

การพัฒนาผลจากวัสดุภายในประเทศเพื่อใช้ในเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

20.8.2534

ปริญญานิพนธ์
ของ
คุณาภรณ์ รัศมีมารี

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

กรกฎาคม 2534

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุม และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม



.....ประธาน

(ดร. สายสนม ธรรมนิทกซ์)

.....กรรมการ

(อ. นกมล พิกมณี)

คณะกรรมการสอบ



.....ประธาน

(ดร. สายสนม ธรรมนิทกซ์)

.....กรรมการ

(อ. นกมล พิกมณี)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศ. ดร. สมพร บัวทอง)

วันที่...28...เดือน...สิงหาคม...พ.ศ...2534.....

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก
ดร. สายสนม อรรถนิทก์ อ. นฤมล นกมณี ดร. ชวดี นาคะผดุงรัตน์
รศ. เกษร พะลัง รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และคณาจารย์ทุกท่าน ผู้วิจัยขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รศ. นพ. ศุภวัฒน์ ชติวงศ์ ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์
สภากาชาดไทย ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวง
วิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และพลังงาน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านทุนช่วยวิจัย

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัย
ประเภททั่วไป กับงานวิจัยนี้ ประจำปี 2532

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ที่ให้อำลังใจและให้ความช่วยเหลือแก่
ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา รวมทั้งผู้มีพระคุณทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือใน
ด้านต่างๆจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยอย่างสมบูรณ์

คณาภรณ์ รัศมีมารีย์

กรกฎาคม 2534

สารบัญ

บทที่

หน้า

1 บทนำ	1
การสำรวจงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง	1
ทฤษฎีและแนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	5
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	10
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	10
ขอบเขตของการวิจัย	10
ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	11
2 ทฤษฎีที่ใช้เป็นหลักในการศึกษา	
การแบ่งชนิดของโครมาโตกราฟี	12
เอ็กซ์คลูชันโครมาโตกราฟี	15
เจลฟิลเตรชัน	16
3 วิธีการวิจัย	
ขั้นตอนในการผลิตเจล	24
ขั้นตอนในการคัดขนาดเจล	29
ขั้นตอนการพัฒนาเจลที่ผลิตขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมี	31
ขั้นตอนการทดสอบคุณภาพเจล	36
ขั้นตอนการแยกโปรตีนพืชเขียวหางไหม้ชนิดทองขาว และพืชเขียวหางไหม้ชนิด ทองเขียว	43

4 ผลการวิจัย

ผลการผลิตเจล	46
ผลการคัดขนาดเจล	52
ผลการพัฒนาเจลที่ผลิตขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมี	53
ผลการทดสอบคุณภาพเจล	58
ผลการแยกโปรตีนพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองขาว และพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองเขียว	63

5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลและอภิปรายผล	68
ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม	74
ภาคผนวก	79
อภิธานศัพท์	82
ประวัติผู้วิจัย	86

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงองค์ประกอบทางเคมีของแป้งถั่วเขียว	6
2	แสดงชนิดของโครมาโตกราฟี	14
3	แสดงตัวอย่างและชนิดของเซฟาเด็กซ์	18
4	แสดงอัตราการไหลสูงสุดและความดันที่เหมาะสมของเซฟาเด็กซ์ชนิดต่างๆ ..	23
5	แสดงการใช้แป้งถั่วเขียวและวันเบอร์ 2 ปริมาตรของสารละลายอินทรีย์ผสม และชนิดของสารที่ทำให้ยู่ตัว	27
6	แสดงปริมาณสารที่ใช้และสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันในการเชื่อมไข้วด้วย ไดไวนิล ซัลโฟน	34
7	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเชื่อมไข้วด้วยอินคลอโรไอดริน	36
8	แสดงปริมาตรของโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนรีเอเจนต์ และสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในแต่ละหลอดทดลอง	42
9	แสดงผลของการใช้แป้งถั่วเขียวและวันเบอร์ 2 ปริมาตรของสารละลาย อินทรีย์ผสม และชนิดของสารที่ทำให้ยู่ตัว	48
10	ผลของความเร็วของเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ต่อลักษณะรูปร่างของเจล	50
11	แสดงผลของปริมาณสารที่ใช้ในการเชื่อมไข้วด้วยอินคลอโรไอดริน	57
12	แสดงสภาวะคอลัมน์ของเจล XVI เจล XXI และเจล XXVII เปรียบเทียบกับ เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100	59
13	แสดงเปอร์เซ็นต์รีคอนเวอร์ซี จากคอลัมน์ชนิดต่างๆ	67

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงส่วนหนึ่งของโครงสร้างอะไมโลสและอะไมโลเพคติน	7
2	แสดงโครงสร้างของอะกาโรไซโอส	8
3	แสดงกลไกการเกิดเจลของอะกาโรส	9
4	แสดงรูพรุนของเจลที่มีผลสารโมเลกุลขนาดเล็กเดินทางออกจากคอลัมน์ได้ช้า	15
5	แสดงส่วนหนึ่งของโครงสร้างเซฟาเด็กซ์	17
6	อธิบายความหมายของ V_e , V_0 และ V_m	19
7	อธิบายหลักการเจลอิลเตรชัน	20
8	แสดงจุดที่จะวัดความดันที่เหมาะสม	22
9	แสดงชุดอุปกรณ์ในการคั่นขนาดโดยอาศัยการไหล	31
10	แสดงการบรรจุเจลลงในคอลัมน์	39
11	แสดงเจล I	46
12	แสดงเจล II	47
13	ก. แสดงเจล IX ข. แสดงเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100	49
14	แสดงเจล XIII ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที	51
15	แสดงเจล XIV	52
16	แสดงเจล XIII	53
17	แสดงเจล XVII	55
18	แสดงเจล XVIII	55
19	แสดงเจล XXI	56
20	แสดงเจล XXVII	58

- 21 ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานคือ เฟอรัรีติน อัลโดเลส และอัลบูมิน โดย
(ก) เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข) เจล XXI บรรจุใน
คอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค) เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56
ซม. เปรียบเทียบกับ (ง) เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด
1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม. ต่อ ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ
2.5 ลบ.ซม. 61
- 22 ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานคือ คาตาเลส อัลโดเลส อัลบูมิน
โคโมทรูปซีโนเจน เอ และโรโบนิวคลีเอส เอ โดย (ก) เจล XVI บรรจุ
ในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข) เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม.
(ค) เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ
(ง) เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล
10.23 ลบ.ซม. ต่อ ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 2.5 ลบ.ซม. 62
- 23 ผลการแยกซีรัมของคน โดย (ก) เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม.
(ข) เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค) เจล XXVII บรรจุ
ในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ (ง) เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100
บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม. ต่อ ชม.
เก็บแยกส่วนหลอดละ 2.5 ลบ.ซม. 63
- 24 ผลการแยกพิษงูเขียวทางไหม้ชนิดทองขาว โดย (ก) เจล XVI บรรจุในคอลัมน์
ขนาด 1x65 ซม. (ข) เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม.
(ค) เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ
(ง) เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล
10.23 ลบ.ซม. ต่อ ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 1.0 ลบ.ซม. 65

- 25 ผลการแยกนิษุเขี้ยวทางไหม้ชนิดท้องเขี้ยว โดย (ก) เจล XVI บรรจุใน
คอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข) เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม.
(ค) เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ
(ง) เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล
10.23 ลบ.ซม. ต่อ ซม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 1.0 ลบ.ซม. 66

บทที่ 1

บทนำ

ในชีวิตประจำวันมนุษย์ต้องเกี่ยวข้องกับสารหลายชนิด สารแต่ละชนิดมีลักษณะการใช้ประโยชน์และการเกิดโทษที่แตกต่างกัน สารบางชนิดสามารถบอกได้ทันทีว่ามีองค์ประกอบอะไรบ้าง แต่บางชนิดไม่สามารถบอกได้ จึงมีการวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบของสาร สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์มีสิ่งเจือปนอยู่เสมอ ดังนั้นก่อนทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องแยกสารที่สนใจออกจากสิ่งเจือปนก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการวิเคราะห์ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการศึกษาเทคนิคและวิธีการแยกสารจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี เทคนิคการแยกสารมีอยู่หลายวิธีเช่น การแยกโดยการตกตะกอน (separation by precipitation) การแยกโดยการทำให้กลายเป็นไอ (separation by volatilization) การแยกโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย (separation by solvent extraction) และการแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟี (separation by chromatography) เป็นต้น สำหรับการแยกสารโดยอาศัยขนาดของโมเลกุลนั้นมีอยู่หลายวิธีเช่น การแยกโดยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) อุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และอุลตราเซนตริฟิวเกชัน (ultracentrifugation) เป็นต้น แต่ 3 วิธีนี้ต้องใช้เวลานาน มีความสามารถในการแยกต่ำ

มีผู้คิดค้นวิธีการแยกสารโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นทางโครมาโตกราฟี โดยในปี 1956 เลทเธอร์เวนได้ทำการแยกสารและคัดแยกขนาดโมเลกุล ด้วยคอลัมน์แบ่งจากแป้งมันฝรั่งและแป้งข้าวโพด ผลปรากฏว่าคอลัมน์แป้งมันฝรั่งที่ขบมั่วในสารละลายบัฟเฟอร์สามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 100-1,000 ได้ ส่วนคอลัมน์แป้งข้าวโพดที่ขบมั่วด้วยความร้อน สามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1,300-150,000 ได้ และใช้คอลัมน์นี้ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของอินซูลิน (insulin) และไมโอโกลบิน (myoglobin) ของวัวได้ประมาณ 6,000 และ 35,000 ตามลำดับ (Lathe and Ruthven.1956)

แต่คอลัมน์แบ่งไม่อยู่ตัวและมีความต้านทานต่ออัตราการไหลสูง จึงมีการเตรียมเจลโดย
 เชื่อมไขว้เด็กซ์แทรนซึ่งเป็นสายของพอลิแซคคาไรด์ได้เกิดเป็นตาข่ายของโมเลกุลใหญ่ขึ้น
 เจลที่ได้อายุตัวมากและไม่ละลายในสารละลายที่เป็นเบสและกรด เจลนี้สามารถแยกสารที่มี
 น้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกันได้ และมีขอบเขตในการแยกสารกว้าง (wide limits)
 โดยสารที่มีโมเลกุลใหญ่เกินขนาดรูพรุนของเจลจะไม่สามารถลอดเข้าไปในเนื้อเจล แต่สาร
 ที่มีขนาดเล็กสามารถลอดเข้าไปในเนื้อเจลได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น บริษัทฟาร์มาเซีย
 (Pharmacia Ltd.) จึงผลิตเจลเด็กซ์แทรนที่ผ่านการเชื่อมไขว้ภายใต้ชื่อเซฟาเด็กซ์
 (Sephadex) นำมาใช้ในการแยกสารที่ละลายได้ในน้ำ และแยกสารได้อย่างรวดเร็วเรียก
 เทคนิคนี้ว่า เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) เป็นวิธีที่ง่ายและใช้กันอย่างกว้างขวาง
 (Porath and Flodin, 1959) ต่อมาในปี 1961 พอลสันสามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล
 ต่างๆกันบนคอลัมน์ของเม็ดวุ้น (granulated agar) โดยเตรียมเจลจากวุ้นดิสโก (difco
 agar) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และคัดขนาดตามที่ต้องการ สามารถแยกโปรตีน
 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 13,000 ถึงหลายล้านได้ (Polson, 1961) และเจลวุ้นสามารถ
 แยกไวรัสพืช (plant viruses) ให้บริสุทธิ์ได้ (Čeek, 1962) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์
 ระหว่างความเข้มข้นของวุ้นที่นำมาทำเจลกับขนาดของรูพรุน พบว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ
 ขนาดรูพรุนจะใหญ่ ทำให้สามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าเจลที่มีความเข้มข้นสูง
 ขนาดรูพรุนจะเล็ก (Andrews, 1962 ; Steere and Ackers, 1962)

ต่อมาเจอร์เกินและมอสบาคได้ทำการเชื่อมไขว้อะคริลละไมด์เจล (acrylamide)
 ด้วย เอ็น.เอ็น-เมทิลีน บิสอะคริลละไมด์เจล (N,N-methylene bisacrylamide)
 สามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงประมาณ 200 ถึง 1 ล้านได้ สามารถแยกสาร
 ที่มีโมเลกุลใหญ่ออกจากสารที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น แยกโปรตีนออกจากกรดอะมิโน
 และแยกไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) น้ำหนักโมเลกุล 300,000 ได้เป็นต้น
 (Hjertén³, 1962 ; Hjertén and Mosbach, 1962) ในปีเดียวกันเจอร์เกิน
 ได้เตรียมสารแขวนลอยของอะกาโรสและวุ้น โดยให้ความร้อนและทำให้เย็นในขณะที่มี

การกวนตลอดเวลา เพื่อเป็นตัวกลางบรรจุในคอลัมน์ เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับแยกส่วนของเซลล์เช่นไรโบโซม (ribosome) และ เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้นสูง 5-15 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับแยกโปรตีนต่างๆ (Hjertén², 1962)

ในปี 1964 เจอร์เทินได้เตรียมเจลที่มีทรงกลมจากอะกาโรสและวุ้น โดยใช้ สารละลายอินทรีย์ที่มีสารทำให้อยู่ตัวซึ่งไม่ละลายน้ำ (hydrophobic stabilizer) พบว่าเจลที่เตรียมได้มีอำนาจในการแยกสูงขึ้นเมื่อมีขนาดเล็กลง มีความแข็งแรงมากแม้ว่า ความเข้มข้นของวุ้นหรืออะกาโรสมีเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแยกสารที่มีขนาด โมเลกุลใหญ่กว่าเมื่อใช้เจลเด็กซ์แทรนหรือพอลิอะคริลละไมด์เจลในการแยก (Hjerten, 1964) และมีการเตรียมเจลวุ้นอีกวิธีหนึ่ง โดยการฉีดสารละลายวุ้นที่ร้อนภายใต้ความดัน เข้าไปในอีเทอร์ที่เย็นจัด (icecold ether) เจลที่ได้มีอัตราการไหลสูง และนำมาแยก ไวรัสสัตว์ได้ (Bengtsson and Philipson, 1964)

เนื่องจากวุ้นมีอะกาโรเพคตินเป็นองค์ประกอบที่มีประจุลบ เพราะมีหมู่ซัลเฟตและ หมู่อื่น ๆ ที่มีประจุลบในปริมาณมาก เมื่อนำวุ้นมาผลิตเป็นเจลจึงทำให้เกิดการจับกันระหว่าง เจลกับโปรตีน ดังนั้นจึงมีการกำจัดหมู่ซัลเฟตของเจลวุ้นและอะกาโรส โดยใช้สารละลาย อัลคาไลน์ที่มีโซเดียมบอโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยา รีดักชันด้วย ลิเทียมอะลูมิเนียมไฮไดรด์ (lithium aluminium hydride) ใน ไดออกเซน (dioxane) เพื่อกำจัดหมู่คาร์บอกซิลิกของเจลวุ้นและอะกาโรส พบว่าการ จับกันระหว่างเจลกับโปรตีนลดลง ทำให้สมบัติการให้โมเลกุลลอดผ่านของเจล และอัตรา การไหลดีขึ้น สามารถทำให้แห้งโดยการแช่แข็ง และแช่ในน้ำได้โดยเจลไม่ถูกทำลาย แต่เจลที่ได้จะมีความคงทนเบสแก่และอุณหภูมิสูงได้น้อย (Porath, Janson and Laàs, 1971; Laàs, 1972)

การเชื่อมไขว้ (cross-linking) อะกาโรสด้วย ไดไวนิล ซัลโฟน (divinyl sulphone) ทำให้ได้เจลใหม่ที่ดีกว่าเจลอะกาโรสที่ไม่ได้เชื่อมไขว้สำหรับโครมาโตกราฟีและตรึงเอนไซม์ เพราะได้เจลที่แข็งแรงกว่าและอัตราการไหลสูงกว่าทนต่อการคั่งและทนต่ออุณหภูมิในหม้ออบความดัน (autoclave) (Porath and others.1975) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อปรับความเข้มข้นของตัวรีติวซ์ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบสในกระบวนการเชื่อมไขว้จะทำให้ได้เจลที่มีการดูดซับต่ำ ความแข็งแรงสูงและอัตราการไหลสูงเหมาะสำหรับโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography) (Hjerten and others.1987)

นอกจากการผลิตเจลเพื่อแยกสารโดยอาศัยขนาดของโมเลกุลแล้ว ยังมีการผลิตเจลสำหรับการแยกสารโดยอาศัยประจุ เช่นในเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยการทำอะเซทิลเลทอะกาโรส (Hjerten.1961) หรือตกตะกอนอะกาโรเพคตินออกจากอะกาโรสด้วยเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyridinium chloride) เพื่อให้ได้เจลที่มีการดูดซับต่ำ (Hjerten'.1962) การสังเคราะห์ ดีอีเออี-อะกาโรส (DEAE-agarose) เพื่อใช้ในโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงสำหรับไอออนเอ็กซ์เชน (high-performance ion-exchange chromatography) พบว่าสภาวะในการเกิดปฏิกิริยารุนแรงมาก ทำให้อะกาโรสสูญเสียสภาพทางเคมี และอัตราการไหลต่ำ (Mikes, Štárop and Zbrožer. 1979) จึงมีการสังเคราะห์ ดีอีเอเอพี-อะกาโรส (DEAHP-agarose) และ คิวเออี-อะกาโรส (QAE-agarose) เพื่อใช้ในโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงสำหรับแอนไอออนเอ็กซ์เชน (Yao and Hjerten.1987) ในสภาวะที่ง่ายและไม่รุนแรง ทำให้อะกาโรสไม่สูญเสียสภาพหรือมีอัตราการไหลต่ำ เจลที่ได้มีขนาดเล็ก ใช้ความหนาแน่นของลิแกนด์ต่ำ (low-ligand density) และพิกที่ต่ำสมควร เช่นเดียวกับที่เจอร์เทินและคณะได้ทดลองไว้ (Hjerten, Yao, Eriksson and Johansson.1986) เจลที่ผลิตได้สามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นต่างๆ เช่นการแยกเซลลูเลส (cellulase) บนดีอีเอเอพี-อะกาโรส-แอลได้ดีกว่าดีอีเออี-อะกาโรส ซึ่งมีตัวชะที่มี

ความเข้มข้นต่างๆเหมือนกัน (Bhikhabnai, Johanasson and Petterson. 1984)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาค้นคว้าและวิจัยเพื่อพัฒนาเจลจากวัสดุในประเทศบ้าง เช่น ได้มีการเตรียมเม็ดวุ้นและเม็ดวุ้นแม่เหล็กในสารละลายอินทรีย์ผสม ที่มีสารลดแรงตึงผิวของน้ำและของน้ำมันชนิดต่างๆ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเม็ดเจลที่ได้มีรูปร่างทรงกลม (อารีรัตน์ สาข. 2529) ต่อมา มีการเตรียมเจลจากเม็ดสาคุ โดยการลวกและทำให้เย็นทันที แล้วด้วยอัลกอฮอล์ผสมบัฟเฟอร์ พบว่าเจลที่ได้สามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันมากๆ ได้ไม่ติดกัน (มนตรี ตรีธมวุฒิทรัพย์ และ จิตติมา ทองใบ . 2529) การผลิตเจลจากวุ้นเส้นที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวโดยการอะเซทิลเลท (acetylation) พบว่าสามารถแยกสารออกจากกันได้แต่ยังไม่สมบูรณ์ (จารุวรรณ อารีย์พันธุ์ และ วิจิตร ชัยกิตติวัฒน์ . 2529) เมื่อนำวุ้นเส้นมาทำปฏิกิริยากับอีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) ปรากฏว่ามีแนวโน้มที่จะพัฒนาคุณภาพของเจลให้ดีขึ้น จนอาจมีคุณภาพใกล้เคียงกับมาตรฐานได้ (เรืองกิตติ กนกปรีชาวุฒิ. 2530) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการผลิตเจลโดยนำแป้งถั่วเขียวมากวนให้เหนียว แล้วเติมลงไปในสารละลายอินทรีย์ที่มีสารทำให้เยือกตัว พบว่าสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันได้ดี เมื่อนำเจลมาทำการเชื่อมไขว้ด้วย ไดไวนิล ซัลโฟน พบว่าสมบัติทางกายภาพดีขึ้น และแยกสารตัวอย่างได้ดีกว่าเจลที่ยังไม่ได้ผ่านการเชื่อมไขว้ (อนุชัย วักกิตเพชร . 2531)

ทฤษฎีและแนวคิดที่จะนำมาใช้ในงานวิจัย

เทคนิคการแยกสารโดยใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลมีอยู่หลายวิธีดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น แต่ปัจจุบันนี้เทคนิคที่นิยมกันมากคือเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) ซึ่งมักจะใช้เซฟาเด็กซ์ (Sephadex) เซฟาคริล (Sephacryl) หรือเซฟาโรส (Sepharese) เป็นตัวกลางในการแยก (Pharmacia Fine Chemicals AB . 1982-3) ตัวกลางเหล่านี้เป็นเจลที่มีความเสถียรต่อสภาวะแวดล้อมเป็นอย่างดี จึงนิยม

นำมาใช้เป็นเจลมาตรฐาน แต่เนื่องจากสารเหล่านี้มีราคาแพงและต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีการนำสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางธรรมชาติที่มีราคาถูก เช่นมันสำปะหลัง (*Manihot exculenta* crantz) และถั่วเขียว (*Phaseolus aureus*) เป็นต้น มาใช้ในการผลิตสารที่สามารถนำมาใช้กับงานแยกสารทางชีวเคมี โดยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน โดยเฉพาะถั่วเขียวเป็นแหล่งสะสมอาหารที่สมบูรณ์ โดยประกอบด้วยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ภายในเมล็ดประมาณ 64.12 เปอร์เซ็นต์ ดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียว

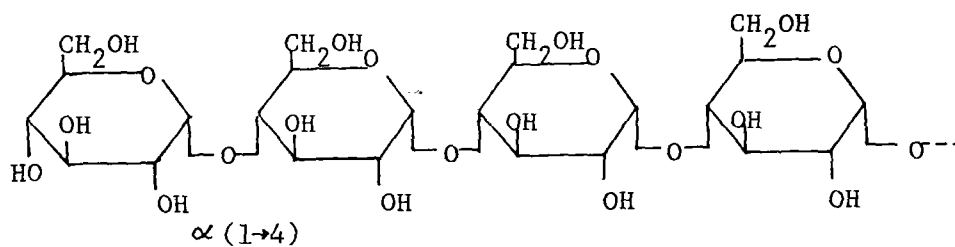
ส่วนประกอบ	องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียว (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)
โปรตีน	25.98
เถ้า	3.80
กาก	4.79
ไขมัน	1.30
คาร์โบไฮเดรต	64.12

สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ภายในเมล็ดนั้น จะอยู่ในรูปพอลิแซ็กคาไรด์ประมาณ 46-54 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในรูปน้ำตาลประมาณ 4-10 เปอร์เซ็นต์ พอลิแซ็กคาไรด์ของถั่วเขียวประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) ประมาณ 20-28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอะกาโรสเป็นสายตรงของ แอลฟา(1-4)กลูโคไพราโนส ($\alpha(1-4)$ glucopyranose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นโซ่กิ่งแบบแรนดอมของ แอลฟา(1-4)กลูโคไพราโนส ($\alpha(1-4)$ glucopyranose unit) ซึ่งมีส่วนที่เป็นสายข้าง (side chain) เกิดขึ้นด้วยพันธะ 1,6 (1,6 linkage)

