Curve 24
3.7 การหาค่าจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 26
4.1 การผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จากเปลือกกุ้ง 26
4.2 การทดสอบเพื่อยืนยันผลกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 27
4.2.1 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test) 27
4.2.2 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method) 28
4.2.3 การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method) 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การหาความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 29
4.3.1 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC) 29
4.3.2 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) 30
4.4 การทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 31
4.4.1 เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต 31
4.4.2 Saturation Curve 32
4.5 การหาค่าจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 33
4.5.1 การวัดอัตราเร็วในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 33
4.5.2 การติดตามหาค่าจลนพลศาสตร์ 35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 39
5.1 สรุปผลการวิจัย 39
5.2 ข้อเสนอแนะ 40
เอกสารอ้างอิง 41
ภาคผนวก 44
ภาคผนวก ก 45
ภาคผนวก ข 47
ภาคผนวก ค 50
ภาคผนวก ง 52
ภาคผนวก จ 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงข้อมูลเวลา จำนวนเซลล์มีชีวิต และเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต	31
4.2	แสดงข้อมูลเวลา ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน	32
4.3	แสดงค่าจลพลศาสตร์กลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ	37
ก-1	การเจือจางสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน	46
ก-2	การเจือจางสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต	46
ค-1	แสดงข้อมูลความเข้มข้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ย และความคลาดเคลื่อน	50
ค-2	แสดงข้อมูลความเข้มข้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร	51
จ-1	แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0 นาที	54
จ-2	แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 30 นาที	54
จ-3	แสดงผลความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	55
จ-4	แสดงผลความเข้มข้นที่เหลือของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	55
จ-5	แสดงผลความเข้มข้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบที่นำเข้าเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	56
จ-6	แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	56
จ-7	แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	57
จ-8	แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	57
จ-9	แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนฟอตเฟต ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ปฏิกิริยาการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์	5
2.2	ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์	5
2.3	ปฏิกิริยาการทดสอบด้วยวิธี DNS	6
2.4	ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธี DNS	6
2.5	โครงสร้างพื้นฐานของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	7
2.6	สูตรโครงสร้างของสีทริปแพน บลู	12
2.7	ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)	12
2.8	ตารางแสดงภายใน 1 Chamber บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ประกอบด้วย 9 ช่องใหญ่ แต่ละช่องมีความกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และลึก 0.1 มิลลิเมตร	13
2.9	เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ Hep G2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า	13
2.10	ปฏิกิริยาการทดสอบด้วยวิธีนินไฮดริน	14
2.11	ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธีนินไฮดริน	15
4.1	ผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินจากเปลือกกุ้งด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยเทคนิคการรีฟลักซ์	27
4.2	ผลการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ น้ำกลั่น (หลอดควบคุม) (A) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (B) กลูโคส (C) ไคโตซาน (D) และไคติน (E)	27
4.3	ผลการไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรตใน น้ำกลั่น (หลอดควบคุม) (A) และสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (B)	28
4.4	ผลการแยกและติดตามด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (A) กลูโคส (B) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้ในการศึกษาครั้งนี้ (C) และไคโตซาน (D)	29
4.5	กราฟ HPLC กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (ก) และกลูโคซามีนที่ผลิตได้จากการศึกษานี้ (ข) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	30
4.6	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตที่เหลืออยู่เมื่อบ่มใน Assay Reaction ภายใน 40 นาที	31
4.7	กราฟ Saturation Curve ของเซลล์มะเร็งตับ Hep G2	33
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคซามีนที่นำเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 กับเวลา กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (ก) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ข) กลูโคซามีนซัลเฟต (ค) กลูโคซามีนฟอสเฟต (ง)	35
4.9	กราฟ Lineweaver-Burk กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (ก) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ข) กลูโคซามีนซัลเฟต (ค) กลูโคซามีนฟอสเฟต (ง)	37
ค-1	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	50
ค-2	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
GlnHCl (STD)	กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน
GlnHCl	กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์
$GlnSO_4$	กลูโคซามีนซัลเฟต
$GlnPO_4$	กลูโคซามีนฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเลมีปริมาณมาก โดยเฉพาะเปลือกกุ้งและหัวกุ้ง คิดเป็น 45 ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดควรนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเลเหล่านี้มาเพิ่มมูลค่า โดยเลือกใช้วัตถุดิบที่ต้นทุนต่ำแต่สร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น เช่น ไคติน ไคโตซาน และกลูโคซามีน (Wanichpongpan และ Attasat, 2016)

กลูโคซามีนเป็นสารประกอบประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) ที่ปกติถูกสร้างจากเซลล์ต้นกระดูกอ่อน (Chondrocyte) และพบในร่างกาย มีการนำกลูโคซามีนไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycans) ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan) และกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic Acid) สารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดของร่างกายโดยจะพบได้มากที่กระดูกอ่อน (Cartilage) ซึ่งจะอยู่ที่บริเวณส่วนปลายของกระดูกโดยเฉพาะที่ข้อต่อ กระดูกอ่อนประกอบด้วยเมทริกซ์ของเส้นใยคอลลาเจนที่มีโปรตีโอไกลแคนอยู่ภายใน โดยโปรตีโอไกลแคนเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีความสามารถในการดึงน้ำเข้ามาหาตัวเองได้ดี จึงทำให้กระดูกอ่อนมีความยืดหยุ่น และสามารถรองรับการเคลื่อนไหวของกระดูกข้อต่อได้ ซึ่งจัดเป็นบทบาทสำคัญของกลูโคซามีน นอกจากนี้กลูโคซามีนยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของสารอักเสบได้หลายชนิด จึงสามารถลดการอักเสบของข้อได้ กลูโคซามีนสามารถผลิตขึ้นได้โดยใช้ไคตินจากเปลือกกุ้งและเปลือกปู ซึ่งเป็นไคตินที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและเป็นคาร์โบไฮเดรตพอลิเมอร์ที่มีมากเป็นอันดับ 2 ของโลก นอกจากนี้ยังมีการผลิตกลูโคซามีนในรูปแบบของยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม อาการปวดเข่า และอาการปวดหลัง (ธนรัตน์ , 2554)

ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ทำการผลิตกลูโคซามีนขึ้นมา 3 รูปแบบ คือ กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (Glucosamine Hydrochloride : GlnHCl) กลูโคซามีนซัลเฟต (Glucosamine Sulfate : $GlnSO_4$) และ กลูโคซามีนฟอสเฟต (Glucosamine Phosphate : $GlnPO_4$) โดยไคตินจากเปลืองกุ้ง ซึ่งกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์สามารถผลิตได้โดยการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยใช้เทคนิคการรีฟลักซ์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย Glycosidic Linkage และ N-Acetyl Linkage ได้เป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ และเปลี่ยนกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ให้เป็นกลูโคซามีนซัลเฟต และ กลูโคซามีนฟอสเฟต จากนั้นเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อผลิตกลูโคซามีนขึ้นจากไคตินของเปลือกกุ้ง

2) เพื่อเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟตเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) การผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

2) การเปลี่ยนกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ให้เป็นกลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต

3) วัดจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถเพิ่มมูลค่าจากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเลให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถพัฒนาเป็นยาหรืออาหารเสริมได้

2) ได้องค์ความรู้เริ่มต้นสำหรับการผลิตกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ได้แก่ กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตกลูโคซามีน

กลูโคซามีน (Glucosamine) เป็นสารประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) ที่ปกติถูกสร้างจากเซลล์ต้นกระดูกอ่อน (Chondrocyte) และพบในร่างกายของมนุษย์ กลูโคซามีนจะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan) กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) สารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดของร่างกาย โดยจะพบได้มากที่กระดูกอ่อน (Cartilage) ซึ่งจะอยู่ที่บริเวณส่วนปลายของกระดูกโดยเฉพาะที่ข้อต่อ กระดูกอ่อนนั้นประกอบด้วยเมทริกซ์ของเส้นใยคอลลาเจนที่มีโปรตีโอไกลแคนอยู่ภายใน โดยโปรตีโอไกลแคนเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีความสามารถในการดึงน้ำเข้ามาหาตัวเองได้ดี จึงทำให้กระดูกอ่อนมีความยืดหยุ่นและสามารถรองรับการเคลื่อนไหวของกระดูกข้อต่อได้ ซึ่งจัดเป็นบทบาทสำคัญของกลูโคซามีนในเรื่องการทำงานของข้อ นอกจากนี้กลูโคซามีนยังมีผลยับยั้งการทำงานของสารอักเสบได้หลายชนิด จึงมีผลลดการอักเสบของข้อด้วย (ธนรัตน์, 2554)

กลูโคซามีนมักถูกนำมาใช้กับผู้ป่วยที่มีอาการข้ออักเสบที่ไม่สามารถใช้ยาแก้ปวดกลุ่ม NSAIDs (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug) เนื่องจากผลข้างเคียงของยาหรือโรคประจำตัวบางอย่างของผู้ป่วย จึงทำให้กลูโคซามีนเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยกับตัวผู้ป่วยมากกว่า

กลูโคซามีนที่มีจำหน่ายแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ตามการขึ้นทะเบียน คือ ยาอันตรายและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการยื่นขอขึ้นทะเบียน รวมถึงเอกสารที่จำเป็นในการขอขึ้นทะเบียน กล่าวคือ กลูโคซามีนที่ขึ้นทะเบียนเป็นยาอันตราย มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม ซึ่งจะต้องมีเอกสารยืนยันถึงการศึกษาทางการแพทย์ที่แสดงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารดังกล่าว และการใช้ยาจะอยู่ภายใต้การสั่งใช้จากแพทย์เท่านั้น ส่วนกลูโคซามีนที่ขึ้นทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงใช้รับประทาน นอกเหนือจากการรับประทานอาหารหลักตามปกติ และในการขอขึ้นทะเบียนไม่จำเป็นต้องแสดงการศึกษาทางการแพทย์ประกอบ สำหรับในประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุขได้อนุญาตให้มีกลูโคซามีนชนิดที่เป็นยาอันตรายเท่านั้นที่ได้รับการขึ้นทะเบียน และจำหน่ายในประเทศได้ (ธนรัตน์, 2554)

ทั้งยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของกลูโคซามีนมีจำหน่ายในรูปแบบของสารประกอบหลายชนิด เช่น กลูโคซามีนซัลเฟต (Glucosamine Sulfate) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (Glucosamine Hydrochloride) กลูโคซามีนฟอสเฟต (Glucosamine Phosphate) กลูโคซามีนคลอโรไฮเดรต

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Glucosamine Chlorohydrate หรือ N-Acetylglucosamine) ซึ่งทำให้ขนาดโมเลกุลและคุณสมบัติอื่นๆ ของกลูโคซามีนมีความแตกต่างกันไป เช่น ความคงตัวเมื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์ของกลูโคซามีนซัลเฟตยังมีการเติมโซเดียม หรือโพแทสเซียมในสูตรตำรับ เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวเพิ่มขึ้น โดยกลูโคซามีนซัลเฟตเป็นกลูโคซามีนที่ขึ้นทะเบียนเป็นยาอันตรายและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ส่วนกลูโคซามีนในรูปแบบอื่นจะขึ้นทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (ธนรัตน์, 2554)

2.1.1 การย่อยสลาย

การย่อยสลาย คือ ปฏิกิริยาที่มีการสลายพันธะทำให้สารโมเลกุลใหญ่แตกตัวเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงทางเคมี เป็นวิธีที่ใช้ทั่วไป โดยกระบวนการย่อยสลายโดยใช้กรด แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายโดยใช้กรดเจือจางและกระบวนการย่อยสลายโดยใช้กรดเข้มข้น (ชัชนันท์ และ เฉลิม, 2555)

2.1.1.1 การย่อยสลายโดยใช้กรดเจือจาง ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดเจือจางจะมีปริมาณต่ำ แต่การเพิ่มอุณหภูมิและความดันสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของกรดสามารถเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นได้ แต่ควรคำนึงถึงจุดที่เหมาะสมที่สุดของความเข้มข้นกรดที่ใช้ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย (จุลวัชร์ และคณะ, 2556)

2.1.1.2 กระบวนการย่อยสลายโดยใช้กรดเข้มข้น ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นจะมีปริมาณสูง แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อน มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และมีค่าใช้จ่ายในการคืนสภาพของกรดสูงมาก (จุลวัชร์ และคณะ, 2556)

2.1.2 เทคนิคการรีฟลักซ์

การรีฟลักซ์ คือ วิธีการให้ความร้อนกับปฏิกิริยาเคมีในระยะเวลาที่ต่อเนื่องยาวนาน โดยตัวทำละลายในขวดกลั่นจะระเหยกลายเป็นไอและควบแน่นในคอนเดนเซอร์ไหลกลับลงมาในขวดกลั่นหมุนเวียนต่อเนื่องตลอดเวลา ทำให้อุณหภูมิของปฏิกิริยาคงที่ (สิริมา, 2554)

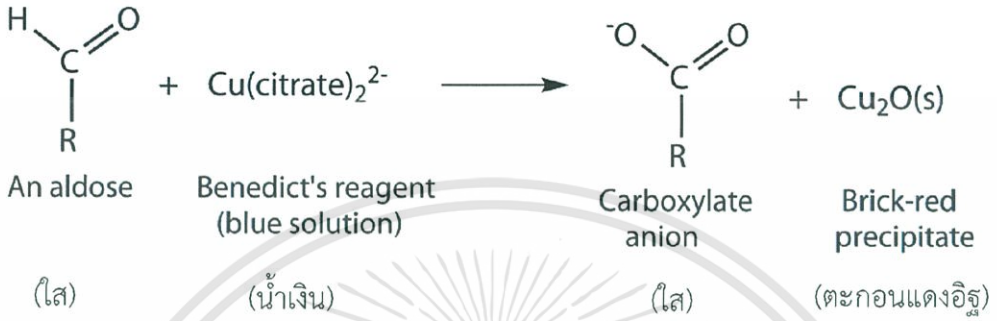
2.2 การทดสอบเพื่อยืนยันผลกลูโคซามีน

2.2.1 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test)

เป็นการดัดแปลงจากการทดสอบเฟลิ่ง (Fehling's Test) โดยเตรียมเป็นสารละลายเดี่ยว ซึ่งสะดวกและได้น้ำยาที่มีความเสถียรกว่าน้ำยาเฟลิ่ง ในน้ำยาประกอบด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulfate) โซเดียมซิเตรต (Sodium Citrate) และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate) ละลายรวมกันอยู่ ความเป็นด่างของน้ำยาเกิดจากการแตกตัวในน้ำของ

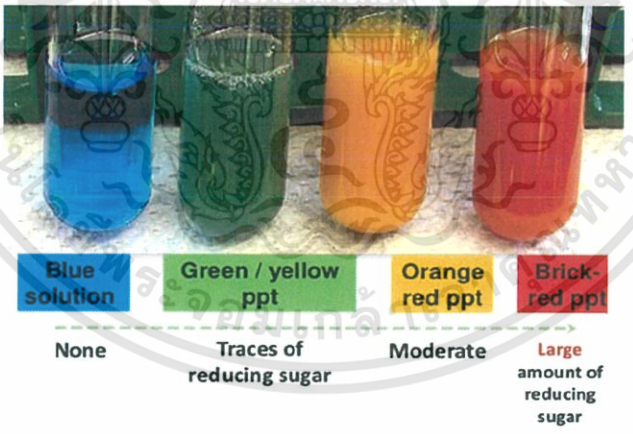
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมคาร์บอเนต คิวปริกไอออนจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับซิเตรตไอออน น้ำตาลที่ให้ตะกอนคิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) ถือว่าให้ผลบวกกับการทดสอบ (รูปที่ 2.1) ตะกอนอาจมีสีเขียว เหลือง ส้ม หรือแดงอิฐ ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่มากขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 2.2) น้ำตาลที่ให้ผลบวกกับการทดสอบเฟลิ่งจะให้ผลบวกกับการทดสอบเบเนดิกต์ด้วย (ชัยวัฒน์, 2556)



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์

ที่มา : https://laboratoryinfo.com/benedicts-test-principle-reagent-preparation-procedure-interpretation/



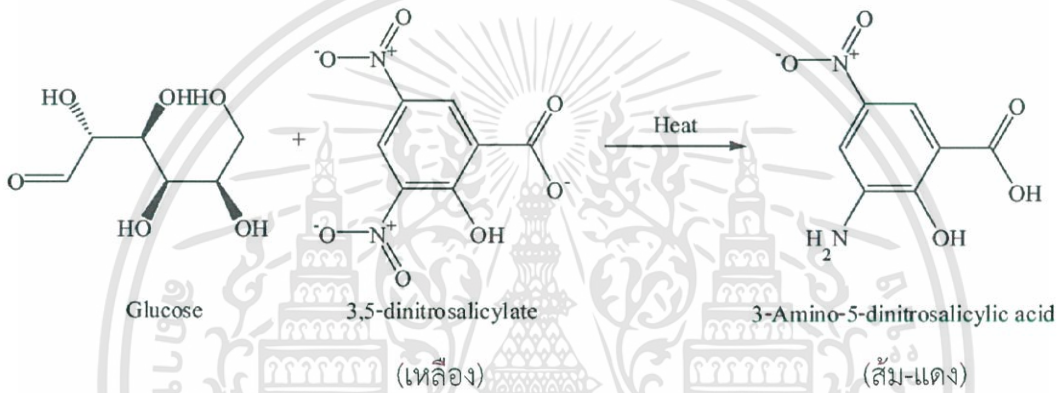
รูปที่ 2.2 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์

ที่มา : https://microbiologyinfo.com/benedicts-test-principle-composition-preparation-procedure-and-result-interpretation/

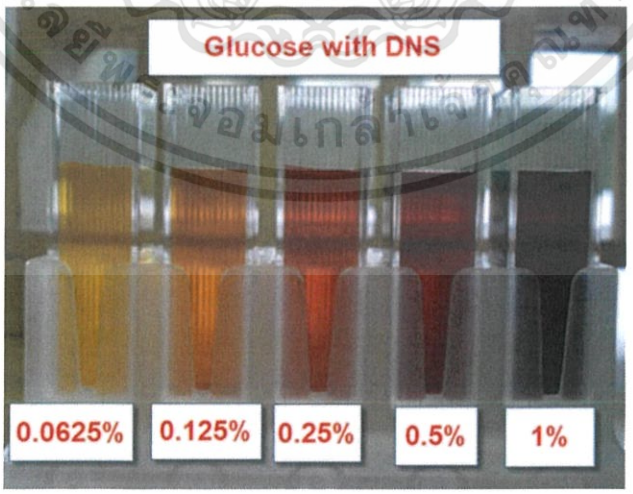
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method)

วิธี กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5–Dinitrosalicylic Acid, DNS) เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ในตัวอย่าง โดยสารละลาย DNS ซึ่งมีหมู่ ไนโตร 2 หมู่ มีลักษณะเป็นสีเหลือง เมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาลโดยมีความร้อนและสารละลายด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylate กลายเป็น 3-Amino-5-Nitrosalicylic Acid ที่มีสีส้ม-แดง (รูปที่ 2.3 และ 2.4) ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 520-540 นาโนเมตร (มนตรี, 2530)



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการทดสอบด้วยวิธี DNS
ที่มา สุรชัย และคณะ, 2014



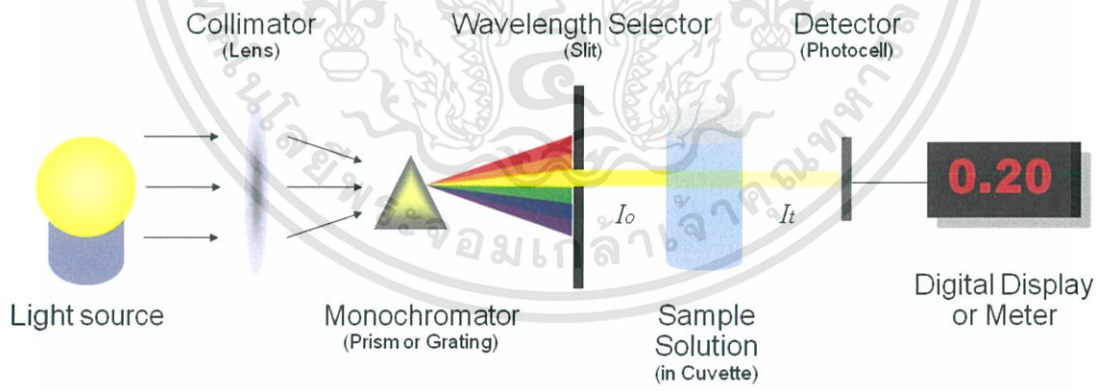
รูปที่ 2.4 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธี DNS
ที่มา : http://lawrencekok.blogspot.com/p/ia-and-ee.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Absorption Spectrophotometer)

การหาปริมาณสารมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้มากคือการวัดความเข้มของสี (Colorimetry) โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution) ที่ทราบค่าในระยะแรกๆ การเปรียบเทียบความเข้มของสีอาศัยสายตา (Visual Colorimetry) ซึ่งมีความถูกต้องและแม่นยำต่ำ ต่อมาได้มีการนำตัวไวแสง (Photo Sensor) มาใช้แทนการเปรียบเทียบด้วยสายตา จึงเรียกเครื่องมือที่ใช้ตัวไวแสงว่า Photoelectriccolorimeter หรือ Photometer เนื่องจากสารหรือสีที่จะวัดมีความสามารถในการดูดกลืนแสง หรือปล่อยแสงที่มีช่วงความยาวคลื่น (Spectrum) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้การวัดมีความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) สูง จึงได้พัฒนาเครื่องมือที่สามารถวัดความเข้มของแสงในช่วงความยาวคลื่นแคบ ๆ ได้อย่างต่อเนื่องตามต้องการ และใช้ตัวไวแสงที่มีประสิทธิภาพสูง เครื่องมือดังกล่าวถูกเรียกว่า สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาอย่างมากมีทั้งแบบอะนาล็อก แบบดิจิตอล รวมทั้งแบบดิจิตอลที่ทำงานโดยอัตโนมัติที่มีระบบไมโครโพรเซสเซอร์ควบคุมการทำงาน (ชูชาติ, 2552)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง มีหลอดไฟกำเนิดแสง (Light Source) ส่องแสงผ่านไปยังตัวแยกแสง (Monochromator) ผ่านสารตัวอย่าง (Sample) ผ่านตัวไวแสง (Photo Sensor) แล้วจึงอ่านค่าออกมา (รูปที่ 2.5) (ชูชาติ, 2552)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ที่มา : https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetcs/Spectrophotometry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method)

การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation Titration) เป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการเกิดตะกอนที่ไม่ละลาย (Insoluble Precipitate) หรือการเกิดตะกอนที่ละลายได้น้อยมาก (Very Slightly Soluble Substance) โดยปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นระหว่างสารละลายมาตรฐานที่สามารถเกิดเป็นตะกอนกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม การไทเทรตแบบตกตะกอนโดยส่วนใหญ่จะเกี่ยวกับการตกตะกอนของซิลเวอร์ที่เกิดจากซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ทำปฏิกิริยากับสารอื่นแล้วเกิดเกลือของซิลเวอร์ที่ละลายในน้ำได้ยากหรือน้อยมาก ดังนั้นการหาปริมาณของสารโดยใช้ซิลเวอร์ไอออนเป็นตัวตกตะกอน จึงเรียกว่าอาร์เจนโตเมทรี (Argentometric Method) สารละลายซิลเวอร์ไอออนจะเป็นสารละลายมาตรฐานที่เกิดตะกอนกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ไอออนที่สามารถหาปริมาณได้ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ คลอไรด์ (Cl^-) โบร์ไมด์ (Br^-) ไอโอไดด์ (I^-) และ ไธโอไซยาเนต (SCN^-) เป็นต้น (ศิริวรรณ, 2545)

2.3 การหาความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์

2.3.1 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC)

โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง แต่เดิม TLC ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์ชนิดสารโดยเปรียบเทียบ Rf (Rate of flow) ของสารกับสารมาตรฐาน (Authentic Sample) ใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ และยังใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

หลักการของ TLC นั้น คือวัฏภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบางๆ สารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้น ๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย Capillary Action ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่งและใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่จึงเคลื่อนที่ขึ้นไปพร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนสารที่มีขั้วมากจะถูกดูดซับไว้ที่วัฏภาคนิ่งหรือซิลิกาจึงไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ได้น้อย จึงเกิดการแยกขึ้นในระบบ เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบ (วิมลมาศ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

2.3.2.1 หลักการทำงาน

HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจ ที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบ จะเกิดขึ้นระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคนิ่ง (Stationary Phase) หรือ คอลัมน์ (Column) กับวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่าง สามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่ หรือวัฏภาคนิ่งโดยสารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคนิ่งก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีคซึ่งจะเรียกว่าโครมาโตแกรม (Chromatogram) (เบญจา, 2551)

2.3.2.2 ส่วนประกอบ

2.3.2.2.1 Mobile phase หรือ Solvent เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ Stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

2.3.2.2.2 Degaser ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศที่มีอยู่ใน Mobile Phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ Column และ Detector

2.3.2.2.3 Pump ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (Mobile Phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

2.3.2.2.4 Injector หรือ Autosampler ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

2.3.2.2.5 Column หรือจะเรียกว่า Stationary Phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง Mobile Phase กับ Stationary Phase

2.3.2.2.6 Detector คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี (เบญจา, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.3 การวิเคราะห์ทดสอบ

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คู่อิแนนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสียสภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุลตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100 % การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป ตัวอย่างการทดสอบด้วย HPLC เช่น หาปริมาณวิตามินซี ในเลือด น้ำผลไม้ วิตามินอีในอาหารสัตว์ น้ำตาลในน้ำผลไม้ กลีเซอร์ไรด์ในน้ำมัน และอื่นๆ (เบญจา, 2551)

2.4 การทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

2.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian Culture Media Preparation)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกายของสัตว์หรือเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (*In Vitro*) มีความจำเป็นที่จะต้องเตรียมสภาวะต่างๆ ให้คล้ายคลึงกับสภาวะภายในร่างกายของสัตว์ชนิดนั้น เช่น อุณหภูมิ ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณสารอาหาร ค่าความเป็นกรด–ด่าง ค่าออสโมลาริตี้ ซึ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่เพาะเลี้ยงได้ในอาหารที่มีค่าออสโมลาริตี้ประมาณ 260 ถึง 320 มิลลิออสโมลาริตี้ต่อกิโลกรัม ซึ่งอยู่ในช่วงที่กว้าง ส่วนพลาสมาของมนุษย์มีค่าออสโมลาริตี้เท่ากับ 290 มิลลิออสโมลาริตี้ต่อกิโลกรัม บางครั้งจึงกำหนดค่านี้เป็นค่าที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ของมนุษย์ การเลือกชนิดของอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งที่เลือกใช้ให้เหมาะสม อาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มสารเคมี 4 กลุ่มคือ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต เกลืออนินทรีย์ และไวตามิน ถ้าส่วนผสมมีปริมาณที่สมดุลในอาหาร จะเป็นแหล่งสังเคราะห์โปรตีน แหล่งพลังงานในกระบวนการเมทาบอลิซึม การทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ และกระบวนการเร่งปฏิกิริยา (อุ่นเรือน และ สุพัตรา, 2555)

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์มีบริษัทผลิตขายเป็นการค้า ซึ่งมี 2 รูปแบบคือ รูปแบบที่เป็นของเหลว และรูปแบบที่เป็นผง และส่วนใหญ่เติมฟีนอลเรด (Phenol Red) ลงในอาหารทั้งสองรูปแบบ ทั้งนี้เพื่อเป็นสีที่บ่งชี้ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหาร โดยปกติค่าพีเอชที่เหมาะสมของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อยู่ในช่วงระหว่าง 7.2 ถึง 7.4 กรณีที่ค่าพีเอชของอาหารเปลี่ยนไป สีของฟีนอลเรดจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาหารที่มีค่าพีเอช 7.4 จะมีสีแดง ถ้าค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเป็น 7.8 อาหารจะมีสีม่วง ค่าพีเอช 6.5 อาหารจะมีสีเหลือง เป็นต้น การปรับค่าพีเอชของอาหารควรจะปรับหลังจากเติมสารเสริมต่างๆ ครบสมบูรณ์แล้ว นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไบคาร์บอเนต และ HEPES มักใช้เป็นบัฟเฟอร์ เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าพีเอชของอาหาร อย่างไรก็ตามอาหารที่มี HEPES สามารถใช้เลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (อุ่นเรือน และ สุพัตรา, 2555)

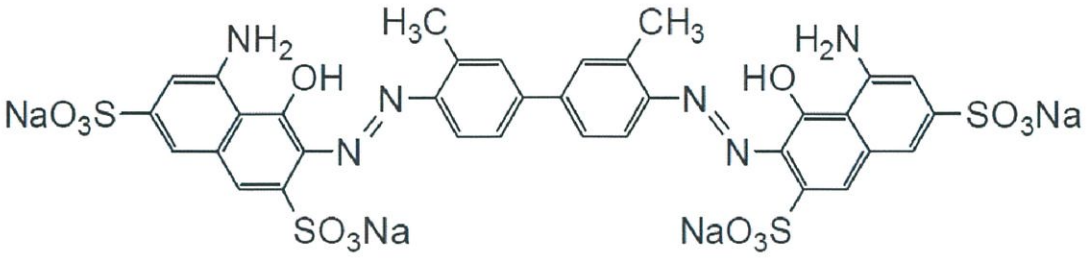
อาหารพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงเซลล์ได้แก่ Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Glasgow Modified Eagle Medium (GMEM), Nutrient Mixture F-12 (Ham's Modification), McCoy's 5a Medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) Medium และ Medium 199 เป็นต้น

