

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

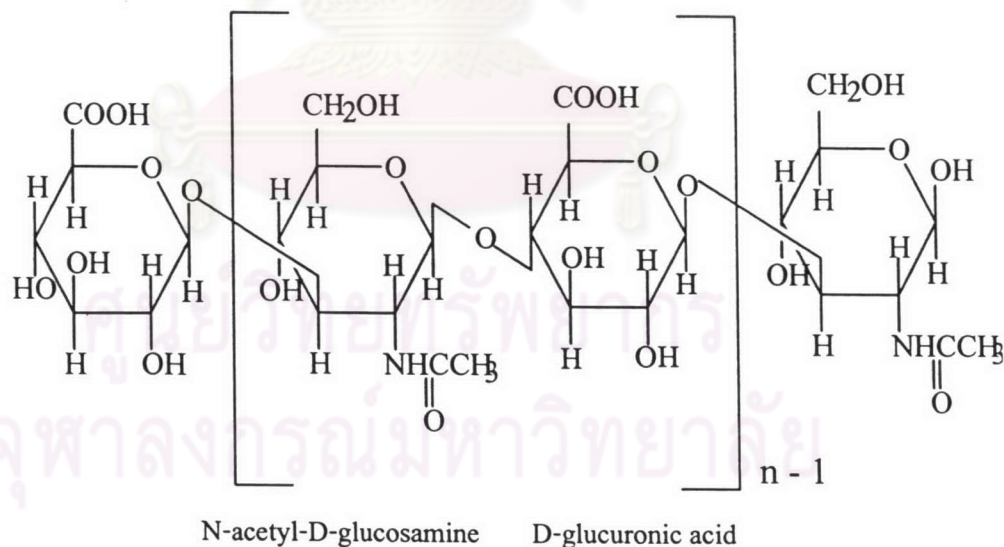
กรดไฮยาลูโรนิกเป็นมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharide) ชนิดหนึ่งที่ปลดปล่อยเซลล์และอาจจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ซึ่งนอกจากกรดไฮยาลูโรนิกแล้วยังมีพอลิเมอร์อื่นในกลุ่มไกลโคสะมิโนไกลแคน ได้แก่ คอนครอยติน-4-ซัลเฟต คอนครอยติน-6-ซัลเฟต เดอมาแทนซัลเฟต เคอราตินซัลเฟต และเฮปาริน กรดไฮยาลูโรนิกสามารถพบได้ในธรรมชาติโดยเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อหลาย ๆ ส่วน ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน และอวัยวะบางอย่าง เช่น สายรก วัณตา น้ำไขข้อ และในหนองไก่ตัวผู้ (Nimrod และคณะ, 1988) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เช่น การสร้างโลหิต, การเจริญของหลอดเลือด และการยึดติดกันของเซลล์ (Morita และ Fujii, 1991) ได้มีการนำกรดไฮยาลูโรนิกมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น แทนวุ้นน้ำตาในการผ่าตัดตา ใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา ใช้รักษาการอักเสบของข้อต่อ (Balazs, 1979) ใช้ในการรักษาบาดแผล (Morita และ Fujii, 1991) ตลอดจนใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน (Kjems และ Lebech, 1976) และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นในครีมทาหน้า (Nimrod และคณะ, 1988) น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะอยู่ในช่วง 5×10^4 คาลตัน ถึง 1.3×10^7 คาลตัน (Nimrod และคณะ, 1988) หรือมากกว่า 1.4×10^7 คาลตัน (Ellwood และคณะ, 1995) โดยน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะมีความแปรผันและขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ แหล่งที่มา ความแตกต่างของวิธีการแยกสกัดกรดไฮยาลูโรนิก คือ ถ้าแยกสกัดโดยวิธีต่างกันจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าแตกต่างกัน (Ellwood และคณะ, 1995)

1.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycan) ที่มีความหนืดสูง ไม่มีสี มีความยืดหยุ่น และสามารถเก็บรักษาความชุ่มชื้นได้ดี ละลายน้ำได้เนื่องจากมีสภาพความเป็นขั้วสูง (Balazs, 1979) ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ โครงสร้างหรือรูปร่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก มีลักษณะเป็นเกลียวแบบขม

(random coil structure) ที่เกี่ยวพันกันเป็นร่างแห ซึ่งมีลักษณะคล้ายเจล มีความเหนียว หนืด และยืดหยุ่น หน้าที่สำคัญประการหนึ่งของกรดไฮยาลูโรนิก คือ ช่วยกักเก็บน้ำ โดยพบว่า สารละลายกรดไฮยาลูโรนิก 2% จะเก็บน้ำได้ถึง 98% (Balazs และ Band, 1984) หรือน้ำปริมาตร 1 ลิตร จะถูกตรึงอยู่ในโครงสร้างเกลียวของกรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนัก 1 กรัม (Laurent, 1970) ด้วยสมบัติที่เหนียวและหนืดกรดไฮยาลูโรนิก จึงทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่นและป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อม (Roden และคณะ, 1972 ; Robert and Pike, 1982 ; Balaz and Band, 1984 ; Nimrod และคณะ, 1988 ; Fujii และคณะ., 1996)

โครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูโรนิกเป็นพอลิเมอร์สายตรงที่มีหน่วยย่อยไดแซ็กคาไรด์ เป็นน้ำตาล 2 ชนิดคือ เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) และ ดี-กลูคูโรนิก แอซิด (D-glucuronic acid) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 มีสูตรโมเลกุลอย่างง่าย คือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ ซึ่ง n จะมีค่ามากกว่า 1,000 (Brown และคณะ, 1994) โดยทั่วไปกรดไฮยาลูโรนิกที่พบในธรรมชาติ และที่แยกได้ มักจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม คือ โซเดียมไฮยาลูโรเนต และพบบ้างในรูปของเกลือโพแทสเซียม คือ โพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Nimrod และคณะ, 1988 ; Brown และคณะ, 1994 ; Ellwood และคณะ, 1995 ; Fujii และคณะ, 1996)



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก (O'Ragan และคณะ, 1994)

1.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ในครั้งแรกได้จากการสกัดแยกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น หงอนไก่, เขื่อเมื่อกบบริเวณลูกตา, สายสะดือ, น้ำจากไขกระดูก, เซลล์เยื่อผิวหนัง (Cifonelli และ Mayeda, 1957 ; Laurent และคณะ, 1960 ; Radin และคณะ, 1970) น้ำไขข้อของวัว (Matsumura และคณะ, 1963) และกระดูกอ่อนของวัว (Keng และคณะ, 1989) เป็นต้น ซึ่งวิธีการสกัดแยกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีข้อเสียจากการปนเปื้อนของไกลโคสะมิโนไกลแคนอื่นๆในเซลล์ เช่น เดอมาแทนซัลเฟต (dermatan sulfate) และการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ทำให้ขั้นตอนการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก และซับซ้อนมากขึ้น ทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นและปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีปริมาณต่ำ (Bracke และคณะ, 1985 ; Morita และ Fujii, 1991 ; Brown และคณะ, 1994 ; Ellwood และคณะ, 1996)

เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตอื่นๆ ตามมา คือ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยการสังเคราะห์จากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ (UDP-sugar) โดย De Luca และคณะ ในปี 1995 ได้รายงานถึงการเตรียมกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิด คือ ยูรีดีนไดฟอสเฟต-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน (UDP-N-acetyl-D-glucosamine) และ ยูรีดีนไดฟอสเฟต-ดี-กลูคูโรนิก แอซิด (UDP-D-glucuronic acid) โดยใช้เอนไซม์ไฮยาลูโรนิก แอซิด ซินเทส (hyaluronic acid synthase) ที่ได้จากแบคทีเรีย *Streptococcus equisimilis* สายพันธุ์ D181 , เอนไซม์ ยูรีดีนไดฟอสเฟต-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ไพโรฟอสโฟไรเลส (UDP-N-acetyl-D-glucosamine pyrophosphorylase) จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเอนไซม์ยูรีดีนไดฟอสเฟต-กลูโคส ดีไฮโดรจีเนส (UDP-glucose dehydrogenase) ซึ่งจะได้กรดไฮยาลูโรนิกในรูปของเกลือโซเดียมถึง 90% วิธีการนี้มีข้อดี คือ จะช่วยลดการปนเปื้อนของกรดไฮยาลูโรนิกจากไกลโคสะมิโนไกลแคนอื่นๆ และยังสามารถกำหนดขนาดโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ตามต้องการ แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเรื่อง ความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต (De Luca และคณะ, 1995) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาการผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม

ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียดังกล่าว เริ่มจาก Kendall และคณะ ในปี 1937 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เป็นครั้งแรก จากการหมักในอาหารเหลว โดยเชื้อ group A hemolytic Streptococci หลังการตกตะกอนน้ำหมักด้วยอะซิเตทและเอทิลแอลกอฮอล์ ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 60 ถึง 140 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้ทำการศึกษาต่อไป โดยฉีดกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้นี้ให้กับสัตว์ทดลอง พบว่า ไม่มีผลกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Crater และ Rijn, 1995) แสดงให้เห็นว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียดังกล่าว มีความคล้ายคลึงกับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบวิธีการอื่นๆ คือ ใช้ระยะเวลาสั้น ให้ผลผลิตสูง และใช้ต้นทุนต่ำ ดังนั้น หากใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

และนำมาทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์ได้เหมาะสม ก็จะสามารถนำวิธีการมาพัฒนาเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4 การแยกและการทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์

การแยก และการทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์ จากอาหารเลี้ยงเชื้อกระทำได้หลายวิธีโดยอาศัยพื้นฐานของคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ และชีวภาพของกรดไฮยาลูโรนิก (Balazs, 1979) เช่น การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยน ไอออน, อิเล็กโทรโฟริซิส เช่น moving-boundary electrophoresis, zone electrophoresis, electro-deposition เป็นต้น และการตกตะกอนด้วยสารละลายอินทรีย์หรือควอนเทอนารีเอมีน (quaternary amine) เป็นต้น แต่วิธีที่นิยมและง่ายต่อการทำคือ วิธีการตกตะกอนซึ่งใช้สำหรับการเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิกที่มาจากแหล่งต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคนและสัตว์ จุลินทรีย์ เป็นต้น โดยแต่ละแหล่งจะมีรายละเอียดในการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งของกรดไฮยาลูโรนิก เช่น กรดไฮยาลูโรนิกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคนและสัตว์ มักมีโปรตีนล้อมรอบอยู่หรือปนเปื้อนจากมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ จากเนื้อเยื่อ จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัดโปรตีนหรือมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเติมด้วย วิธีการแยกโปรตีนอาจใช้คอลัมน์ เช่น Micro-cel E Fuller's earth การใช้ proteolytic enzyme การใช้กรดไทรโคลอโรอะซิติก และการใช้ถ่านกัมมันต์ในการดูดซับโปรตีนออกไป เป็นต้น ขณะที่การแยกกรดไฮยาลูโรนิกจากแบคทีเรียกระทำได้ง่ายเนื่องจากไม่มีมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นปะปนมา ดังนั้นในการเก็บเกี่ยวกรดดังกล่าวต้องคำนึงถึงความยากง่ายในการเตรียม เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว ความบริสุทธิ์ ปริมาณกรดที่ได้ และการเสียดสภาพ เพราะมักพบการลดลงของปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดดังกล่าวหลังการเก็บเกี่ยว และยังพบเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสปนเปื้อนมาอีกด้วย โดยมีผู้ศึกษาไว้ดังนี้

Cifonelli และ Mayeda (1957) นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัสชนิดย่อย-เม็คเลียดแดงอย่างสมบูรณ์ มาตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วนำมาดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ พบว่าได้ปริมาณกรด 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

Thonard และคณะ (1964) นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัสชนิดย่อยเม็คเลียดแดงอย่างสมบูรณ์ 3 ชนิดมาตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 65 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ปริมาณกรด 0.5 – 1 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้

Holmstrom และ Ricica (1967) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A Cobum R18 Strain 32369 แล้วนำน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์ ลดปริมาตรลงเหลือ 1 ใน 10 นำมาตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และตกตะกอนซ้ำด้วยซีทิลไพริคีนีเยมคลอไรด์ ละลายกรดในสารละลายโซเดียม

กลอไรด์ 0.5 โมลาร์ แยกโปรตีนออกโดยใช้ Micro-Cel E แล้วตกตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 300–400 มิลลิกรัมต่อลิตร

Woolcock (1974) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัส กลุ่ม C และใช้ quaternary ammonium salt ในการตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก คือ ซิทิล ไทรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์เข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ร่วมกับการใช้ filter aid และ cationic exchange พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิก 80 เปอร์เซ็นต์ โดยต้องเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อให้ลดลงครึ่งหนึ่งด้วยน้ำกลั่นก่อนการตกด้วยซิทิล ไทรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ แต่ถ้าไม่มีการเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการเก็บเกี่ยวจะลดลงเหลือ 65 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

Kjems และ Lebech (1976) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัสชนิดย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ Lancefield's กลุ่ม A type 12 strain K56 นำน้ำหมักมาฆ่าเชื้อด้วยการใช้ไอน้ำนาน 30 นาที แยกเซลล์ออกโดยการกรอง และตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยซิทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ ตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 0.3 กรัมต่อลิตร

Bracke และคณะ (1985) นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัส ฆ่าเชื้อและตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไทรคลอโรอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ กรองแยกเชื้อ แล้วตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนซ้ำด้วยซิทิล ไทรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกอย่างน้อย 2 กรัมต่อลิตร (Bracke และคณะ, 1985)

Nimrod และคณะ (1988) นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidermicus* HA-116 ATCC 39920 มาแยกเพื่อให้ได้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีความบริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรม เครื่องสำอางและในทางคลินิก โดยนำน้ำหมักมาให้ความร้อนเพื่อทำการฆ่าเชื้อ กรองแยกส่วนประกอบที่ไม่ละลายน้ำออก ตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และตกตะกอนซ้ำ

Akasaka และคณะ (1989) นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidermicus* NH-131 มาเหวี่ยงแยกเซลล์และส่วนประกอบที่ไม่ละลายน้ำออก จากนั้นแยกโปรตีนโดยใช้สารผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 5 : 1 แล้วจึงแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกโดยการทำอัลตราฟิลเตรชันเพื่อขจัดสารโมเลกุลเล็กๆ ออก แล้วนำไปทำให้แห้ง

Miyamori และคณะ (1989) นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidermicus* NCTC 7023 และ *Streptococcus equi* ATCC 9527 เหวี่ยงแยกเซลล์ ตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนอีกครั้งด้วย ซิทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ ตกตะกอนครั้งที่สามด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำมาทำให้แห้งในสูญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุล $1.6 - 2 \times 10^6$ คาลตัน

Hashimoto และคณะ (1990) ได้นำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus equi* เหวี่ยงแยกเซลล์ ตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนอีกครั้งด้วยซิทิลไพรดิเนียมคลอไรด์

ตกตะกอนครั้งที่สามด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำมาทำให้แห้งในสูญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

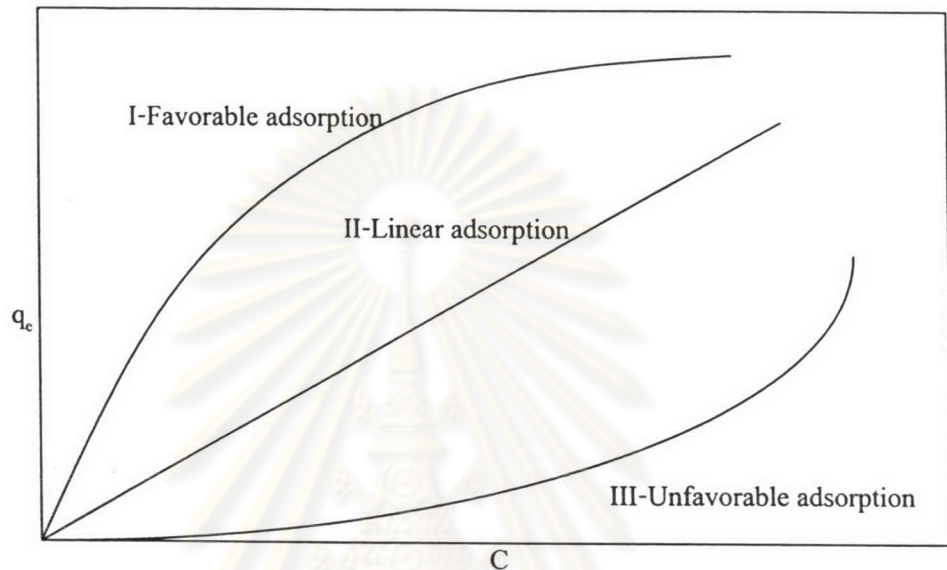
Morita และ Fujii (1991) ได้นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus equi* Ferm BP-879 และ *Streptococcus zooepidermicus* Ferm BP-878 แยกเซลล์ออกโดยการเหวี่ยงแยกหรือการกรอง จากนั้นแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกโดยการทำอัลตราฟิลเทรชันหรือการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis) ตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยแอลกอฮอล์ ตกตะกอนอีกครั้งด้วยซีทิล ไทรมีทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ และใช้ ion exchange chromatography หรือ gel permeation เพื่อทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

Brown และคณะ (1994) ทำการตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วย anionic surfactant และ cationic surfactant ตกตะกอนซ้ำด้วยแอลกอฮอล์ ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกอย่างน้อย 10 กรัมต่อลิตร

ในปี 1995 Ellwood และคณะ ได้นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus equi* มาทำการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนหรือสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ นำมาผ่านการกรองไมโครฟิลเทรชันชนิด plate and frame จากนั้นนำมาแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกด้วยอัลตราฟิลเทรชันชนิดไดอะฟิลเทรชัน โดยใช้เยื่อกรองชนิดพอลิซัลโฟน และให้มี molecular weight cut off 20,000 คาลตัน พบว่าได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 2.5 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักโมเลกุล $1.6 - 2.5 \times 10^6$ คาลตัน

ในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิกจะต้องคำนึงถึงโปรตีนที่ปะปนมา เนื่องจากโปรตีนอาจส่งผลให้เกิดการแพ้ หรือไฮยาลูโรนิตะปนส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกลดลง เป็นต้น จากประวัติการแยกการทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์จะพบว่ามีขั้นตอนในการกำจัดโปรตีน โดยอาจใช้ proteolytic enzyme การใช้กรดไทโรคลอโรอะซิดิก หรือการใช้ถ่านกัมมันต์ อย่างไรก็ตามวิธีที่น่าสนใจคือการกำจัดโปรตีนเปปตอนของโปรตีนโดยการใช้ถ่านกัมมันต์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก นอกจากนี้การแยกถ่านกัมมันต์ออกจากกรดไฮยาลูโรนิกยังทำได้ง่าย ซึ่งขั้นตอนการกำจัดโปรตีนโดยถ่านกัมมันต์นี้ใช้หลักการของการดูดติดผิว โดยทั่วไปในกระบวนการการดูดติดผิวมักจะใช้ในกระบวนการทำบริสุทธิ์ของสารเพื่อดูดซับสิ่งที่ไม่ต้องการออก เช่น การดูดซับสี การดูดซับประจุในน้ำเสีย เป็นต้น การดูดติดผิวเกี่ยวข้องกับการสะสมตัวของสาร หรือความเข้มข้นของสารที่บริเวณพื้นผิว หรือระหว่างหน้า (interface) กระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นที่ระหว่างหน้าของ 2 สภาวะใดๆ เช่น ของเหลวกับของเหลว ก๊าซกับของเหลว หรือของเหลวกับของแข็ง โดยโมเลกุลหรือคอลลอยด์ที่ถูกดูดซับ เรียกว่า สารถูกดูดซับ (adsorbate) ส่วนของแข็งที่มีผิวเป็นที่เกาะจับของสารถูกดูดซับ เรียกว่า สารดูดซับ (adsorbent) รูปที่ 1.2 แสดงการกระจายโมเลกุลระหว่างของเหลวและพื้นผิวของของแข็ง โดยที่ C บนแกนนอน หมายถึง ความเข้มข้นของสารในของเหลวที่สัมผัสกับของแข็งบริเวณระหว่างหน้าของของเหลวกับของแข็ง และ q_c บนแกนตั้ง หมายถึง จำนวนของสารที่ผ่านข้ามระหว่างหน้า

จากรูป 1.2 เส้นโค้ง I และ III แสดงถึงการดูดซับโดยความเข้มข้นของสารบนพื้นผิวของของแข็งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่ในของเหลว เส้นโค้งนี้แสดงถึงรูปแบบการดูดซับที่ดี (favorable) และไม่ดี (unfavorable) ส่วนเส้นโค้งที่ II แสดงรูปแบบการดูดซับแบบเส้นตรง จะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารบนผิวของของแข็งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่เหลืออยู่ในของเหลว



รูปที่ 1.2 การกระจายโมเลกุลระหว่างของเหลวและพื้นผิวของแข็ง (Weber, 1972)

1.4.1 กลไกการดูดซับ และอัตราการเคลื่อนย้ายโมเลกุล (adsorption process and rate of molecular transfer)

1.4.1.1 กลไกการดูดซับ (adsorption mechanism)

การดูดซับของสารประกอบอินทรีย์เกิดจากแรงรวมตัว (binding force) หลายชนิด ระหว่างโมเลกุลของสารอินทรีย์และพื้นผิวของคาร์บอน ซึ่งแรงทั้งหมดมีแหล่งที่มาจากอันตรกิริยาแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic interaction) การดูดซับที่สำคัญแบ่งเป็น 2 แบบ คือ การดูดซับทางกายภาพ (physisorption) และการดูดซับทางเคมี (chemisorption) (Eckenfelder, 1981) การดูดซับทั้ง 2 แบบนี้เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลในชั้นของเหลวเข้าไปใกล้และยึดติดกับผิวของของแข็ง ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดึงดูดที่ผิวของของแข็งสามารถเอาชนะพลังงานจลน์ของโมเลกุลของสารที่อยู่ในของเหลวได้ (Cheremisionoff and Morresi, 1978)

การดูดติดผิวทางกายภาพเป็นผลมาจากกิริยา (action) ของแรงวันเดอวาล์ว (Van der Waals force) ซึ่งเกิดจากการรวมกันของแรง 2 ชนิด คือ แรงกระจาย (London dispersion force) และแรงไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic force) (Eckenfelder, 1981) โมเลกุลของสารดูดซับจะยึดติดกันทางกายภาพกับโมเลกุลของสารดูดซับ การดูดติดผิวแบบนี้เป็นการดูดติดผิวแบบหลายชั้น (multilayered) กล่าวคือ แต่ละชั้นของโมเลกุลจะเกิดอยู่บนชั้นของโมเลกุลที่ถูกดูดติดก่อนหน้านี้นี้ โดยจำนวนชั้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของโมเลกุลของสารดูดซับ หรือจำนวนชั้นของโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารดูดซับเพิ่มขึ้น (Cheremisionoff and Morresi, 1978)

การดูดติดผิวทางเคมีเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารดูดซับและสารดูดซับ ซึ่งก่อให้เกิดสารประกอบทางเคมีขึ้น การดูดติดผิวทางเคมีแตกต่างกับการดูดติดผิวทางกายภาพ เนื่องจากเป็นการดูดติดแบบชั้นเดียว (monolayered) และไม่สามารถผันกลับได้ (irreversible) ส่วนการดูดติดผิวทางกายภาพสามารถที่จะผันกลับได้ (reversible) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของแรงดึงดูดระหว่างสารดูดซับ และสารดูดซับ ถ้าหากแรงดึงดูดนี้อ่อนลงจะเป็นผลให้เกิดการคายสารออก (desorption) ขึ้น (Cheremisionoff and Morresi, 1978)

1.4.1.2 อัตราการเคลื่อนย้ายโมเลกุล (rate of molecular transfer)

อัตราการดูดติดผิวมีความสำคัญอย่างมาก อัตราการดูดติดผิวที่รวดเร็วจะทำให้ระบบเข้าสู่ภาวะสมดุลได้เร็วขึ้น อัตราการดูดติดผิวจะถูกควบคุมโดยขั้นตอนที่มีความต้านทานมากที่สุดในการเคลื่อนย้ายโมเลกุล ซึ่งขั้นตอนที่ช้าที่สุดจะเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการดูดติดผิว ขั้นตอนในการดูดติดผิวของสารจากสารละลายโดยสารดูดซับที่มีรูพรุน มี 3 ขั้นตอน คือ

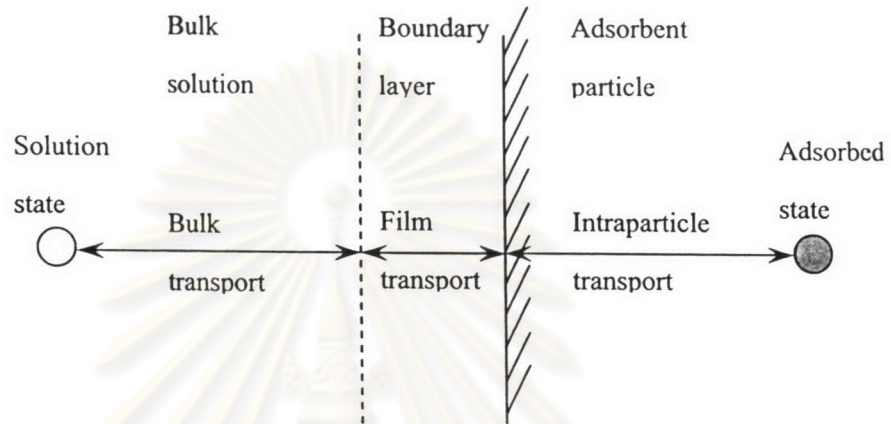
1. การขนส่งทั้งก้อน (bulk transport) เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นเร็วที่สุด โมเลกุลของตัวถูกละลายในของเหลว จะถูกส่งไปที่ผิวหน้าของชั้นของเหลวบางๆ ที่ห่อหุ้มสารดูดซับ

2. การขนส่งชั้นฟิล์ม (film transport) เป็นขั้นตอนที่โมเลกุลที่ผิวหน้าของชั้นของเหลวบางๆ แทรกตัวเข้าสู่ผิวหน้าของสารดูดซับ การขนส่งชั้นฟิล์มเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการแพร่ผ่านฟิล์ม (film diffusion) จัดเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการดูดติดผิวขั้นตอนหนึ่ง โดยปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการจำกัดอัตราเร็วในการดูดติดผิว คือ ขนาดเม็ดถ่าน อัตราการไหลของสารละลาย และความเข้มข้นของสารละลาย

3. การขนส่งภายในอนุภาค (intraparticle transport) เป็นการแพร่ของ โมเลกุลตัว ถูกละลายเข้าสู่โพรงหรือรูพรุนของสารดูดซับ (pore diffusion) และทำให้เกิดการดูดติด ผิวนั้นภายใน ขั้นตอนนี้จัดเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการดูดติดผิวนั้นเช่นกัน

ขั้นตอนการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของสารถูกดูดซับมายังสารดูดซับ แสดงดังรูปที่

1.3



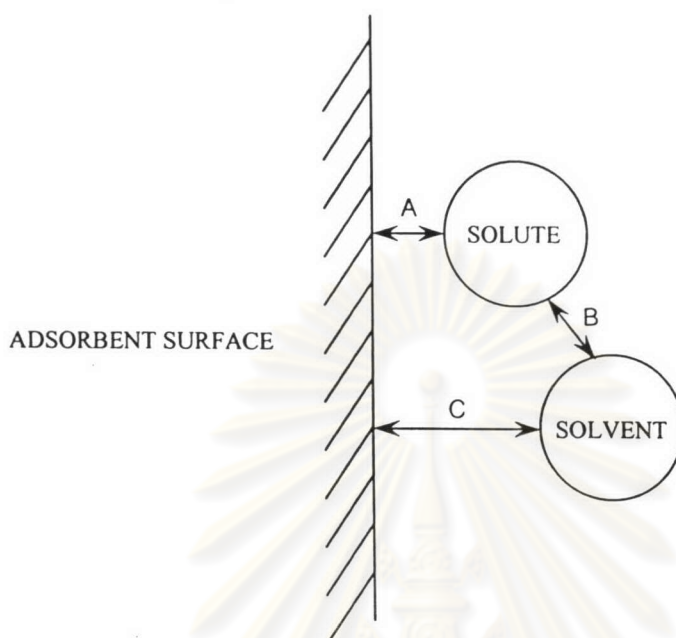
รูปที่ 1.3 ขั้นตอนการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของการดูดติดผิวนั้นด้วยถ่านกัมมันต์ (Eckenfelder, 1981)

1.4.2 การดูดติดผิวนั้นจากสารละลาย

ตัวถูกละลายและตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อการดูดติดผิวนั้นตัวถูกละลายจากสารละลาย แนวโน้มสำหรับการดูดติดตัวถูกละลาย ถูกกำหนดโดยความแตกต่างของศักย์ภาพของการดูดติดผิวนั้นระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย แรงที่กล่าวถึงแสดงดังรูป 1.4

จากรูป 1.4 A หมายถึงศักย์ภาพการดูดติดผิวนั้นของตัวถูกละลาย B หมายถึง ศักย์ภาพของ ปฏิกริยาระหว่างตัวถูกละลาย และตัวทำละลาย หรือความสามารถในการละลาย (solubility) C หมายถึง ศักย์ภาพการดูดติดผิวนั้นของตัวทำละลาย ความสามารถของสารดูดติดผิวนั้นที่จะดูดติด ผิวนั้นตัวถูกละลายจะถูกจำกัดโดยศักย์ภาพการดูดติดผิวนั้นของตัวถูกละลาย แต่โดยทั่วไปแล้ว ความสามารถในการดูดติดผิวนั้นระหว่างตัวทำละลาย กับสารดูดติดผิวนั้นจะมีค่าน้อยกว่าความ สามารถในการดูดติดผิวนั้นระหว่างตัวถูกละลายกับสารดูดติดผิวนั้น ถ่านกัมมันต์มีความสามารถในการดูดติดผิวนั้นในน้ำสูง เนื่องจากพลังงานศักย์ภาพการดูดติดผิวนั้นที่ต้องการในการแยกตัวถูกละลายออกจากน้ำมีค่าต่ำ Tebbutt และ Bahiah (1977) กล่าวว่า ในสารละลายผสม ตัวถูกละลาย

ละลายที่สามารถถูกดูดซับได้ดีจะถูกกำจัดก่อนโดยจะให้ความจุการดูดซับสูง แต่สารละลายที่เหลือที่มีความสามารถในการดูดซับต่ำกว่าจะมีความจุต่ำกว่า



รูป 1.4 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของตัวถูกละลาย ตัวทำละลาย และสารดูดซับ
(Neely และ Isacoff, 1982)

การที่ศักยภาพการดูดซับระหว่างตัวทำละลายกับสารดูดซับมีค่าต่ำกว่าศักยภาพการดูดซับระหว่างตัวถูกละลาย กับสารดูดซับนั้นไม่สามารถรับรองได้ว่าจะมีความสามารถในการดูดซับสูง ศักยภาพการดูดซับระหว่างตัวถูกละลาย และสารดูดซับจะต้องสูงกว่าศักยภาพระหว่างตัวถูกละลายกับตัวทำละลายด้วย ถึงจะเกิดการดูดซับที่ดี นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อความสามารถในการดูดซับ โดยที่ตัวถูกละลายที่ละลายได้น้อยกว่ามีแนวโน้มว่าถูกดูดซับได้เร็วกว่าตัวถูกละลายที่ละลายได้มากกว่า เนื่องจากศักยภาพการดูดซับที่สูงขึ้นระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย ดังนั้นธรรมชาติของการดูดซับ คือ สารดูดซับที่มีขั้วจะดูดซับตัวถูกละลายที่มีขั้วได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ในทางตรงข้ามสารดูดซับที่ไม่มีขั้วจะดูดซับตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว

1.4.3.2 ไอโซเทอร์มการดูดซับแบบเบท (BET, Brunauer Emmerett-Teller adsorption isotherm)

ไอโซเทอร์มแบบเบทพัฒนามาจากไอโซเทอร์มแบบแลงมัวร์ โดยจากการดูดซับแบบชั้นเดียวเป็นการดูดซับแบบหลายชั้น (multilayers) ซึ่งแบบจำลองแบบเบทมีพื้นฐานอยู่บนสมมติฐานที่ว่า แต่ละโมเลกุลในชั้นดูดซับผิวชั้นแรก จะเป็นบริเวณที่ซึ่งโมเลกุลชั้นที่สองดูดซับ เช่นเดียวกับชั้นต่อไป โดยแสดงดังสมการ

$$X = (X_m b C_e) / (C_s - C_e) [1 + (b-1) C_e / C_s] \quad (1.4)$$

โดยที่ X = ปริมาณของตัวถูกละลายที่ถูกดูดซับต่อหน่วยน้ำหนักของสารดูดซับ มีหน่วยเป็น mg/g หรือ mol/g

X_m = ปริมาณของตัวถูกละลายต่อหน่วยน้ำหนักของสารดูดซับที่ใช้ในการสร้างแผ่นชั้นเดี่ยว (Monolayer) มีหน่วยเป็น mg/g หรือ mol/g

C_e = ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่จุดสมดุล มีหน่วยเป็น mg/l หรือ mol/l

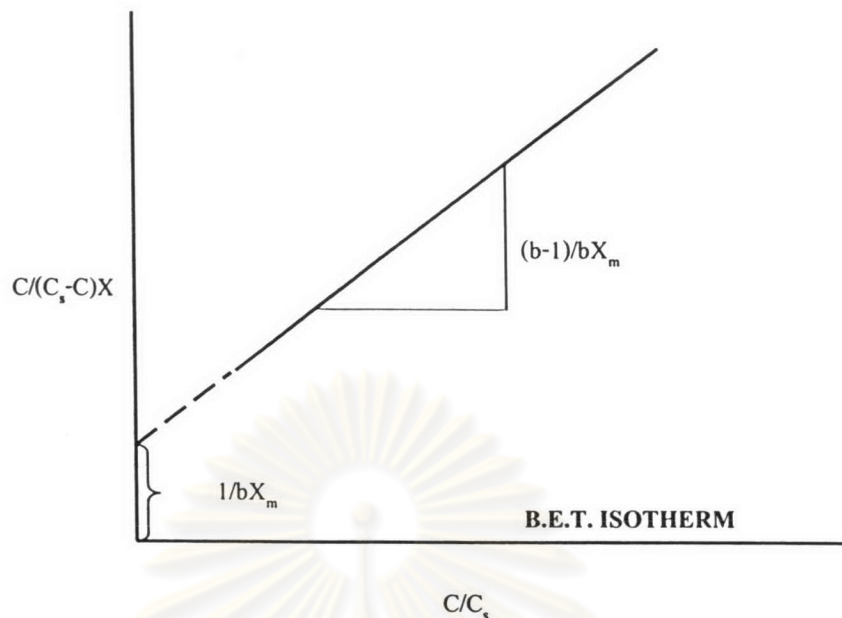
C_s = ความเข้มข้นอิ่มตัวของตัวถูกละลาย มีหน่วยเป็น mg/l หรือ mol/l

b = ค่าคงที่ของพลังงานในการดูดซับ (ml/g)

จากสมการ (1.4) สามารถเปลี่ยนได้เป็น

$$C_e / X (C_s - C_e) = (1/X_m b) + [(b-1)/X_m b] (C_e / C_s) \quad (1.5)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $C_e / X (C_s - C_e)$ กับ C_e / C_s ซึ่งเป็นเส้นตรงจะมีความชัน $(b-1)/X_m b$ และจุดตัดแกน y เท่ากับ $1/X_m b$ โดยสมการ (1.5) แสดงดังรูป 1.6



รูป 1.6 ไอโซเทอร์มการดูดติดผิวแบบเบท (Valancia และ Gloyna, 1972)

1.4.3.3 ไอโซเทอร์มการดูดติดผิวฟรุนดลิช (Freundlich adsorption isotherm)

สมการการดูดติดผิวแบบฟรุนดลิชใช้อย่างแพร่หลายที่สุดในการอธิบายการดูดติดผิวในระบบของเหลว โดยวิธีทางคณิตศาสตร์ ซึ่งมีสมการดังนี้

$$X = KC_c^{1/n} \quad (1.6)$$

โดยที่ X = ปริมาณของตัวถูกละลายที่ถูกดูดติดต่อหน่วยน้ำหนักของสารดูดซับ มีหน่วยเป็น mg/g หรือ mol/g

C_c = ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่จุดสมดุล มีหน่วยเป็น mg/l หรือ mol/l

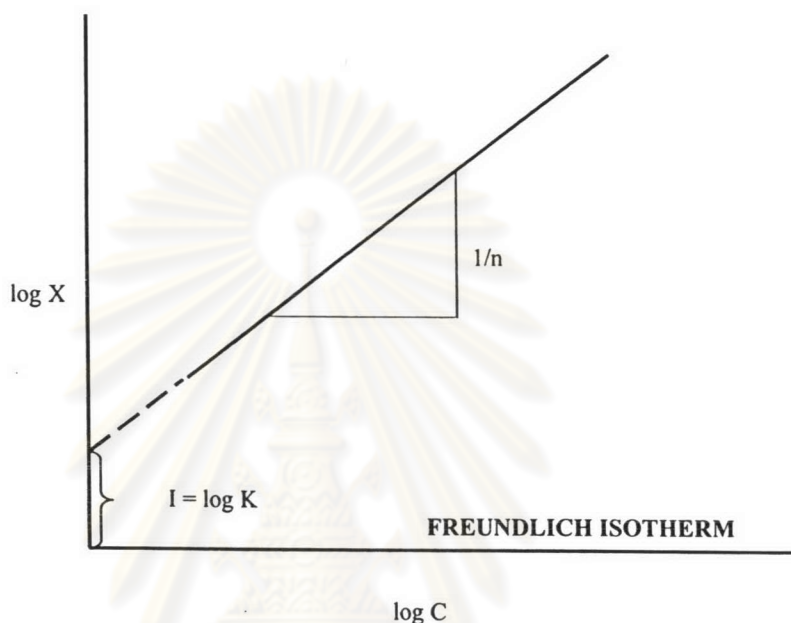
K = ค่าคงที่สัมพันธ์กับความสามารถในการดูดติดผิวของคาร์บอน

$1/n$ = ค่าคงที่สัมพันธ์กับพลังงานของการดูดติดผิว

จากสมการ (1.6) สามารถเขียนในรูปแบบลอการิทึม ได้เป็น

$$\log X = \log K + 1/n \log C_c \quad (1.7)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\log X$ กับ $\log C$ ซึ่งเป็นเส้นตรงจะมีความชัน $1/n$ และ จุดตัดแกน y เท่ากับ $\log K$ โดยแสดงดังรูป 1.7 Tebbutt และ Bahiah (1977) อธิบายว่า สมการฟรุนคลิชไอโซเทอร์มแสดงถึงความสามารถในการดูดซับ โดยถ้าค่า $n < 1$ แสดงถึงการดูดซับที่ไม่ดี (unfavourable adsorption) ถ้า $n = 1$ แสดงถึงการดูดซับที่ดี เป็นสมการเส้นตรง และถ้า $n > 1$ แสดงถึงการดูดซับที่ดี (favourable adsorption)



รูป 1.7 ไอโซเทอร์มการดูดซับแบบฟรุนคลิช (Valancia และ Gloyna, 1972)

แม้ว่าจะกำจัดโปรตีนโดยการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์แล้ว ยังอาจพบการปนเปื้อนของสารที่มี น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งสามารถแยกออกได้โดยการใช้กระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน ซึ่งเป็น กระบวนการที่ใช้เยื่อแผ่นสำหรับแยกสารโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 1,000 ถึง 300,000 ดาลตัน ออกจากสารละลาย โดยเยื่อแผ่นที่ใช้เป็นเยื่อแผ่นไม่สมมาตรที่มีชั้นผิวหนา 0.1-2 ไมโครเมตร มีขนาดรูพรุน 20-200 Å หลักการของอัลตราฟิลเทรชัน คือ การให้ความดันแก่ สารละลายระหว่าง 1-10 บรรยากาศ ตัวทำละลายซึ่งส่วนมากคือ น้ำและสารโมเลกุลเล็กจะผ่านเยื่อ แผ่น ในขณะที่เดียวกันสารโมเลกุลใหญ่จะถูกกักไว้

1.4.4 กลไกการไหลผ่านเยื่อแผ่น (Kimura and Nakao, 1984)

แบบจำลองที่ใช้ในการวิเคราะห์กลไกการกรองแบบอัลตราฟิลเทรชันในระบบแบบไม่ ต่อเนื่อง (batch) สามารถแบ่งออกเป็นแบบจำลองต่างๆ ได้ดังนี้

1.4.4.1 concentration polarization model (รูปที่ 1.8)

สมบัติการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชันโดยทั่วไปแล้วจะแสดงด้วยอัตราเร็วการไหลผ่านเยื่อแผ่นของสารละลาย และค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชัน (rejection coefficient) ของตัวถูกละลาย อัตราการไหลผ่านเยื่อแผ่น (flux) คือ ปริมาตรของสารละลายที่ไหลผ่านทะลุเยื่อแผ่นต่อหนึ่งหน่วยเวลาต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่เยื่อแผ่น ส่วนค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชันโดยปกติจะนิยามด้วยสมการต่อไปนี้

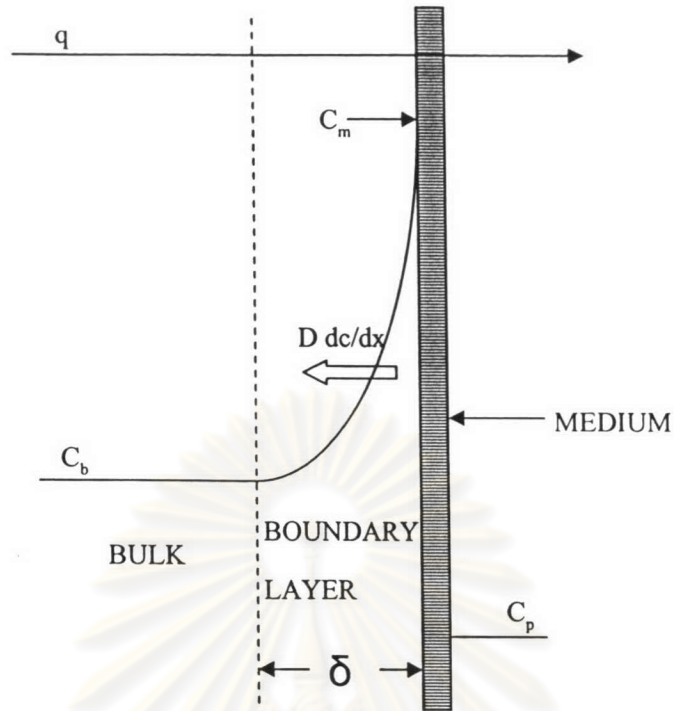
$$\sigma_{\text{obs}} = 1 - C_p/C_b \quad (1.8)$$

ค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชันนี้เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชันปรากฏ (σ_{obs}) ถ้า C_p คือค่าความเข้มข้นของเพอร์มิเอต และ C_b คือค่าความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้นก่อนการกรอง แต่ในการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน ตัวถูกละลายจะถูกพัดพาตามกระแสที่ไหลผ่านเยื่อแผ่นมาที่ผิวหน้าเยื่อแผ่น และถูกเยื่อแผ่นกักไว้ ทำให้เกิดการสะสมตัวอยู่บริเวณผิวหน้าเยื่อแผ่น ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายหน้าเยื่อแผ่นสูงกว่าความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น (bulk solution) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า concentration polarization ซึ่งมีอิทธิพลอย่างสูงต่อปรากฏการณ์การไหลผ่านเยื่อแผ่น

ผลของ concentration polarization ทำให้เยื่อแผ่นกักกันสารละลายที่มีความเข้มข้นที่เท่ากับความเข้มข้นที่ผิวหน้าเยื่อแผ่น (C_m) ดังนั้น ค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชันจริง (σ) จะแสดงได้ดังนี้

$$\sigma = 1 - C_p/C_m \quad (1.9)$$

ค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชันจริงนี้เป็นค่าสัมประสิทธิ์รีเจกชันที่แสดงสมบัติการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน แต่ในทางปฏิบัติไม่สามารถที่จะทำการวัดความเข้มข้นที่ผิวหน้าเยื่อแผ่นได้ รูปที่ 1.8 แสดงแบบจำลองของ concentration polarization ตัวถูกละลายจะถูกกักกันโดยเยื่อแผ่น ทำให้เกิดชั้นขอบเขต (boundary layer) ที่มี concentration gradient ระหว่างเยื่อแผ่นและ bulk solution และจาก concentration gradient นี้ จะทำให้ตัวถูกละลายแพร่กลับ (diffuse) ไปสู่ bulk solution เมื่อเข้าสู่ภาวะเสถียร ปริมาณตัวถูกละลายที่ถูกพาเข้ามาสู่เยื่อแผ่นจะเท่ากับผลรวมของปริมาณตัวถูกละลายแพร่กลับสู่ bulk solution และปริมาณที่ตัวถูกละลายไหลผ่านเยื่อแผ่น จากสมคูลมวลงจะแสดงได้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 1.8 concentration polarization model (Pradistsuwana, 1991)

$$q \cdot C = D \left(\frac{dC}{dx} \right) + q_s \tag{1.10}$$

ในที่นี้ q และ q_s คือ อัตราเร็วการไหลผ่านเยื่อแผ่น และอัตราเร็วการไหลของตัวถูกละลาย ค่า D คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusivity) ของตัวถูกละลาย ค่า C คือค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลาย ณ ตำแหน่งใดๆ

boundary condition ของภาวะเสถียรแสดงได้ดังนี้

$$x = 0, \quad C = C_m$$

$$x = \delta, \quad C = C_b$$

δ คือ ความหนาของชั้นขอบเขต (boundary layer) และ q_s สามารถแสดงได้ดังนี้

$$q_s = q \cdot C_p \tag{1.11}$$

เมื่ออินทิเกรตสมการ (1.10) โดยใช้ ภาวะขอบ (boundary condition) และสมการที่ (1.11) จะได้สมการที่เรียกว่า concentration polarization equation ดังสมการต่อไปนี้

$$q = k \ln [(C_m - C_p) / (C_b - C_p)] \quad (1.12)$$

ในที่นี้ k คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวล (mass transfer coefficient) ของตัวถูกละลายภายในชั้น concentration polarization ซึ่ง

$$k = D/\delta$$

1.4.4.2 gel polarization model (รูปที่ 1.9)

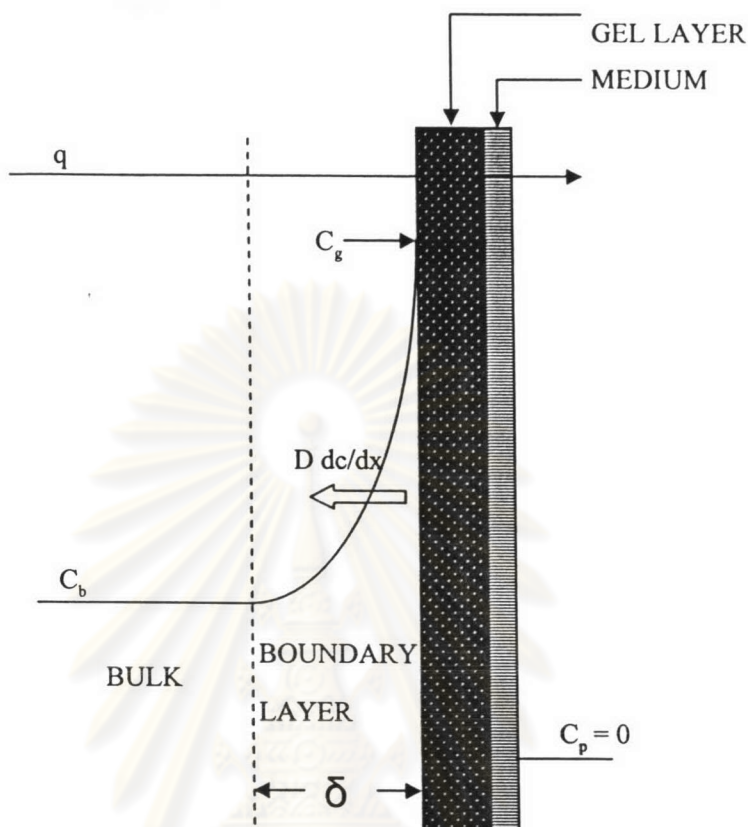
การกรองแบบอัลตราฟิลเตรชันนั้นโดยทั่วไปจะถูกนำไปประยุกต์ใช้กับสารละลายจำพวกโพลิเมอร์ ซึ่งมีค่า diffusivity ของตัวถูกละลายที่เป็นโพลิเมอร์ที่ต่ำ ทำให้ปริมาณตัวถูกละลายแพร่กลับเข้าสู่ bulk solution ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ concentration polarization model เป็นผลทำให้ความเข้มข้นหน้าเยื่อแผ่นมีค่าสูงมาก ความเข้มข้นที่สูงขึ้นนี้ เมื่อสูงจนถึงความเข้มข้นเจล (gel concentration) ของตัวถูกละลาย ก็จะเกิดเป็นชั้นที่เรียกว่า ชั้นเจลเหนือหน้าเยื่อแผ่น ซึ่งเจลนี้จะมีคุณสมบัติต้านทานต่อการไหลผ่านสูง ทำให้อัตราการไหลผ่านเยื่อแผ่นลดลงอย่างรวดเร็ว และหลังจากเกิดชั้นเจลนี้ขึ้นแล้ว ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความดันในการกรองให้สูงขึ้น ก็จะทำให้เพียงแต่ทำให้ความหนาของชั้นเจลสูงขึ้น แต่อัตราการไหลของเพอร์มิเอตผ่านเยื่อแผ่นจะไม่สูงขึ้น ค่าอัตราการไหลของเพอร์มิเอตจำกัด (limiting flux) q_{lim} ตามแบบจำลองนี้ จะแสดงได้ด้วยสมการที่ (1.13) โดยเปลี่ยน C_m เป็นความเข้มข้นของชั้นเจล C_g จะได้

$$q_{lim} = k \ln [(C_g - C_p) / (C_b - C_p)] \quad (1.13)$$

โดยทั่วไปแล้วค่าสัมประสิทธิ์เรย์ชันของตัวถูกละลายที่ก่อเป็นชั้นเจลนี้จะสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อเวลาเกิดเป็นชั้นเจลด้วยแล้ว ค่าสัมประสิทธิ์นี้จะมีค่าใกล้ 1 ดังนั้น

$$q_{lim} = k \ln (C_g - C_p) \quad (1.14)$$

อัตราการไหลผ่านเยื่อแผ่น ยังสามารถแสดงได้โดยใช้ความต้านทานการไหลผ่าน ถ้าให้ R_m เป็นค่าความต้านทานของแผ่นเยื่อที่มีต่อการไหลผ่าน มีนิยามดังต่อไปนี้



รูปที่ 1.9 gel polarization model (Pradistsuwana, 1991)

$$q_w = \frac{\Delta P}{\mu R_m} \quad (1.15)$$

ในที่นี้ q_w คืออัตราการไหลผ่านของน้ำบริสุทธิ์ ΔP คือความแตกต่างของความดันระหว่างผิวหน้าทั้งสองของเยื่อแผ่น μ คือความหนืดของสารละลาย และเมื่อมีชั้นเจลเกิดขึ้น ความต้านทานของชั้นเจล R_g เมื่อรวมเข้ากับความต้านทานของเยื่อแผ่น R_m ในแบบอนุกรมก็จะได้เป็นความต้านทานรวมที่มีต่อการไหลของเพอร์มิเอต ดังนั้น อัตราเร็วการไหลของเพอร์มิเอตที่ผ่านเยื่อแผ่นจะได้

$$q_{lim} = \frac{(\Delta P - \Delta \pi)}{\mu(R_m - R_g)} \quad (1.16)$$

ในที่นี้ $\Delta \pi$ คือ ความแตกต่างของความดันออสโมติคระหว่างผิวหน้าทั้งสองของเยื่อแผ่น แต่โดยปกติแล้วใน gel polarization model ค่า $\Delta \pi$ จะน้อยกว่าค่า ΔP มากจนตัดทิ้งได้ และในช่วงของ limiting flux ความต้านทานของชั้นเจลจะมากกว่าค่าความต้านทานของแผ่นเยื่อมาก ดังนั้น สมการที่ (1.16) จึงเขียนใหม่ได้ดังนี้

$$q_{lim} = \frac{\Delta P}{\mu R_g} \quad (1.16)$$

1.5 การสูญเสียสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกสามารถถูกทำลายได้โดยปัจจัยทั้งทางด้านกายภาพและเคมี เช่น ความร้อน แรงเฉือน (shear rate) ความดัน อัลตราโซนิก รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีแกมมา ค่าความเป็นกรด-ด่าง การเกิดออกซิเดชัน (oxidation) โดยมีไอออนของโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ เป็นต้น (Pigman และคณะ, 1961; Balazs, 1979; Milena และคณะ, 1994; Rehakova และคณะ, 1994; Zu และคณะ, 1997; Gura และคณะ, 1998)

Pigman และคณะ (1961) มีรายงานว่า การเติมแอลกอฮอล์ร้อยละ 5-10 ในสารละลายระหว่างการเตรียม lyophilization สามารถยับยั้งการทำลายกรดไฮยาลูโรนิกได้

Eric และคณะ (1993) มีรายงานว่าแรงเฉือนที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยแรงเฉือนมีผลทำให้ความหนืดลดลง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกด้วย กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นของกรดมาก แรงเฉือนทำให้ความหนืดของกรดลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ในที่ความเข้มข้นของกรดต่ำแรงเฉือนจะส่งผลทำให้ความหนืดลดลงอย่างช้าๆ

Brown และคณะ (1994) มีรายงานว่า การใช้อุณหภูมิสูงส่งผลทำให้ความหนืดของกรดไฮยาลูโรนิกลดต่ำลง

Karen และ Ellington (1994) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของกรดไฮยาลูโรนิก พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่ำลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียส

Homer และคณะ (1994) ได้รายงานว่าผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จากการย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ปลายรีดิวซ์ของ N-acetylglucosamine ด้วยไฮยาลูโรนิกเดสจากแบคทีเรียคือน้ำตาล โมเลกุลคู่ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 4,5 ของ glucuronosyl residue

Rehakova และคณะ (1994) มีรายงานว่าโซเดียมไฮยาลูโรเนตสามารถถูกทำลายได้โดยคลื่นเสียงความถี่สูงที่กระบวนการตัดสายมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ขณะที่แสงอัลตราไวโอเล็ตมีกระบวนการตัดสายโดยความสัมพันธ์นั้นไม่ได้เป็นแบบเส้นตรง และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ทำให้ได้โมเลกุลน้ำตาลสายสั้นๆ

Zu และคณะ (1997) มีรายงานว่า การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไฮยาลูโรนิกถูกยับยั้งโดยเอนไซม์แคตาเลส hydroxyl radical scavengers และสารคีเลทไอออนโลหะ (metal ion chelators)

Miyazaki และคณะ (1998) มีรายงานว่าที่ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกต่างกัน เมื่อให้แรงเฉือนเท่ากันในเวลาเท่ากัน ส่งผลให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลลดลงในอัตราที่ต่างกัน โดยกรดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าจะมีอัตราการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลมากกว่ากรดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า นอกจากนี้เมื่อให้อัตราเฉือนที่ 20 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.001 โมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือสูง

Gura และคณะ (1998) มีรายงานว่าเมื่ออัตราการย่อยสลายจากปัจจัยทั้งทางกายภาพและเคมีมากขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดสูงขึ้น และจากการศึกษาค่าความเป็นกรดค้างที่มีผลต่อความหนืดพบว่าค่า intrinsic viscosity คงที่ตลอดเมื่อค่าความเป็นกรดค้างอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 11.0 โดยที่ค่าความเป็นกรดค้างน้อยกว่า 5.0 และมากกว่า 11.0 กรดจะแตกตัวได้โดยการไฮโดรไลซิส

1.6 ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกที่นำมาใช้ในวงการแพทย์และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีมาตรฐานความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกที่ใช้ในทางการแพทย์เปรียบเทียบกับที่ใช้ในเครื่องสำอางแสดงได้ดังตารางที่ 1.1 ทางทางการแพทย์มีความต้องการความบริสุทธิ์ของกรดสูงโดยมีปริมาณกรดร้อยละ 88-92 (Ellwood และคณะ, 1996 ; Nimrod และคณะ, 1988) เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย ตัวอย่างการนำกรดไฮยาลูโรนิกมาใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน (Kjems และ Lebeck, 1976) ใช้แทนวุ้นน้ำตาลในการผ่าตัดตา ใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา ใช้รักษาการอักเสบของข้อต่อ (Balazs, 1979) ใช้ในการรักษาบาดแผล (Morita และ Fujii, 1991) โดยในการผ่าตัดตาจะใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1.5×10^5 ถึง 5×10^6 คาลตัน การนำไปใช้ในการรักษาการอักเสบของข้อต่อจะใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5.0×10^5 ถึง 2.6×10^6 คาลตัน และการนำไปใช้ในการรักษาบาดแผลจะใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุล 0.9×10^5 ถึง 1.6×10^5 คาลตัน (Lapcik และคณะ, 1998) นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิกยังสามารถใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิว เพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผิว (Nimrod และคณะ, 1988) ในปัจจุบันพบว่ากรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวที่ดีที่สุดของตลาด โดยจะใช้กรดไฮยาลูโรนิกร้อยละ 0.05-0.3 โดยน้ำหนักผสมในผลิตภัณฑ์จำพวกครีม โลชั่น ลิปสติก เป็นต้น (อรัญญา มโนสร้อย และ จิรเดช มโนสร้อย, 2543) ซึ่งการนำไปใช้พบว่า ในปี ค.ศ.2002 มูลค่าทางการตลาดทั่วโลกมีค่าถึงสองหมื่นหนึ่งพันล้านบาท โดยสัดส่วนของสินค้าในทางการแพทย์มีมูลค่าประมาณหนึ่งหมื่นเจ็ดพันล้านบาท และในส่วนของเครื่องสำอางมีมูลค่าสี่พันล้านบาท (Novozymes, 2002) การประยุกต์ใช้ของกรดไฮยาลูโรนิกแสดงดังตารางที่ 1.2

1.7 มุมเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ปัจจุบัน กรดไฮยาลูโรนิกมีการนำไปใช้งานทั้งในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากคุณสมบัติที่มีความหนืดสูง ไม่มีสี มีความยืดหยุ่น สามารถเก็บรักษาความชุ่มชื้นได้ดี ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกที่มีจำหน่ายอยู่ในตลาดผลิตมาจาก 2 แหล่ง คือ หงอนไก่ และโดยการหมักของ

จุลินทรีย์ เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์มีข้อดีคือ ใช้เวลาน้อย ผลผลิตสูง และต้นทุนต่ำ ดังนั้นจึงเลือกใช้จุลินทรีย์ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 32547 ได้สายพันธุ์ UN-7 ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงกว่าเดิมร้อยละ 33.33 (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) ต่อมาอนุภาค บัวเขียว (2544) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมัก อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการทำกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อนี้ให้บริสุทธิ์เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปใช้งานต่อไป งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตจากกระบวนการหมัก โดยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ให้บริสุทธิ์ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ ได้แก่ การกำจัดโปรตีนโดยใช้กรดไตรคลอโรอะซิติกเปรียบเทียบกับการใช้ด่างมันด์ การกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน นอกจากนี้ยังศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ ซึ่งปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ และความเร็วรอบของการกวนสารแขวนลอยกรดไฮยาลูโรนิก และปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดค่า และผลของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเอส

ตารางที่ 1.1 การเปรียบเทียบสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกที่ใช้ทางการแพทย์กับที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Nimrod และคณะ, 1988)

สมบัติ	ทางการแพทย์	เครื่องสำอาง
ปริมาณกรด	88-92%	87-91%
อัตราส่วน A/B	1/1	1/1
ปริมาณน้ำ	8-12%	8-12%
ปริมาณโปรตีน	<.001%*	<.0.1%
ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์	4-6%	4-6%
ปริมาณซัลเฟต	<.001%	<.0.05%
ปริมาณกรดนิวคลีอิก	<.0.02%*	<.0.5%
การระคายเคืองของผิวหนัง	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่เกิด
ปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลาง	<.0.2%*	ไม่ได้ทดสอบ
การทำให้เกิดความร้อน	ไม่เกิด	ไม่ได้ทดสอบ
การทำให้เกิดการอักเสบ	ไม่เกิด	ไม่ได้ทดสอบ

หมายเหตุ * หมายถึง ไม่สามารถวัดได้

A หมายถึง กลูโคโรนิก

B หมายถึง เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน

ตารางที่ 1.2 การนำกรดไฮยาลูโรนิกไปใช้ในตลาดยุโรปและอเมริกา (Lapcik และคณะ, 1998)

ผลิตภัณฑ์	แหล่ง	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักโมเลกุล (คาลตัน)	บริษัท	การนำไปใช้
Amo Vitrax		3.0		Allergan	ผ่าตัดตา
Amvisc	หรงอนไก่	1.2	2×10^6	Chiron	ผ่าตัดตา
Amvisc Plus	หรงอนไก่	1.6	1.5×10^6	Chiron	ผ่าตัดตา
Aquaderm				Baker Cummins	รักษาโรคผิวหนัง
ARTZ	หรงอนไก่	1.0	$6-12 \times 10^5$	Seikagaku	รักษาโรคไขข้อ อักเสบ
Bionect		0.2		Fidia	รักษาบาดแผล
Connettivina	หรงอนไก่	0.2	$0.9-1.6 \times 10^5$	Biofarma	รักษาบาดแผล
Cytistat				Bioniche	รักษาโรคกระเพาะ ปัสสาวะ
Eyestil		0.5		Ophthapharma	ผ่าตัดตา
Healon	หรงอนไก่	1.0	4×10^6	Pharmacia	ผ่าตัดตา
Healon GV	หรงอนไก่	1.4	5×10^6	Pharmacia	ผ่าตัดตา
Healonid	หรงอนไก่			Pharmacia	ผ่าตัดตา
Hyalart		1.0		TRB	รักษาไขข้ออักเสบ
Hyalgen	หรงอนไก่	1.0	$5-7.3 \times 10^5$	Fidia	รักษาไขข้ออักเสบ
Hyalistil		0.2		Sifi	ผ่าตัดตา
Hylumed		0.1-1.0		Genzyme	รักษาบาดแผล
IAL	หรงอนไก่	1.0	9×10^5	Fidia	ผ่าตัดตา
Ialugen		0.05		Ibsa	รักษาบาดแผล
Jossalind		0.2		Jossa	รักษาบาดแผล
Microvisc		1.0		Bohus Bio Tech	ผ่าตัดตา
Opegan	หรงอนไก่	1.0	1.5×10^5	Seikagaku	ผ่าตัดตา
Opelead	แบคทีเรีย	1.0	2.6×10^6	Seikagaku	รักษาไขข้ออักเสบ
Ophthalin		1.0		Ciba-Geigy	ผ่าตัดตา
Provisc				Alcon	ผ่าตัดตา
Synvisc		0.8		Biomatrix	รักษาไขข้ออักเสบ
Viscoat	แบคทีเรีย	3.0	5×10^5	Cilco	ผ่าตัดตา
Vitrax	หรงอนไก่	3.0	7×10^5	Allergan	ผ่าตัดตา