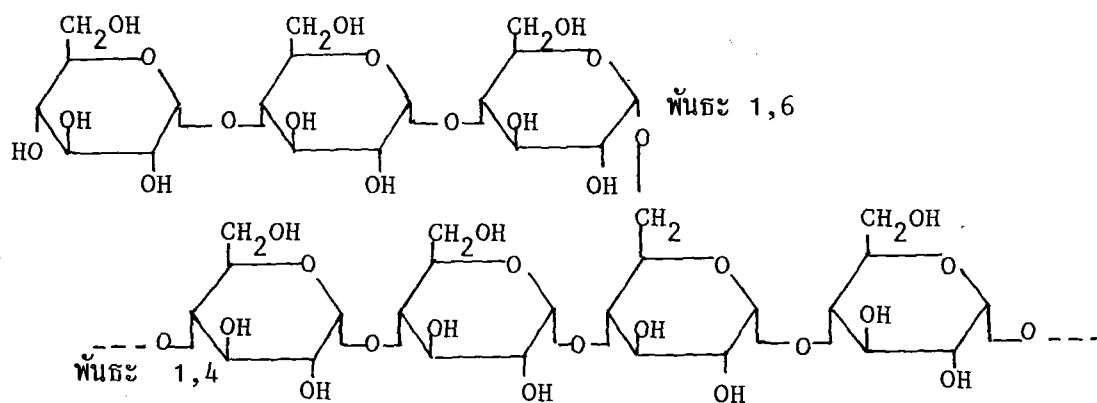
(สมชาย ประภาวัต และวิเชียร วรพทพร.2528 ; พงษ์จันทร์ จันทยศ.2529)

ดั่งภาพประกอบ 1

อะไมโลส



อะไมโลเพคติน

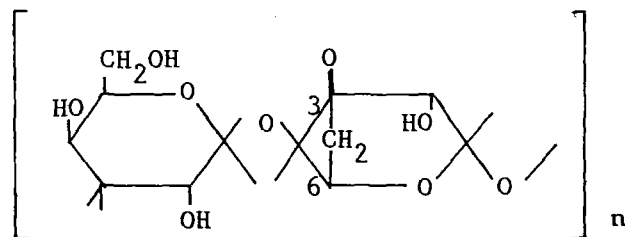


ภาพประกอบ 1 แสดงส่วนหนึ่งของโครงสร้างอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

สมบัติการเกิดเจลของแป้งขึ้นอยู่กับส่วนที่เป็นอะไมโลส ซึ่งมีโครงสร้างที่เหมาะสมแก่การเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลข้างเคียงและสร้างโครงข่าย 3 มิติ อะไมโลเพคตินมีลักษณะเป็นกิ่งก้านมากมายทำให้โมเลกุลเข้ามาเรียงชิดกันไม่ได้ จึงเกิดเจลไม่ได้ โดยทั่วไปการเกิดเจลของแป้งเกิดขึ้นเมื่อ ให้ความร้อนแก่สารละลายแป้งจนมีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิการเกิดเจลของแป้ง จากนั้นทำสารละลายที่เป็นเจลาตินให้เย็นตัวลง การเร่งขบวนการนี้ทำได้โดยทำแป้งให้สุก แล้วนำแป้งที่มีลักษณะเหมือนโคลน (starch slurry)

มาทำให้แห้ง แป้งที่ผ่านกระบวนการนี้จะละลายได้ในน้ำเย็น และได้เจลที่อุณหภูมิต่ำแต่จะมีคุณภาพและประสิทธิภาพของเจลลดลงจากเดิม

ผลผลิตจากถั่วเขียวเช่นวันเส้นและแป้งถั่วเขียวเมื่อนำมาทำเป็นเม็ดเล็ก ๆ สามารถใช้แยกสารที่มีขนาดต่าง ๆ กันออกจากกันได้ แต่เม็ดเจลนั้นมีรูปร่างไม่แน่นอน จึงอาจนำวันเส้นหรือแป้งถั่วเขียวมาผสมกับวันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง (Rhodophyceae) บางชนิด เพื่อผลิตเจลที่มีรูปร่างทรงกลม เพราะวันประกอบด้วย อะกาโรส (agarose) และอะกาโรเพคติน (agaropectin) อะกาโรสเป็น พอลิเมอร์สายยาวของอะกาโรไบโอส (agarobiose) ดังภาพประกอบ 2 ที่ต่อกัน ด้วยพันธะ 1-3 โดยอะกาโรไบโอสคือ เบต้า-ดี-กาแลคโตส (β -D-galactose) ที่ต่อกับ 3,6-แอนไฮโดร-แอลฟา-แอล-กาแลคโตส (3,6-anhydro- α -L-galactose) ด้วยพันธะ 1-4 (Araki, 1956)



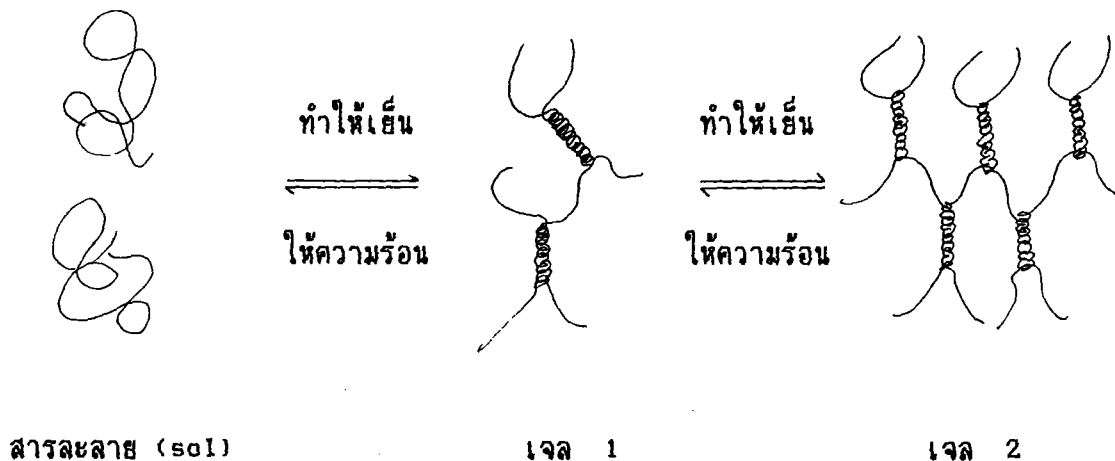
ดี-กาแลคโตส

3,6-แอนไฮโดร-แอลฟา-แอล-กาแลคโตส

ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างของอะกาโรไบโอส

เชื่อว่าอะกาโรเพคตินในโมเลกุลมีโครงสร้างแบบเดียวกับอะกาโรส เว้นแต่ว่า บางโมเลกุลของ 3,6-แอนไฮโดร-แอลฟา-แอล-กาแลคโตส ถูกแทนที่ด้วย แอล-กาแลคโตสซัลเฟต (L-galactose sulfate) หรือด้วย 4,6-โอ-(1-คาร์บอกซีเอทิลิดีน)-ดี-กาแลคโตส (4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactose) (Hirase, 1957)

อะกาโรสเป็นสารที่มีลักษณะพิเศษคือ สามารถเปลี่ยนสถานะจากโซลเป็นเจล สำหรับกลไกการเกิดเจลเชื่อว่าเกิดเนื่องจากไฮโดรเจน 3 อะตอมที่ตำแหน่งอีควาโทเรียล (equatorial) ในส่วนของ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตส ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง อยู่ในรูปอีลิคซ์ (helix) เมื่ออุณหภูมิของสารละลายอะกาโรสลดต่ำลง โดยเกิดการพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายอะกาโรส 2 สาย ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดเจล ดังนั้นการแทนที่ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตสด้วยแอล-กาแลคโตสซัลเฟต ทำให้อีลิคซ์เกิดการคงอ เป็นผลให้เจลมีความแข็งแรงลดน้อยลง โดยปกติอะกาโรสจะมีอุณหภูมิการเกิดเจลอยู่ในช่วง 40-52 องศาเซลเซียส (Guiseley and Renn. 1977)



ภาพประกอบ 3 แสดงกลไกการเกิดเจลของอะกาโรส

อะกาโรสสามารถนำมาผลิตเป็นเจลที่มีรูปร่างทรงกลมได้ (Hjerten. 1964) และอะกาโรสมีประจุเป็นกลางซึ่งเมื่อนำมาผลิตเป็นเจล แล้วจะไม่มีประจุกันระหว่างเจลกับโปรตีน ส่วนอะกาโรเฟคตินมีประจุเป็นลบเนื่องจากมีหมู่ซัลเฟตและหมู่อื่น ๆ ที่มีประจุลบ ในปริมาณมาก เมื่อนำมาผลิตเจลจะทำให้เกิดการจับกันระหว่างเจลกับโปรตีนดังนั้นอะกาโรสจึงเหมาะสมสำหรับการผลิตเจล (Araki. 1956) หรืออาจผสมวุ้นเส้นหรือแป้งถั่วเขียวกับ

อะกาโรสโดยตรง และนำไปใช้ในเทคนิคเจลอิเล็กโตรซันเพื่อประโยชน์ต่อการวิจัย เช่นการแยกส่วนประกอบของพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองขาว (*Trimeresurus alborabris*) และพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองเขียว (*Trimeresurus macrops*) ที่จัดอยู่ในวงศ์ Viperidae (Kosugi, Ariga, Nakamura, Kinjo and Inoue, 1987) เพื่อดูโปรตีนที่แตกต่างกันในพิษของงูเขียวหางไหม้ทั้งสองชนิด ทั้งนี้เพราะพิษงูเขียวหางไหม้ทั้งสองชนิดจะทำให้เกิดอาการพิษที่รุนแรงต่างกัน ดังนั้นหากเราสามารถพัฒนาเจลจนนำมาใช้งานได้แล้ว และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงหรือเทียบเท่าเจลมาตรฐาน ก็จะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในงานวิเคราะห์ต่าง ๆ ได้

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเจลจากวัสดุภายในประเทศ เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งถั่วเขียว เป็นต้น เพื่อใช้ในเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมเจลจากวัสดุภายในประเทศเช่นแป้งมันสำปะหลัง แป้งถั่วเขียว
2. เพื่อพัฒนาเจลให้สามารถนำไปใช้ในเทคนิคเจลอิเล็กโตรซัน เช่นการแยกส่วนประกอบของพิษงูเขียวหางไหม้
3. เพื่อหาความคงทนของเจลที่มีต่อสภาวะแวดล้อม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการผลิตเจลจากแป้งมันสำปะหลัง แป้งถั่วเขียว วุ้น และอะกาโรส
2. ศึกษาประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน โดยเปรียบเทียบ

ระหว่างเจลที่ผลิตได้ เจลที่ผ่านกระบวนการทางเคมี กับเจลมาตรฐานคือเซฟาเด็กซ์ จี-100

3. ศึกษาประสิทธิภาพในการแยกพิษงูเขียวหางไหม้โดยเปรียบเทียบระหว่าง
เจลที่ผ่านกระบวนการทางเคมีได้ดีที่สุดกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. สามารถนำวัตถุดิบที่หาง่ายมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ทางชีวเคมี
2. ลดค่าใช้จ่ายในงานวิเคราะห์ เป็นการประหยัดเงินตราต่างประเทศ
3. เป็นงานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่จะนำไปสู่ระบบ
อุตสาหกรรมการผลิตเจล และอาจได้เงินตราจากต่างประเทศ หากพัฒนาเจลได้ผล
เทียบมาตรฐานต่างประเทศ
4. เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย เช่น ใช้ในการแยกส่วนประกอบของพิษงูเขียว
หางไหม้
5. ได้ความก้าวหน้าทางวิชาการ และก่อให้เกิดการปรับปรุงทางการเรียน
การสอนทางชีวเคมีและเคมีประยุกต์

บทที่ 2

ทฤษฎีที่ใช้เป็นหลักในการศึกษา

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคและวิธีการแยกสารที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นเทคนิคในการทำให้สารละลายเข้มข้น สามารถวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ด้วย วิธีการทำโครมาโตกราฟี คือการทำให้ส่วนผสมของสารตัวอย่างแยกตัวออกจากกันเป็นโซน หรือแบ่งเป็นตอนๆซึ่งเกิดขึ้นได้จากการกระจายของสารตัวอย่างระหว่างเฟส 2 เฟส ซึ่งเฟสหนึ่งคือเฟสที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) อีกเฟสหนึ่งคือเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) การเคลื่อนที่ของเฟสที่เคลื่อนที่ได้จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารผสมแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างแตกต่างกัน จึงทำให้สารผสมแยกออกจากกันเป็นตอนๆหรือเป็นโซนได้ กระบวนการที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่แยกออกจากกันได้โดยมีตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ได้เป็นตัวพาเรียกว่า อีลูชัน (elution) หรือการอีลูท ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวพาตัวถูกละลายนั้นเรียกว่าตัวอีลูท (eluent) และตัวถูกละลายซึ่งถูกอีลูทจะเรียกว่า อีลูเอท (eluate) เหตุที่เรียกเทคนิคนี้ว่าโครมาโตกราฟี เพราะผู้ค้นพบวิธีการทดลองนี้เป็นครั้งแรก พบว่าการแยกที่ทำให้เกิดโซนหรือตอนๆนั้นเป็นโซนที่มีสี จึงตั้งชื่อวิธีการแยกว่า โครมาโตกราฟี (chromatography) ซึ่งมาจากภาษากรีกที่แปลว่า "สีและการเขียน" (color and to write) คำว่าโครมาโตกราฟีจึงถูกใช้มาโดยตลอด ถึงแม้ว่าจะได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการใหม่ขึ้นมาโดยที่วิธีแยกนั้นไม่ได้ให้โซนที่มีสีก็ตาม

การแบ่งชนิดของโครมาโตกราฟี

เฟสที่เคลื่อนที่ได้ประกอบด้วย 2 ชนิดคือ ของเหลวและก๊าซ ดังนั้นวิธีโครมาโตกราฟีจึงแบ่งได้เป็น 2 แบบดังนี้คือ

1. ก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ประกอบด้วยเทคนิคและวิธีการ 2 วิธี คือวิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสอยู่กับที่เรียกว่า ก๊าซ-ลิควิดโครมาโตกราฟี (gas-liquid chromatography) เฟสที่เขียนขึ้นก่อนหมายถึงเฟสที่เคลื่อนที่ได้ ส่วนเฟสที่เขียนตามหลังหมายถึงเฟสที่อยู่กับที่ วิธีที่ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่เรียกว่า ก๊าซ-โซลิดโครมาโตกราฟี (gas-solid chromatography)

2. ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) เป็นวิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ได้ มีหลายเทคนิคคือ

2.1 การทำโครมาโตกราฟีแบบแผ่น ที่เรียกว่าเพลนโครมาโตกราฟี (plane chromatography) ถ้าเฟสที่อยู่กับที่ เป็นเฟสที่เป็นของเหลวจะเรียกว่า ลิควิด-ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid-liquid chromatography, LLC) ตัวอย่างเช่น เปเปอร์โครมาโตกราฟี (paper chromatography, PC) ถ้าเฟสอยู่กับที่ เป็นของแข็งจะเรียกว่า ลิควิด-โซลิดโครมาโตกราฟี (liquid-solid chromatography, LSC) เช่น อินแนร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography, TLC)

2.2 การทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) นิยมใช้กันทั่วไป สามารถใช้ได้กับเฟสที่อยู่กับที่ที่เป็นของเหลว เรียกว่า แอลแอลซี (LLC) หรือที่เป็นของแข็งที่เรียกว่า แอลแอลซี (LSC) และได้พัฒนาโดยใช้ความดันช่วย เพื่อให้การแยกดีขึ้นเรียกว่าโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ถ้าเฟสที่อยู่กับที่ เป็นของแข็งที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้เรียกว่า ไอออนเอ็กซ์เชนโครมาโตกราฟี (ion exchange chromatography)

ถ้าเฟสที่อยู่กับที่คือสารที่ไม่สามารถเกิดการดูดซับหรือแบ่งส่วนหรือแลกเปลี่ยนไอออน แต่เป็นสารที่สามารถกีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารตัวอย่าง เนื่องจากมีรูพรุนให้สารตัวอย่างเข้าไปได้จะเรียกเทคนิควิธีการวิเคราะห์นี้ว่า เอ็กсклюชันโครมาโตกราฟี (exclusion chromatography)

การจัดแบ่งชนิดของโครมาโตกราฟีสามารถแสดงตามตาราง 2

ตาราง 2 แสดงชนิดของโครมาโตกราฟี

ชนิดของโครมาโตกราฟี	ประกอบด้วยเทคนิค
1. ก๊าซโครมาโตกราฟี	1.1 ก๊าซ-ลิควิดโครมาโตกราฟี 1.2 ก๊าซ-โซลิดโครมาโตกราฟี
2. ลิควิดโครมาโตกราฟี	2.1 เพลน 2.1.1 เปเปอร์โครมาโตกราฟี 2.1.2 อินแนร์โครมาโตกราฟี และโครมาโตกราฟี สมรรถนะสูงสำหรับอินแนร์ 2.2 คอลัมน์ 2.2.1 ลิควิด-โซลิดโครมาโตกราฟี 2.2.2 ลิควิด-ลิควิดโครมาโตกราฟี 2.2.3 ไอออนเอ็กซ์เชน 2.2.4 เอ็กซ์-คลุซัน 2.2.4.1 เจลฟิลเตรชัน 2.2.4.2 เจลเพอร์มีเอชัน (ซึ่งคอลัมน์โครมาโตกราฟีทุกชนิดสามารถทำเป็น โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงได้)

การทำโครมาโตกราฟีมีกลไกที่เกิดขึ้น 2 กระบวนการคือ

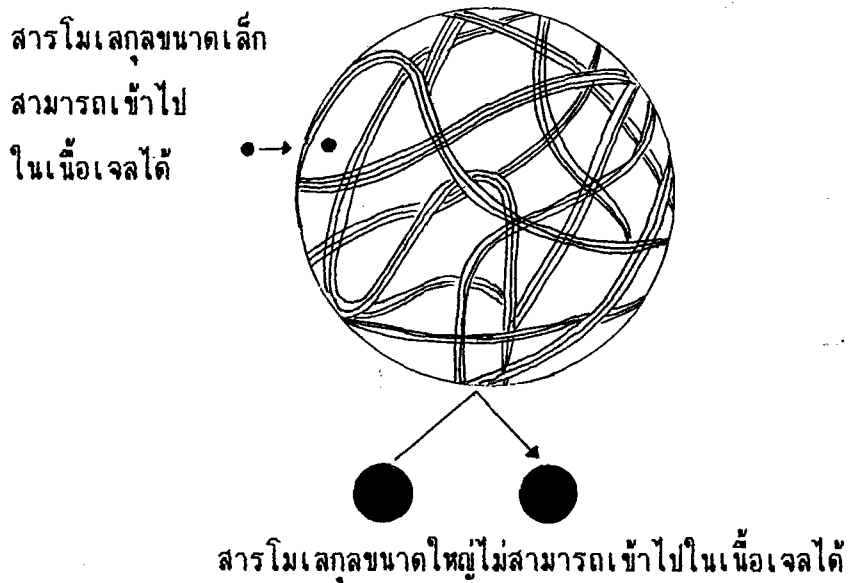
1. กระบวนการดูดซับ (adsorption) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งที่เรียกว่า ลิควิด-โซลิด โครมาโตกราฟี การดูดซับจะขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของของแข็งด้วย

2. กระบวนการแบ่งส่วน (partition) กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวที่เรียกว่า ลิควิด-ลิควิดโครมาโตกราฟี

เอ็กซ์คลูชันโครมาโตกราฟี (exclusion chromatography)

โครมาโตกราฟีชนิดนี้เป็นเทคนิคในการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล เฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่มีลักษณะโมเลกุลเป็นเจลค่อนข้างกลมขนาดเล็กๆ มีรูพรุนอยู่ทั่วไป ขนาดรูพรุนแน่นอน สารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่ารูพรุนไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ ก็จะถูกพาออกจากคอลัมน์ได้ง่ายด้วยเฟสที่เคลื่อนที่ สารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กเพียงพอที่จะเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ ก็จะถูกกักไว้ ทำให้ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นาน ดังแสดงตามภาพประกอบ 4

ตาข่ายการเชื่อมโยงไขว้ของอนุภาคเจลที่บวมตัวในน้ำ



ภาพประกอบ 4 แสดงรูพรุนของเจลที่มีผลทำให้สารโมเลกุลขนาดเล็กเดินทางออกจากคอลัมน์ได้ช้า

เนื่องจากขนาดโมเลกุลขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล คือถ้าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ก็จะมี น้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสาร ตัวอย่าง สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเจล จะถูกอีลิวต์ออกจากคอลัมน์ได้ก่อน สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ก็จะถูกอีลิวต์ออกจากคอลัมน์ได้ช้า ขนาดรูพรุนของเจลที่ยอมให้สารตัวอย่าง ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆผ่านเข้าไปได้ เรียกว่า เอ็กซ์คลูชัน ลิมิต (exclusion limit) เช่นเจลที่มีเอ็กซ์คลูชัน ลิมิต เท่ากับ 30,000 จะยอมให้สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 30,000 ผ่านเข้าไปได้ ทำให้เคลื่อนที่ ออกจากคอลัมน์ช้า แต่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30,000 จะไม่สามารถเข้าไปได้ จึงไม่ถูกกักไว้ ทำให้สามารถเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ง่าย การเลือกใช้ชนิดของเจลเพื่อ บรรจุในคอลัมน์ ต้องพิจารณาจากสารตัวอย่างที่ต้องการแยก คือต้องเลือกเจลที่มีรูพรุน ขนาดที่ให้สารชนิดหนึ่งผ่านเข้าไปได้ แต่อีกชนิดหนึ่งไม่สามารถเข้าไปได้จึงจะมีการแยกที่ดี

เจลที่ใช้ในการทำเอ็กซ์คลูชันโครมาโตกราฟีแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

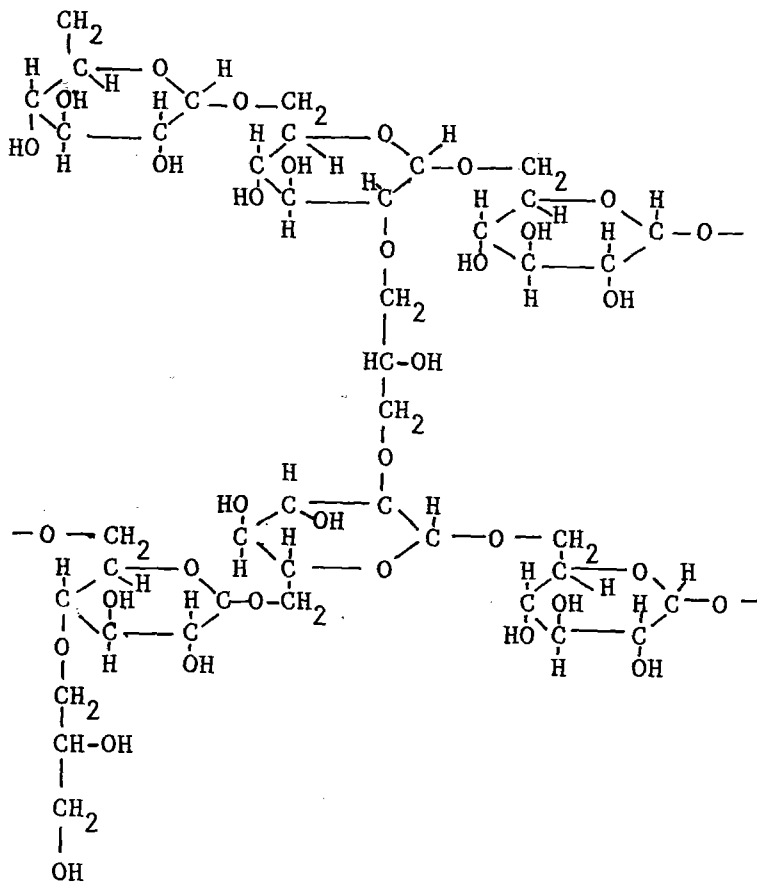
1. เจลชนิดอ่อน (soft gels) เจลชนิดนี้คือสารพอลิเมอร์ (polymeric material) ที่ได้จากการเชื่อมโซ่สารพวคาร์โบไฮเดรต เช่นเด็คซ์แทรน ที่มีชื่อทางการค้าว่า เซฟาเด็คซ์ การเชื่อมโซ่สารพวอะคริลละไมด์ ที่มีชื่อทางการค้าว่า ไบโอ-เจล พี (bio-gel P) มีได้หลายขนาดเช่นเดียวกัน การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้เจลชนิดอ่อนนี้มีชื่อเรียกว่า เจลฟิลเตรชัน

2. เจลชนิดแข็ง (semirigid gels) เจลชนิดนี้ได้จากการเชื่อมโซ่ สารพวพอลิสไตรีน เช่นเจลที่มีชื่อทางการค้าว่า ไบโอ-บีท เอส (bio-beads S) ถ้าใช้เจลชนิดนี้เป็นเฟสที่อยู่กับที่บรรจุในคอลัมน์มีชื่อเรียกว่า เจลเพอร์มิเอชัน (gel permeation chromatography)

เจลฟิลเตรชันเป็นเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่แยกสารโดยอาศัยขนาดของ โมเลกุลเป็นสำคัญดังกล่าวก่อนแล้วข้างต้น สารที่จะแยกได้ก็ต้องมีลักษณะค่อนข้างเป็นทรงกลม

สารชีวโมเลกุลที่ใช้แยกโดยวิธีนี้ในปัจจุบันเช่น เอ็นไซม์ ออร์โมน และโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นต้น

เจลที่ใช้ในการแยกของเทคนิคเจลฟิลเทรชัน มักใช้เซฟาเดกซ์ เซฟาริล หรือ เซฟาคริล เจลเหล่านี้ลักษณะค่อนข้างกลมขนาดเล็กๆซึ่งมีรูพรุนอยู่ทั่วไป เปรียบได้เหมือนตะแกรกร่อน เจลเหล่านี้ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งอ้อมตัวด้วยบัฟเฟอร์ หน้าที่ความห่าง ตลอดจนความแข็งแรงของรูพรุนเจลขึ้นกับชนิดของเจล (สายสนม ธรรมชาติ) 2528) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เจลเซฟาเดกซ์ซึ่งเกิดจากการเชื่อมไขว้เดกซ์แทรนด้วย อิทธิคลอโรไฮดรินเป็นเจลเปรียบเทียบ เจลเซฟาเดกซ์มีโครงสร้างดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 แสดงส่วนหนึ่งของโครงสร้างเซฟาเดกซ์

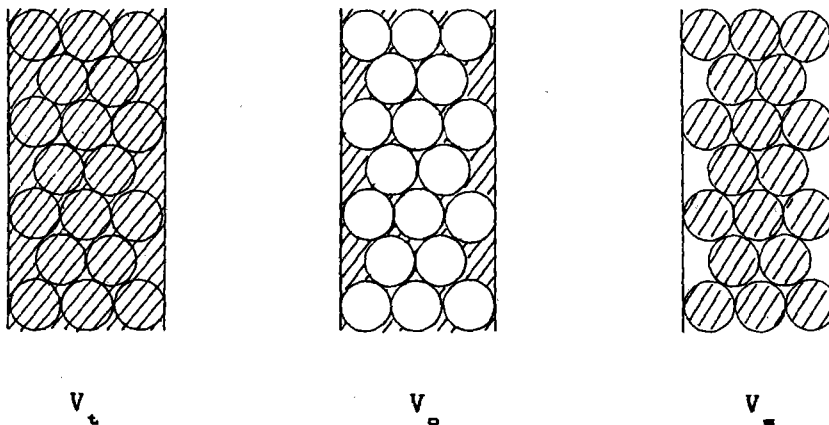
เซฟาเด็กซ์ในการค้ามีอยู่หลายชนิดตามขนาด และความถี่ห่างของขนาดรพูน
ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงตัวอย่างชนิดและขนาดของเจลเซฟาเด็กซ์ (Pharmacia Fine
Chemicals AB . 1982-3)

ชนิดของเจล เซฟาเด็กซ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง กลางของเม็ดเจลแห้ง	น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก			ปริมาตรที่พองตัว(ลบ.ซม. ต่อกรัมแห้ง)ของเซฟาเด็กซ์
		เปปไทด์และโปรตีน	เด็กซ์แทรน		
จี-10	40-120	- 700	- 700	2-3	
จี-15	40-120	- 1,500	- 1,500	2.5-3.5	
จี-25 หยาบ	100-300	1,000- 5,000	100- 5,000	4-6	
ปานกลาง	50-150				
ละเอียด	20- 80				
ละเอียดมาก	10- 40				
จี-50 หยาบ	100-300	1,500- 30,000	500- 10,000	9-11	
ปานกลาง	50-150				
ละเอียด	20- 80				
ละเอียดมาก	10- 40				
จี-75	40-120	3,000- 80,000	1,000- 50,000	12-15	
ละเอียดมาก	10- 40	3,000- 70,000			
จี-100	40-120	4,000-150,000	1,000-100,000	15-20	
ละเอียดมาก	10- 40	4,000-100,000			
จี-150	40-120	5,000-300,000	1,000-150,000	20-30	
ละเอียดมาก	10- 40	5,000-150,000		18-22	
จี-200	40-120	5,000-600,000	1,000-200,000	30-40	
ละเอียดมาก	10- 40	5,000-250,000	1,000-200,000	20-25	

เซฟาคีร์ไม่ละลายในตัวทำละลายส่วนใหญ่ และทนต่อการต้มในหม้ออนความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แต่ถ้านำไปอบที่อุณหภูมิมากกว่า 120 องศาเซลเซียส เจลเซฟาคีร์จะเริ่มไหม้

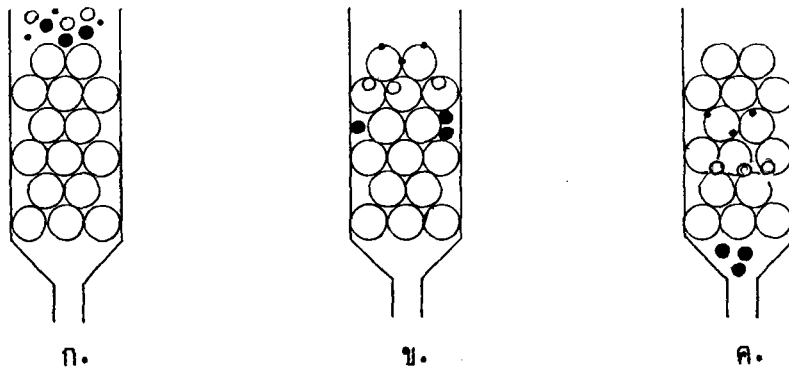
การแยกสารด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน โดยการบรรจุเจลลงในคอลัมน์ปริมาตรทั้งหมด (total volume, V_t) ที่ได้ประกอบด้วย ปริมาตรส่วนที่เป็นเนื้อเจล ปริมาตรของสารละลายภายในเจล และปริมาตรช่องว่างระหว่างเจล (void volume, V_o) ซึ่งปริมาตรส่วนที่เป็นเนื้อเจลและปริมาตรของสารละลายภายในเจลรวมเรียกว่า ปริมาตรของเจลที่พองตัวแล้ว (gel volume, V_g) ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 อธิบายความหมายของ V_t , V_o และ V_g

การเก็บสารละลายที่ถูกชะด้วยปริมาตรที่เท่ากัน เขียนกราฟระหว่างปริมาตรของสารที่เก็บได้กับ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในแต่ละหลอด พบว่าปริมาตรที่ใช้ชะ (elution volume, V_e) ในตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกชะออกมาด้วยปริมาตรที่เท่ากับ V_o ในขณะที่สารขนาดเล็กจะถูกชะออกมาหลังจากด้วยปริมาตรที่เท่ากับ V_t ส่วนสารขนาดอื่นๆจะถูกชะอยู่ระหว่าง V_o และ V_t

ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 อธิบายหลักการของเจลฟิลเทรชัน

โดยที่ ○ แทนเม็ดเจล

● แทนสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่

○ แทนสารที่มีโมเลกุลขนาดกลาง

• แทนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

ก. หมายถึงเริ่มต้นนำสารตัวอย่างมาแยกในคอลัมน์

ข. หมายถึงสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของเจลจะเคลื่อนที่ลงมาก่อน

ค. หมายถึงสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของเจล จะเคลื่อนออกจากคอลัมน์ก่อน ตามด้วยสารที่มีโมเลกุลขนาดกลางและสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กตามลำดับ

ประสิทธิภาพในการแยกสารของเจลนั้น สามารถใช้เทอมที่เรียกว่า สัมประสิทธิ์ของการแบ่งสาขา (partition coefficient, K_d) มีค่าเท่ากับ

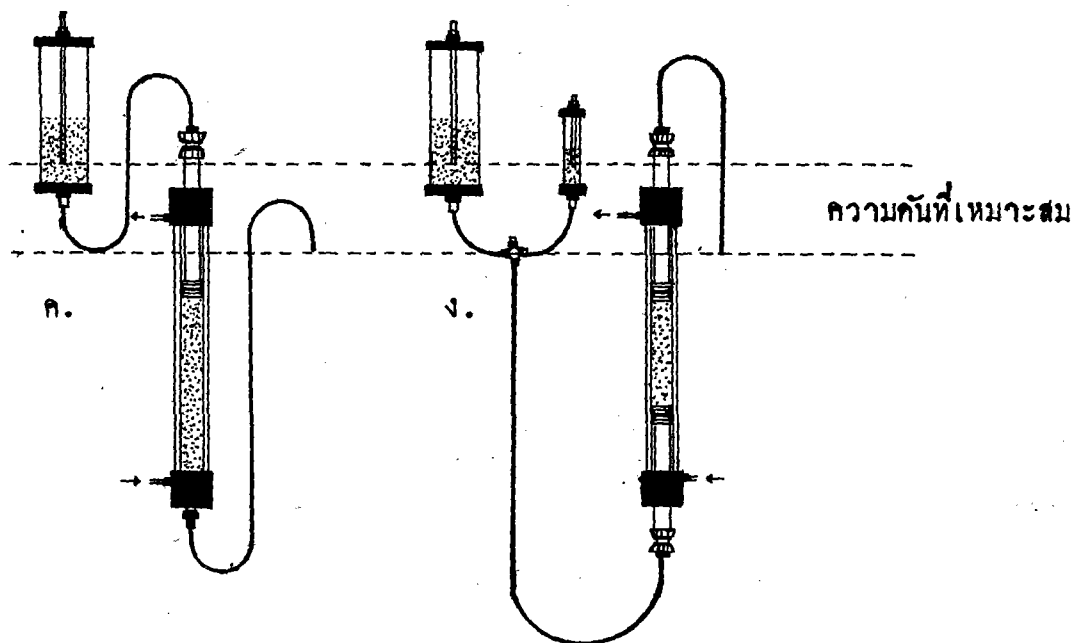
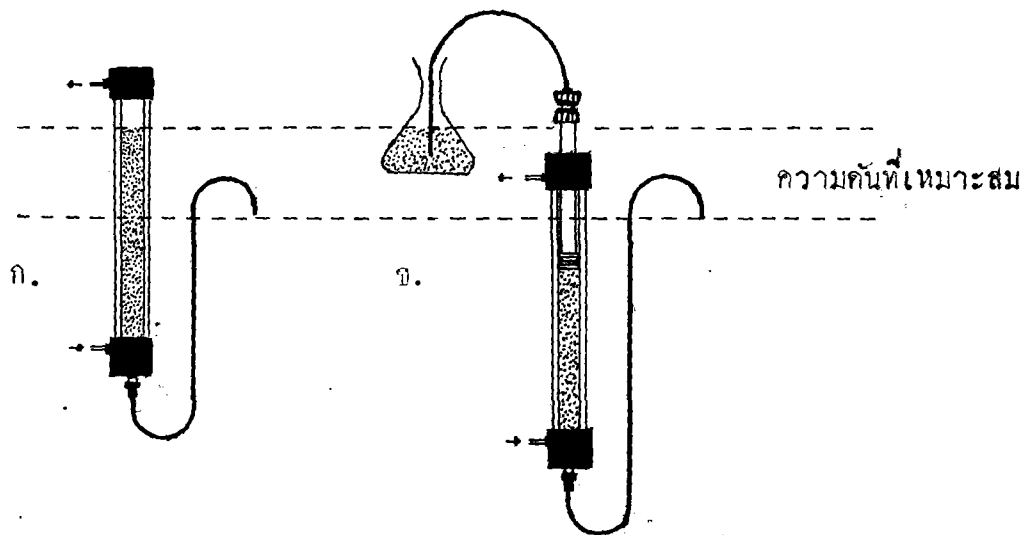
$$K_d = \frac{V_u - V_o}{V_c - V_o}$$

ดังนั้นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีค่า $K_d = 0$ และสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะมีค่า $K_d = 1$ ส่วนสารขนาดอื่นๆจะมีค่า K_d อยู่ระหว่าง 0 ถึง 1

เจลฟิลเทรชันสามารถที่จะนำมาประมาณค่าของน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้

โดยคำนวณหาค่า K_u จาก V_u ของโปรตีนมาตรฐาน และเขียนกราฟระหว่างค่า K_u และ $\log$ ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นหาค่า K_u ของสารตัวอย่างจากการแยกสารผ่านคอลัมน์ ก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารจากกราฟมาตรฐานได้

สิ่งที่ต้องระวังในการแยกสารด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันคือ ต้องคำนึงถึงความดันที่เหมาะสม (operating pressure) ดังภาพประกอบ 8 และตาราง 4 ถ้าความดันมากเกินไปจะทำให้เจลเบียดกันมากเกินไปรูพรุน อัตราการไหลจะลดลง การแยกสารไม่ดีเท่าที่ควร



ภาพประกอบ 8 แสดงจุดที่จะวัดความดันที่เหมาะสม

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. ขั้นตอนในการผลิตเจล

สารเคมี

1. แป้งถั่วเขียว ผลิตโดยบริษัทพัฒนาสินค้า จำกัด กรุงเทพฯ
 2. แป้งมันสำปะหลัง ผลิตโดยโรงงานแป้งมันไทยท่า ชลบุรี
 3. วุ้นตราปลาตะเพียนทอง ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลวงศ์ทวีวัฒน์จำหน่าย
- เรียกวันเบอร์ 1
4. วุ้นดีฟโก (difco) ผลิตโดย Detroit Michigan USA เรียกวันเบอร์ 2
 5. อะกาโรส ผลิตโดย Pharmacia Sweden
 6. สารละลายเอทานอล (ethanol) commercial grade จากเคมีเฮ้าส์ กรุงเทพฯ นำมากลั่นให้บริสุทธิ์
 7. แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) laboratory grade ผลิตโดย J.T. Baker Holland
 8. ไตรตอน เอ็กซ์-100 (triton x-100) laboratory grade ผลิตโดย Fluka Switzerland
 9. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) laboratory grade ผลิตโดย Analar English
 10. ทอลูอิน (toluene) commercial grade จากเคมีเฮ้าส์ กรุงเทพฯ นำมากลั่นให้บริสุทธิ์
 11. อีเทอร์ (ether) laboratory grade ผลิตโดย J.T. Baker USA
 12. ทวิน 80 (tween 80) laboratory grade ผลิตโดย Serva New York

อุปกรณ์

1. เครื่องอุ่นสารแบบปรับความร้อนได้ 8 จังหวะ (heater) รุ่น 10104 EGO Germany
2. เครื่องปั่นฮอมอจีไนเซอร์ (homogenizer) รุ่น MX-31GN ผลิตโดย National Japan
3. เครื่องกวนสารให้เข้ากัน (magnetic stirrer) Irano รุ่น M 20/1 ผลิตโดย Franz Morat KG. Germany
4. หม้ออบความดัน (autoclave) รุ่น HA-30 ผลิตโดย Hirayama Japan
5. ชุดกรองสาร ประกอบด้วย Buchner funnel และ Suction flask
6. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น WF10X 961601 ผลิตโดย Olympus Japan

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การผลิตเจลจากแป้งถั่วเขียว เรียกเจล I มีขั้นตอนดังนี้
 - 1.1 เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสปริมาตร 40 ลบ.ซม. ในแป้งถั่วเขียวหนัก 2.5 กรัม กวนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ให้เข้ากัน
 - 1.2 เติมสารละลายเอทานอลปริมาตร 200 ลบ.ซม. ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ กวนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 นาที ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส
 - 1.3 หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ลบ.ซม. อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสทันที
 - 1.4 นำเจลที่ได้ไปล่องคูลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล
2. การผลิตเจลวันจากวันเบอร์ 2 เรียกเจล II (ดัดแปลงมาจาก Hjerten. 1964; อุษณีษ์ วักคิ์เพชร. 2531) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ชั่งวันเบอร์ 2 หนัก 2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ลบ.ซม. กวนด้วยด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 25-30 นาที

2.2 แบ่งสารละลายวันในข้อ 2.1 มา 33 ลบ.ซม. ใส่ลงไปใน สารละลายผสมของไตรตอน เอ็กซ์-100 ปริมาตร 15 ลบ.ซม. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ปริมาตร 40 ลบ.ซม. และทอลูอินปริมาตร 160 ลบ.ซม. ที่ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.3 บั่นด้วยเครื่องโฮมอิจิโนเซอร์ ความเร็ว 9,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.4 ล้างด้วยอีเทอร์ที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสปริมาตร 100 ลบ.ซม. เขย่าเป็นเวลา 5 นาที

2.5 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียสปริมาตร 200 ลบ.ซม. เขย่าเป็นเวลา 2 นาที

2.6 นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกรผล

3. การผลิตเจลจากแป้งข้าวเขียวผสมวันเบอร์ 2 หรืออะกาโรส (ดัดแปลงจาก Hjertén. 1964 ; อุทัย วักดีเพชร. 2531) แบ่งออกเป็น 4 วิธีคือ
วิธีที่ 1 ใช้วิธีเดียวกับการผลิตเจลจากวันเบอร์ 2 แต่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารที่ใช้ และชนิดของสารที่ทำให้ยู่ตัว (stabilizer) ดังตาราง 5

ตาราง 5 แสดงการใช้แป้งถั่วเขียวและวันเบอร์ 2 ปริมาตรของคาร์บอนเตตระคลอไรด์
ทอลูอิน และชนิดสารที่ทำให้ยู่ตัว

เจล	วันเบอร์ 2 (เปอร์เซ็นต์)	แป้งถั่วเขียว	ปริมาตรสารผสม ที่ใช้(ลบ.ซม.)	สารที่ทำให้ยู่ตัว		คาร์บอนเตตระ คลอไรด์ (ลบ.ซม.)	ทอลูอิน (ลบ.ซม.)
				ไตรตอน เอ็กซ์-100 (ลบ.ซม.)	ทวิน-80 (ลบ.ซม.)		
II	2	-	33	15	-	40	160
III	2	-	33	-	15	40	160
IV	2	-	33	12	3	40	160
V	4	-	33	-	15	40	160
VI	4	-	33	10	5	40	160
VII	0.5	1.5	33	15	-	40	160
VIII	1.5	1.5	33	5	10	40	160
IX	1.5	0.5	33	15	-	40	160
X	1.5	0.5	100	30	-	80	320
XI	*4.5	1.5	100	25	-	80	320

*ล้างด้วยอีเทอร์ปริมาตร 200 ลบ.ซม. และล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 ลบ.ซม. 3 ครั้ง

วิธีที่ 2 เรียกเจล XII มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 ชั่งแป้งถั่วเขียวหนัก 1.5 กรัมและวันเบอร์ 2 หนัก 4.5 กรัม ละลาย

ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ลบ.ซม. ต้มในหม้ออบความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน

1 บรรยากาศ เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง

3.2.2 เติมสารละลายในข้อหนึ่งลงไปในการละลายผสมของไตรตอน เอ็กซ์-100 ปริมาตร 25 ลบ.ซม. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ปริมาตร 80 ลบ.ซม. และทอลูอินปริมาตร 320 ลบ.ซม. ที่ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3.2.3 ปั่นด้วยเครื่องอ้อมอิจิไนเซอร์ความเร็ว 9,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.2.4 ล้างด้วยอีเทอร์ที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ลบ.ซม. เขย่าเป็นเวลา 5 นาที

3.2.5 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ลบ.ซม. เขย่าเป็นเวลา 2 นาที 3 ครั้ง

3.2.6 นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล
วิธีที่ 3 เรียกเจล XIII มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 ชั่งแป้งถั่วเขียวหนัก 1.5 กรัม และวุ้นเบอร์ 2 หนัก 4.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ลบ.ซม. ต้มในหม้ออบความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง

3.3.2 เติมสารละลายในข้อหนึ่งลงไปในการละลายผสมของไตรตอน เอ็กซ์-100 ปริมาตร 25 ลบ.ซม. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ปริมาตร 80 ลบ.ซม. และทอลูอินปริมาตร 320 ลบ.ซม. ที่ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3.3.3 ปั่นด้วยเครื่องอ้อมอิจิไนเซอร์ โดยใช้ความเร็วต่างๆกันคือความเร็ว 8,600 9,300 และ 10,000 รอบต่อนาที ตามลำดับ เป็นเวลา 5 นาที

3.3.4 แช่วีกเกอร์ในภาชนะที่มีน้ำแข็งหรือน้ำแข็งผสมเกลือแกงล้อมรอบ กวนด้วยความเร็ว 700 รอบต่อนาที จนสารละลายมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3.3.5 กรองสารละลายออก นำส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอีเทอร์ปริมาตร 200 ลบ.ซม. เขย่าเป็นเวลา 5 นาที

3.3.6 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ลบ.ซม. เขย่าเป็นเวลา 2 นาที 3 ครั้ง

3.3.7 นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล

3.3.8 ทำวิธีเดียวกับข้อ 3.3.1-3.3.7 แต่เปลี่ยนจากวันเบอร์ 2 เป็นอะกาโรส เรียกเจล XIV และใช้ความเร็วในการปั่นของเครื่องอ้อมจิไนเซอร์ ที่ให้เม็ดเจลเล็กที่สุด นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลง

วิธีที่ 4 เรียกเจล XV มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1 ชั่งแป้งผิวเขียวหนัก 1.5 กรัมและวันเบอร์ 2 หนัก 4.5 กรัม ละลาย ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ลบ.ซม. ต้มในหม้ออบความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง

3.4.2 เติมน้ำละลายในข้อหนึ่งลงไปในส่วนละลายผสมของไตรทอน เอ็กซ์-100 ปริมาตร 25 ลบ.ซม. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ปริมาตร 80 ลบ.ซม. และทอลูอินปริมาตร 320 ลบ.ซม. ที่ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3.4.3 ปั่นด้วยเครื่องอ้อมจิไนเซอร์ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.4.4 แขนักเกอร์ในภาชนะที่มีน้ำแข็งหรือน้ำแข็งผสมเกลือแกงล้อมรอบ และเติม อีเทอร์ที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ลบ.ซม. กวนด้วยความเร็ว 700 รอบต่อนาที จนสารละลายมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3.4.5 กรองสารละลายออก นำส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอีเทอร์ปริมาตร 200 ลบ.ซม. เช้าเป็นเวลา 5 นาที

3.4.6 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ลบ.ซม. เช้าเป็นเวลา 2 นาที 3 ครั้ง

3.4.7 นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลง

3.4.8 ทำวิธีเดียวกับข้อ 3.4.1-3.4.7 แต่เปลี่ยนจากวันเบอร์ 2 เป็นอะกาโรส เรียกเจล XVI นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลง

2. ขั้นตอนในการคัดขนาดเจล

สารเคมี

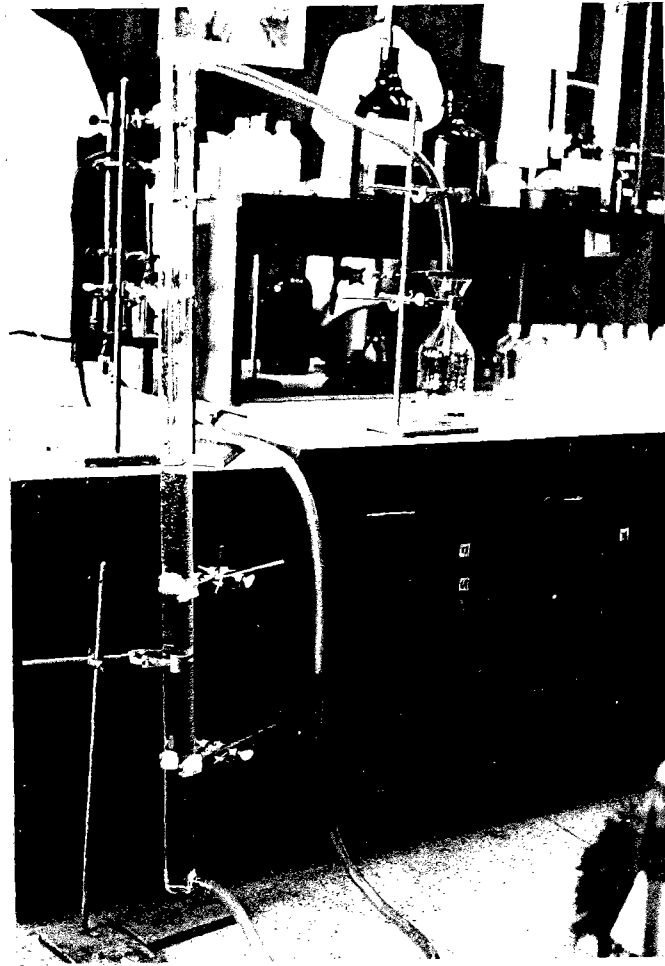
1. เจลที่ผลิต
2. น้ำกลั่น

อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ในการคัตขนาดโดยอาศัยการไซฟอน (syphon) ประกอบด้วย คอลัมน์ส่วนล่างขนาด 110x4.5 ซม. ต่อกับคอลัมน์ส่วนบนขนาด 4x32 ซม. ซึ่งส่วนข้อต่อมีท่อแก้วให้สารผ่านขนาด 2x8 ซม. โดยให้น้ำเข้าส่วนล่าง และน้ำออกส่วนบน ดังภาพประกอบ 9
2. ตะแกรงร่อนขนาด 100 ไมโครเมตร ผลิตโดย Endecotts Ltd. England

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำเจลที่ผลิตได้ปริมาตร 500 ลบ.ซม. มา คัตขนาดด้วยชุดอุปกรณ์ ดังภาพประกอบ 9 ให้มีอัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 100 , 200 , 300 และ 400 ลบ.ซม.ต่อชม.ตามลำดับ
2. เก็บเจลที่ไหลออกจากส่วนบนของคอลัมน์ที่มีอัตราการไหลของน้ำดังข้อ 1 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูป
3. นำเจลที่ผลิตได้ 100 ลบ.ซม. มาคัตขนาดด้วยตะแกรงร่อนขนาด 100 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกับการคัตขนาดด้วยชุดอุปกรณ์
4. นำเจลขนาดที่ต้องการ โดยให้มีขนาดใกล้เคียงกับเจลมาตรฐาน เซฟาเด็กซ์ จี-100 มาทดสอบคุณภาพของเจลส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งนำมาพัฒนาคุณภาพของเจลให้ดีขึ้น



ภาพประกอบ 9 แสดงชุดอุปกรณ์ในการคัดขนาดโดยอาศัยการไซฟอน

3. ขั้นตอนการพัฒนาเจลที่ผลิตขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมี

3.1 การเชื่อมไขว้เจลที่ผลิตได้ด้วยไดไวนิล ซัลไฟน์ (divinyl sulphone)

(ดัดแปลงจาก Porath. 1975 ; อุษณีย์ วรกิจเพชร. 2531)

สารเคมี

1. เจลที่ผลิตและคัดขนาดแล้ว
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 12.1 และ
pH 12.5
4. โซเดียม บอโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) laboratory grade
ผลิตโดย Fluka Switzerland
5. ไคไวนิล ซัลโฟน laboratory grade ผลิตโดย Fluka Switzerland
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ laboratory grade ผลิตโดย
Merck Germany
7. ดี(-)แมนนิทอล (D(-)mannitol) laboratory grade ผลิตโดย BDH
Limited Poole England

อุปกรณ์

1. เครื่องกวนสารให้เข้ากัน (magnetic stirrer)
2. แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ขนาด 0.5x2, 0.8x2.5 และ 0.8x4 ซม.
ตามลำดับ
3. เครื่องปั่นเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) รุ่น IEC CENTRA-7R ผลิตโดย
International Equipment Company USA
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) Log R รุ่น 611 ผลิตโดย
Orion Research incorporated Cambridge USA
5. กล้องจุลทรรศน์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แخذเจลที่ผลิตและคัดขนาดแล้วในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง
2. เทสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ออก เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 12.0-12.5
3. เติมโซเดียม บอโรไฮไดรด์ และไดไวนิล ซัลโฟนปริมาณตามตาราง 6 กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็กในการกวน มีขนาดดังระบุในตาราง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็วดังระบุในตาราง
4. นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 10 นาที (อัตราเร็วดังระบุ)
5. ล้างเจลที่ตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนมี pH 7-8
6. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่มีโซเดียม บอโรไฮไดรด์ และดี(-)แมนนิทอล ปริมาณตามตาราง 6 กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็กในการกวน มีขนาดดังระบุในตาราง อีก 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม
7. นำมาปั่นอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 10 นาที (อัตราเร็วดังระบุ)
8. ล้างเจลที่ตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนมี pH 7-8
9. นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูป
10. เก็บเจลไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

ตาราง 6 แสดงปริมาณของสารที่ใช้และสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันในการเชื่อมโซ่โพลีเอทิลีนด้วยโซลโฟม

เจลที่ใช้	เตรียม จากเจล	ปริมาตร เจล (ลบ.ซม.)	สารละลาย บัฟเฟอร์ pH (ลบ.ซม.)	โซเดียม โซเดียม โซลโฟม		อัตราเร็ว		โซเดียม โซเดียม ดี(-)		อัตราเร็ว		แท่งแม่เหล็ก		
				บอร์ไฮโดรเจน	โซลโฟม	กวน	ปั่น	โซเดียม โซเดียม ดี(-)	บอร์ไฮโดรเจน	กวน	ปั่น			
				(กรัม)	(ลบ.ซม.)	(รอบ/นาที)	(รอบ/นาที)	(กรัม)	(กรัม)	(รอบ/นาที)	(รอบ/นาที)	(ซม.)		
XVII	II	90	12.1	60	1.5	15	700	2,000	90	0.15	3	700	3,500	0.8x4
XVIII	XV	90	12.1	60	1.5	15	700	2,000	90	0.6	12	700	3,500	0.8x4
XIX	XVI	90	12.5	60	1.4	18	200	1,500	60	0.6	12	200	1,500	0.8x2.5
XX	XVI	30	12.5	20	0.4	6	200	1,000	20	0.2	4	200	1,000	0.5x2
XXI	XVI	30	12.5	20	0.4	6	200	500	20	0.2	4	200	500	0.5x2

3.2 การเชื่อมไข้วเจลที่ผลิตได้ด้วยอีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin)
(ดัดแปลงมาจาก เรื่องกิตติ กนกปรีชาวุฒิ. 2530)

สารเคมี

1. เจล XVI ที่คัดขนาดแล้ว
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4
3. อีพิคลอโรไฮดริน laboratory grade ผลิตโดย Fluka Switzerland
4. สารละลายเอทานอล
5. ไดออกเซน laboratory grade ผลิตโดย Merck Germany

อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์สำหรับรีฟลักซ์ ประกอบด้วย condenser ต่อกับขวดกันกลม ซึ่งตั้งอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องอุ่นและกวนสารให้เข้ากัน รุ่น 1267 ผลิตโดย Lab-Line Instrument, Inc.
3. แท่งแม่เหล็กขนาด 0.8x2.5 ซม.
4. กล้องจุลทรรศน์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เติมอีพิคลอโรไฮดริน และไดออกเซนลงในเจลที่บรรจุในขวดกันกลมขนาด 250 ลบ.ซม. ปริมาตร ตามตาราง 7
2. รีฟลักซ์ในอ่างน้ำ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3. ล้างด้วยน้ำกลั่นและล้างด้วยสารละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ
4. หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง
5. นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูป
6. เก็บเจลไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

ตาราง 7 แสดงปริมาณของสารที่ใช้ในการเชื่อมโยงด้วยอินคลอไรโดริน

เรียง เจล	เจล XVI (ลบ.ซม.)	อินคลอไรโดริน (ลบ.ซม.)	ไดออกเซน (ลบ.ซม.)	หมายเหตุ
XXII	30	3	4.5	ผลิตจากเจล XVI ที่เก็บไว้ 3 เดือน
XXIII	30	3	4.5	ผลิตจากเจล XVI ที่เก็บไว้ 1 วัน
XXIV	30	15	22.5	ไม่ได้กวนขณะรีฟลักซ์
XXV	30	30	45.0	ไม่ได้กวนขณะรีฟลักซ์
XXVI	30	30	45.0	กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีขณะรีฟลักซ์
XXVII	60	60	90.0	กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีขณะรีฟลักซ์

4. ขั้นตอนการทดสอบคุณภาพเจล

สารเคมี

1. เจลที่ผลิต เจลที่พัฒนา และเจลมาตรฐานเซฟาเดกซ์ จี-100
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5

4. ไส้แก้ว
5. โปรตีนมาตรฐานสำหรับเจลฟิลเทรชัน ผลิตโดย Pharmacia Ltd.
6. สีย้อมโปรตีนโคมาสสี บริลเลียนท์ บลู จี (coomassie brilliant blue G)
7. สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
8. กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ laboratory grade ผลิต

โดย RPE Milano

9. กรดไฮโดรคลอริก laboratory grade ผลิตโดย BHD England
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ laboratory grade ผลิตโดย Merck Germany

ตามลำดับ

11. ชีวภัณฑ์ จากศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ขนาด 1x70 ซม.
2. อุปกรณ์สำหรับไล่อากาศ ประกอบด้วย suction flask ที่มีจุกยางปิดปากขวด

ต่อกับ vacuum pump

3. เครื่องเก็บแยกส่วนพร้อมปั๊ม (fraction collector and pump) รุ่น 2112 Redirac Fraction Collector และรุ่น 2132 Microperpex Peristaltic Pump Sweden

4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Beckman รุ่น DU-6 Japan

5. ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ Finn timer ขนาด 50 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร Finland

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำเจลที่ผลิตได้รูปร่างทรงกลม และเจลที่ผ่านกระบวนการทางเคมี มาแยกสารตัวอย่างโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน (Pharmacia Fine Chemical AB, 1982-3) เปรียบเทียบกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 ดังนี้

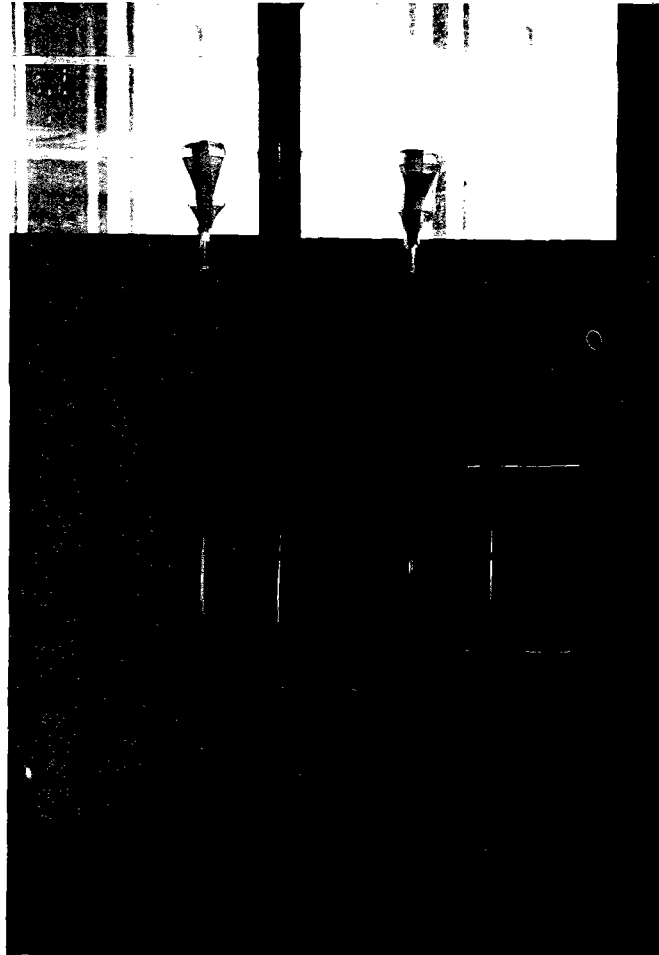
1.1 นำเจลที่ต้องการมาบรรจุคอลัมน์ (packing a column) ดังนี้

1.1.1 คว่ำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายแขวนลอยเจลที่ผ่านการไล่อากาศแล้ว จากนั้นเจลจะค่อยๆตกลงตามน้ำหนักของเจล จนมีความสูงถึงปากคอลัมน์ ดังภาพประกอบ 10

1.1.2 หงายขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารแขวนลอยเจลและดึงกรวยแก้วออก

1.1.3 ผ่านสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ผ่านการไล่อากาศแล้วจากขวดเก็บ และปล่อยให้ไหลออกทางด้านล่างของคอลัมน์ โดยต้องทำให้ระบบทั้งหมดเป็นระบบปิด และต้องคำนึงถึงความดันที่เหมาะสม (operating pressure) ดังภาพประกอบ 8 และตาราง 4

1.1.4 ปล่อยให้สารละลายบัฟเฟอร์ชะผ่านคอลัมน์ เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวกันดี (equilibrate) เป็นเวลา 10 ชั่วโมงหรือ ปริมาตร 2 เท่าของคอลัมน์



ภาพประกอบ 10 แสดงการบรรจุเจลลงในคอลัมน์

1.2 หาอัตราการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ไหลผ่านคอลัมน์ โดยคำนวณเป็นปริมาตร ลบ.ซม.ต่อ ซม.

1.3 หาปริมาตรระหว่างเจล ปริมาตรของเจลทั้งหมด และปริมาตรของเจลที่พองตัวแล้วดังนี้

1.3.1 ปลอຍให้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ไหลผ่านด้านล่างของคอลัมน์ โดยให้เหลือสารละลายบัฟเฟอร์ที่ด้านบนของคอลัมน์ประมาณ 0.2 ลบ.ซม.

1.3.2 เติมสารละลายผสมของบลูเด็กซ์แทรน 2000 (blue dextran 2000) และโพแทสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ (potassium ferricyanide) อย่างละ 0.001 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.5 ลบ.ซม. ลงไป เมื่อสารละลายผสมผ่านเข้าไปในเนื้อเจลจนเกือบแห้ง ค่อยๆเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไป

1.3.3 ปลอຍให้สารละลายบัฟเฟอร์ผ่านคอลัมน์ ต่อปลายสายยางด้านล่างของคอลัมน์เข้ากับปั๊ม และเครื่องเก็บแยกส่วน โดยเก็บหลอดละ 2.5 ลบ.ซม. จนสังเกตได้ว่าสารละลายสีเหลืองเริ่มจางหายไป จึงหยุดเก็บ

1.3.4 นำแต่ละหลอดที่แยกส่วนได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 และ 420 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร จะเป็นปริมาตรช่องว่างระหว่างเจล และปริมาตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรจะเป็นปริมาตรของเจลทั้งหมด

1.4 เติมสารตัวอย่างที่ประกอบด้วย เฟอร์ริติน (ferritin) น้ำหนักโมเลกุล 440,000 อัลโดเลส (aldolase) น้ำหนักโมเลกุล 158,000 และบอวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 67,000 อย่างละ 0.001 กรัม ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.5 ลบ.ซม. ลงในคอลัมน์

1.5 เมื่อสารละลายผ่านลงในเนื้อเจลแล้ว จึงชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

1.6 เก็บปริมาตรของสารที่ถูกชะ (elution volume) หลอดละ 2.5 ลบ.ซม. จนปริมาตรของสารที่ถูกชะออกมาเท่ากับปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ที่มีเจลบรรจุอยู่ ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน

1.7 นำแต่ละส่วนที่เก็บได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280

นาโนเมตร

1.8 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร กับปริมาตรของสารที่ถูกละ

1.9 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2-1.6 แต่เปลี่ยนสารตัวอย่างเป็น

1.9.1 สารตัวอย่างที่ประกอบด้วย คาตาเลส (catalase) น้ำหนักโมเลกุล 232,000 อัลโดเลส (aldolase) อัลบูมิน (albumin) ไคโมทริปซินโนเจน เอ (chymotrypsinogen A) น้ำหนักโมเลกุล 25,000 และไรโบนิวคลีเอส เอ (ribonuclease A) น้ำหนักโมเลกุล 13,700 อย่างละ 0.001 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.5 ลบ.ซม.

1.9.2 ซีรัมคนปริมาตร 0.5 ลบ.ซม.

2. หาปริมาณของสารตัวอย่างโดยวิธีทำปฏิกิริยากับสีโคมาสสี บิลเลี่ยนท์ บลู จี (ดัดแปลงมาจาก Bradford. 1976) ดังนี้

2.1 เตรียมโปรตีนรีเอเจนต์ (protein reagent) โดยชั่งสีโคมาสสี บิลเลี่ยนท์ บลู จี หนัก 0.0025 กรัม ละลายในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12.5 ลบ.ซม. และกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ลบ.ซม. นำมากรองและทำให้เจือจางจนมีปริมาตร 250 ลบ.ซม.

2.2 เตรียมโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) โดยชั่ง บอวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) หนัก 1 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลบ.ซม.

2.3 เติมสารในข้อ 2.1 และ 2.2 ดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงปริมาณของโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนรีเอเจนต์ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในแต่ละหลอดทดลอง

หลอดที่	หลอดเปรียบเทียบ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
โปรตีนมาตรฐาน($\times 10^{-3}$ ลบ.ซม.)	-	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	-
pH 7.5 ($\times 10^{-3}$ ลบ.ซม.)											
โปรตีนรีเอเจนต์($\times 10^{-3}$ ลบ.ซม.)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 470 และ 590 นาโนเมตร ตามลำดับ

2.5 หาค่าดัชนีการดูดกลืนแสง (absorbance ratio) ดังนี้

$$\text{ดัชนีการดูดกลืนแสง} = \frac{A_{590 \text{ นาโนเมตร}} (\text{โปรตีน}) - A_{590 \text{ นาโนเมตร}} (\text{หลอดเปรียบเทียบ})}{A_{470 \text{ นาโนเมตร}} (\text{โปรตีน}) - A_{470 \text{ นาโนเมตร}} (\text{หลอดเปรียบเทียบ})}$$

โดยที่ $A_{590 \text{ นาโนเมตร}}$ (โปรตีน) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตรของโปรตีน

$A_{470 \text{ นาโนเมตร}}$ (โปรตีน) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรของโปรตีน

$A_{590 \text{ นาโนเมตร}}$ (หลอดเปรียบเทียบ) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตรของหลอดเปรียบเทียบ

$A_{470 \text{ นาโนเมตร}}$ (หลอดเปรียบเทียบ) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรของหลอดเปรียบเทียบ

2.6 เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าดัชนีการดูดกลืนแสง กับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

2.7 หาปริมาณสารแต่ละส่วนโดยใช้สารปริมาตร 0.09 ลบ.ซม. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 0.01 ลบ.ซม. และโปรตีนรีเอเจนต์ ปริมาตร 5 ลบ.ซม.

2.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 470 และ 590 นาโนเมตร ตามลำดับ และคำนวณค่าดัชนีการดูดกลืนแสง

2.9 อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน พร้อมทั้งเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง กับปริมาตรของสารที่ถูกระเหย

3. นำเจลที่ผลิตได้ และเจลที่ผ่านกระบวนการทางเคมี มาแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ตามลำดับ และแช่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 10. โมลาร์ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือนเปรียบเทียบกับ เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100

4. นำเจลที่ผลิตได้ และเจลที่ผ่านกระบวนการทางเคมี มาต้มในหม้ออบความดัน อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาทีเปรียบเทียบกับ เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100

5. ขั้นตอนการแยกโปรตีนพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองขาวและพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองเขียว

สารเคมี

1. คอลัมน์ที่บรรจุเจลที่พัฒนาได้ดีที่สุด และเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100
2. พิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองขาวและพิษงูเขียวหางไหม้ชนิดทองเขียว

ที่ทำแห้ง (lyophilized) จากสภากาชาดไทย

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4
4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5
5. ลีแอมโปรตีน โคมาสสิ บริลเลียนท์ บลู จี
6. สารละลายเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
7. กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์

1. เครื่องเก็บแยกส่วนพร้อมปั๊ม
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
3. ไมโครปิเปต

วิธีดำเนินการวิจัย

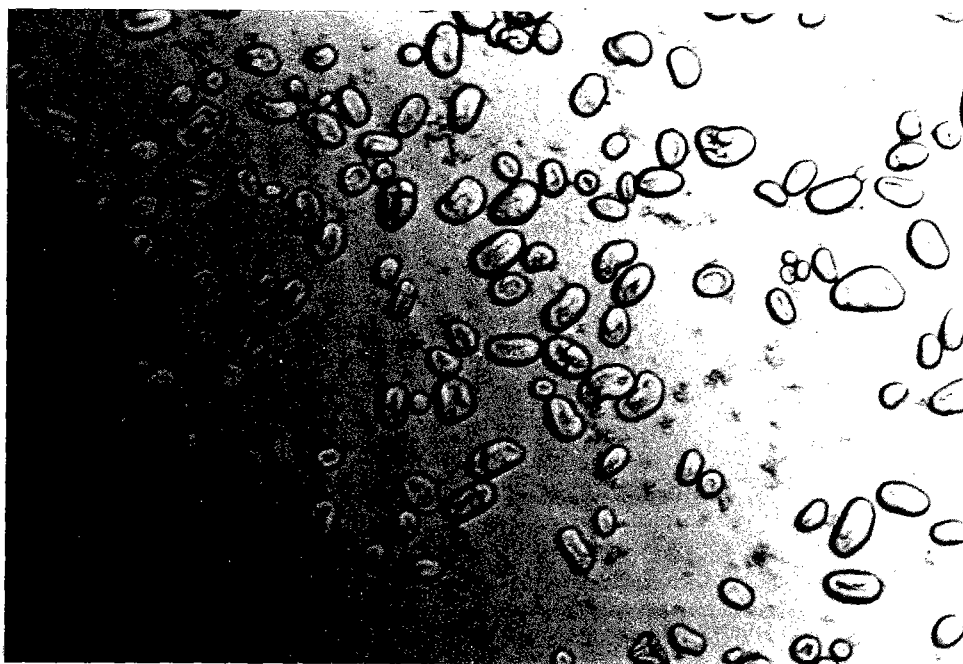
1. นำคอลัมน์ที่บรรจุเจลที่พัฒนาได้ดีที่สุด มาทำการแยกพิษเขียวหางไหม้ชนิดท้องขาวหนัก 0.008 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.4 ลบ.ซม.
2. เก็บปริมาตรของสารที่ถูกระเหยหาลอดละ 1 ลบ.ซม. ประมาณ 100 หลอด ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน
3. นำแต่ละหลอดที่แยกส่วนได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
4. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรกับปริมาตรของสารละลายที่ถูกระเหย
5. หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างแต่ละหลอดที่แยกส่วนได้ โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 0.09 ลบ.ซม. ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

6. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างกับ
ปริมาตรของสารที่ถูกละ
7. ทำวิธีเดียวกับข้อ 1-6 แต่เปลี่ยนจากพืชเขียวหางไหม้ชนิดทองขาว เป็น
พืชเขียวหางไหม้ชนิดทองเขียว และนำมาเปรียบเทียบกับเจลเซฟาเดกซ์ จี-100
8. คำนวณเปอร์เซ็นต์รีคอฟเวอรี่ของสารตัวอย่างทุกชนิดที่แยกได้จากคอลัมน์
ชนิดต่างๆดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์รีคอฟเวอรี่} = \frac{\text{ผลรวมของปริมาณโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละหลอด}}{\text{ปริมาณโปรตีนก่อนการแยก}} \times 100$$

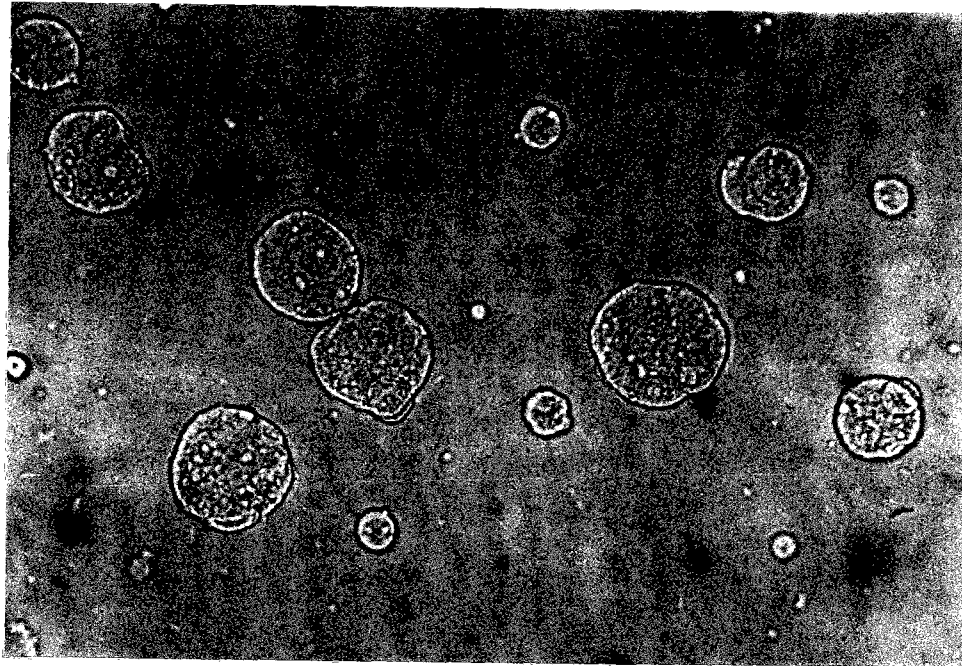
1. ผลการผลิตเจล

1.1 การผลิตเจล I พบว่าเจลที่ได้มีรูปร่างวงรี ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 แสดงเจล I จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

1.2 การผลิตเจล II พบว่าเจลที่ได้รูปร่างค่อนข้างกลมแต่ผิวไม่เรียบ
ดังภาพประกอบ 12



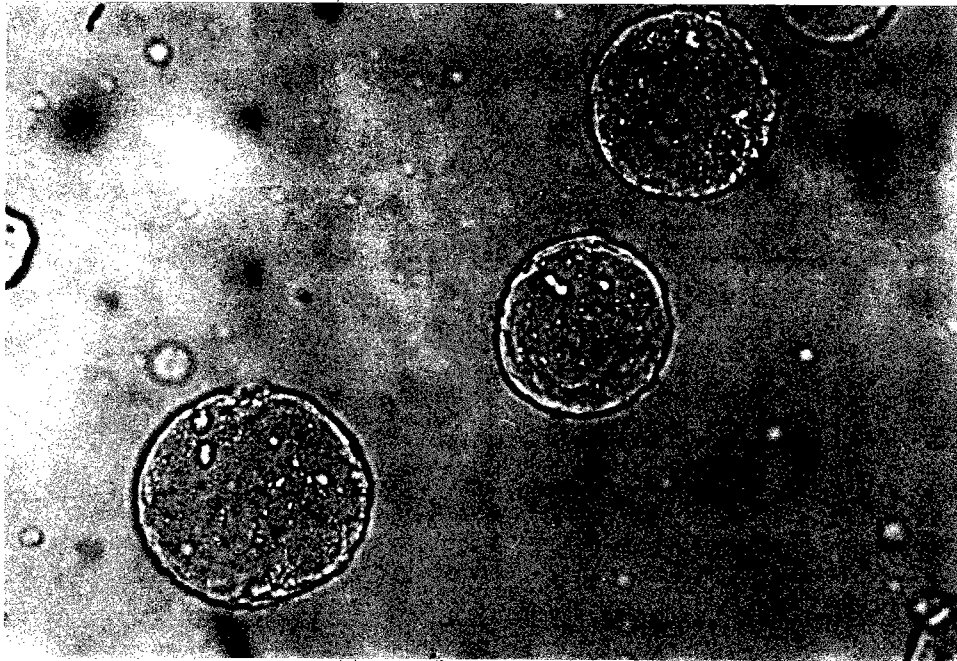
ภาพประกอบ 12 แสดงเซลล์ II จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

1.3 การผลิตเจลจากแป้งข้าวผสมกับวันเบอร์ 2 หรืออะกาโรส พบว่า
เมื่อผลิตเจลจากแป้งข้าวผสมกับวันเบอร์ 2 โดยใช้วิธีเดียวกับการผลิตเจล II
แต่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารที่ใช้และชนิดของสารที่ทำให้ยู่ตัว จะให้ผลการทดลอง
ดังตาราง 9

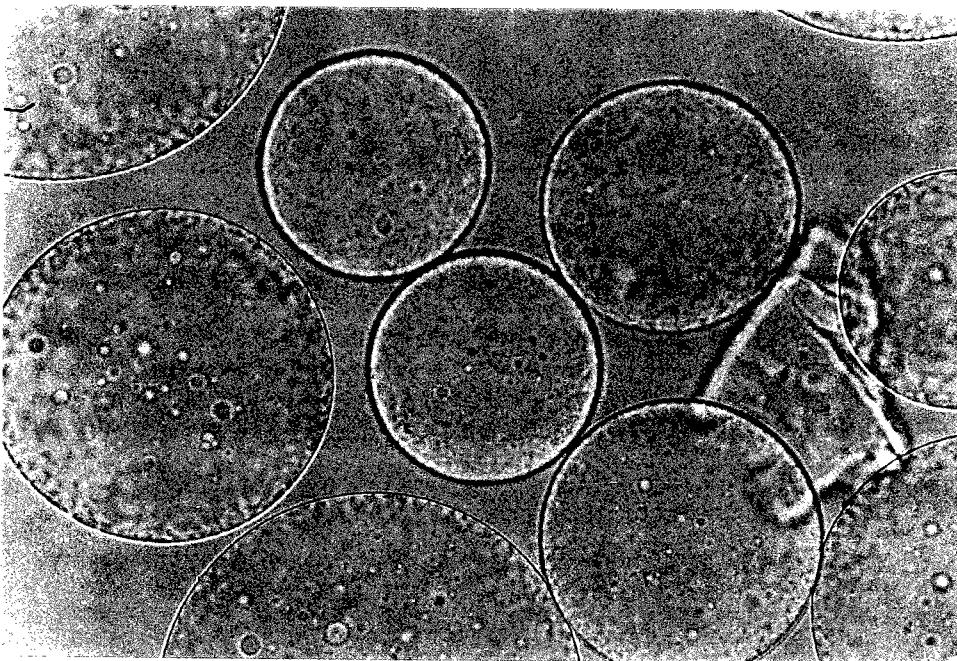
ตาราง 9 ผลการใส่แ่งถั่วเขียวและหุ่นเบอร์ 2 ปริมาตรของการบดและหุ่นเบอร์ 2 ปริมาตรของสารที่ให้อยู่ตัว คอลัมน์ และชนิดของสารที่ให้อยู่ตัว คอลัมน์

เจล	หุ่น	แ่งถั่วเขียว	สารที่ให้อยู่ตัว	คาร์บอนเตตระ	หอลูอื่น	ผลการทดลอง
เบอร์ 2	เบอร์ 2	ไซรคอน	หุ่น 80	คอลไรท์	(ลบ. ชม.)	(รูปร่างลักษณะเจลที่ได้)
(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	เอ็กซ์-100	(ลบ. ชม.)	(ลบ. ชม.)		
II 2	-	15	-	40	160	ทรงกลมผิวไม่เรียบส่วนใหญ่มีขนาดประมาณเซฟาเด็กซ์ จี-100
III 2	-	-	15	40	160	ทรงกลมผิวเรียบ ขนาดเล็กมาก
IV 2	-	12	3	40	160	เจลดัดกันไม่เป็นทรงกลม
V 4	-	-	15	40	160	ทรงกลมผิวเรียบ ขนาดเล็กมาก
VI 4	-	10	5	40	160	เจลดัดกันไม่เป็นทรงกลม
VII 0.5	1.5	15	-	40	160	เจลดัดกันไม่เป็นทรงกลม
VIII 1.5	1.5	5	10	40	160	เจลดัดกันไม่เป็นทรงกลม
IX 1.5	0.5	15	-	40	160	ทรงกลมผิวไม่เรียบส่วนใหญ่มีขนาดประมาณเซฟาเด็กซ์ จี-100
ดังภาพประกอบ 13						
X 1.5	0.5	30	-	80	320	ทรงกลมผิวไม่เรียบส่วนใหญ่มีขนาดประมาณเซฟาเด็กซ์ จี-100
XI 4.5	1.5	25	-	80	320	เจลเป็นแผ่นโดยมีเม็ดเจลดหลายาเม็ด ลักษณะทรงกลมผิวเรียบ
มาหลอมรวมติดกัน						

หมายเหตุ เจล II-IX ปริมาตรเจลที่ใช้ 33 ลบ.ชม. และเจล X-XI ปริมาตรเจลที่ใช้ 100 ลบ.ชม.



ก.



ข.

ภาพประกอบ 13 ก. แสดงเจล IX

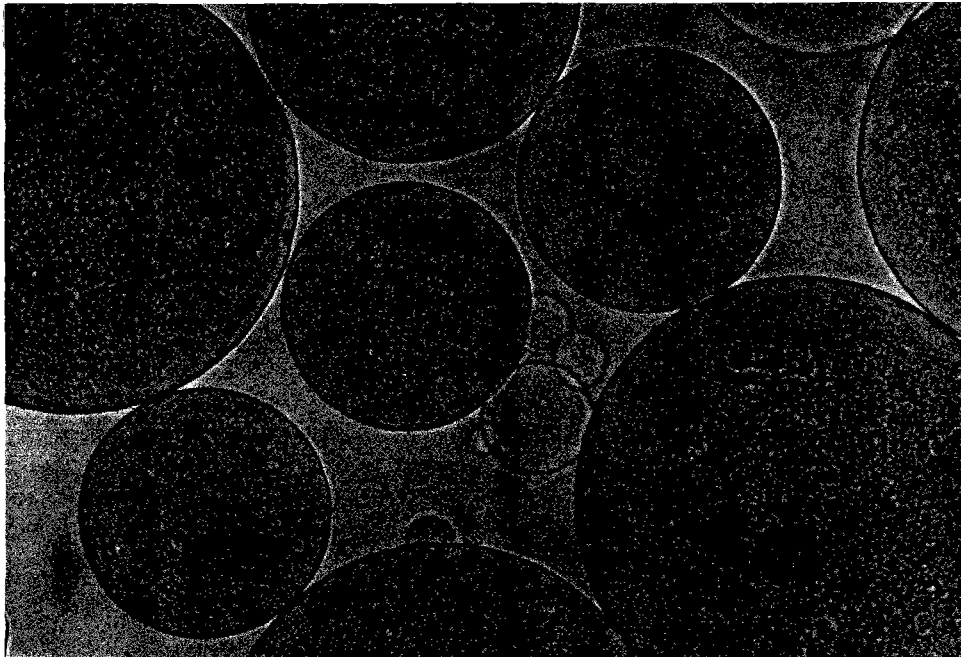
ข. แสดงเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 ชนิดละเอียด

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลแห้ง 40-120 ไมโครเมตร
จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

เมื่อผลิตเจล XII ในหม้ออบความดันแทนการกวนด้วยไฟอ่อน พบว่าเจลที่ได้ไม่เป็นทรงกลม แต่ถ้าทำให้เจลเย็นลงโดยแช่บีกเกอร์ในภาชนะที่มีน้ำแข็งหรือน้ำแข็งผสมเกลือแกงล้อมรอบ หลังจากปั่นด้วยเครื่องปั่นออมอจีไนเซอร์โดยใช้ความเร็วต่างกัน เจลที่ได้ (เจล XIII) จะมีรูปร่างทรงกลมแตกต่างกัน ตามตาราง 10

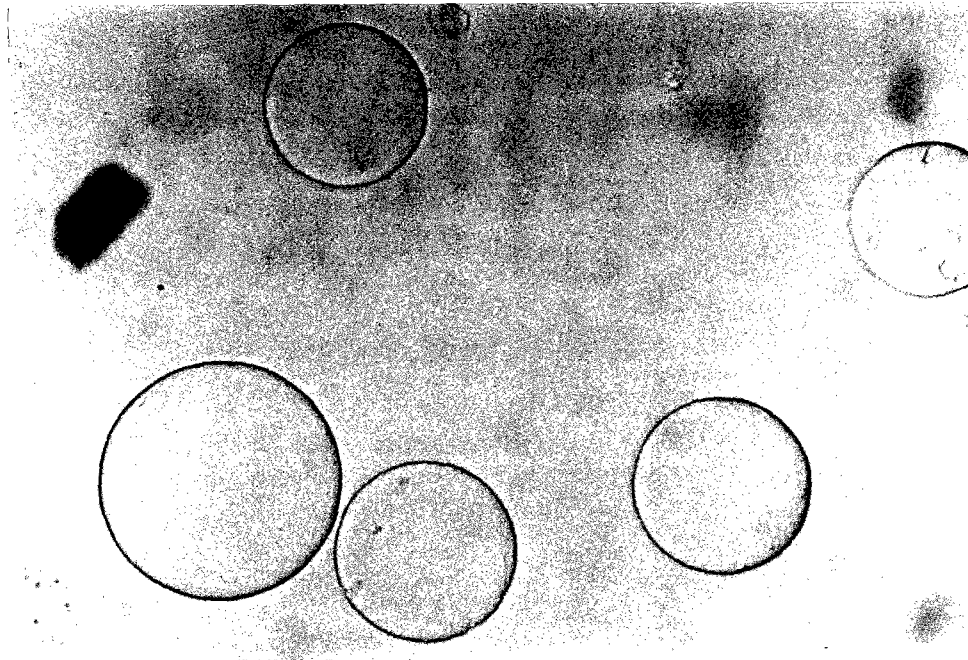
ตาราง 10 ผลของความเร็วของเครื่องปั่นออมอจีไนเซอร์ต่อลักษณะรูปร่างของเจล

ความเร็วของเครื่องออมอจีไนเซอร์ (รอบต่อนาที)	ผลการทดลอง (รูปร่างลักษณะของเจลที่ได้)
8,600	ทรงกลม ขนาดต่าง ๆ กัน มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ เจลติดกันบ้าง
9,300	ทรงกลม ขนาดต่าง ๆ กัน มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ แต่ขนาดเล็กกว่าเมื่อใช้ความเร็ว 8,600 รอบต่อนาที เจลติดกันบ้าง
10,000	ทรงกลม ขนาดเล็กกว่า เมื่อใช้ความเร็ว 8,600 9,300 รอบต่อนาที ขนาดประมาณเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 เจลติดกันน้อยดังภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 แสดงเจล XIII ขึ้นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที
จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

ถ้าผลิตเจลจากแป้งถั่วเขียวกับอะกาโรส ใช้ความเร็วของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์
ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ได้เจล XIV ซึ่งทำให้เย็นโดยแช่บีกเกอร์ในภาชนะที่มี
น้ำแข็งผสมเกลือแกงล้อมรอบ เจลที่ได้มีรูปร่างทรงกลมขนาดเล็ก ดังภาพประกอบ 15



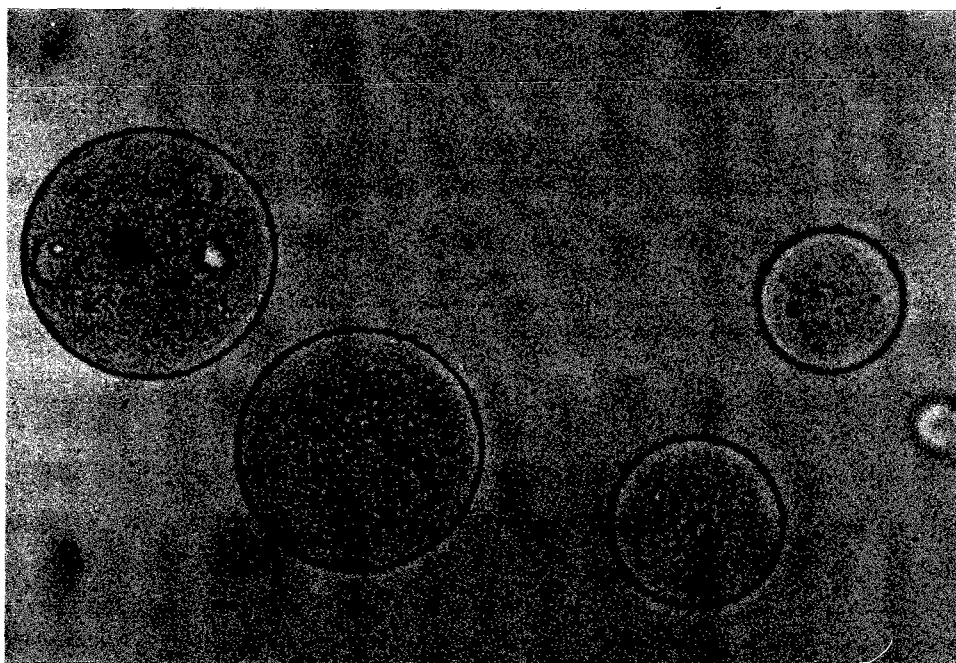
ภาพประกอบ 15 แสดงเจล XIV จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

ในการผลิตเจลด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นสามารถผลิตเจลได้ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่าในการผลิต 100 ครั้งสามารถผลิตเจลที่มีลักษณะทรงกลมได้ 70 ครั้งอีก 30 ครั้งจะหลอมติดกันมากจนใช้ไม่ได้ เมื่อปรับปรุงวิธีการผลิตในขั้นตอนที่ทำให้เจลเย็นตัวทันที โดยเติมอีเทอร์ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และแช่เจลในภาชนะที่ล้อมรอบด้วยน้ำแข็งผสมเกลือแกง พบว่าในการผลิตเจล XV และ เจล XVI ด้วยวิธีนี้สามารถผลิตเจลได้ 100 เปอร์เซ็นต์

และได้มีความพยายามแต่เบื้องต้นที่จะผลิตเจลจากแป้งมันสำปะหลัง และผลิตเจลจากแป้งมันสำปะหลังผสมกับวันเบอร์ 1 แต่ไม่สามารถที่จะผลิตเจลขึ้นได้

2. ผลการคัดเลือกขนาดเจล

การคัดขนาดเจลด้วยชุดอุปกรณ์ดังภาพประกอบ 9 พบว่าอัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 300 และ 400 ลบ.ซม ต่อชม. จะได้เจลที่มีขนาดประมาณเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 และขนาดใกล้เคียงกันมากขึ้น แต่เจลเปลี่ยนสีเนื่องจากใช้น้ำประปา เมื่อนำเจลที่ผลิตผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 ไมโครเมตร จะได้เจลที่มีขนาดประมาณเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 และเจลมีขนาดใกล้เคียงเช่นกันคือขนาดประมาณ 40-120 ไมโครเมตร จากการสังเกตเมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ที่เห็นจากสเกล แต่ไม่ได้ถ่ายภาพสเกลเอาไว้ นอกจากนี้เจลไม่เปลี่ยนสีเนื่องจากใช้น้ำกลั่น ในการคัดขนาด ดังภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 แสดงเจล XIII ที่คัดขนาดแล้ว จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

3. ผลการพัฒนาเจลที่ผลิตขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมี

3.1 ผลการเชื่อมไขว้เจลที่ผลิตได้ด้วยไดไวนิล ซัลโฟน ด้วยวิธีดังตาราง 6 พบว่า เจล XVII เจลที่ได้จะแตกละเอียดดังภาพประกอบ 17

เจล XVIII เจลที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพประกอบ 18

เจล XIX เจลที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลมประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

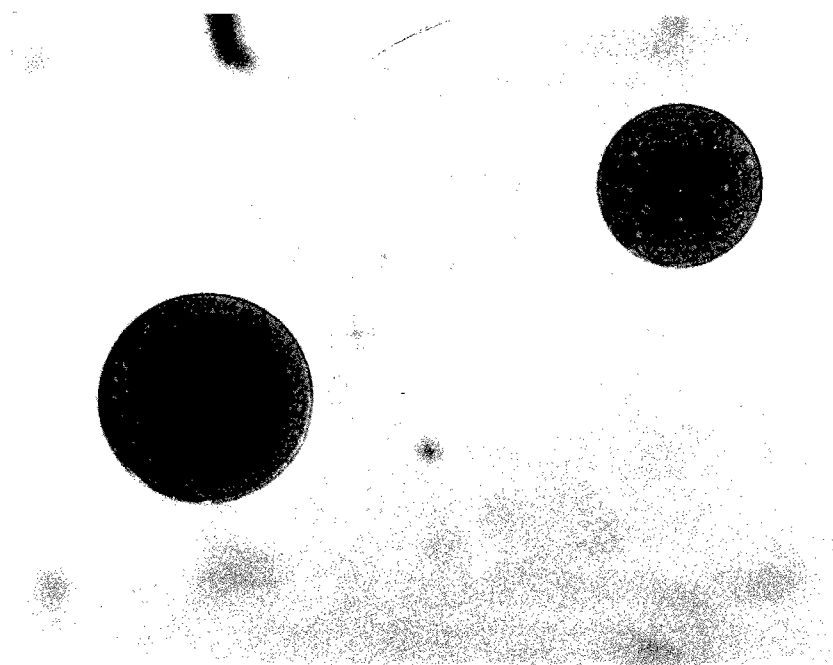
เจล XX เจลที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลมประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์

เจล XXI เจลที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลมประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพประกอบ 19

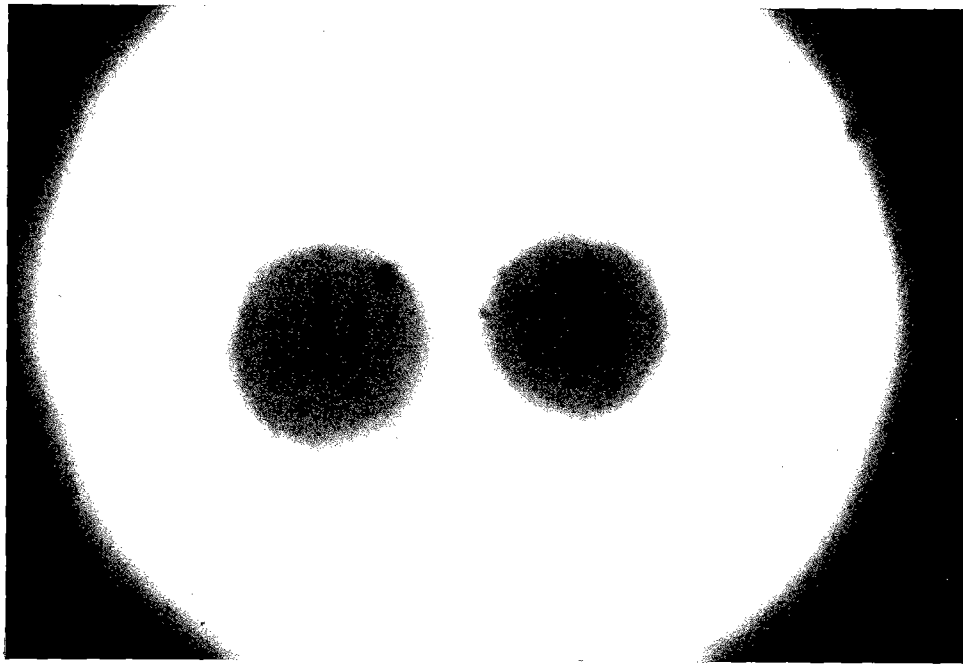
แสดงว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมไขว้เจลด้วยไดไวนิล ซัลโฟน คือการเชื่อมไขว้เจลที่ผลิตจากแป้งข้าวเหนียวกับอะกาโรส (6 เปอร์เซ็นต์) ด้วยไดไวนิล ซัลโฟนที่ pH 12.5 ซึ่งจะต้องใช้ความเร็วในการกวนของเครื่องกวนสารให้เข้ากัน คือกวนความเร็ว 200 รอบต่อนาทีและความเร็วในการปั่นที่ใช้คือ 500 รอบต่อนาที ถ้าความเร็วในการปั่นมากกว่านี้คือ 1000 รอบต่อนาที จะเห็นว่าเจลที่ผลิตได้จะเสียสภาพมากขึ้น คือจากเจลที่มีรูปร่างทรงกลมประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 70 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเจลที่จะนำมาบรรจุคอลัมน์เพื่อใช้ในการแยกสารตัวอย่างต่อไป คือเจล XXI



ภาพประกอบ 17 แสดงเจล XVII จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า



ภาพประกอบ 18 แสดงเจล XVIII จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า



ภาพประกอบ 20 แสดงจุด XXVII จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 67 เท่า

4. ผลการทดสอบคุณภาพของเจล

4.1 ผลการทดสอบคุณภาพด้านการแยกสารของเจลที่ผลิตได้ และเจลที่ผ่านกระบวนการเชื่อมไขว้ เปรียบเทียบกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 พบว่าเจลที่ผลิตและเจลที่ผ่านกระบวนการเชื่อมไขว้ในระยะแรก (เจล XVII และเจล XVIII) ไม่สามารถแยกบลูเด็กซ์แทรน และโพแทสเซียม เพอร์ริโซยานด์ได้ เมื่อนำเจล XVI (แป้งถั่วเขียว 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับอะกาโรส 4.5 เปอร์เซ็นต์ เจลเรียบกลม 100 เปอร์เซ็นต์) เจล XXI (เจล XVI ที่เชื่อมไขว้ด้วยไดไวนิล ซัลโฟน เจลเรียบกลม 90 เปอร์เซ็นต์) และเจล XXVII (เจล XVI ที่เชื่อมไขว้ด้วยอีพิกโลโรไฮดริน เจลเรียบกลม 80 เปอร์เซ็นต์) มาทำการแยกบลูเด็กซ์แทรนและโพแทสเซียม เพอร์ริโซยานด์ พบว่าสามารถ

ตาราง 11 แสดงผลของปริมาณสารที่ใช้ในการเชื่อมไข้วเจลด้วยอินคลอไรไฮดริน

เจล	อินคลอไรไฮดริน	ไดออกเซน	ผลการทดลอง
ชนิด ปริมาตร (ลบ.ซม.)	(ลบ.ซม.)	(ลบ.ซม.)	แสดงรูปร่างลักษณะของเจลที่ได้
XXII 30	3	4.5	เจลหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน แขนงลอยอยู่ในน้ำและไม่ตกตะกอน
XXIII 30	3	4.5	ลักษณะเช่นเดียวกับเจล XXII
XXIV 30	15	22.5	เจลหลอมเป็นแผ่นและตกตะกอน
XXV 30	30	45.0	เจลหลอมเป็นแผ่น เริ่มเห็นเป็นทรงกลมบางส่วนและตกตะกอน
XXVI 30	30	45.0	ทรงกลมประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์
XXVII 60	60	90.0	ทรงกลมประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพประกอบ 20

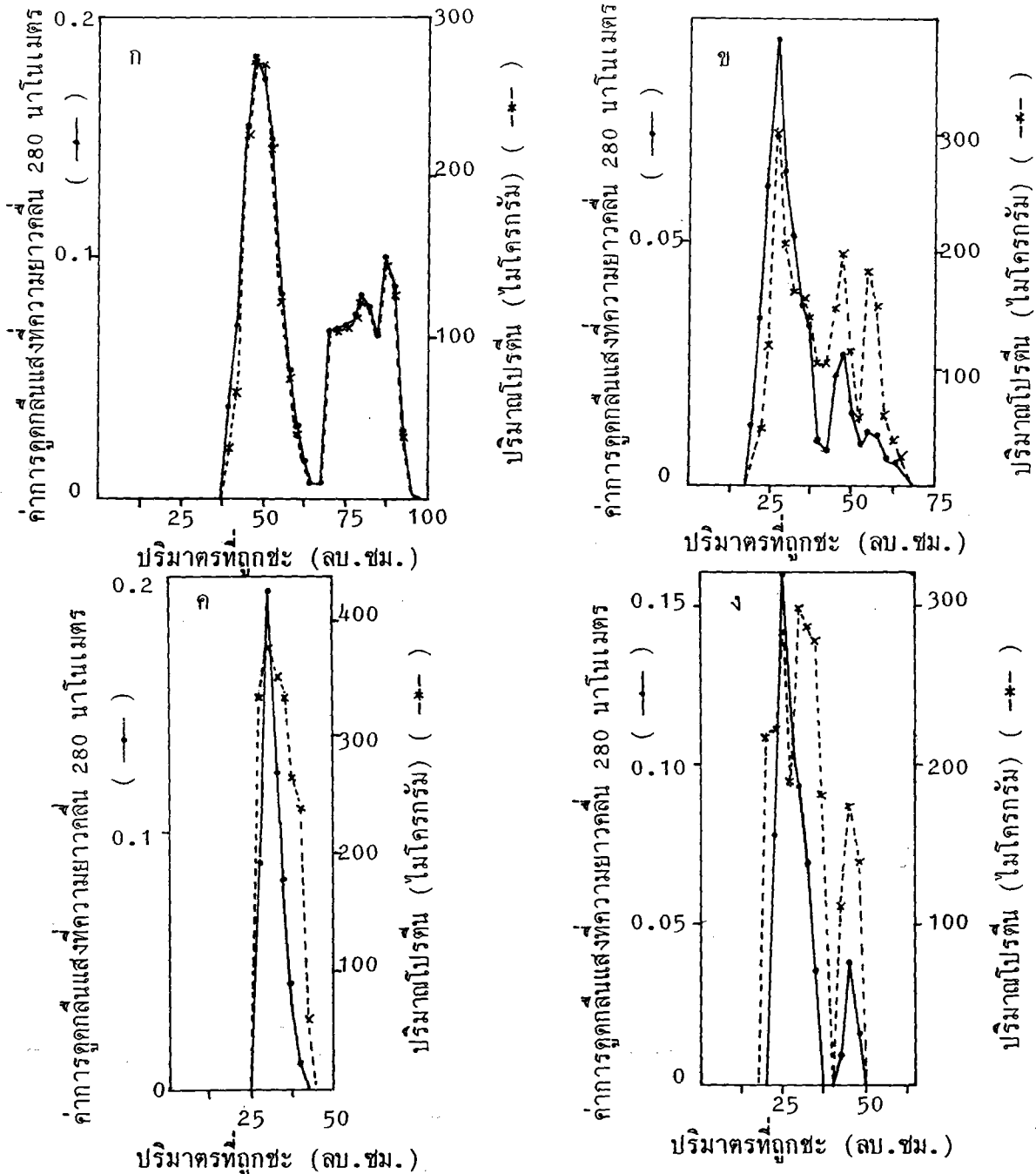
จากตาราง 11 จะเห็นว่า ในการเชื่อมไข้วเจลด้วยวิธีนี้ ถ้ามีการกวนเจลขณะทำการเชื่อมไข้วตลอดเวลาแล้ว จะได้เจลที่มีรูปร่างทรงกลม แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณในการผลิตเจลแล้วก็ตาม ดังนั้นจึงนำเจล XXVII มาบรรจุคอลัมน์ เพื่อนำมาแยกสารตัวอย่างต่อไป

สภาวะคอลัมน์

เจล	ปริมาตรทั้งหมด V_c (ลบ.ซม)	ปริมาตรช่องว่างระหว่างเจล V_o (ลบ.ซม)	ปริมาตรเนื้อเจล $V_c - V_o$ (ลบ.ซม)	อัตราเร็ว (ลบ.ซม./ซม.)
XVI	72.5	32.5	40.0	10.23
XXI	72.5	30.0	42.5	10.23
XXVII	50.0	25.0	25.0	10.23
เจลเซฟาคีร์				
จี-100	60.0	25.0	35.0	10.23

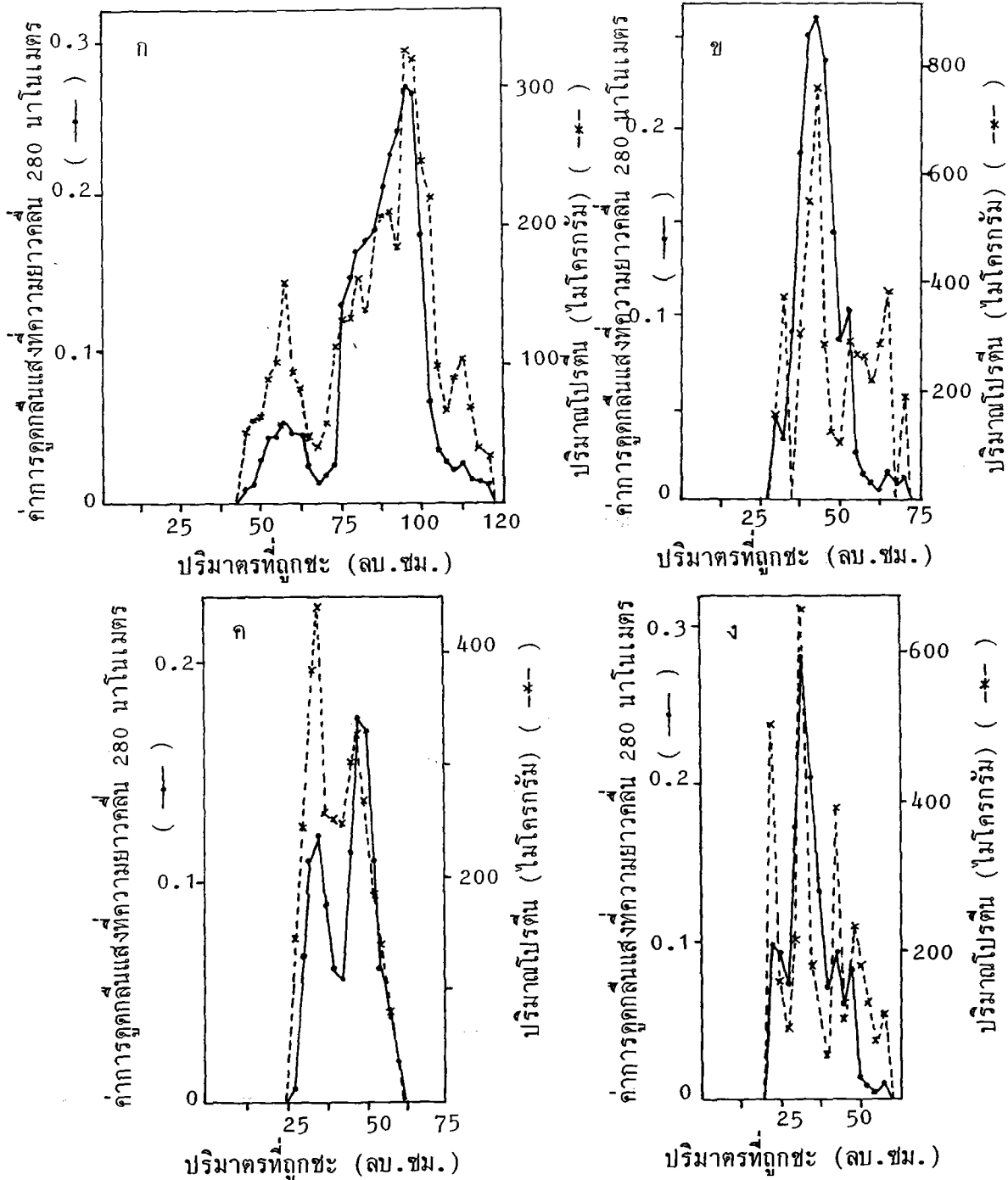
และเมื่อนำ เจล XVI เจล XXI เจล XXVII มาทำการแยกสารตัวอย่างและหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีทำปฏิกิริยากับสียโคมาสสตี บริลเลียนท์ บลู จี เปรียบเทียบกับ เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 ดังแสดงตามภาพประกอบ 21-23 พบว่า เจล XVI เจล XXI และ เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 สามารถแยกโปรตีนมาตรฐานคือ เฟอร์รีติน อัลโบลูมินและอัลบูมินได้ 4 พิกัดหลัก 2 พิกัด โดยพิกัด 2 ของ เจล XVI และ เจล XXI อาจจะมีย่อย 2 พิกัดที่เกิดการซ้อนทับกัน สำหรับ เจล XXVII แยกได้เพียงพิกัดเดียว ดังภาพประกอบ 21

เมื่อนำเจลทั้งหมดมาแยกโปรตีนมาตรฐานคือ คาทาเลส อัลโคเลส อัลบูมิน ไคโมทริปซินโนเจน เอ และโรโบนิวคลีเอส เอ พบว่าเจล XVI เจล XXI และเจล เซฟาเด็กซ์ จี-100 แยกได้ 5 นิค แต่เจล XVI นิคแยกออกจากกันไม่ตั้นัก สำหรับ เจล XXVII แยกได้เพียง 2 นิค ดังภาพประกอบ 22 และเมื่อนำเจลทั้งหมดมาแยก ซีรัมของคน พบว่าเจล XVI เจล XXVII และเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 แยกได้ 2 นิค แต่เจล XVI นิคแยกออกจากกันไม่ตั้นัก สำหรับเจล XXI รูปแบบของนิคก็ต่างไปจาก เมื่อใช้เจลชนิดอื่นๆ แสดงว่านิคแยกออกจากกันไม่ได้ ดังภาพประกอบ 23



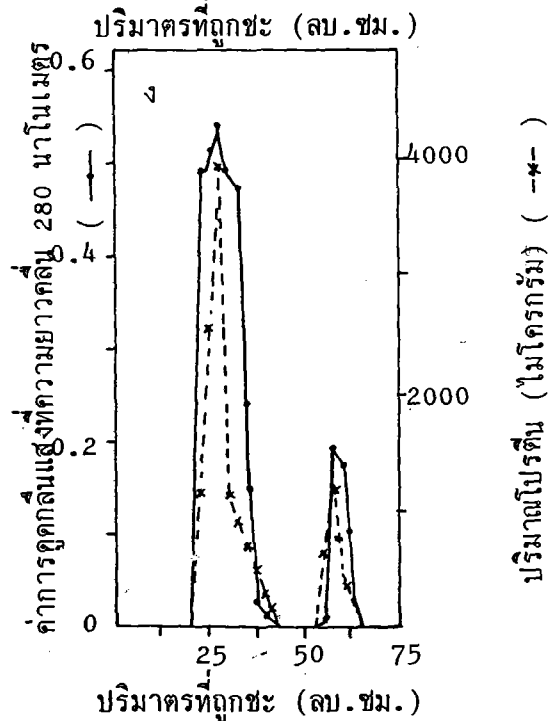
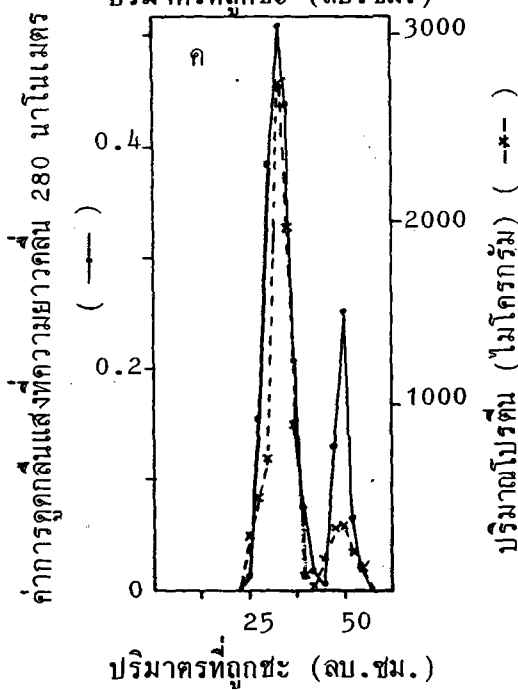
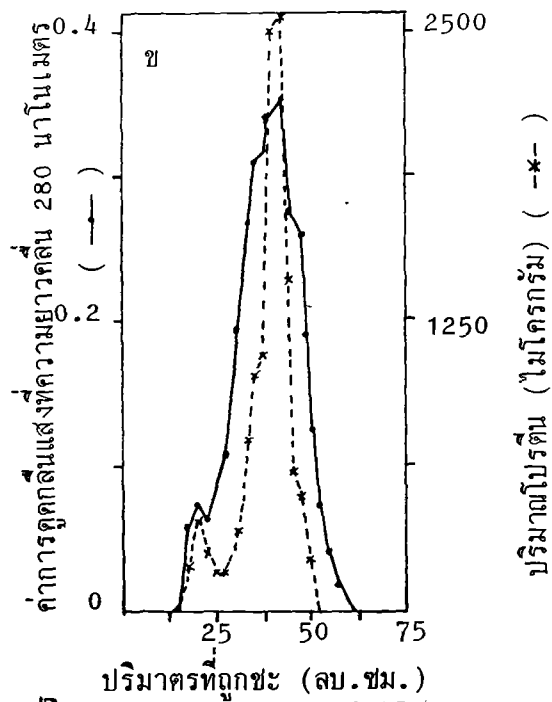
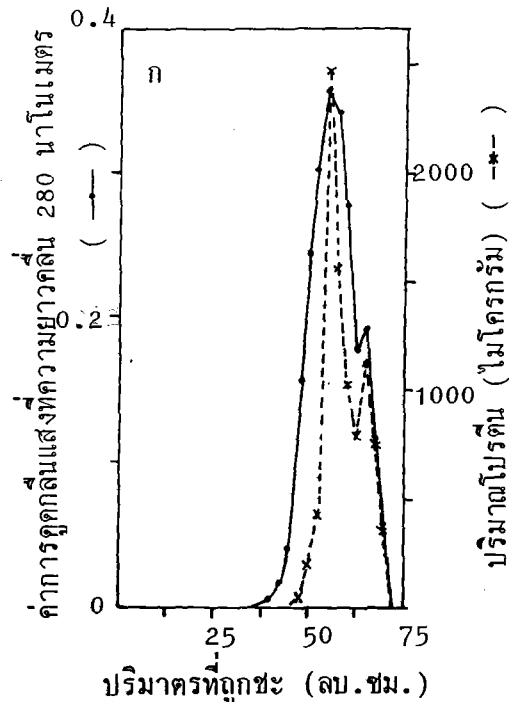
ภาพประกอบ 21 ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานคือ เฟอริติน อัลโบลูมิน และอัลบูมินโดย

(ก) เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข) เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค) เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ (ง) เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม.ต่อชม. เก็บแยกส่วน หลอกละ 2.5 ลบ.ซม.



ภาพประกอบ 22 ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานคือ คาทาเลส อัลโคเลส อัลบูมิน

โคโมทริปรีโนเจน เอ และไรโบนิวคลีเอส เอ โดย(ก)เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข)เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค)เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ (ง)เจลเซฟาดิเก็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม.ต่อชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 2.5 ลบ.ซม.



ภาพประกอบ 23 ผลการแยกซีรัมของคน โดย(ก)เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด

1x65 ซม. (ข)เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค)เจล XXVII บรรจุใน

คอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ (ง)เจลเซฟาเดกซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด

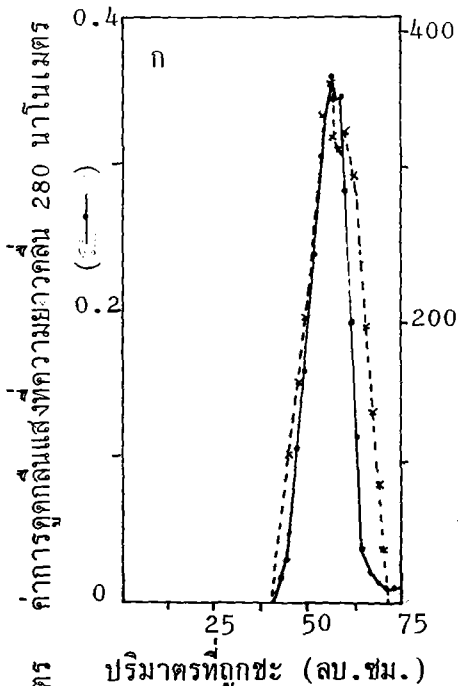
1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม.ต่อชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 2.5 ลบ.ซม.

4.2 การทดสอบความคงทนของเจลชนิดต่างๆที่ผลิตได้ (เจล XVI เจล XXI และเจล XXVII) เปรียบเทียบกับเจลเซฟาคีร์ จี-100 พบว่าเจลทั้งหมดสามารถเก็บในน้ำกลั่น สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2-1.0 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2-1.0 โมลาร์ ได้นาน 30 วัน โดยลักษณะของเจลไม่เปลี่ยนแปลง

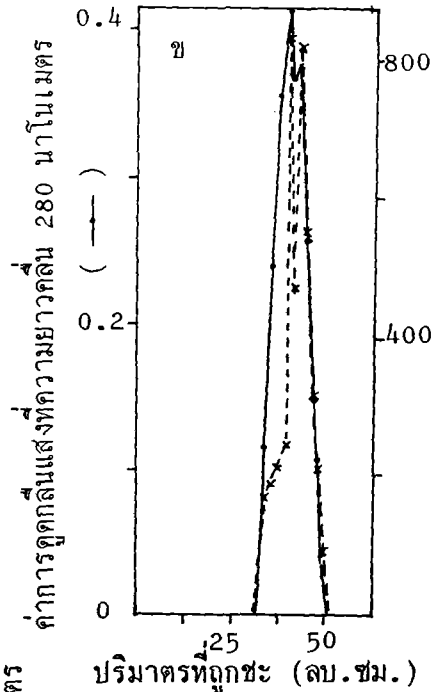
และเมื่อนำเจลทั้งหมดมาต้มในหม้ออบความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าเจล XVI จะแตกสลายเป็นเนื้อเดียวกัน เจล XXI สามารถคงสภาพอยู่ได้เป็นเวลา 5 นาที ส่วนเจล XXVII สามารถคงสภาพอยู่ได้นานกว่า 30 นาทีเช่นเดียวกับเจลเซฟาคีร์ จี-100

5. ผลการแยกโปรตีนพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองขาวและพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองเขียว

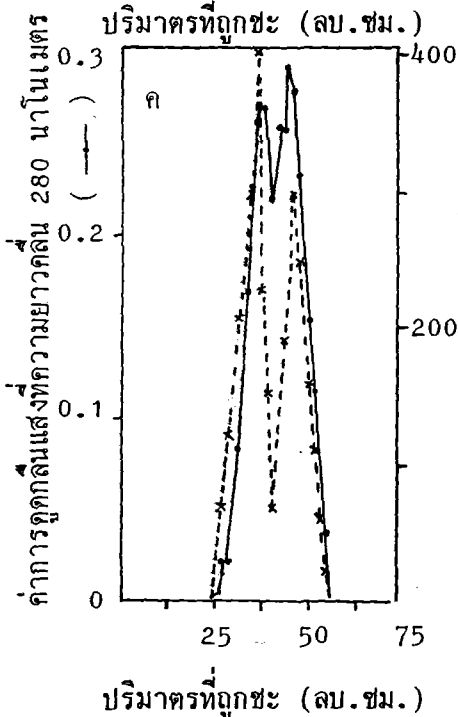
การแยกโปรตีนพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองขาวและพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองเขียว โดยเจล XVI เจล XXI และเจล XXVII เปรียบเทียบกับเจลเซฟาคีร์ จี-100 ดังแสดงตามภาพประกอบ 24-25 พบว่าเจล XXVII และเจลเซฟาคีร์สามารถแยกพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองขาวได้พีกหลัก 2 พีก แต่เจล XXVII พีกที่แยกได้มีบางส่วนที่ซ้อนทับกัน สำหรับเจล XVI และเจล XXI ไม่สามารถแยกพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองขาวได้ ดังภาพประกอบ 24 และเมื่อนำเจลทั้งหมดมาแยกพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองเขียวพบว่า เจล XVI และเจล XXI ไม่สามารถแยกพิษเขียวทางโหม้ชนิดทองเขียวได้ สำหรับเจล XXVII และเจลเซฟาคีร์ จี-100 แยกได้ 3 พีก แต่เจล XXVII พีกแยกออกจากกันไม่ตั่นก ดังภาพประกอบ 25



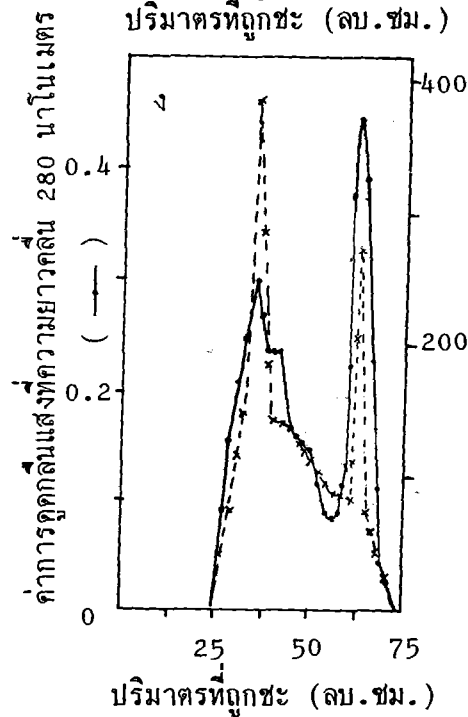
ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) (---)



ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) (---)

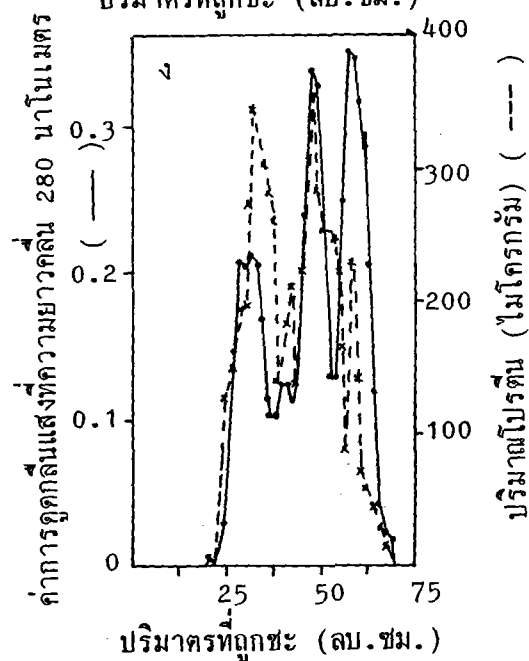
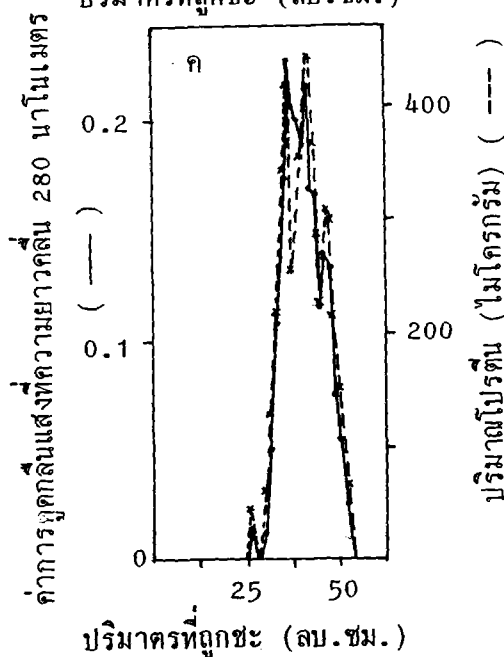
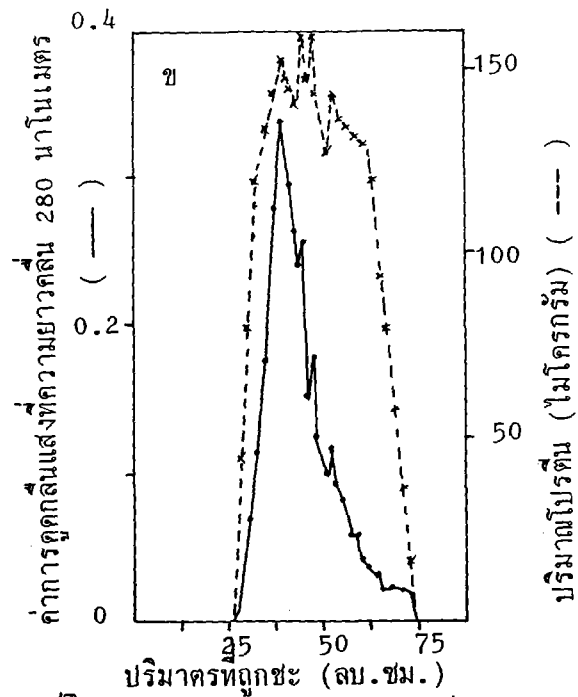
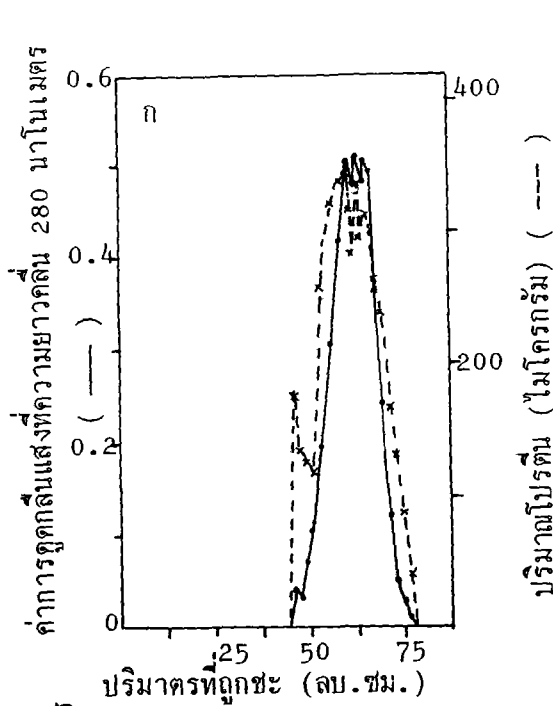


ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) (---)



ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) (---)

ภาพประกอบ 24 ผลการแยกพิษเขียวหางไหม้ชนิดท้องขาว โดย(ก)เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข)เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค)เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ (ง)เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม.ต่อชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 1.0 ลบ.ซม.



ภาพประกอบ 25 ผลการแยกนึ่งไขขาวหางไหม้ชนิดท้องเขียว โดย(ก)เจล XVI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x65 ซม. (ข)เจล XXI บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x50 ซม. (ค)เจล XXVII บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x56 ซม. เปรียบเทียบกับ (ง)เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x70 ซม. อัตราการไหล 10.23 ลบ.ซม.ต่อชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 1.0 ลบ.ซม.

เมื่อพิจารณา เปอร์เซนต์รีคอฟเวอรี่ (percent recovery) จะได้ดังตาราง 13

ตาราง 13 แสดงเปอร์เซนต์รีคอฟเวอรี่ จากคอลัมน์ชนิดต่างๆ

ชนิดของเจล สารที่แยก	เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 (เปอร์เซ็นต์)	เจล XVI (เปอร์เซ็นต์)	เจล XXI (เปอร์เซ็นต์)	เจล XXVII (เปอร์เซ็นต์)
สารที่ประกอบด้วย เฟอร์ริติน อัลโคเลส และอัลบูมิน	77.72	83.61	80.57	78.37
สารที่ประกอบด้วย คาตาเลส อัลโคเลส อัลบูมิน ไคโมทริปซี- โนเจน เอ และ ไรโบนิวคลีเอส เอ	77.23	64.80	90.73	74.56
ซีรัมของคน	85.90	71.13	82.86	73.54
พิษงูเขียวหางไหม้ ชนิดทองขาว	83.20	86.70	85.14	74.52
พิษงูเขียวหางไหม้ ชนิดทองเขียว	82.95	89.20	74.15	89.02

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลและอภิปรายผล

1. การผลิตเจลและการพัฒนาเจล

จากการศึกษาวิธีการผลิตเจล พบว่าแป้งถั่วเขียวและแป้งมันสำปะหลัง ไม่สามารถนำมาผลิตเจลให้มีรูปร่างทรงกลมได้ และเจลที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้แยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันออกจากกันได้ แต่ผลิตภัณฑ์ของแป้งถั่วเขียวได้แก่ วุ้นเส้นและเม็ดสาหร่าย เมื่อนำมาทำเป็นเม็ดเล็กๆสามารถที่จะแยกสารได้ (มนตรี ตริณวุฒิทรัพย์ และจิตติมา ทองใบ . 2529 ; จารุวรรณ อารีย์พันธุ์ และวิจิตร ชัยกิตติวิทย์ . 2529 ; เรืองกิตติ กนกปรีชาวุฒิ . 2530) เมื่อนำแป้งถั่วเขียวมาผสมกับวุ้นหรืออะกาโรส เจลที่ผลิตขึ้นมีรูปร่างทรงกลมและสามารถนำมาใช้แยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันออกจากกันได้ ในการผสมแป้งถั่วเขียวปริมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กับวุ้นหรืออะกาโรส พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของแป้งถั่วเขียวที่ผสมกับวุ้นหรืออะกาโรสแล้วสามารถผลิตเจลที่มีรูปร่างทรงกลมได้คือ 25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองผลิตเจลจากแป้งถั่วเขียว 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับวุ้นหรืออะกาโรสได้ปริมาณรวมต่างๆคือ 2 เปอร์เซ็นต์ 3 เปอร์เซ็นต์ 4 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียว 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับวุ้นหรืออะกาโรสได้ปริมาณรวม 6 เปอร์เซ็นต์ คือ แป้งถั่วเขียว 1.5 กรัม และวุ้นหรืออะกาโรส 4.5 กรัมในน้ำ 100 ลบ.ซม. แล้วต้มในหม้ออบความดัน มีรูปร่างทรงกลมที่สุด การผลิตเจลที่มีรูปร่างทรงกลมยังขึ้นกับสารที่ทำให้อยู่ตัวด้วยคือไตรตอน เอ็กซ์-100 สามารถผลิตเจลที่มีรูปร่างทรงกลมได้ และถ้าใช้ทวิน 80 เจลที่ได้จะมีขนาดเล็กเกินไป แม้ว่าจะนำมาผสมกับไตรตอน เอ็กซ์-100 แล้วก็ตาม

นอกจากนี้การผลิตเจลยังขึ้นกับความเร็วในการปั่น จากการทดลองใช้ความเร็วในการปั่นของเครื่องฮอมอจีไนเซอร์คือ 8,600 9,300 10,000 รอบต่อนาทีตามลำดับ พบว่าเมื่อปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีจะได้เจลที่มีรูปร่างทรงกลมและมีขนาดใกล้เคียงกับเจลเซฟาเดกซ์ จี-100 มากที่สุด การทำสารแขวนลอยเจลเย็นมีผลต่อรูปร่างเจลนั้นคือการทำสารแขวนลอยเจลเย็นตัวทันที จะทำให้เจลมีรูปร่างทรงกลมไม่ติดกัน แต่ถ้าสารแขวนลอยเจลเย็นตัวลงช้าๆ จะทำให้เจลหลอมติดกันได้ง่าย เจลที่ได้จะมีรูปร่างไม่เป็นทรงกลม นอกจากนี้การล้างด้วยอีเทอร์เพื่อขจัดสารละลายอินทรีย์ผสมที่มากเกินไป พบว่าถ้าใช้อีเทอร์มากเกินไปจะทำให้เจลหลอมติดกัน เนื่องจากได้ทดลองใช้อีเทอร์มากกว่าปริมาณที่กำหนดในการทดลอง แต่ถ้าใช้น้อยเกินไปจะทำให้สารละลายอินทรีย์ผสมเหลือตกค้างอยู่ในเจล สังเกตได้จากเจลที่ผลิตไม่ตกตะกอน (Hjertén. 1964) ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเจลมีหลายประการคือ ความเข้มข้นของสารที่นำมาผลิต ชนิดและปริมาณของสารที่ทำให้ย่อยตัว ซึ่งพบเช่นเดียวกับเจอร์เทิน (Hjertén. 1964) ความเร็วของเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ การทำสารแขวนลอยเจลให้ย่อยตัว และปริมาณอีเทอร์ที่ใช้

เนื่องจากเจลที่ผลิตนั้นมีขนาดต่างๆปะปนกัน จึงจำเป็นต้องมีการคัดขนาดเจลก่อนที่จะนำมาใช้งาน จากการศึกษาวิธีการคัดขนาดเจล พบว่าการใช้ชุดอุปกรณ์ดังภาพประกอบ 9 เหมาะสำหรับการคัดขนาดเจลที่มีปริมาณมาก แต่เจลที่ผลิตปริมาณน้อยควรคัดขนาดด้วยตะแกรงร่อนจะสะดวกและรวดเร็วกว่า และขนาดของเจลที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 40-120 ไมโครเมตร

การพัฒนาเจลเพื่อให้ได้เจลที่แข็งแรงกว่า อัตราการไหลสูงกว่า ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดีกว่า สามารถทำได้โดยนำเจลที่ผลิตมาผ่านกระบวนการทางเคมีเช่น การเชื่อมไข้วด้วยไดไวนิล ซัลโฟน และการเชื่อมไข้วด้วยอีพิลอโรไอดริน เป็นต้น จากการศึกษาการเชื่อมไข้วเจลด้วยไดไวนิล ซัลโฟน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมไข้วเจลด้วยไดไวนิล ซัลโฟน คือการเชื่อมไข้วเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวผสมกับอะกาโรส (เจล XXI) ซึ่งทำการเชื่อมไข้วเจลที่ pH 12.5 อุณหภูมิห้อง การเติม

โซเดียม บอโรไฮไดรด์เพื่อป้องกันการเสียสภาพของเจลที่ pH สูงๆและที่อุณหภูมิสูงๆ เพราะในระหว่างที่มีการเชื่อมไขว้เจลอุณหภูมิของสารละลายจะเพิ่มขึ้น ปริมาณของ ไดไวนิล ซัลโฟเนตต้องพอเหมาะ ถ้าไดไวนิล ซัลโฟเนตน้อยเกินไปจะทำให้เจลเชื่อมไขว้กันน้อย การกำจัดไดไวนิล ซัลโฟเนตที่มากเกินไปสามารถกำจัดได้โดยใช้ ดิ(-)แมนนิทอล ทำปฏิกิริยากับหมู่ไวนิลที่อิสระ (free vinyl group) การกำจัดไดไวนิล ซัลโฟเนตที่มากเกินไปไม่ควรใช้น้ำกลั่น เพราะไดไวนิล ซัลโฟเนตไม่ละลายในน้ำกลั่น การล้างเจลที่ pH สูงเนื่องจากเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์จะได้เจลอสีขาว สิ่งที่ต้องพิจารณาในการพัฒนาเจลด้วยวิธีนี้อีกประการหนึ่งก็คือ ความเร็วในการกวนของเครื่องกวนสารให้เข้ากัน และความเร็วในการปั่นของเครื่องปั่นเซนตริฟิว พบว่าถ้ามีการกวนหรือการปั่นเจลมากเกินไปจะทำให้เจลแตกได้ง่าย ไม่เหมาะในการนำมาใช้งาน และถ้ากวนเจลอเกินไปก็จะทำให้ไดไวนิล ซัลโฟเนตสัมผัสกับเจลไม่ทั่วถึง และถ้าความเร็วในการปั่นน้อยเกินไป เจลจะไม่ตกตะกอน นอกจากนี้ขนาดของแท่งแม่เหล็กที่ใช้ในการกวนมีผลต่อการพัฒนาเจลเพราะถ้าใช้แท่งแม่เหล็กที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะทำให้เจลแตก ดังนั้นการเชื่อมไขว้เจลด้วยไดไวนิล ซัลโฟเนต สิ่งที่ต้องพิจารณาดังนี้คือปริมาณของไดไวนิล ซัลโฟเนต ตัวรีดิวซ์ pH สารที่ใช้สำหรับกำจัดไดไวนิล ซัลโฟเนต ที่มากเกินไป สิ่งเหล่านี้เจอที่พบเช่นเดียวกัน (Hjertén . 1987) นอกจากนี้ยังมีความเร็วในการกวนและการปั่น และขนาดของแท่งแม่เหล็ก

การเชื่อมไขว้ด้วยอิทธิพลโรไฮดริน พบว่าขณะทำการเชื่อมไขว้เจลต้องมีการกวนตลอดเวลาเพื่อไม่ให้เจลดตกเป็นแผ่นอยู่ข้างขวดกันกลม ในการเชื่อมไขว้ด้วยวิธีนี้อัตราส่วนที่เหมาะสมของปริมาณเจลต่อปริมาณอิทธิพลโรไฮดรินต่อปริมาณไดออกเซนคือ 2:2:3 ตามลำดับ

2. การทดสอบคุณสมบัติของเจลทางโครมาโตกราฟี (chromatographic test)

เมื่อนำเจลที่ผลิตจากแป้งข้าวโพดผสมกับอะกาโรส (เจล XVI) และเจลที่ผลิตจาก

แป้งถั่วเขียวผสมกับอะกาโรสที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วยไดไวเนล ซัลโฟน (เจล XXI) กับ อิพิกลอโรไฮดริน (เจล XXVII) มาทำการแยกสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 พบว่าเจล XVI เจล XXI และเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 สามารถแยกโปรตีนมาตรฐาน คือ เฟอรัรีติน อัลโกลูสและอัลบูมินได้หลัก 2 พิก โดยพิกที่ 2 ของเจล XVI และเจล XXI อาจจะมีพิกย่อย 2 พิกที่เกิดการซ้อนทับกัน สำหรับเจล XXVII แยกได้เพียงพิกเดียว ดัง ภาพประกอบ 21 เมื่อนำเจลทั้งหมดมาแยกโปรตีนมาตรฐานคือ คาทาเลส อัลโกลูส อัลบูมิน โคโมทรูปซีโนเจน เอ และโรโบนิวคลีเอส เอ พบว่าเจล XVI เจล XXI และเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 แยกได้ 5 พิก แต่เจล XVI พิกแยกออกจากกันไม่ตึง สำหรับเจล XXVII แยกได้เพียง 2 พิก ดังภาพประกอบ 22 แสดงว่าเจลที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วยไดไวเนล ซัลโฟน สามารถแยก โปรตีนมาตรฐานได้ดีกว่า เจลที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วยอิพิกลอโรไฮดรินซึ่งมีขนาดของรูพรุนเล็กมาก และเมื่อนำเจลทั้งหมดมาแยกซีรัมของคน พบว่าเจล XVI เจล XXVII และเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 แยกได้ 2 พิก แต่เจล XVI พิกแยกออกจากกันไม่ตึง สำหรับเจล XXI รูปแบบของพิกที่ได้ต่างไป จากเมื่อใช้เจลชนิดอื่นๆ แสดงว่าพิกแยกออกจากกันไม่ได้ ดังภาพประกอบ 23

สำหรับประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนพิกเขียวทางไหม้ชนิดท้องขาวและพิกเขียว ทางไหม้ชนิดท้องเขียวโดยเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวผสมกับอะกาโรส (เจล XVI) เจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวผสมกับอะกาโรสที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วยไดไวเนล ซัลโฟน (เจล XXI) และเชื่อมไข้วด้วยอิพิกลอโรไฮดริน (เจล XXVII) เปรียบเทียบกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 พบว่าเจล XXVII และเจลเซฟาเด็กซ์สามารถแยกพิกเขียวทางไหม้ชนิดท้องขาวได้หลัก 2 พิก แต่เจล XXVII พิกที่แยกได้มีบางส่วนที่ซ้อนทับกัน สำหรับเจล XVI และเจล XXI ไม่สามารถแยกพิกเขียวทางไหม้ชนิดท้องขาวได้ ดังภาพประกอบ 24 และเมื่อนำเจลทั้งหมด มาแยกพิกเขียวทางไหม้ชนิดท้องเขียวพบว่า เจล XVI และเจล XXI ไม่สามารถแยก พิกเขียวทางไหม้ชนิดท้องเขียวได้ สำหรับเจล XXVII และเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 แยกได้ 3 พิก แต่เจล XXVII พิกแยกออกจากกันไม่ตึง ดังภาพประกอบ 25

เมื่อนิจารณา เปอร์เซ็นต์รีคอฟเวอรี ตามตาราง 13 พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วเจลทั้งหมด

มีเปอร์เซ็นต์รีคอฟเวอรี ในการแยกสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยคาตาเลส อัลโตเลส อัลบูมิน ไคโมทริปซินเจน เอ และไรโบนิวคลีเอส เอ ของเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวผสมกับอะกาโรส (เจล XVI) เจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวกับอะกาโรสที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวนิล ซัลโฟน (เจล XXI) คือ 64.80 เปอร์เซ็นต์ และ 90.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่า เปอร์เซ็นต์รีคอฟเวอรี ขึ้นกับชนิดของสารที่ต้องการแยกและชนิดของเจลที่ใช้ (Hjerten, 1962 ;Pharmacia Fine Chemical AB, 1982-3)

3. ความคงทนทางเคมี(chemical stability)ของเจลชนิดต่างๆ

การทดสอบความคงทนของเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวกับอะกาโรส (เจล XVI) เจลที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวนิล ซัลโฟน (เจล XXI) และเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน (เจล XXVII) เปรียบเทียบกับเจลเซฟาเดกซ์ จี-100 พบว่าสามารถเก็บเจลไว้ในน้ำกลั่น สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2-1.0 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2-1.0 โมลาร์ได้นาน 30 วัน โดยลักษณะเจลไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถเก็บเจลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 แช่ในตู้เย็น ได้นานหลายเดือน

4. ความคงทนทางกายภาพ(physical stability)ของเจลชนิดต่างๆ

การทดสอบความคงทนของเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวกับอะกาโรส (เจล XVI) เจลที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวนิล ซัลโฟน (เจล XXI) และเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน (เจล XXVII) เปรียบเทียบกับเจลเซฟาเดกซ์ จี-100 โดยการต้มในหม้ออบความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าเจล XXI มีความคงทนต่อการต้มได้นานกว่า 30 นาที เช่นเดียวกับ เซฟาเดกซ์ จี-100 เจล XXVII มีความคงทนต่อการต้มได้นาน 5 นาที แต่เจล XVI ไม่มีความคงทนต่อการต้มในหม้ออบความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

ดังนั้นจากการทดสอบคุณภาพของเจลที่ผลิตและเจลที่พัฒนาโดยผ่านกระบวนการทางเคมี พบว่าสามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของเจลต่อไปอีก เพื่อให้เจลที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพการแยกสารได้เทียบเท่ากับเจลมาตรฐาน

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาวิธีการเชื่อมโซ่เจลด้วยวิธีอื่นเช่นการเชื่อมโซ่เจลด้วย บิสอีพอกไซด์ (bisepoxide) เปรียบเทียบกับวิธีดังกล่าวข้างต้น เพื่อพัฒนาเจลให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารชีวโมเลกุลได้ดีที่สุด
2. ศึกษากรรมวิธีในการทำเจลที่ผลิตให้แห้ง เพื่อสามารถเก็บเจลไว้ได้นานเช่นเดียวกับเจลมาตรฐาน
3. ศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของพอลิแซคคาไรด์ที่จะนำมาผลิตเจล
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มผลผลิต(scale-up) ในการผลิตเพื่อให้ได้เจลปริมาณมากแต่ต้นทุนในการผลิตต่ำที่สุด

מדריך למורה

บรรณานุกรม

- จารุวรรณ อาริพันธ์ และวิจิตร ชัยกิตติวัฒน์. "การพัฒนาเจลจากวันเส้น," โครงการเคมีวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2529.
- ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. เคมีวิเคราะห์ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์ ขวณิพนธ์, 426-430 , 652-654 ; 2531.
- พงษ์จันทร์ จันทยศ . "ไอโดรคอลลอยด์," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 1 : 49-59 ; 1 มิถุนายน 2529.
- มนตรี ตริณวุฒิพันธ์ และจิตติมา ทองใบ. "การพัฒนาเจลจากเมล็ดสาบเสือมาใช้แทนเจลมาตรฐาน," โครงการเคมีวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร , 2529.
- เรืองกิตติ กนกปรีชาวุฒิ. "การพัฒนาเจลวันเส้นโดยทำปฏิกิริยากับ epichlorohydrin," โครงการเคมีวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530.
- สมชาย ประภาวัฒน์ และวิเชียร วรพุกขพร. "การศึกษาการทำวันเส้นจากถั่วมะแอ่นพันธุ์ต่างๆเปรียบเทียบกับถั่วเขียว," วารสารอาหาร. 15(1) : 12-29 ; 1 มกราคม-มีนาคม 2528.
- สายสนม ธรรมพิทักษ์. "การแยกสารชีวเคมีโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิดต่างๆ," ใน เอกสารประกอบการประชุมปฏิบัติการเรื่อง "การแยกสารชีวเคมี". หน้า 47-61. ประสานมิตร : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2528.
- อารีรัตน์ สาขาน. "การเตรียมเม็ดวุ้นและเม็ดวุ้นแม่เหล็ก สำหรับแยกสารชีวโมเลกุล," ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12 (วิทยุ โทร นานิชพันธ์). หน้า 430-431. ประสานมิตร : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2529.

อษณีย์ วักดีเพชร. "การพัฒนาเจลสำหรับแยกสารโดยใช้วัสดุภายในประเทศ,"
โครงการเคมีวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2531.

Andrews, P. "Estimation of Molecular Weights of Proteins by Gel
 Filtration," Nature. 196 : 36-39 ; 1962.

Araki, C. "Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar,"
Bulletin of Chemical Society of Japan. 29 : 543-544 ; 1956.

Bengtsson, S. and L. Philipson. "Chromatography of Animal Viruses
 on Pearl-Condensed Agar," Biochimica et Biophysica Acta.
 79 : 399-406 ; 1964.

Bhikhabhai, R., G. Johansson and G. Pettersson. "Isolation of
 Cellulolytic Enzymes from Trichoderma reesei QM 9414,"
Journal of Applied Biochemistry. 6 : 336-345 ; 1984.

Bradford, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation
 of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle
 of Protein-dye Binding," Analytical Biochemistry. 72 :
 248-254 ; 1976.

Ceck, M. "Some Notes on the Use of Agar Gel Filtration in the
 Study of Plant Viruses," Virology. 18 : 487-489 ; 1962.

Guisely, K.B. and D.W.Renn. "Agarose," Marine Colloids. p.1-34. FMC.
 Corporation. 1977.

Hirase, S. "Chemical Constitution of Agar-agar. XIX Pyruvic Acid
 as A Constitution of Agar-agar. I .Identification and
 Estimation of Pyruvic Acid in Hydolysis of Agar," Bulletin
of Chemical Society of Japan. 30(1) : 68-70 ; 1957.

Hjertén, S. "Agarose as an Anyiconviction Agent in Zone
 Electrophoresis," Biochimica et biophysica Acta. 53 :
 514-517 ; 1961.

Hjertén¹, S. "A New Method for Preparation of Agarose for Gel
 Electrophoresis," Biochimica et Biophysica Acta. 62 :
 445-449 ; 1962.

Hjertén², S. "Chromatographic Separation According to Size of
 Macromolecules and Cell Particles on Column of Agarose
 Suspensions," Archieves of Biochemistry and Biophysics. 99:
 466-475 ; 1962.

- Hjertén³, S. "'Molecular Sieves' Chromatography on Polyacrylamide Gel , Prepared According to a Simplified Method," Archives of Biochemistry and Biophysics. 1 : 147-151 ; 1962.
- Hjertén, S. "The Preparation of Agarose Spheres for Chromatography of Molecules and Particles," Biochimica et Biophysica Acta. 79 : 393-398 ; 1964.
- Hjertén, S., B.L. Wu and J.L. Liao. "An High-Performance Liquid Chromatography Matrix Based on Agarose Cross-linked with Divinyl Sulphone," Journal of Chromatography. 396 : 101-113 ; 1987.
- Hjertén, S. and R. Mosbach. "'Molecular-Sieve' Chromatography of Proteins on Columns of Cross-linked Polyacrylamide," Analytical Biochemistry. 3 : 109-118 ; 1962.
- Hjertén, S., K. Yao, K-O. Eriksson and B. Jahansson. "Gradient and Isocratic High-Performance Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins on Agarose Columns," Journal of Chromatography. 359 : 99-109 ; 1986.
- Kosugi, T., Y. Ariga, M. Nakamura, K. Kinjo and F. Inoue. "Caseinolytic Activity in Venom of Trimeresurus flavoviridis : Isolation and Purification of Metalloproteinase," The Snake. 19 : 10-18 ; 1987.
- Lääs, T. "Agar Derivatives for Chromatography , Electrophoresis and Gel-bound Enzymes Charge-free Agar," Journal of Chromatography. 66 : 347-355 ; 1972.
- Lathe, G.H. and C.R.J. Ruthven. "The Separation of Substance and Estimation of their Relation Molecular Sizes by the Use of Columns of Strach in Water," Biochemistry. 62 : 665-674 ; 1956.
- Mikeš, O., P. Štrop and J. Zbrožak. "Ion-Exchange Derivative of Spheron. II Diethylaminoethyl Spheron," Journal of Chromatography. 180 : 17-30 ; 1979.
- Phramacia, Fine Chemicals. Gel Filtration Theory and Practice. Sweden : Rahms i Lund , 1982-3.
- Polson, A. "Fractionation of Protein Mixtures on Columns of Granulated Agar," Biochimica et Biophysica Acta. 50 : 565-567 ; 1961.
- Porath, J. and P. Flodin. "Gel filtration : A Method for Desalting and Groups Separation," Nature. 183 : 1657-1659 ; 1959.

- Porath, J., J.C. Janson and T. Låås. "Agar Derivatives for Chromatography , Electrophoresis and Gel-bound Enzymes Desulphated and Reduced Cross-linked Agar and Agarose in Spherical Bead Form," Journal of Chromatography. 60 : 167-177; 1971.
- Porath, J., T. Låås and J.C. Janson. "Agar Derivatives for Chromatography , Electrophoresis and Gel-bound Enzymes Rigid Agarose Gels Cross-linked with Divinyl Sulphone(DVS)," Journal of Chromatography. 103 : 49-62 ; 1975.
- Steere, R.L., G.K. Ackers. "Restricted-Diffusion Chromatography through Calibrated columns of Granulated Agar Gel ; a Simple Method for Particle-Size Determination," Nature. 196 : 475-476 ; 1962.
- Yao, K. and S. Hjertén. "Gradient and Isocratic High-Performance Liquid Chromatography of Proteins on a New Agarose-Based Anion Exchanger," Journal of Chromatography. 385 : 87-98 ; 1987.

การพัฒน

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71.64 กรัมใน
น้ำกลั่น 1000 ลบ.ซม.

2. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.21 กรัมใน
น้ำกลั่น 1000 ลบ.ซม.

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4

นำสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์มา
101.25 ลบ.ซม. และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2
โมลาร์มา 23.75 ลบ.ซม. ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 1000 ลบ.ซม. ทำให้เจือจางด้วย
น้ำกลั่น จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 12.12

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 7.10 กรัมในน้ำกลั่น 100 ลบ.ซม.
เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ เพื่อปรับ pH ให้ได้ 12.12

5. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 12.5

ละลายไตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ 89.55 กรัมในน้ำกลั่น 500 ลบ.ซม.

เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ เพื่อปรับ pH ให้ได้ 12.5

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

- เจล I หมายถึง เจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียว
- เจล II หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (2 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล III หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (2 เปอร์เซ็นต์) มี ทวิน 80 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล IV หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (2 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 และทวิน 80 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล V หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (4 เปอร์เซ็นต์) มี ทวิน 80 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล VI หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (4 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 และทวิน 80 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล VII หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (0.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล VIII หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (1.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 และทวิน 80 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล IX หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (1.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (0.5 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล X หมายถึง เจลที่ผลิตจากวุ้นเบอร์ 2 (1.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (0.5 เปอร์เซ็นต์) มีไตรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้ยู่ตัว แต่เพิ่มปริมาณเจล และสารอินทรีย์ผสม (ตาราง 5)

- เจล XI หมายถึง เจลที่ผลิตจากวันเบอร์ 2 (4.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไทรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (ตาราง 5)
- เจล XII หมายถึง เจลที่ผลิตจากวันเบอร์ 2 (4.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไทรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (วิธีที่ 2)
- เจล XIII หมายถึง เจลที่ผลิตจากวันเบอร์ 2 (4.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไทรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (วิธีที่ 3)
- เจล XIV หมายถึง เจลที่ผลิตจากอะกาโรส (4.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไทรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (วิธีที่ 3)
- เจล XV หมายถึง เจลที่ผลิตจากวันเบอร์ 2 (4.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไทรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (วิธีที่ 4)
- เจล XVI หมายถึง เจลที่ผลิตจากอะกาโรส (4.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับแป้งถั่วเขียว (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีไทรตอน เอ็กซ์-100 เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (วิธีที่ 4)
- เจล XVII หมายถึง เจล IX ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวโนลซัลโฟน (ตาราง 6)
- เจล XVIII หมายถึง เจล XV ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวโนลซัลโฟน (ตาราง 6)
- เจล XIX หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวโนลซัลโฟน และใช้ความเร็วในการปั่น 1,500 รอบต่อนาที (ตาราง 6)
- เจล XX หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวโนลซัลโฟน และใช้ความเร็วในการปั่น 1,000 รอบต่อนาที (ตาราง 6)

- เจล XXI หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวโนลซัลโฟน และใช้ความเร็วในการปั่น 500 รอบต่อนาที (ตาราง 6)
- เจล XXII หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน โดยใช้เจลที่ผลิตมา 3 เดือน (ตาราง 7)
- เจล XXIII หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน โดยใช้เจลที่ผลิตมา 1 วัน (ตาราง 7)
- เจล XXIV หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเจลต่อปริมาณอีพิกลอโรไฮดรินต่อปริมาณไดออกเซนคือ 4:2:3 ตามลำดับ (ตาราง 7)
- เจล XXV หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเจลต่อปริมาณอีพิกลอโรไฮดรินต่อปริมาณไดออกเซนคือ 2:2:3 ตามลำดับ (ตาราง 7)
- เจล XXVI หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเจลต่อปริมาณอีพิกลอโรไฮดรินต่อปริมาณไดออกเซนคือ 2:2:3 ตามลำดับ กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ขณะทำการรีฟลักซ์ (ตาราง 7)
- เจล XXVII หมายถึง เจล XVI ที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเจลต่อปริมาณอีพิกลอโรไฮดรินต่อปริมาณไดออกเซนคือ 2:2:3 ตามลำดับ แต่เพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่าของการผลิตเจล XXVI (ตาราง 7)

ซม. ย่อมาจาก เซนติเมตร

ลบ.ซม. ย่อมาจาก ลูกบาศก์เซนติเมตร

ลบ.ซม.ต่อซม. ย่อมาจาก ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาว คณาภรณ์ ชื่อสกุล รัศมีมารีย์
เกิดวันที่ 21 เดือน มกราคม พุทธศักราช 2509
สถานที่เกิด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 125/31 หมู่ 3 ซอยกำนันแมน
ถนนเอกชัย แขวงบางขุนเทียน
เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2526	เตรียมอุดมศึกษา (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนอัสสัมชัญคอนแวนต์ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2531	ค.บ.(เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534	วท.ม.(เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

การพัฒนาเจลจากวัสดุภายในประเทศเพื่อใช้ในเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

บทคัดย่อ
ของ
คุณภรณ์ รัศมีมารีย์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

กรกฎาคม 2534

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตเจลโดยใช้น้ำแป้งถั่วเขียว แป้งมันสำปะหลัง วุ้นและอะกาโรส พบว่าสารที่ทำให้เจลที่ผลิตมีรูปร่างลักษณะทรงกลมได้เป็นครั้งแรก โดยใช้อัตราส่วน แป้งถั่วเขียวผสมกับวุ้นหรืออะกาโรสเท่ากับ 1:3 โดยให้มีเนื้อของของผสมในเปอร์เซ็นต์ ต่างๆกันคือ 2, 3, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ การเกิดเจลทำในสารละลายอินทรีย์ผสมของ ไตรตอน เอ็กซ์-100 คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และทอลูอิน พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต เจลมีหลายประการคือความเข้มข้นของสารที่นำมาผลิต ชนิดและปริมาณของสารที่ทำให้ยู่ตัว ความเร็วของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ และการทำสารแขวนลอยเจลให้เย็นตัว

นำเจลขนาดประมาณ 40-120 ไมโครเมตร มาทำการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวนิล ซัลไฟน์ และอีพิกลอโรไฮดริน พบว่าสมบัติทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ในการเชื่อมไขว้ ด้วยไดไวนิล ซัลไฟน์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมไขว้กระทำที่ pH 12.5 กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และความเร็วในการปั่น 500 รอบต่อนาที และปัจจัยที่มี ผลต่อการเชื่อมไขว้ด้วยไดไวนิล ซัลไฟน์ มีหลายประการคือ ปริมาณของไดไวนิล ซัลไฟน์ ตัวรีดิวซ์ ความเป็นกรด-เบส สารที่ใช้สำหรับกำจัดไดไวนิล ซัลไฟน์ที่มากเกินไป และ ความเร็วในการกวนและการปั่น สำหรับการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดริน พบว่าอัตราส่วน ที่เหมาะสมของปริมาณเจลต่อปริมาณอีพิกลอโรไฮดรินต่อปริมาณไดออกเซนคือ 2:2:3 ตามลำดับ ขณะที่ทำการเชื่อมไขว้เจลต้องมีการกวนตลอดเวลา

คุณสมบัติการแยกสารโดยเฉพาะโปรตีนของเจล ทำได้โดยการแยกโปรตีนมาตรฐาน คือ เฟอรัรีติน คาตาเลส อัลโคเลส อัลบูมิน โคโมทรูปซินเจน เอ และโรโบนิวคลีเอส เอ เปรียบเทียบกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 พบว่าเจลทั้งหมดสามารถแยกโปรตีนมาตรฐานได้ แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังทดสอบการแยกซีรัม นิซุเขียวหางไหม้ชนิดทองขาวและนิซุเขียว หางไหม้ทองเขียว พบว่าเจลที่ผ่านการเชื่อมไขว้ด้วยอีพิกลอโรไฮดรินสามารถแยกซีรัมของคน

และสามารถแยกพิษงูเขียวหางไหม้ทั้งสองชนิดได้ ส่วนเจลที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วยไดไวนิล ซัลโฟน และเจลที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมไข้ว แยกซีรัมของคน และพิษงูเขียวหางไหม้ทั้งสองชนิดได้ไม่ตักัก เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์รีคัพเวอรี่ พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วเจลทั้งหมดมีเปอร์เซ็นต์รีคัพเวอรี่ ใกล้เคียงกัน แต่อาจจะแตกต่างกันบ้าง ในกรณีการแยกโปรตีนมาตรฐานที่ประกอบด้วยคาตาเลส อัลโคเลส อัลบูมิน ไคโมทริปซินโนเจน เอ และโรโบนิวคลีเอส เอ ของเจลที่ผลิตจาก แป้งถั่วเขียวกับอะกาโรส และเจลที่ผลิตจากแป้งถั่วเขียวกับอะกาโรส ที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วย ไดไวนิลซัลโฟน คือมีเปอร์เซ็นต์รีคัพเวอรี่ เท่ากับ 64.80 และ 90.73 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่าเปอร์เซ็นต์รีคัพเวอรี่ขึ้นกับชนิดของสารที่ใช้และชนิดของสารที่ต้องการแยก

เมื่อนำเจลมาทดสอบคุณสมบัติความคงทนทางเคมีและทางกายภาพ พบว่าในช่วง เวลาที่ทดสอบ เจลที่ผลิตและเจลที่ผ่านกระบวนการทางเคมี มีความคงทนทางเคมีไม่ต่างกับ เจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 และเจลที่ผ่านกระบวนการเชื่อมไข้วด้วยไดไวนิล ซัลโฟนมีความ คงทนทางกายภาพไม่ต่างกับเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 เจลที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วย อิทธิคลอโรไฮดริน มีความคงทนทางกายภาพน้อยกว่าเจลเซฟาเด็กซ์ จี-100 ส่วนเจลที่ไม่ผ่าน การเชื่อมไข้วมีความคงทนน้อยที่สุด

DEVELOPMENT OF GEL FROM LOCAL RESOURCES FOR
CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

AN ABSTRACT

BY

KANAPORN RASMIMARIYA

Presented in partial fulfillment of the requirements for the Master of
Sciences degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University

July 1991

Abstract

Gel beads prepared from mung bean starch, agar and agarose were obtained for the first time in spherical form. The method has been used for preparation the mixture of the starch and agar or agarose for difference concentration. The organic liquid phase containing dissolved stabilizer is added. The size and the shape of the gel beads obtained at the suspension gelation depend on a great number of variables. The most important of these are ; the concentration of the starch , agar and agarose, the nature and amount of the stabilizers , the stirring speed, the temperature of suspension. The gel size of about 40-120 μm . were prepared and tested for the properties to the chromatograms of the standard proteins namely ferritin , catalase , aldolase , albumin , chymotrypsinogen A and ribonuclease A or serum or snake venom were compared to the chromatograms run in sephadex G-100 as well as those of the chromatogram run in cross-linked gel with divinyl sulphone or epichlorohydrin. The properties of the cross-linked gel with divinyl sulphone depend on the concentration of divinyl sulphone , the concentration of reducing agent , pH , solvent of remove of excess of divinyl sulphone and the stirring speed. The cross-linked gel with epichlorohydrin was also prepared. The stability of the cross-linked and uncross-linked gel were tested in different conditions.