บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น FX- 3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอัลทราฟิลเทรชัน (Amicon ultrafiltration) และเมมเบรน amicon XM300 บริษัท W.R. Grace Co., U.S.A.

ตู้ปลอดเชื้อ(larminar flow hood) รุ่น NK System Clean Bench ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR-6650 ของบริษัท Hitachi, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6-blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH combination electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น KT-30 SD ของบริษัท ALP Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (hot air oven) รุ่น 94789 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd. ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้บ่มเชื้อ (program incubator) รุ่น IN 81 ของบริษัท Yamato Scientific Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หลอดแก้ววัดความหนืด (Canon-Ubbelohde semi-micro viscometer) ของบริษัท เพนนีฟูล (ไทยแลนด์) จำกัด

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TE – 8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศที่ผลิต	เกรดที่ใช้
กรดซัลฟูริก	Merck	เยอรมัน	analytical
กรดไทรคลอโรอะซิติก	Merck	เยอรมัน	analytical
กรดไฮโดรคลอริก	Merck	เยอรมัน	analytical
กรดไฮยาลูโรนิก (*S.zooepidemicus*)	Sigma	สหรัฐอเมริกา	analytical
คอปเปอร์ซัลเฟต	Merck	เยอรมัน	commercial
คาร์บาโซล	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์	analytical
แคลเซียมคลอไรด์	Merck	เยอรมัน	lab
ซูโครส	มิตรผล	ไทย	lab
โซเดียมเตตระบอเรท	Merck	เยอรมัน	lab
โซเดียมคลอไรด์	Carlo Erba	อิตาลี	analytical
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Carlo Erba	อิตาลี	lab
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	BDH	อังกฤษ	analytical
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck	เยอรมัน	lab
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck	เยอรมัน	lab
ถ่านกัมมันต์	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์	lab
ถ่านกัมมันต์ CGC-16	บจ. ซี ไจแกนติค คาร์บอน	ไทย	commercial
ถ่านกัมมันต์ CGC-wood	ซี ไจแกนติค คาร์บอน	ไทย	commercial
โพแทสเซียมคลอไรด์	Merck	เยอรมัน	commercial
โฟลินฟีนอล	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์	analytical
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์	lab

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศที่ผลิต	เกรดที่ใช้
แลกติกเคซีน	ไวท์กรุ๊ป	ไทย	commercial
เอทานอล 95 %	กรมสรรพสามิต	ไทย	commercial
เอนไซม์ปาเปน	BDH	อังกฤษ	analytical
เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส	Marck	เยอรมัน	analytical

2.2 <u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ซึ่งเป็นเชื้อที่กลายพันธุ์มาจาก *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 โดย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540)

2.3 <u>การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย</u>

เก็บรักษาเชื้อ โดยเขี่ยเชื้อด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ แล้วลาก (streak) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) Brain Heart Infusion (BHI) (ภาคผนวก ก-1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 <u>การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก</u>

2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (inoculum) ได้โดย เลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง BHI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตน้ำที่ขจัดไอออนออกแล้ว (deionized water) 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร เขี่ยเชื้อให้กระจายในน้ำ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ได้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว BHI (ภาคผนวก ก-1.1) 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าแบบหมุน ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการหมุน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid – log phase) ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.2

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.1 300 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต (ภาคผนวก ง) 2,700 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น เท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ควบคุมภาวะตลอดการหมักโดยใช้สภาวะที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้น้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุดจากอณุมาศ บัวเขียว (2544) คือที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ โดยใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

2.5 การทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์

2.5.1 การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

นำน้ำหมักจากข้อ 2.4.2 มาเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.01 0.02 0.03 และ 0.05 คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรน้ำหมักตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.5.2 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

นำน้ำหมักจากข้อ 2.4.2 มาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 65 75 85 และ 95 ตามลำดับ และปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็น 2 เท่าของน้ำหมักเริ่มต้น เหวี่ยงแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

2.5.3 การกำจัดโปรตีน

2.5.3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไทรคลอโรอะซิติก

นำน้ำหมักที่ผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์ มาตกตะกอนด้วยเอทานอล เก็บส่วนตะกอนมาละลาย นำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกเติมกรดไทรคลอโรอะซิติกโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1 3 และ 5 คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปเหวี่ยงแยกโปรตีน นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีน ปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

2.5.3.2 การกำจัดโปรตีนด้วยการใช้ถ่านกัมมันต์

นำน้ำหมักที่ผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์ มาตกตะกอนด้วยเอทานอล เก็บส่วนตะกอนมาละลาย นำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกมาใส่ถ่านกัมมันต์โดยให้มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 1 3 และ 5 คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก เขย่าที่

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มากรองเพื่อแยกเอาถ่านกัมมันต์ออก สารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้นำไปวัดปริมาณโปรตีน ปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.5.3.2.1 การหา equilibrium time ของการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

ชั่งถ่านกัมมันต์ CGC-16 และ CGC-wood เติมลงในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 30 45 และ 60 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองเพื่อแยกเอาถ่านกัมมันต์ออก สารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้นำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับโดยหาจากปริมาณโปรตีนที่เวลาเริ่มต้นลบปริมาณโปรตีนที่เวลาสุดท้าย และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

2.5.3.2.2 การหา adsorption isotherm ของการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