การเตรียมอาหารที่สมบูรณ์พร้อมเพาะเลี้ยงเซลล์ต้องเติมซีรัม (Fetal Bovine Serum, FBS หรือ Fetal Calf Serum, FCS) ลงในอาหารประมาณ 5 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ที่สำคัญต้องทำการ Heat-Inactivated ซีรัมก่อนนำมาเติมลงในอาหาร โดยนำขวดซีรัมที่หลอมละลายแล้วแช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 56 องซาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานขององค์ประกอบที่มีอยู่ในซีรัม นอกจากซีรัมดังกล่าวข้างต้น ซีรัมชนิดอื่นที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ Calf Serum Horse Serum และ Human Serum นอกจากนี้สารเสริมที่มักเติมลงในอาหารคือสารปฏิชีวนะทั้งนี้เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยเติมลงในอาหารก่อนใช้งาน แต่ไม่ควรใช้ตลอดไป เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เกิดการดื้อต่อสารปฏิชีวนะได้ สารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ควบคู่กัน ได้แก่ Penicilliin และ Streptomycin ส่วน Kanamycin และ Gentamycin มักใช้แบบเดี่ยว นอกจากนี้สารฆ่าเชื้อรา (Fungicides) ที่นิยมใช้คือ Mycostatin และ Amphotericin B (อุ่นเรือน และ สุพัตรา, 2555)

2.4.2 การนับจำนวนเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Quantitation of Mammalian Cells in Culture)

การนับจำนวนเซลล์มีความจำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ เพราะจะทำให้ทราบจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่สำคัญทำให้ทราบจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายได้ เนื่องจากมีการใช้ประโยชน์จากเซลล์ไลน์ในการศึกษาด้านต่างๆ เช่น ศึกษาการเจริญของเซลล์ การทดสอบความเป็นพิษ การปรับปรุงสูตรอาหารเพาะเลี้ยง การเพิ่มปริมาณไวรัส เป็นต้น จึงจำเป็นต้องทราบจำนวนเซลล์ตั้งต้นก่อนทำการทดลองทุกครั้ง การตรวจหาจำนวนเซลล์มีชีวิต ในที่นี้ใช้วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสีทริปแพน บลู (Trypan Blue) ซึ่งเป็นสีชนิด Dye Exclusion (รูปที่ 2.6) เนื่องจากสีชนิดนี้ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์มีชีวิต แต่ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์ที่ตายแล้วหรือเซลล์ที่ได้รับสารพิษ เยื่อหุ้มเซลล์เหล่านี้จะขาดคุณสมบัติของการยอมให้สารบางอย่างผ่านเข้าออกจากเซลล์ ดังนั้น สีทริปแพน บลู จึงสามารถเข้าไปในเซลล์ที่ตายและทำให้นิวเคลียสติดสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน ต้องระมัดระวังในการใช้สีชนิดนี้เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง จึงควรใส่ถุงมือป้องกันทุกครั้งที่ทำการย้อมสีชนิดนี้ ส่วนอุปกรณ์สำหรับนับเซลล์ในที่นี้ใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer) (อุ่นเรือน และ สุพัตรา, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของสีทริปแพน บลู

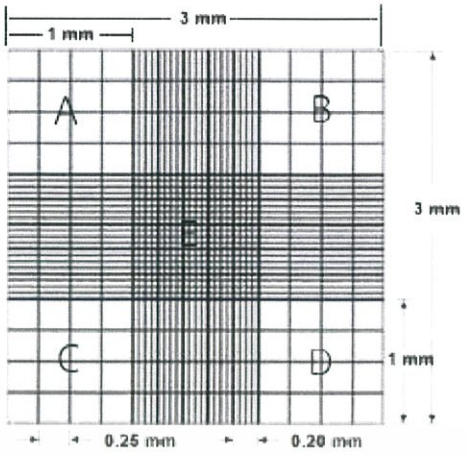
ที่มา : https://www.dojindo.com/store/p/193-Cellstain-Trypan-Blue.html

ฮีมาไซโตมิเตอร์ ประกอบด้วย 2 Chamber โดยแต่ละ Chamber มีตาราง (Grid) แบ่งออกเป็น 9 ช่องใหญ่ (Primary Squares) แต่ละช่องมีความกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และเมื่อปิดด้วยแผ่นปิดไสลด์ (Cover Glass) จะมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้น แต่ละช่องจะมีปริมาตรเท่ากับ 1/10 x 1/10 x 1/100 = 1/10,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ $1/10^4$ มิลลิเมตรหรือ 10^{-4} มิลลิเมตร (รูปที่ 2.7 และ 2.8)

รูปที่ 2.7 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)

ที่มา : http://unisciencelab.com/product/hemocytometer/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

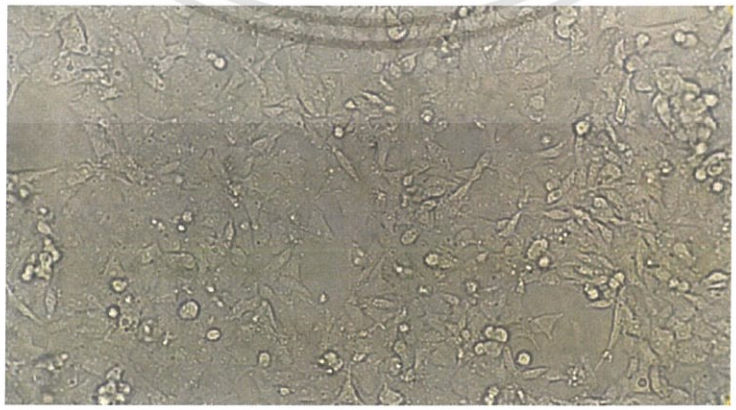


รูปที่ 2.8 ตารางแสดงภายใน 1 Chamber บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ประกอบด้วย 9 ช่องใหญ่ แต่ละช่องมีความกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และลึก 0.1 มิลลิเมตร

ที่มา : http://www.bulldog-bio.com/4_chip.html

จากรูปที่ 2.8 จะเห็นได้ว่า ช่องใหญ่ (Primary Square) มุมบนซ้ายขวา (A และ B) และล่างซ้ายขวา (C และ D) แต่ละช่องประกอบด้วย 16 ช่องเล็ก ส่วนช่องใหญ่ตรงกลาง (E) ประกอบด้วย 25 ช่องเล็ก (อุ่นเรือน และ สุพัตรา, 2555)

สำหรับโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ทำการเลือกใช้เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ Hep G2 (Human Liver Cancer Cell Line, Hep G2) (รูปที่2.9) สามารถเพาะเลี้ยงแบบเกาะพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง สามารถทำให้หลุดจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงโดยใช้เอนไซม์ทริปซินย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิว จากนั้นหยุดการทำงานของ ทริปซินด้วยการเติมอาหารที่เสริมด้วยฟีตัลโบวายน์ซีรัม (Fetal Bovine Serum) เนื่องจากเป็น แอลฟา-1-แอนติทริปซิน (α_1-Antitrypsin) และแอลฟา-2-มาโครโกลบูลิน (α_2-Macroglobulin) ที่สามารถยับยั้งการย่อยของทริปซินได้

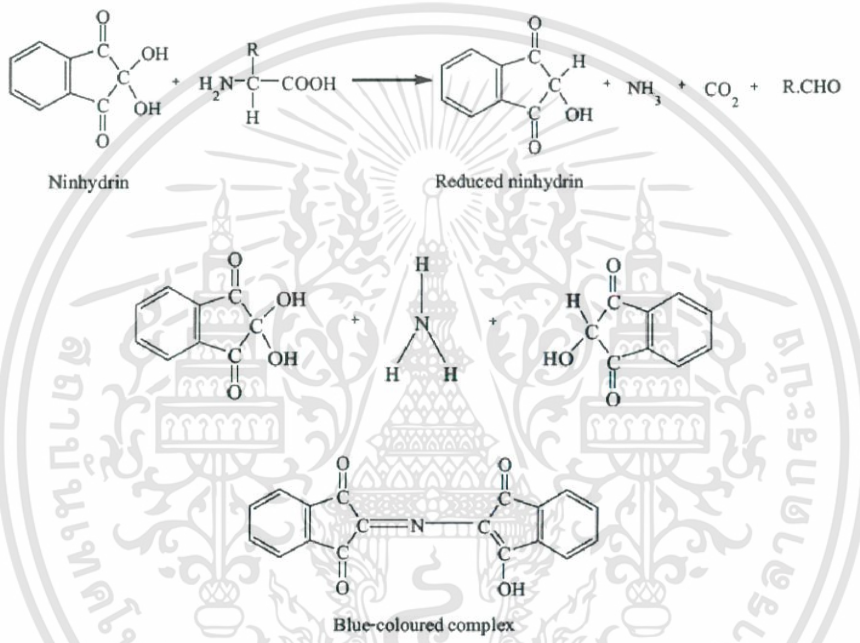


รูปที่ 2.9 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ Hep G2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin Reaction)

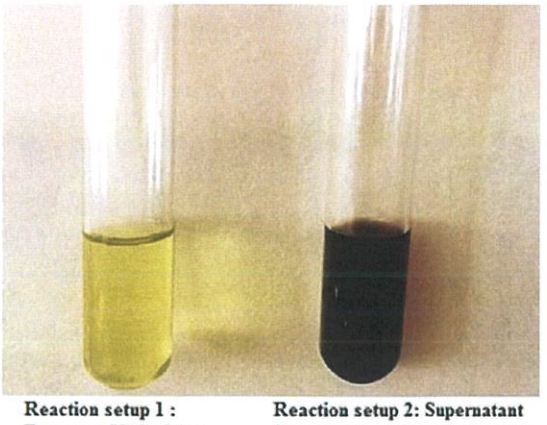
นินไฮดริน (Triketohydrindene Hydrate) ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่แอลฟาอะมิโนของกรดอะมิโนที่พีเอช 4 ถึง 8 ให้สารที่มีสีน้ำเงินม่วงเกิดขึ้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี 2 ขั้นตอนด้วยกัน ขั้นแรกเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและนินไฮดรินเกิดสารประกอบไฮดรินแดนติน (Hydrindantin) อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย ในขั้นที่ 2 แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากขั้นแรกเข้าทำปฏิกิริยากับไฮดรินแดนตินและนินไฮดรินอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดสารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง (Blue-Purple) (รูปที่ 2.10 และ 2.11) (ชัยวัฒน์, 2556)



รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาการทดสอบด้วยวิธีนินไฮดริน

ที่มา : ชัยวัฒน์, 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Reaction setup 1 : Enzyme + Ninhydrin : No colour change seen

Reaction setup 2: Supernatant from enzyme substrate reaction mixture+ Ninhydrin : Colour change to purple

รูปที่ 2.11 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธีนินไฮดริน
ที่มา : Marathe และคณะ, 2018

2.5 การนำไปใช้ประโยชน์

ด้านประสิทธิภาพของกลูโคซามีนต่อโรคข้อเสื่อม พบว่าการศึกษาทางการแพทย์ขนาดใหญ่ส่วนมากเป็นการศึกษาโดยใช้กลูโคซามีนซัลเฟตที่ขึ้นทะเบียนเป็นยาอันตราย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการให้ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้รับกลูโคซามีนซัลเฟตในขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลานาน 3 ปี ช่วยลดอาการปวด และช่วยลดการสึกหรอของข้อเข่าได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (หรือใช้ยาหลอก) แต่การใช้กลูโคซามีนซัลเฟตในระยะสั้น เช่น 3 ถึง 6 เดือน พบว่าผลการศึกษามีทั้งสองแบบ คือ ให้ผลดีในการรักษา และไม่เห็นความแตกต่างในการรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ยา นอกจากนี้การศึกษาในผู้ป่วยข้อสะโพกเสื่อมก็ไม่แสดงประโยชน์เหนือกว่าการไม่ใช้ยาเช่นกัน สำหรับกลูโคซามีนในรูปแบบอื่นนั้น พบว่ามีการศึกษาทางการแพทย์บ้าง จำนวนผู้ป่วยที่ใช้ศึกษาน้อย เช่น การใช้กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งขึ้นทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ให้ประสิทธิภาพในการระงับปวดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้ไม่แตกต่างจากกลูโคซามีนซัลเฟต (ธนรัตน์, 2554)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Benavente และคณะ (2015) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อสกัดไคตินจากเปลือกกุ้งมาผลิตเป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มี 4 ขั้นตอนหลักดังนี้ 1. ย่อยสลายด้วยไฮโดรคลอริก 12 M ด้วยเทคนิคการรีฟลักซ์ 2. กรองสิ่งสกปรกทิ้ง 3. ตกผลึกโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 4. กรอง ล้าง และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สเปกตรัม FTIR ของผลิตภัณฑ์จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ FTIR ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่มีความบริสุทธิ์ 99.86 เปอร์เซ็นต์ ผลพบว่ามีความสอดคล้องระหว่างเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของสเปกตรัมที่ 96.90 เปอร์เซ็นต์ และ 99.66 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ อัตราส่วนของไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริก (กรัมต่อมิลลิลิตร) และการเขย่า (เขย่า-ไม่เขย่า) ในการย่อยสลาย ซึ่งความสัมพันธ์ที่ดีที่สุดในการย่อยสลายผลิตภัณฑ์ คือ ที่อัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1:20 อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และมีการเขย่า ค่าผลผลิตร้อยละที่ได้ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์คือ 42 58 36 และ 48 และมีอัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริก 1:10 1:20 1:30 และ 1:40 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิสูงและมีการเขย่าทำให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายได้ดีขึ้น ผลการทดลองที่ได้พบว่าช่วงที่ทำการศึกษากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มีคุณภาพสูงจะมีอัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1:20

Bruyere และคณะ (2008) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อหาอิทธิพลในการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียมของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่เคยได้รับการรักษาด้วยกลูโคซามีนซัลเฟตหรือการให้ยาหลอกในระยะยาว โดยมีการติดต่อผู้ป่วยที่เคยเข้าร่วมการทดลองแบบให้ยาหลอก (Placebo-Controlled) และการให้กลูโคซามีนซัลเฟต 3 ปี อย่างน้อย 12 เดือน เข้ารับการประเมินเพื่อหาอิทธิพลในการเปลี่ยนข้อเข่าเทียม จากการศึกษาผู้ป่วยผู้ป่วยที่รับการรักษาแบบใช้ยาหลอกต้องเข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมมากกว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยการให้กลูโคซามีนซัลเฟต และจากการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ของ Kaplan Meier/Log–Rank ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยกลูโคซามีนซัลเฟตจะมีการผ่าตัดการเปลี่ยนข้อเข่าเทียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์ทางเภสัชเศรษฐศาสตร์ชี้ให้เห็นว่าผู้ป่วยที่ใช้กลูโคซามีนซัลเฟตในการรักษาจะมีความรุนแรงของอาการน้อยกว่าผู้ป่วยที่ใช้การรักษาด้วยวิธีอื่นๆ

Islam และคณะ (2011) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อเตรียมกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่มีประสิทธิภาพจากไคตินที่สกัดจากเปลือกกุ้งพื้นเมือง ขั้นตอนสำคัญได้แก่การสกัดไคตินออกโครงสร้างภายนอกของกุ้ง แล้วทำการย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จะเกิดปฏิกิริยาผ่านการย่อยสลาย Glycosidic Linkage การวิเคราะห์โครงสร้างจะวิเคราะห์จากจุดหลอมเหลว TLC FT-IR การวิเคราะห์องค์ประกอบและข้อมูลทั้งหมด จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เป็นผลิตภัณฑ์ได้ (C 32.75 ; H 6.51 ; N 6.20) ซึ่งมีความสอดคล้องกับค่าที่คำนวนได้ (C 33.42 ; H 6.54 ; N 6.50) การที่ V_{max} หายไปที่ 1726 ต่อเซนติเมตร บ่งชี้ว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ Deacetylated ของไคติน ส่วนค่าผลผลิตร้อยละจะขึ้นอยู่กับเงื่อนไขของปฏิกิริยาโดยจะได้ค่าผลผลิตร้อยละสูงสุด 63.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายไคตินด้วยไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1.30 ชั่วโมง

Mojarrad และคณะ (2007) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อผลิตของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จากไคตินและตรวจสอบผลกระทบของปัจจัย 3 ประการ (ความเข้มข้นของกรด อัตราส่วนของกรดต่อไคติน และเวลาของการเกิดปฏิกิริยา) Minitab Software ออกแบบ Box-Behnken ขึ้น 12 ปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน และจะทำปฏิกิริยาซ้ำ 2 ครั้ง นำการตอบสนอง Surface Methodology มาใช้ในการเตรียมกลูโคซามีน โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์คือกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่ายในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และ 37 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนสารละลายกรดต่อของแข็งเป็น 9:1 ร้อยละโดยปริมาตรต่อมวล และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนของเวลาและความเข้มข้นของกรดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่าผลผลิตร้อยละ

Reginster และคณะ (2001) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อหาความก้าวหน้าในระยะยาวของการใช้กลูโคซามีนซัลเฟตต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและอาการของโรคข้อเสื่อม ซึ่งจะแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยให้กลุ่มที่ 1 รับกลูโคซามีนซัลเฟต 1,500 มิลลิกรัม และกลุ่มที่ 2 รับยาหลอกวันละครั้ง เป็นเวลา 3 ปี และทำการประเมินผลจากพื้นที่ของช่องว่างในข้อเข่าและเกณฑ์ Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) Osteoarthritis Index ผลจากการศึกษาคือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยใช้ยาหลอกจะมีพื้นที่ช่องว่างของข้อเข่าแคบลง 0.31 มิลลิเมตร แต่ผู้ป่วยที่รักษาด้วยกลูโคซามีนซัลเฟตจะแคบลงเพียง 0.06 มิลลิเมตร ส่วนผลจากเกณฑ์ WOMAC คือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาหลอกจะมีอาการแย่ลงกว่าผู้ป่วยที่รักษาโดยใช้กลูโคซามีนซัลเฟต

Uldry และคณะ (2002) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของ GLUT 1 2 และ 4 ในการขนส่งกลูโคซามีนในเซลล์ไข่ซีโนปัส มีค่า V_{max} ซึ่งต่ำกว่าการขนส่งกลูโคส 3 ถึง 4 เท่า แต่มี K_m ในการขนส่งกลูโคซามีนและกลูโคสของ GLUT1 และ GLUT4 คล้ายคลึงกัน แต่ใน GLUT2 ค่า K_m ของกลูโคซามีนจะมากกว่ากลูโคส การขนส่งกลูโคซามีนโดย GLUT2 ยืนยันได้จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และใช้เซลล์ตับของหนูที่ไม่มี GLUT2 เป็นตัวควบคุมข้อมูลเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับผลกระทบจากกลูโคซามีนที่ทำให้การเมทาบอลิซึมกลูโคสลดลง และการเรียนรู้เกี่ยวกับแบบแผนการทำงานของโปรตีนขนส่งที่ทำหน้าที่จับโมเลกุลน้ำตาล

Wanichpongpan และ Attasat (2016) การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมกลูโคซามีนโดยการย่อยสลายไคโตซานที่สกัดจากเปลือกกุ้งโดยสภาวะที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเอทานอลที่ใช้ในการย่อยสลายเพื่อตกผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ อุณหภูมิกับเวลาของปฏิกิริยาสำหรับการเตรียมกลูโคซามีนซัลเฟต และการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนซัลเฟตโดยแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) และแมสสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Mass Spectrometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

3.1.1 ไคตินจากเปลือกกุ้ง

3.1.2 กรดไฮโดรคลอริก 36 เปอร์เซ็นต์

3.1.3 กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 98 เปอร์เซ็นต์

3.1.4 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

3.1.5 ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver Nitrate)

3.1.6 นินไฮดริน (Ninhydrin)

3.1.7 1-บิวทานอล (1-Butanal)

3.1.8 กรดกลเซียลอะซิติก (Glacial Acetic Acid)

3.1.9 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก แอซิด (DNS)

3.1.10 อาหาร DMEM และ RPMI รูปแบบผง

3.1.11 ซีรัม (Fetal Bovine Serum, FBS) ต้องทำการ inactivate โดยการแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.1.12 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium Bicarbonate)

3.1.13 Gentamicin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.14 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.1.15 Trypsin/EDTA 0.25 เปอร์เซ็นต์

3.1.16 Phosphate Buffersaline (without Ca^{2+} ion and Mg^{2+})

3.1.17 Pluronic® F-68 10 เปอร์เซ็นต์

3.1.18 ทริปแพนบลู 0.4 เปอร์เซ็นต์

3.1.19 สารละลายเบเนดิกต์

3.1.20 น้ำกลั่น

3.1.21 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)

3.1.22 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride)

3.1.23 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride)

3.1.21 แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซาไฮเดรต (Magnesium Chloride Hexahydrate)

3.1.25 HEPES

3.1.26 BSA (Bovine Serum Albumin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.27 โซเดียมซัลเฟต (Sodium Sulfate)

3.1.28 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate)

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.2.1 ขวดดูแรน 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.2 กระบอกตวง

3.2.3 หลอดหยด (Dropper)

3.2.4 ปิเปตต์แก้ว

3.2.5 ลูกยาง

3.2.6 บีกเกอร์

3.2.7 เครื่องชั่งสาร

3.2.8 ตู้ดูดควัน (Hood)

3.2.9 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.10 หลอดทดลอง

3.2.11 แร็คใส่หลอดทดลอง

3.2.12 ไมโครปิเปตต์

3.2.13 ทิป

3.2.14 ช้อนตักสาร

3.2.15 แท่งแก้ว

3.2.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

3.2.17 ชุดเครื่องกรอง

3.2.18 กระดาษกรองเบอร์ 1

3.2.19 ชุดทดลอง TLC

3.2.20 แผ่น TLC

3.2.21 ไดร์เป่าลมร้อน

3.2.22 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.2.23 คิวเวทท์ (Cuvette)

3.2.34 กระบอกน้ำกลั่น

3.2.25 ขวดเพาะเลี้ยงที่มีพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร

3.2.26 ขวด Spinner Flask ที่ปราศจากเชื้อขนาด 100 หรือ 125 มิลลิลิตร

3.2.27 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Pipette Boy)

3.2.28 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)

3.2.29 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.30 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound

3.2.31 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (Laminar Air Flow)

3.2.32 ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์5 เปอร์เซ็นต์ (Incubator)

3.2.33 หลอดสำหรับปั่นแยกสาร 1.5 มิลลิลิตร

3.2.34 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) + แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Stirrer Bar)

3.2.35 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)

3.2.36 เครื่องเซนติฟิวก์ (Centrifuge)

3.2.37 หลอดไมโครเซนติฟิวก์

3.2.38 แร็คใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์

3.2.98 Membrane Filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3.2.40 ไซริงค์ (Syringe)

3.2.41 ขวดใส่สาร (Vial)

3.2.42 กระดาษชำระ

3.3 การผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จากเปลือกกุ้ง

3.3.1 การย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยเทคนิคการรีฟลักซ์ (Acid Hydrolysis)

ในขั้นตอนการย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริก ทำโดยการนำไคติน 8 กรัม และกรดไฮโดรคลอริก 36 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน 1:15 (ดัดแปลงจาก Mojarrad และคณะ, 2007) บรรจุลงในขวดใส่สารเคมีขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปรีฟลักซ์โดยการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง รอให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องหรือทำการหล่อเย็น และกรองตะกอนออกจากสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

3.3.2 การตกผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (Recrystallization)

เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ลงในสารละลายที่ได้จากการกรองในข้อ 3.3.1 ปริมาตร 3 เท่า และเก็บสารผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มอัตราการตกผลึก จากนั้นทำการกรองผลึกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และล้างผลึกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง นำผลึกที่ล้างแล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนผลึกแห้ง (ดัดแปลงจาก Benavente และคณะ, 2015) จากนั้นคำนวณหาค่าผลผลิตร้อยละ (ภาคผนวก ง ข้อ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อผลิตกลูโคซามีนจากไคตินของเปลือกกุ้งได้แล้ว จะต้องทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลว่าเป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์โดย การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test) การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method) และการไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method)

3.4 การทดสอบเพื่อยืนยันผลกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

3.4.1 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test)

ขั้นตอนการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ ทำโดยการตักผงไคติน ไคโตซาน กลูโคส และกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้มาในปริมาณเท่าๆ กัน และใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด โดยในหลอดควบคุมจะใส่น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นเติมสารละลายเบเนดิกต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น หากผลเป็นบวกจะเปลี่ยนจากสารละลายสีฟ้าเป็นตะกอนสีแดงอิฐ ซึ่งเกิดจากน้ำตาลถูกออกซิไดซ์ (Oxidized) ด้วยสารละลายเบเนดิกต์ทำให้เกิดตะกอนคิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) โดยน้ำตาลที่สามารถถูกออกซิไดซ์ด้วยสารละลายเบเนดิกต์จะเรียกว่า น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar)

3.4.2 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method)

เตรียมสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิก (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก ข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบตามเวลาให้ทำการหล่อเย็นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก อารี, 2559) คำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยการแทนค่าการดูดกลืนแสงในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ ค-1) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ (ภาคผนวก ง ข้อ 2) ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method)

ตักผงกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ เติมน้ำเล็กน้อยผสมให้เข้ากันและเติมซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 1 หยด จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการทดสอบกับซิลเวอร์ไนเตรตเป็นการทดสอบว่ากลูโคซามีนที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้อยู่ในรูปแบบของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จริงหรือไม่ โดยซิลเวอร์ไอออนจะไปจับกับคลอไรด์ไอออน ถ้าให้ผลเป็นบวกจะเกิดตะกอนสีขาวของซิลเวอร์คลอไรด์

เมื่อทำการยืนยันผลว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้เป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์แล้ว จึงทำการหาความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ด้วย การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC) และการทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

3.5 การหาความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

3.5.1 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC)

เตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการสปอทตัวอย่างลงบนแผ่น TLC 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งสนิท และแยกตัวอย่างในระบบด้วยตัวทำละลาย 1-บิวทานอล (1-Butanal) : กรดเกลเซียลอะซิติก (Glacial Acetic Acid) : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แผ่น TLC แห้งสนิท เตรียมน้ำยานินไฮดริน (Ninhydrin) โดยผสมนินไฮดริน 0.06 กรัม เข้ากับ 1-บิวทานอล 20 มิลลิลิตร และกรดเกลเซียลอะซิติก 0.6 มิลลิลิตร บรรจุสารผสมในขวดสเปรย์แก้ว จากนั้นสเปรย์น้ำยานินไฮดรินลงบนแผ่น TLC ให้ชุ่ม และเป่าด้วยลมร้อนอุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส (Mojarrad และคณะ, 2007) จนปรากฏจุดสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นวัดระยะทางที่สารเดินทางจากจุดตั้งต้นและคำนวณหา Rf (Rate of flow) (ภาคผนวก ง ข้อ 3) ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ โดยการทดสอบด้วยวิธี TLC เป็นการทดสอบเพื่อพิสูจน์ถึงการมีอยู่ของสารตัวอย่างโดยเทียบกับสารมาตรฐาน

3.5.2 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะใช้คอลัมน์ ACE 5 C_{18} PFP โดยตัวชะที่ใช้คือ อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ตรวจพบด้วย UV-Vis Abs. ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทดสอบกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลูซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตฐานที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการทดสอบด้วยวิธี HPLC เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารตัวอย่างโดยเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งจะเกิดพีคขึ้นในเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time)

เมื่อทำการหาความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือทำการทดสอบว่าเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ในปฏิกิริยาได้เป็นเวลานานเท่าไหร่ และเซลล์สามารถนำเข้ากลูโคซามีนได้ในช่วงเวลาดังกล่าวหรือไม่ จึงเป็นที่มาของการทดลองเริ่มต้นโดยการหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิต และการหา Saturation Curve โดยสามารถทำได้ดังวิธีต่อไปนี้

3.6 ทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

3.6.1 การเตรียมเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ให้เป็นเซลล์แขวนลอย

ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด (วิธีการเตรียมอาหาร RPMI 1640 ศึกษาได้จากภาคผนวก ข ข้อ 2 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ศึกษาได้จากภาคผนวก ข ข้อ 3) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 120 g เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร DMEM ที่ไม่มีกลูโคส ทำการปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเติมอาหาร DMEM ไม่มีกลูโคสที่ผสมกรดแลคติก 0.01 โมลาร์และทำการกระจายเซลล์ จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาให้ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์และส่วนใส เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย Kreb-Ringer Buffer (วิธีการเตรียม ภาคผนวก ก ข้อ 2) 1 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิมให้ปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร (Uldry และคณะ, 2002) ทำการนับเซลล์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (ภาคผนวก ง ข้อ 4 และข้อ 5)

3.6.2 เตรียมตัวอย่างกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน กลูโคซามีนไฮโดคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต

โดยเตรียมตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 2 มิลลิลิตร และ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 ความเข้มข้นละ 4 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมตัวอย่างกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต แต่ละรูปแบบที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 4 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 6) (Mojarrad และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 การหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์และ Saturation Curve

นำกลูโคซามีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จากข้อ 3.6.2 ไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตต์กลูโคซามีนมาตรฐานปริมาตร 2,300 ไมโครลิตร และเซลล์แขวนลอยจากข้อ 3.6.1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดทดลองขวดใหม่ เขย่าเบาๆ ตลอดเวลาเพื่อไม่ให้เซลล์ตกตะกอน ปิเปตต์สารผสม 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เพื่อนับเซลล์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) สำหรับหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (ภาคผนวก ง ข้อ 6) และ 550 ไมโครลิตรสำหรับหา Saturation Curve ออกมาทุกๆ 10 นาที และนำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์และเก็บน้ำกรองใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ จากนั้นวัดความเข้มข้นของกลูโคซามีนมาตรฐานที่นำเข้าเซลล์ด้วยวิธีนินไฮดริน (ดัดแปลงจาก Wu และคณะ 2005) ปิเปตต์น้ำกรอง 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร นินไฮดรินเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 2,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบตามเวลาทำการหล่อเย็นและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานที่นำเข้าเซลล์โดยการแทนค่าการดูดกลืนแสงในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ ค-2)

3.7 การหาค่าจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

ปิเปตต์ตัวอย่างกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ จากข้อ 3.6.2 มา 506 ไมโครลิตร ใส่ในขวดทดลอง แยกตัวอย่างกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบและความเข้มข้น จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยจากข้อ 3.6.1 ปริมาตร 44 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละขวดทั้งหมด 16 ขวด เขย่าเบาๆ ตลอดเวลาเพื่อไม่ให้เซลล์ตกตะกอน เมื่อครบ 30 นาที ปิเปตต์สารผสม 550 ไมโครลิตรออกมา นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์และเก็บน้ำกรองใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ วัดความเข้มข้นกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบที่นำเข้าเซลล์ด้วยวิธีนินไฮดริน (ดัดแปลงจาก Wu และคณะ, 2005) โดยปิเปตต์น้ำกรอง 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร นินไฮดรินเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 2,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบตามเวลาทำการหล่อเย็นและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบที่นำเข้าเซลล์ และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบที่นำเข้าเซลล์กับเวลาเพื่อนำค่าความชันที่ได้จากกราฟมาสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟ Lineweaver-Burk ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/อัตราเร็ว และ 1/ความเข้มข้นกลูโคซามีน และคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากจุดตัดแกน x และ y ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

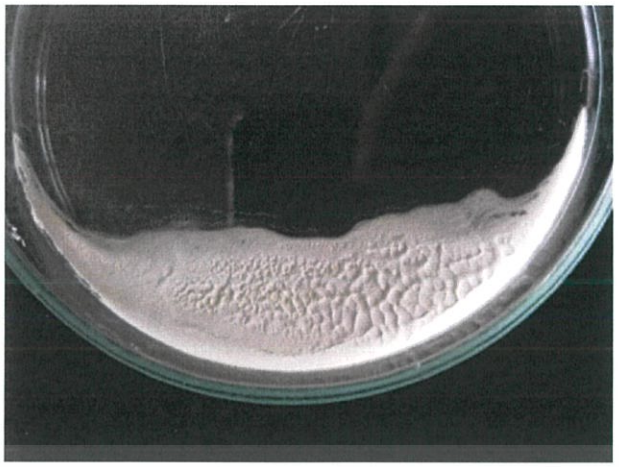
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเลมีปริมาณมาก โดยเฉพาะเปลือกกุ้งและหัวกุ้งคิดเป็น 45 ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดควรนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเลเหล่านี้มาเพิ่มมูลค่า โดยเลือกใช้ต้นทุนที่ต่ำแต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น เช่น ไคติน ไคโตซาน และกลูโคซามีน ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ทำการผลิตกลูโคซามีนขึ้นมา 3 รูปแบบ คือ กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (Glucosamine Hydrochloride : GlnHCl) กลูโคซามีนซัลเฟต (Glucosamine Sulfate : $GlnSO_4$) และกลูโคซามีนฟอสเฟต (Glucosamine Phosphate : $GlnPO_4$) ด้วยไคตินจากเปลืองกุ้ง ซึ่งกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์สามารถผลิตได้โดยการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยใช้เทคนิคการรีฟลักซ์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย Glycosidic Linkage และ N-Acetyl Linkage ได้เป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ และเปลี่ยนกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ให้เป็นกลูโคซามีนซัลเฟตและกลูโคซามีนฟอสเฟต จากนั้นเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

4.1 การผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จากเปลือกกุ้ง

การผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์จากเปลือกกุ้ง ทำโดยการย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยเทคนิครีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีม่วงอมเทา จากนั้นกรองเพื่อแยกเศษไคตินออก และทำการตกผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ด้วยการเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์และเก็บสารผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มอัตราการตกผลึก เมื่อครบ 24 ชั่วโมงทำการกรองและล้างผลึกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำผลึกที่ล้างไปอบแห้ง จากการทดลองกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะเป็นผลึกสีม่วงอมเทาและมีผลผลิตร้อยละเท่ากับ 31.16 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

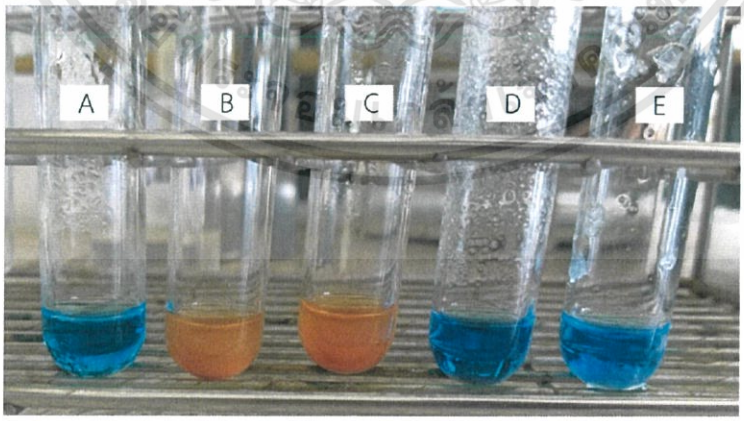


รูปที่ 4.1 ผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินจากเปลือกกุ้งด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยเทคนิคการรีฟลักซ์

4.2 การทดสอบเพื่อยืนยันผลกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

4.2.1 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test)

จากการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ โดยการตักผงไคติน ไคโตซาน กลูโคส และกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ปริมาณเท่าๆ กันใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด โดยในหลอดควบคุมจะใส่น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นเติมสารละลายเบเนดิกต์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย และนำไปต้มในน้ำเดือด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ น้ำกลั่น (หลอดควบคุม) (A) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (B) กลูโคส (C) ไคโตซาน (D) และไคติน (E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

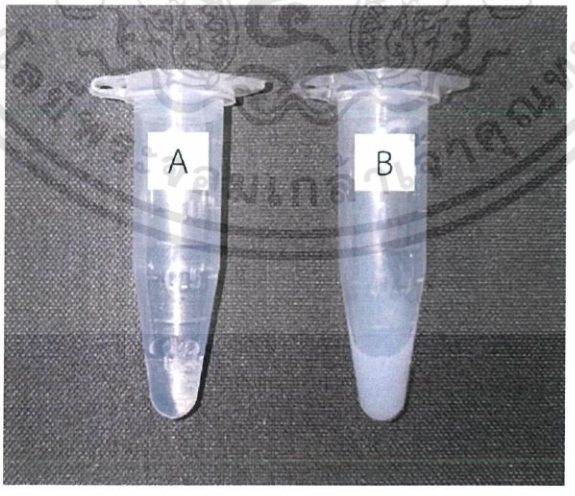
จากการทดลอง หลอด B ซึ่งเป็นหลอดของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้และหลอด C ซึ่งเป็นหลอดของกลูโคส เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายสีฟ้าเป็นตะกอนสีแดงอิฐแสดงให้เห็นว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar)

4.2.2 การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic Acid : DNS Method)

จากการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ได้ผลิตจากการศึกษาครั้งนี้ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรได้เท่ากับ 0.086 เมื่อนำมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ ค-1) y = 0.4262x สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคซามีนได้เท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นในการเตรียมสารและสามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 100 %

4.2.3 การไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method)

ตักผงกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ เติมน้ำเล็กน้อยผสมให้เข้ากันและเติมซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 โมลาร์ โดยในหลอดควบคุมจะใส่น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลการไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรตใน น้ำกลั่น (หลอดควบคุม) (A) และ สารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์เกิดตะกอนสีขาวของซิลเวอร์คลอไรด์และสารละลายขุ่น แสดงให้เห็นว่ามีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบในสารตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

4.3 การหาความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

4.3.1 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chormatography : TLC)

ทำการสปอทตัวอย่างลกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนแผ่น TLC ทิ้งให้แห้ง และแยกตัวอย่างในระบบด้วยตัวทำละลาย ทิ้งให้แห้ง จากนั้นสเปรย์น้ำยานินไฮดรินลงบนแผ่น TLC และเป่าด้วยลมร้อนอุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส จนปรากฏจุดสีน้ำตาลเข้ม ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4

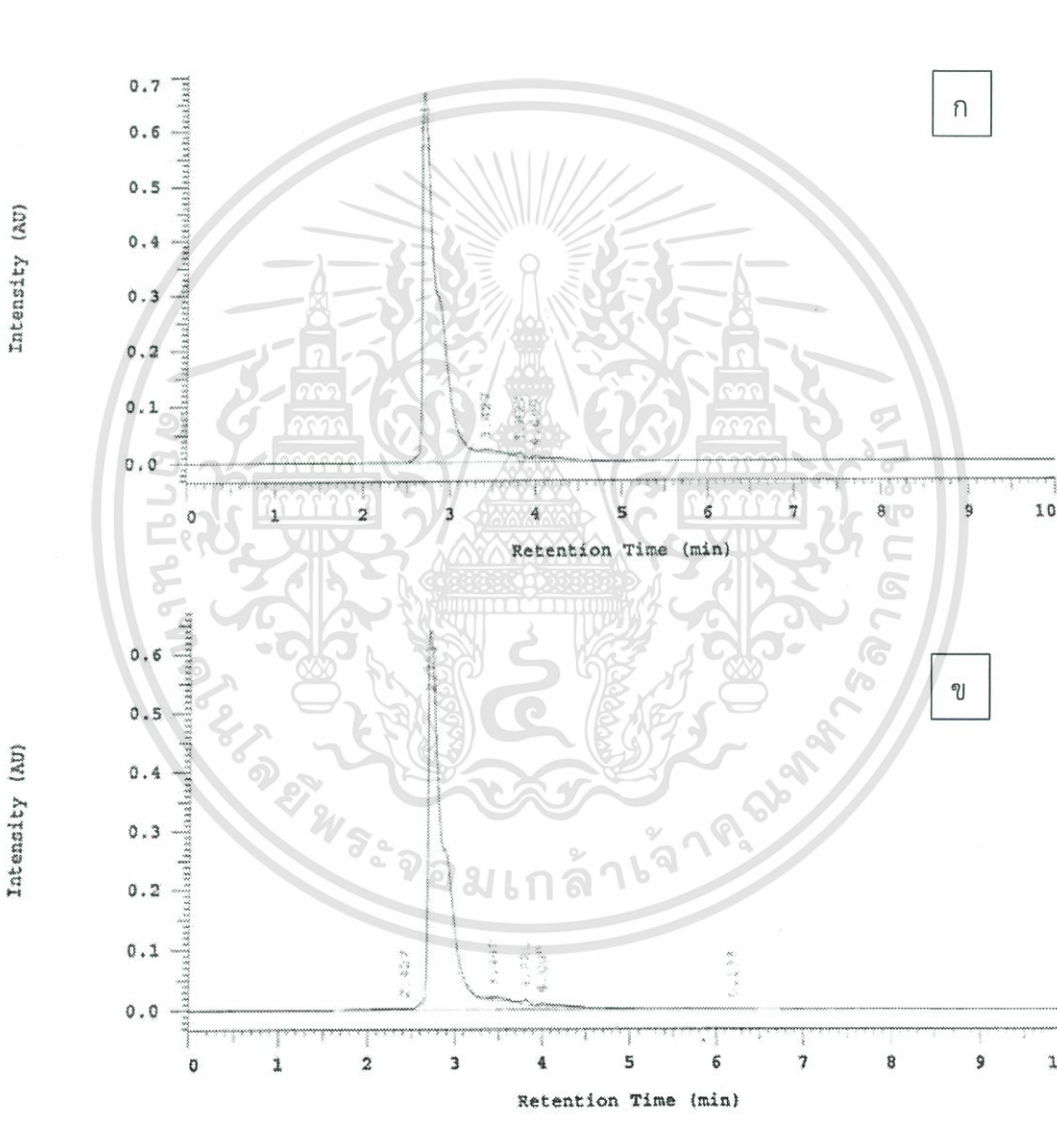
รูปที่ 4.4 ผลการแยกและติดตามด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (A) กลูโคส (B) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้ในการศึกษาครั้งนี้ (C) และไคโตซาน (D)

จากการทดลองมีจุดสีน้ำตาลเข้มปรากฏบนแผ่น TLC ของสารตัวอย่าง 3 ชนิด คือ บริเวณ A กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน บริเวณ C กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ และบริเวณ D ไคโตซาน จากนั้นทำการวัดระยะทางเพื่อคำนวณหาค่า Rf โดยค่า Rf ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 0.4 ซึ่งตรงกับทฤษฎี (Mojarrad และคณะ, 2007) โดยบริเวณ D ไคโตซานเกิดสีเล็กน้อยเนื่องมาจากในขั้นตอนการผลิตไคโตซานสามารถเกิดโมโนเมอร์ของกลูโคซามีนได้บางส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

การทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะใช้คอลัมน์ ACE 5 C_{18} PFP โดยตัวชะที่ใช้คือ อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ตรวจพบด้วย UV-Vis Abs. ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทดสอบกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลูซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟ HPLC กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (ก) และกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษานี้ (ข) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานและกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้ในการศึกษาครั้งนี้เกิดพีคขึ้นในเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่เวลาเดียวกัน (Retention Time) แสดงว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้และกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานเป็นสารชนิดเดียวกัน

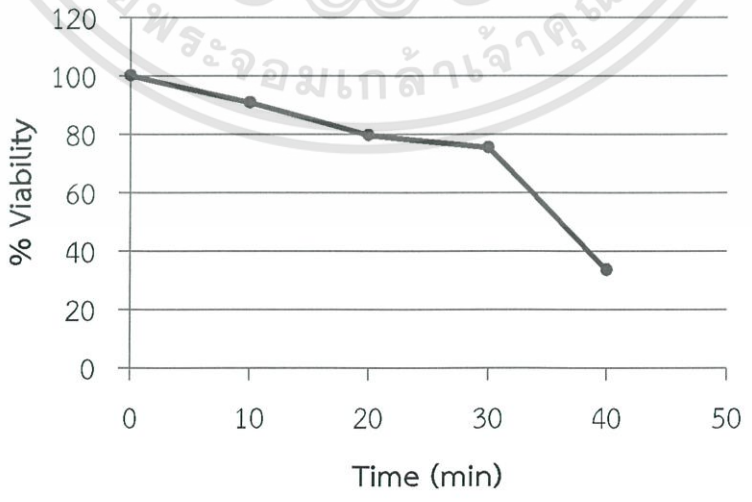
4.4 การทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

4.4.1 เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต

ศึกษาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิต โดยการปิเปตต์ตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ผสมกับเซลล์แขวนลอยที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 7.16×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารผสมระหว่างเซลล์แขวนลอยและตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร ออกมาทุกๆ 10 นาที เพื่อนับเซลล์สำหรับหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 และสามารถแสดงในรูปแบบกราฟได้ดังรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลเวลา จำนวนเซลล์มีชีวิต และเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต

Time (min)	Viability (cell/ml)	% Viability
0	7.16×10^5	100
10	6.5×10^5	90.78
20	5.7×10^5	79.61
30	5.4×10^5	75.42
40	2.4×10^5	33.52



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตที่เหลืออยู่เมื่อบ่มใน Assay Reaction ภายใน 40 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตพบว่าเซลล์มีการลดลงเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น จึงเลือกใช้เวลาที่ 30 นาที ในการทดลองติดตามค่าจลนพลศาสตร์ต่อไป เนื่องจากเวลาในช่วง 0 ถึง 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตเหลือ 75.42 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 30 นาที แต่เวลาที่ 40 นาที มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตลดลงเหลือ 33.52 เปอร์เซ็นต์ซึ่งลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งจึงไม่เลือกใช้

4.4.2 Saturation Curve

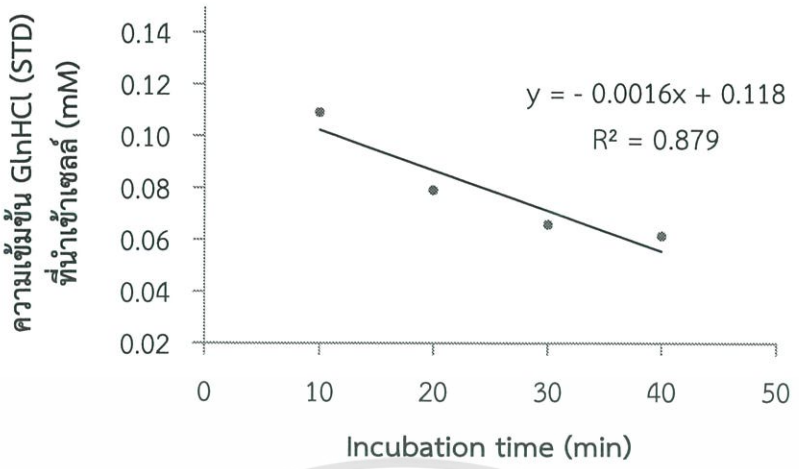
ศึกษา Saturation Curve โดยการปิเปตต์ตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ผสมกับเซลล์แขวนลอย จากนั้นปิเปตต์สารผสมระหว่างเซลล์แขวนลอยและตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐาน 550 ไมโครลิตร ออกมาทุกๆ 10 นาที นำมากรองผ่านเมมเบรนเพื่อหยุดปฏิกิริยาการนำกลูโคซามีนมาตรฐานเข้าเซลล์และเก็บน้ำกรอง เพื่อทำการวัดความเข้มข้นกลูโคซามีนมาตรฐานที่นำเข้าเซลล์ด้วยวิธีนินไฮดริน และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

และคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน ซึ่งคำนวณได้จากการแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงจากความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในสมการเส้นตรง $y = 4.0935x$ จากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ ค-2) ผลที่คำนวณแสดงดังตารางที่ 4.2 และสามารถแสดงในรูปแบบกราฟได้ดังรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลเวลา ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานที่นำเข้าเซลล์

Time (min)	A_{570}	ความเข้มข้น GlnHCl (STD) ที่นำเข้าเซลล์ (mM)
10	0.447	0.11
20	0.324	0.08
30	0.270	0.07
40	0.252	0.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟ Saturation Curve ของเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

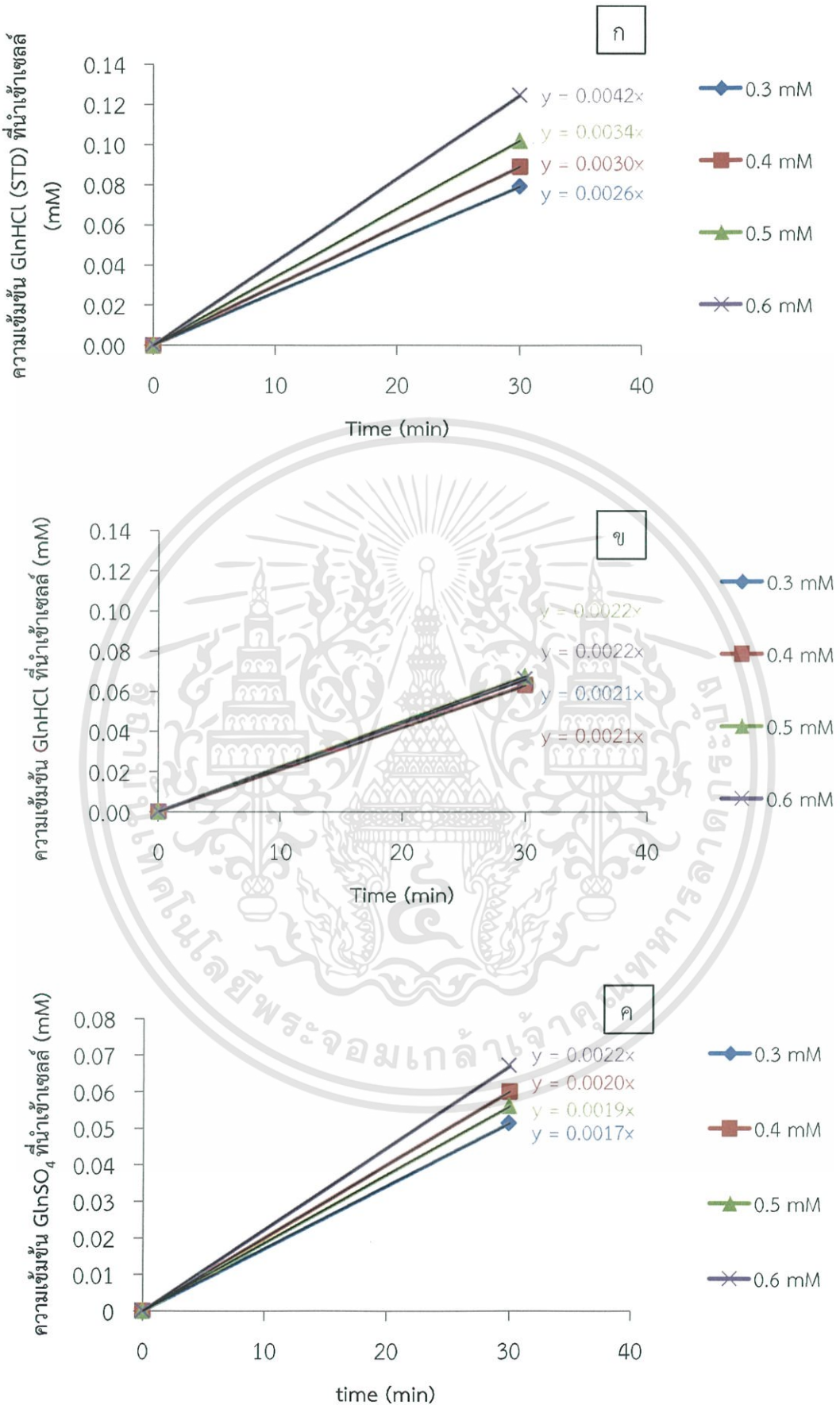
จากการทดลองหา Saturation Curve สังเกตได้ว่าค่าความเข้มข้นของกลูโคซามีนมาตรฐานที่นำเข้าเซลล์ลดลงเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 มีการนำกลูโคซามีนมาตรฐานเข้าเซลล์ได้จริง

4.5 การหาค่าจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

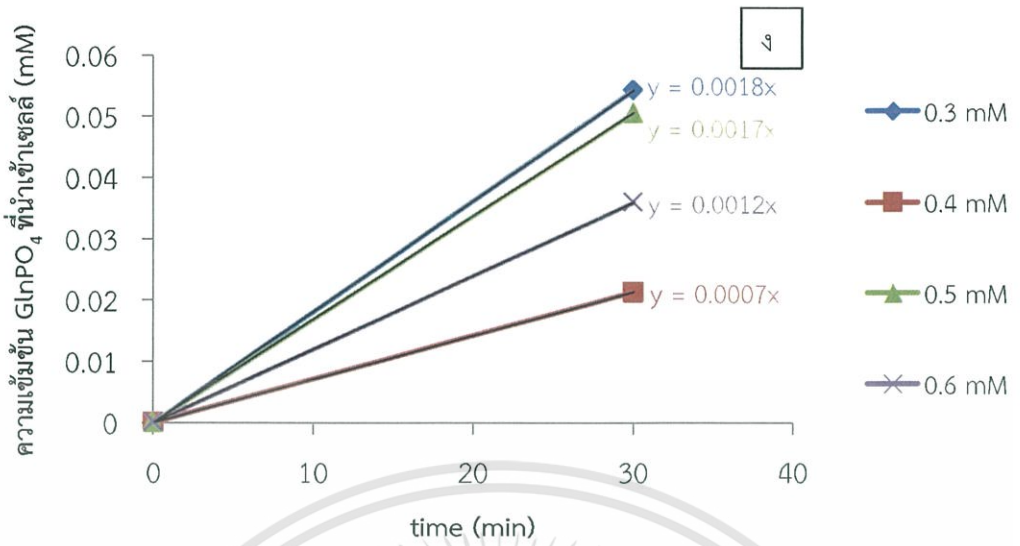
4.5.1 การวัดอัตราเร็วในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

ปิเปตต์ตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐาน กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ จากข้อ 3.6.2 ผสมกับเซลล์แขวนลอย เมื่อครบ 30 นาที ปิเปตต์สารผสมระหว่างเซลล์แขวนลอยและตัวอย่างกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบออกมา 550 ไมโครลิตรทุกๆ 10 นาที นำมากรองผ่านเมมเบรน เพื่อหยุดปฏิกิริยาการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์และทำการวัดความเข้มข้นกลูโคมีนแต่ละรูปแบบที่นำเข้าเซลล์ด้วยวิธีนินไฮดริน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (ข้อมูลตารางแสดงดังภาคผนวก จ) และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคมีนที่นำเข้าเซลล์กับเวลา ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



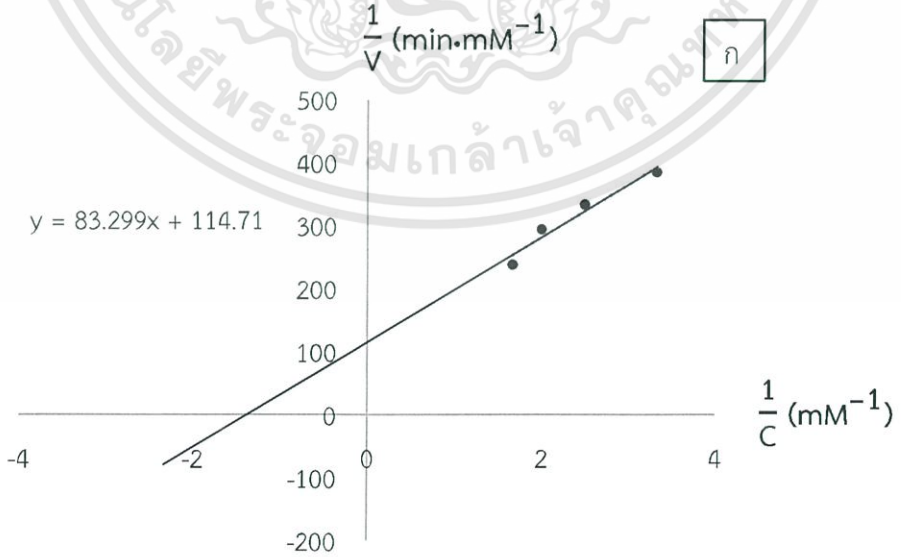
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



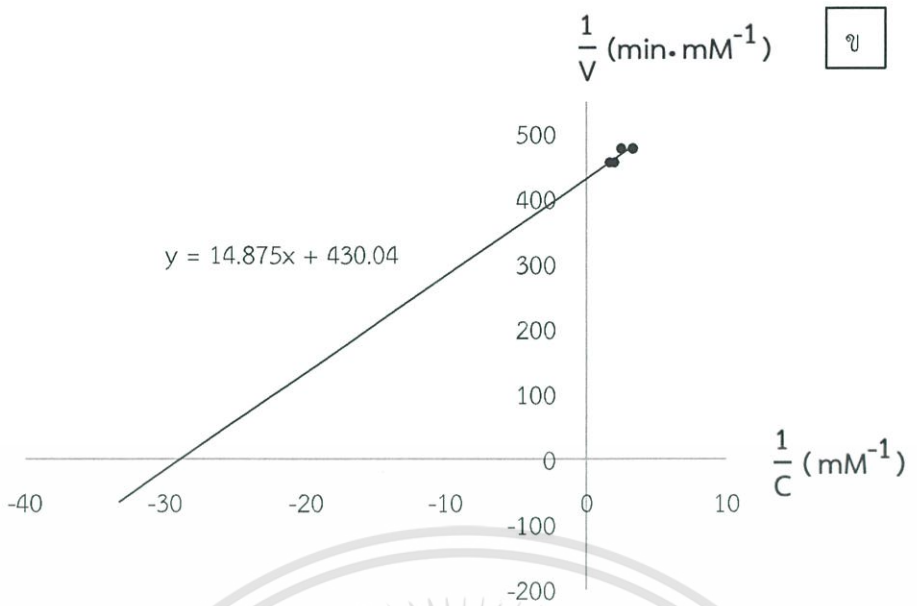
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคซามีนที่นำเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 กับเวลา กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (ก) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ข) กลูโคซามีนซัลเฟต (ค) กลูโคซามีนฟอสเฟต (ง)

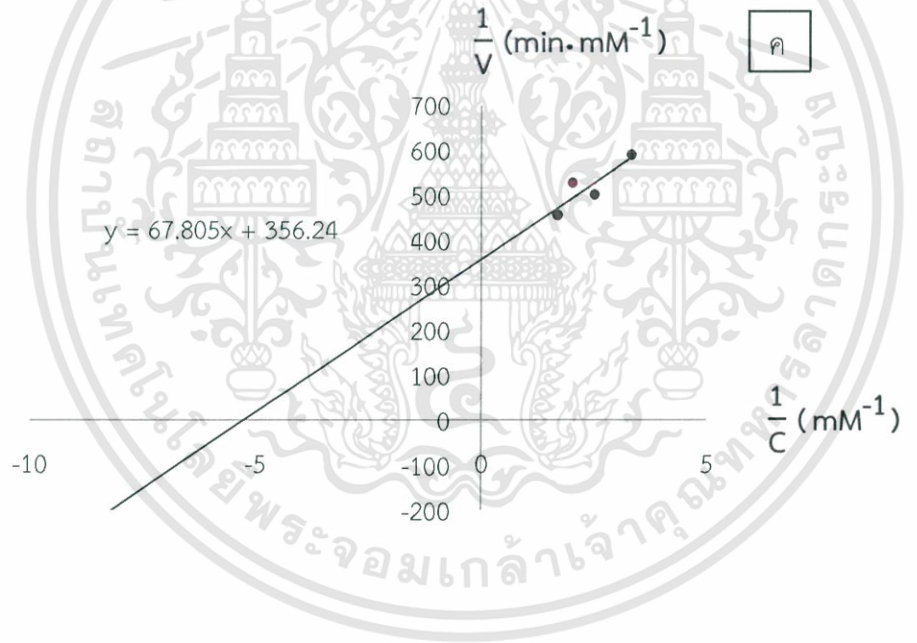
4.5.2 การติดตามหาค่าจลนพลศาสตร์

นำค่าความชันของกลูโคซามีนแต่รูปแบบมาคำนวณหาค่า 1/อัตราเร็ว และ 1/ความเข้มข้นกลูโคซามีน เพื่อสร้างกราฟ Lineweaver-Burk ผลการคำนวณแสดงดังรูปที่ 4.9

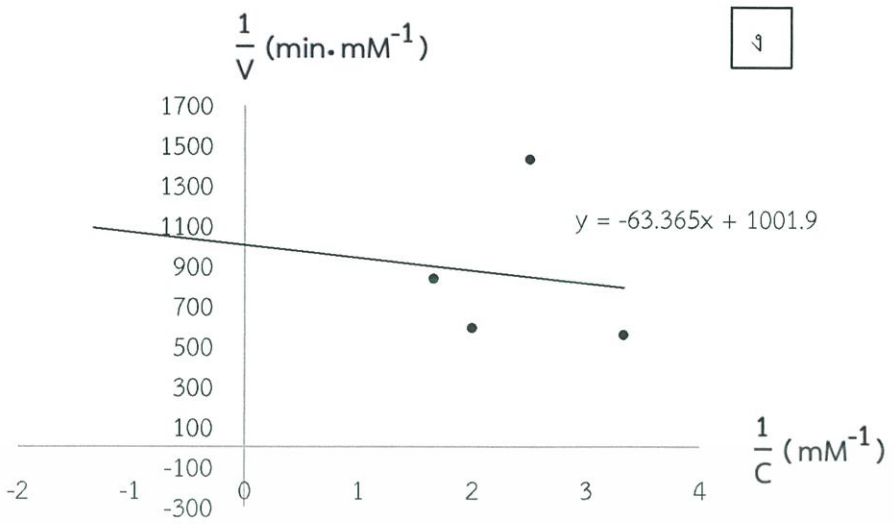


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 กราฟ Lineweaver-Burk กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน (ก) กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ข) กลูโคซามีนซัลเฟต (ค) กลูโคซามีนฟอสเฟต (ง)

จากนั้นคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากจุดตัดแกน x และ y ตามลำดับ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าจลพลศาสตร์กลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ

รูปแบบ Gln	K_m (mM)	V_{max} (nmol/10^5 cell/min)
GlnHCl (STD)	0.726	9.48
GlnHCl	0.035	2.53
$GlnSO_4$	0.186	2.98
$GlnPO_4$	n/a	n/a

* หมายเหตุ n/a คือ not available (ไม่สามารถตรวจวัดได้)

จากการทดลองการหาจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ค่า K_m ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานที่ได้คือ 0.726 มิลลิโมลาร์ ค่า V_{max} เท่ากับ 9.48 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที ซึ่งตามทฤษฎีค่า K_m ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์เท่ากับ 0.8 ± 0.1 มิลลิโมลาร์ (Uldry และคณะ, 2002) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 สามารถนำเข้ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานได้ใกล้เคียงกับทฤษฎี กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้มีค่า K_m เท่ากับ 0.035 มิลลิโมลาร์ ค่า V_{max} เท่ากับ 2.53 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที และกลูโคซามีนซัลเฟตมีค่า K_m เท่ากับ 0.186 มิลลิโมลาร์ ค่า V_{max} เท่ากับ 2.98 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที ซึ่งกลูโคซามีนซัลเฟตมีค่า K_m น้อยกว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถนำเข้ากลูโคซามีนซัลเฟตได้ดีกว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ แต่ค่า K_m ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้และค่า K_m ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานมีความแตกต่างกันมาก เนื่องมาจากความบริสุทธิ์ในการผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจมีโครงสร้างอื่นๆ จากเปลือกกุ้งปะปนมาในขั้นตอนการรีฟลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองการผลิตกลูซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูซามีนซัลเฟต และกลูซามีนฟอสเฟต เพื่อเปลี่ยนวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเลให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น โดยใช้ต้นทุนต่ำในการผลิตกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์โดยการย่อยสลายด้วยเทคนิคการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทำการเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มอัตราการตกผลึก สามารถคำนวณหาผลผลิตร้อยละได้เท่ากับ 31.16 เปอร์เซ็นต์

โดยผลึกกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์สามารถทำการทดสอบเพื่อยืนยันได้ด้วย การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's Test) วิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (DNS Method) และการไทเทรตโดยปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Argentometric Method)

ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ โดยทำการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) จากการทดลองมีจุดสีน้ำตาลเข้มปรากฏบนแผ่น TLC ของสารตัวอย่าง 3 บริเวณ คือ กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ และไคโตซาน และทำการทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานและกลูโคซามีนไฮโรคลอไรด์ที่ผลิตได้เกิดพีคขึ้นในเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่เวลาเดียวกัน

ผลการทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 โดยการหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นของกลูโคซามีนมาตรฐาน 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0 ถึง 40 นาที พบว่าที่เวลา 0 นาทีมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต 90.78 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 20 นาที มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต 79.61 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต 75.42 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 40 นาที มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต 33.52 เปอร์เซ็นต์ และทำการหา Saturation curve ที่ความเข้มข้นของกลูโคซามีนมาตรฐาน 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 10 ถึง 40 นาที ผลการทดลองพบว่าที่เวลา 10 นาที มีความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานเท่ากับ 0.11 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 20 นาที มีความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 30 นาที มีความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานเท่ากับ 0.07 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 40 นาที มีความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานเท่ากับ 0.06 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเปลี่ยนกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ให้เป็นกลูซามีนซัลเฟต และกลูซามีนฟอสเฟต เพื่อทำการทดสอบการติดตามค่าจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 โดยการวัดอัตราเร็วในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ที่ความเข้มข้นกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 30 นาที เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรต่อเวลา และการติดตามหาค่าจลนพลศาสตร์ เพื่อสร้างกราฟ Lineweaver-Burk ของกลูโคซามีนแต่ละชนิด จากนั้นนำมาคำนวณผลเพื่อหาค่าจลนพลศาสตร์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานมีค่า K_m เท่ากับ 0.726 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 9.48 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มีค่า K_m เท่ากับ 0.035 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 2.53 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที กลูโคซามีนซัลเฟตมีค่า K_m เท่ากับ 0.186 มิลลิโมลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 2.98 นาโนโมล/10^5 เซลล์/นาที

5.2 ข้อเสนอแนะ

ค้นคว้าวิธีการทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นในขั้นตอนของการย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ด้วยเทคนิคการรีฟลักซ์ โดยอาจจะลดพิษของไฮโดรคลอริกลงและเปลี่ยนไปใช้ระบบเอนไซม์แทน อาจทดลองเปลี่ยนจากไคตินของเปลือกกุ้งเป็นไคตินจากเปลือกปูหรือแกนหมึกเนื่องจากเป็นไคติน หาเทคนิคการกำจัดสีของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลึกสีขาวเหมือนกลูโคซามีนมาตรฐาน ทดลองนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้กับเซลล์ชนิดอื่นที่เหมาะสมเช่นเซลล์มะเร็งลำไส้เล็กหรือเซลล์ลำไส้เล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุลวัชร์ คงแท่น, บดินทร์ เนียมนคร และ วีรพันธุ์ ไม้แก้ว. 2556 การผลิตกลูโคสจากเส้นใยมะพร้าวโดยกระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชัชนันท์ นิวาสวงษ์ และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลซิกเอทานอลในประเทศไทย. ขอนแก่น : วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์. 2556. กรดอะมิโนและโปรตีน 1. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/01402312lab04aminoprotein1156.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 พ.ค. 62.

ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์. 2556. คาร์โบไฮเดรต. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/01402312lab03carbo156.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 พ.ค. 62.

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. 2552. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : https://home.kku.ac.th/chuare/12/coverandtable.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 11 พ.ค. 62.

ธนรัตน์ สรวลเสน่ห์. 2554. ไขข้อข้องใจเกี่ยวกับกลูโคซามีในโรคข้อเสื่อม. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/glucosamine. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 พ.ค. 62.

เบญจา ชุตินทราศรี. 2551. ปฏิบัติการเทคโนโลยีส่วนผสมอาหารสังเคราะห์ (Synthetic Food Ingredients Technology Laboratory) (FY473). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

มนตรี จุฬาวัฒนทล. 2530. การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/6160/9/Chapter2.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 พ.ค. 62.

วิมลมาศ โพธิ์รัศมี. 2555. การวิเคราะห์หมึกสีดำจากปากกาลูกลื่นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟีและการวิเคราะห์ภาพ. นิติวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร์. 2554. ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์สำหรับวิศวกรรมเคมี. กรุงเทพฯ : วี.เจ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิริมา แก้วนุช. 2554. การสกัดสมุนไพรโดยวิธี REFLUX (การสกัดแบบไหลย้อนกลับ). [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : https://www.gotoknow.org/posts/457805.com. เข้าถึงเมื่อวันที่ 14 พ.ค. 62.

สุรชัย รัตนสุข, จตุพร หงส์ทองคำ, สุฑารัตน์ คนขยัน, กฤษณา คุ้มศรีไวย์ และพิจิตร สุ่มมาตร. 2557. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสเพื่อใช้สำหรับการพัฒนาการผลิตพรีไบโอติก. มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2559. ปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์. โครงการตำรา. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2559. ปฏิบัติการวิชากระบวนการหมักในอุตสาหกรรม (Industrial Fermentation Process). โครงการตำรา. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2555. การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal Cell Culture). โครงการตำรา. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Benavente M., Arias S., Moreno L. and Martínez J. 2015. Production of Glucosamine Hydrochloride from Crustacean Shell. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3 : 20-26.

Bruyere O., Pavelka K., Rovati L.C., Gatterova J., Giacovelli G., Olejarova M., Deroisy R. and Reginster J.Y. 2008. Total Joint Replacement After Glucosamine Sulphate Treatment in Knee Osteoarthritis: Results of A Mean 8-Year Observation of Patients from Two Previous 3-Year, Randomised, Placebo-Controlled Trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16 : 254–260.

Islam M.M., Masum S.M., Rahman M.M. and Shaikh A.A. 2011. Preparation of Glucosamine Hydrochloride from Indigenous Shrimp Processing Waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 46(3) : 375-378.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marathe S.K., Vashistht M.A., Prashanth A., Parveen N., Chakraborty S. and Nair S.S. 2017. Isolation, Partial Purification, Biochemical Characterization and Detergent Compatibility of Alkaline Protease Produced by *Bacillus subtilis, Alcaligenes faecalis and Pseudomonas aeruginosa* Obtained from Sea Water Samples " *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 : 39-46.

Mojarrad J.S., Nemati M., Valizadeh H., Ansarin M. and Bourbour S. 2007. Preparation of Glucosamine from Exoskeleton of Shrimp and Predicting Production Yield by Response Surface Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 : 2246–2250.

Reginster J.Y., Deroisy R., Rovati L.C., Lee R.L., Lejeune E., Bruyere O., Giacovelli G., Henrotin Y., Dacre J.E. and Gossett C. 2001. Long-term Effects of Glucosamine Sulphate on Osteoarthritis Progression: a Randomised, Placebo-Controlled Clinical Trial. *The Lancet*, 357 : 251-256.

Uldry M., Ibberson M., Hosokawa M. and Thorens B. 2002. GLUT2 is a High Affinity Glucosamine Transporter. *Febs Letters*, 524 : 199-203.

Wanichpongpan P. and Attasat S. 2016. Optimum Conditions for Preparation of Glucosamine Hydrochloride and Glucosamine Sulfate from Shrimp Shell Chitin. *International Journal of Applied Science and Technology*, 6(2) : 24-29.

Wu Y., Hussain M. and Fassihi R. 2005. Development of a Simple Analytical Methodology for Determination of Glucosamine Release from Modified Release Matrix Tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 : 263–269.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายกรด 3,5-ไดไนไตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1 ลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 3,5-ไดไนไตรซาลิไซลิก 10 กรัม ฟีนอล 0.2 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมตราเทรต 200 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 0.5 โดยค่อยๆ ละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงเติมสารเคมีตามลำดับจนครบทุกตัวและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. Kreb's Ringer Buffer ที่ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.7013 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.0373 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.0222 กรัม แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซาไฮเดรต 0.2033 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.21 กรัม HEPES 0.2383 กรัม BSA 1 กรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน

3. การเตรียมโซเดียมซัลเฟต 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมซัลเฟต 0.1420 ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน

4. การเตรียมโซเดียมฟอสเฟส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมฟอสเฟตไตรเบสิค 0.3801 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน

5. การเตรียม 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 1 ลิตร

5.1 ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 35.6 กรัม ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชด้วย 4 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

5.2 เตรียม 4 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยกรดไฮโดรคลอริก 14.58 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเตรียมกลูโคซามีน 4 รูปแบบ

ตารางที่ 1 การเจือจางสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน

Gln	conc.	Gln-STD 1 mM (µl)	Na_2SO_4 100 mM (µl)	Na_3PO_4 100 mM (µl)	Kreb's 10x (µl)	H_2O (µl)	ปริมาตรรวม (ml)
Gln-STD	0.1	200	-	-	200	1600	2
	0.2	400			200	1400	2
	0.3	1200			400	2400	4
	0.4	1600			400	2000	4
	0.5	2000			400	1600	4
	0.6	2400			400	1200	4

ตารางที่ 2 การเจือจางสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ กลูโคซามีนซัลเฟต และกลูโคซามีนฟอสเฟต

Gln	conc.	Gln-HCl 1 mM (µl)	Na_2SO_4 100 mM (µl)	Na_3PO_4 100 mM (µl)	Kreb's 10x (µl)	H_2O (µl)	ปริมาตรรวม (ml)
Gln-HCl	0.3	1200	-	-	400	2400	4
	0.4	1600			400	2000	4
	0.5	2000			400	1600	4
	0.6	2400			400	1200	4
Gln-SO_4	0.3	1200	6	-	400	2394	4
	0.4	1600	8		400	1992	4
	0.5	2000	10		400	1590	4
	0.6	2400	12		400	1188	4
Gln-PO_4	0.3	1200	-	4	400	2396	4
	0.4	1600		5.3	400	1994.7	4
	0.5	2000		6.67	400	1593.33	4
	0.6	2400		8	400	1192	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

1. การสร้างกราฟมาตรฐานจากวิธีกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (DNS)

1.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยทำการเจือจางสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0 - 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 แต่ละความเข้มข้นบรรจุลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

1.3 เติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

1.4 เมื่อครบตามเวลาทำการหล่อเย็นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย โดยหลอดที่เป็น Blank จะใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างและทำตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.6 สร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน แสดงดังตารางที่ ค-1 และสามารถแสดงในรูปแบบกราฟได้ดังรูปที่ ค-1

2. การเตรียมอาหาร RPMI

2.1 เตรียมอาหาร RPMI 1640 ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูปลักษณะผง เป็นผลิตภัณฑ์ของ Gibco Invitrogen Corporation อาหาร 1 ซอง สามารถเตรียมเป็นอาหารเหลวได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ทำการละลายอาหารสำเร็จรูป 1 ซองโดยใช้น้ำปราศจากไอออน และปราศจากเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ในบีกเกอร์ขนาดปริมาตร 2 ลิตร

2.2 เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร แล้วนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร จะได้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่ครบองค์ประกอบ จากนั้นเทแบ่งใส่ขวดแยกไว้ 2 มิลลิลิตร เพื่อทดสอบการปนเปื้อน และนำขวดทดสอบการปนเปื้อนไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เมื่อไม่มีการปนเปื้อน ให้นำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบครบองค์ประกอบ โดยแบ่งอาหาร RPMI 1640 แบบไม่ครบองค์ประกอบ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ใส่ในขวดใส่สารเคมีขนาด 100 มิลลิลิตร

2.4 เติมสารปฏิชีวนะเจนตาไมซินปริมาตร 2 ไมโครลิตรและฟีตัลโบวายซีรัม (Fetal Bovine Serum) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.5 เติมอาหาร RPMI 1640 แบบไม่ครบให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ลงในอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วยซีรัม 8 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่ผิว 25 ตารางเซนติเมตร

3.2 บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน

3.3 สังเกตการปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted หากมีปริมาณเซลล์ 70 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ทำการ Subculture โดยดูดอาหารเก่าออก

3.4 ล้างด้วย PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 2 รอบ เจือจางความเข้มข้นทริปซินโดยการผสม PBS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และทริปซินปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่ม 1 ถึง 2 นาที สังเกตลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์มีลักษณะกลมให้ดูดสารผสมทิ้ง

3.5 เติมอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วยซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร จากนั้นดูดพ่น (Resuspension) ให้เซลล์หลุดจากขวดเพาะเลี้ยง นำไปสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์ส่วนมากมีการหลุดลอยให้ดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เพื่อนำไปทำการทดสอบการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ต่อไป จากนั้นให้เติมอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วยซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดเพาะเซลล์เลี้ยงจนครบ 5 มิลลิลิตร

3.6 บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีการนับเซลล์

4.1 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอย 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมทริปแพนบลู 0.4 เปอร์เซ็น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.2 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วใส่ลงในแอ่ง (Chamber) ทั้ง 2 ของฮีมาไซโตมิเตอร์ แอ่งละ 10 ไมโครลิตร

4.3 ตรวจหาเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีใสไม่ติดสีของทริปแพนบลู ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะติดสีฟ้าของทริปแพนบลู

4.4 การนับเซลล์ นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 5 ช่อง (Primary Square) ต่อ 1 แอ่ง (Chamber) โดยนับเซลล์ทั้ง 2 ด้าน บันทึกผลการนับจำนวนเซลล์ลงในตาราง เพื่อนำข้อมูลที่ได้คำนวณจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตรต่อไป

5. การสร้างกราฟมาตรฐานจากวิธีนินไฮดริน

5.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ โดยปิเปตต์ตัวอย่างกลูโคซามีนมาตรฐาน 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 2,000 ไมโครลิตร นินไฮดริน 0.8 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายแล้ว

5.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบตามเวลาทำการหล่อเย็นและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย สารละลาย โดยหลอดที่เป็น Blank จะใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างและทำตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

5.3 นั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

5.4 สร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรกับความเข้มข้นกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน แสดงดังตารางที่ ค-2 และสามารถแสดงในรูปแบบกราฟได้ดังรูปที่ ค-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

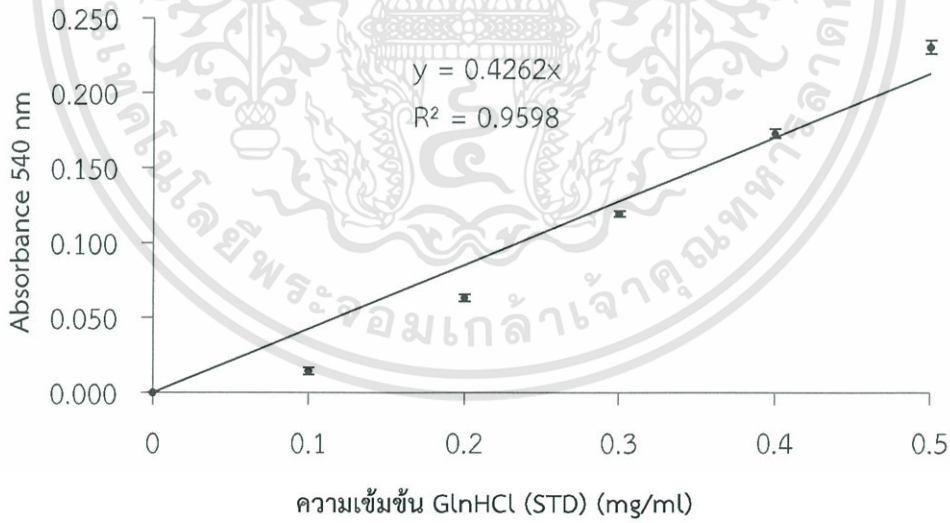
ภาคผนวก ค

ตารางแสดงข้อมูลดิบ

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลความเข้มข้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ย และความคลาดเคลื่อน

Gln	ความเข้มข้น (mg/ml)	A_{540} ครั้งที่ 1	A_{540} ครั้งที่ 2	A_{540} ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ความคลาดเคลื่อน
standard	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.1	0.017	0.012	0.014	0.014	0.003
	0.2	0.062	0.066	0.062	0.063	0.002
	0.3	0.121	0.117	0.120	0.119	0.002
	0.4	0.170	0.176	0.173	0.173	0.003
	0.5	0.235	0.231	0.226	0.231	0.005
Sample	0.2	0.086	0.087	0.085	0.086	0.001

นำข้อมูลจากตารางที่ ค-1 แสดงในรูปแบบของกราฟได้ดังรูปที่ ค-1



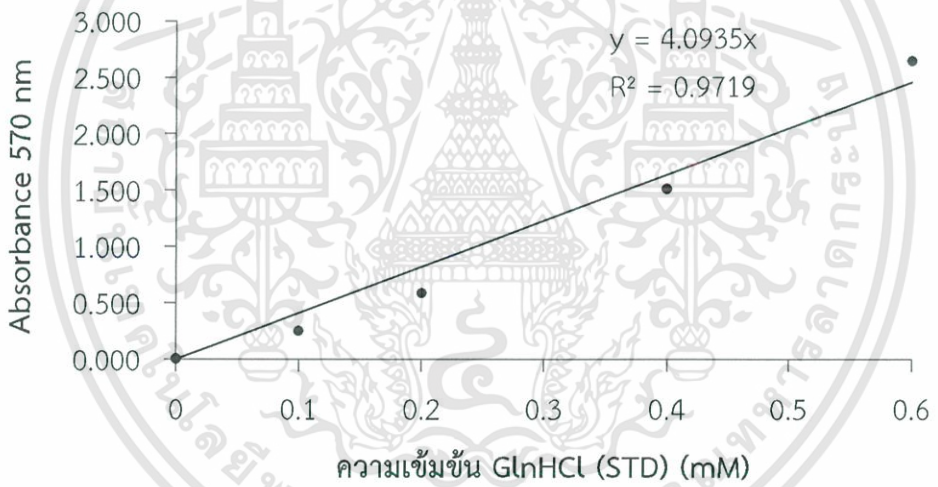
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลความเข้มข้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (mM)	A_{570}
0	0.000
0.1	0.249
0.2	0.586
0.3	-
0.4	1.509
0.5	-
0.6	2.646

นำข้อมูลจากตารางที่ ค-2 แสดงในรูปแบบของกราฟได้ดังรูปที่ ค-2



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีคำนวณที่ใช้ในการทดลอง

1. การหาค่าผลผลิตร้อยละ

$$\text{ผลผลิตร้อยละ} = \frac{\text{กลูโคซามีนที่ผลิตได้ (กรัม)}}{\text{ไคตินเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

2. การหาเปอร์เซ็นความบริสุทธิ์

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์} = \frac{\text{ความเข้มข้นของตัวอย่างที่คำนวณได้}}{\text{ความเข้มข้นของตัวอย่างตามทฤษฎี}} \times 100$$

3. การคำนวณหา Rf

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเดินทางจากจุดตั้งต้น (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเดินทาง (ซม.)}}$$

4. การหาจำนวนเซลล์มีชีวิต

$$\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต/มิลลิลิตร} = \text{จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย} \times 10^4 \times \text{ค่าความเจือจาง (dilution factor)}$$

$$\text{ค่าความเจือจาง} = \frac{\text{(ปริมาตรเซลล์แขวนลอยที่นำมานับ + ปริมาตรสีย้อม)}}{\text{ปริมาตรเซลล์แขวนลอยที่นำมานับ}}$$

5. คำนวณหาความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นเริ่มต้น

C_2 = ความเข้มข้นสุดท้าย

V_1 = ปริมาตรเริ่มต้น

V_2 = ปริมาตรสุดท้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิต

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต/มิลลิลิตร}}{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตเริ่มต้น/มิลลิลิตร}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การคำนวณและตารางแสดงข้อมูลการหาค่าจลนพลศาสตร์ในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

1. การวัดอัตราเร็วในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

ในการวัดอัตราเร็วในการนำกลูโคซามีนเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0 และ 30 นาที สามารถวัดได้ด้วยปฏิกิริยานินไฮดริน โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ-1 และ จ-2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0 นาที

ความเข้มข้น (mM)	GlnHCl (STD)	GlnHCl	$GlnSO_4$	$GlnPO_4$
0.3	0.417	0.474	0.455	0.465
0.4	0.435	0.500	0.472	0.481
0.5	0.512	0.524	0.494	0.487
0.6	0.557	0.562	0.497	0.507

ตารางที่ 2 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 30 นาที

ความเข้มข้น (mM)	GlnHCl (STD)	GlnHCl	$GlnSO_4$	$GlnPO_4$
0.3	0.309	0.388	0.385	0.391
0.4	0.314	0.414	0.390	0.452
0.5	0.373	0.432	0.417	0.418
0.6	0.387	0.472	0.405	0.458

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0 และ 30 นาที คำนวณได้จาก การแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงจากความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ตารางที่ 5 และ 6 ในสมการเส้นตรง y = 4.0935x จากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ ค-2)

ค่าการดูดกลืนแสง A_{570} = 4.0935x

ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ จ-3 และ จ-4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงผลความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น (mM)	GlnSTD (mM)	GlnHCl (mM)	$GlnSO_4$ (mM)	$GlnPO_4$ (mM)
0.3	0.130	0.171	0.158	0.165
0.4	0.143	0.191	0.170	0.177
0.5	0.199	0.208	0.186	0.181
0.6	0.232	0.236	0.188	0.196

ตารางที่ 4 แสดงผลความเข้มข้นที่เหลือของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น (mM)	GlnSTD (mM)	GlnHCl (mM)	$GlnSO_4$ (mM)	$GlnPO_4$ (mM)
0.3	0.051	0.108	0.106	0.111
0.4	0.054	0.128	0.110	0.155
0.5	0.097	0.141	0.130	0.130
0.6	0.108	0.170	0.121	0.160

การคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคซามีนที่นำเข้าเซลล์แต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0 และ 30 นาที คำนวณได้จาก

ความเข้มข้นของกลูโคซามีนที่นำเข้าเซลล์ = ความเข้มข้นเริ่มต้น - ความเข้มข้นที่เหลือ

ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ จ-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลความเข้มข้นของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบที่นำเข้าเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น (mM)	GlnHCl(STD) (mM)	GlnHCl (mM)	$GlnSO_4$ (mM)	$GlnPO_4$ (mM)
0.3	0.079	0.063	0.051	0.054
0.4	0.089	0.063	0.060	0.021
0.5	0.102	0.067	0.056	0.051
0.6	0.125	0.066	0.067	0.036

2. การติดตามหาค่าจลนพลศาสตร์

ในการติดตามหาค่า K_m และ V_{max} ของกลูโคซามีนแต่ละรูปแบบ ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นที่เหลือของกลูโคซามีน และ เวลา ให้ได้ซึ่งสมการเส้นตรงของกลูโซมีนแต่ละความเข้มข้น คำนวณค่า 1/อัตราเร็ว และ 1/ความเข้มข้นกลูโคซามีน เพื่อนำไปสร้างกราฟ Lineweaver-Burk แสดงดังตารางที่ จ-6 ถึง จ-9

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น GlnHCl (STD) (mM)	1/ความเข้มข้น GlnHCl (STD) (mM^{-1})	อัตราเร็ว ($mM \cdot min^{-1}$)	1/อัตราเร็ว ($min \cdot mM^{-1}$)
0.3	3.33	0.0026	384.62
0.4	2.50	0.0030	333.33
0.5	2.00	0.0034	294.12
0.6	1.67	0.0042	238.10

* หมายเหตุ อัตราเร็ว คือ ค่าความชันจากสมการเส้นตรงของกราฟแสดงค่าการนำกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ในแต่ละความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น GlnHCl (mM)	1/ความเข้มข้น GlnHCl (mM^{-1})	อัตราเร็ว ($mM \cdot min^{-1}$)	1/อัตราเร็ว ($min \cdot mM^{-1}$)
0.3	3.33	0.0021	476.19
0.4	2.50	0.0021	476.19
0.5	2.00	0.0022	454.55
0.6	1.67	0.0022	454.55

* หมายเหตุ อัตราเร็ว คือ ค่าความชันจากสมการเส้นตรงของกราฟแสดงค่าการนำกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์เข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น $GlnSO_4$ (mM)	1/ความเข้มข้น $GlnSO_4$ (mM^{-1})	อัตราเร็ว ($mM \cdot min^{-1}$)	1/อัตราเร็ว ($min \cdot mM^{-1}$)
0.3	3.33	0.0017	588.24
0.4	2.50	0.0020	500.00
0.5	2.00	0.0019	526.32
0.6	1.67	0.0022	454.55

* หมายเหตุ อัตราเร็ว คือ ค่าความชันจากสมการเส้นตรงของกราฟแสดงค่าการนำกลูโคซามีนซัลเฟตเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกลูโคซามีนฟอตเฟตที่ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น $GlnPO_4$ (mM)	1/ความเข้มข้น $GlnPO_4$ (mM^{-1})	อัตราเร็ว ($mM \cdot min^{-1}$)	1/อัตราเร็ว ($min \cdot mM^{-1}$)
0.3	3.33	0.0018	555.56
0.4	2.50	0.0007	1428.57
0.5	2.00	0.0017	588.24
0.6	1.67	0.0012	833.33

* หมายเหตุ อัตราเร็ว คือ ค่าความชันจากสมการเส้นตรงของกราฟแสดงค่าการนำกลูโคซามีนฟอสเฟตเข้าเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้