ชั่งถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood ปริมาณร้อยละ 1 2 3 และ 5 คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก เติมลงในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองเพื่อแยกเอาถ่านกัมมันต์ออก แล้วจึงนำไปวัดปริมาณโปรตีน

2.5.3.2.3 การดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์แบบ single stage และ multi stage

ก. single stage

ชั่งถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood ปริมาณร้อยละ 1 2 3 4 และ 5 คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก เติมลงในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองเพื่อแยกเอาถ่านกัมมันต์ออก แล้วจึงนำไปวัดปริมาณโปรตีน

ข. multi stage

ชั่งถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood ปริมาณร้อยละ 1 เติมลงในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองเพื่อแยกเอาถ่านกัมมันต์ออก นำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกมาผ่านขั้นตอนการดูดซับโปรตีนอีกครั้งโดยใช้สภาวะเช่นเดิม จนกระทั่งปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ใช้สะสมเป็นร้อยละ 5 แล้วจึงนำไปวัดปริมาณโปรตีน

2.5.3.2.4 การหา breakthrough curve ของถ่านกัมมันต์

ชั่งถ่านกัมมันต์ปริมาณ 1 กรัมมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ผ่านสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก โดยมีอัตราการไหล 10.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างเป็นลำดับส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

2.5.4 การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกและการกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำด้วยเครื่องอัลทราฟิลเทรชัน

นำน้ำหมักที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วมาผ่านกระบวนการอัลทราฟิลเทรชันโดยใช้โมดูลแบบ dead-end (ภาคผนวก จ) โดยใช้เยื่อแผ่นที่มี molecular weight cut off เท่ากับ 300,000 ดาลตัน โดยใช้ความดัน 0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร แล้วนำส่วน permeate และ retentate มาวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.6.1 ปัจจัยทางกายภาพ

2.6.1.1 อุณหภูมิ

นำกรดไฮยาลูโรนิกจากขั้นตอน 2.5.4 มาบ่มที่อุณหภูมิ 25 37 50 70 และ 100 องศาเซลเซียส นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.6.1.2 ความเร็วรอบของการกวน

นำกรดไฮยาลูโรนิกจากขั้นตอน 2.5.4 มากวนผสม โดยให้ความเร็วรอบ 100 200 และ 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 60 120 และ 240 นาที นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.6.2 ปัจจัยทางเคมี

2.6.2.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

นำกรดไฮยาลูโรนิกจากขั้นตอน 2.5.4 มาปรับพีเอชให้เท่ากับ 1 3 5 7 9 11 และ 13 เป็นเวลา 30 60 และ 120 นาที นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.6.2.2 เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

นำกรดไฮยาลูโรนิกจากขั้นตอน 2.5.4 มาเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 1 3 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.7 วิธีวิเคราะห์

2.7.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.7.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.2 ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้ง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ที่ได้ลงสู่กระทงอะลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด หักน้ำหนักของกระทงอะลูมินัมฟอยล์ออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล (Bitter และ Muir, 1962)

2.7.3.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

ปิเปตสารละลายที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ ตามขั้นตอนที่ 2.5.1 และ 2.5.2 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ เติมเอทานอล 95 % 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกครั้งที่ 2 โดยเทส่วนของสารละลายลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ และเติมเอทานอล 95 % 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนของสารละลายทิ้ง นำตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มารวมกัน เพื่อใช้ในการละลายกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

2.7.3.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิก

นำตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.7.3.1 มาละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เพื่อใช้ในการหาปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

2.7.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล (Bitter and Muir, 1962)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.5.1 2.5.2 และ 2.5.3 ที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลายบอเรท-ซัลฟูริก (ภาคผนวก ข-1.1) 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้น นำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เติมสารละลายคาร์บาโซล (ภาคผนวก ข-1.2) 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ใช้น้ำขจัดไอออน 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิก จากกราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค-1)

2.7.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืด (viscometry)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืดสามารถทำได้โดยหาค่า relative viscosity (η_r) จากสมการ

$$\eta_r = t / t_0$$

โดย t_0 = เวลาที่ตัวทำละลายใช้ไหลผ่าน viscometer (วินาที)

t = เวลาที่สารละลายไหลผ่าน viscometer (วินาที)

จากนั้น หาค่า specific viscosity (η_{sp}) จากสมการ

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

จากนั้น หาค่า intrinsic viscosity ($[\eta]$) จากสมการ

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \eta_{sp} / c$$

c = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

โดยพลอตกราฟระหว่างค่า η_{sp} / c กับ c และลากเส้นตรงตัดที่ $c = 0$

จะได้ค่า $[\eta]$ นำค่า $[\eta]$ ที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยสมการของ Mark –Houwink คือ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$[\eta] = KM^{a}$$

โดย $[\eta]$ = intrinsic viscosity

M = น้ำหนักโมเลกุล

K และ a = ค่าคงที่

ซึ่งจากการศึกษาของ Cleland และ Wang (1970) เกี่ยวกับการหาค่าคงที่ K และ a สามารถหาค่าคงที่ K ได้เท่ากับ 0.0228 และค่าคงที่ a ได้เท่ากับ 0.816 สำหรับกรดไฮยาลูโรนิกที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย

2.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนลาวรี (Lowry และคณะ, 1951)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย ง. 2 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข - 2.4) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโฟลิน 0.2 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข - 2.5) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ค - 2) ได้จากกราฟมาตรฐานโปรตีน ในช่วงความเข้มข้น 0 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค - 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย