การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรเพื่อใช้ในการเตรียมฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมไทย

นายเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558

EXTRACTION OF COLLAGEN FROM PORCINE ACHILLES TENDON FOR PREPARATION OF COLLAGEN/THAI SILK FIBROIN BLENDED FILMS

Mr. Tepparit Wongpakham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Biomedical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2015

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรเพื่อใช้ในการเตรียมฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมไทย
โดย	นายเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(นายแพทย์ ดร.กฤษฎา เหลืองชวพงศ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

....กรรมการ

(ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ปิยะนุช ฐิติวุฒิเกียรติ)

เทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ : การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรเพื่อใช้ในการเตรียมฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมไทย (EXTRACTION OF COLLAGEN FROM PORCINE ACHILLES TENDON FOR PREPARATION OF COLLAGEN/THAI SILK FIBROIN BLENDED FILMS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.โศรดา กนกพานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, 171 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกร ศึกษาสมบัติของคอลลาเจนและศักยภาพในการนำไปใช้ร่วมกับไฟโบรอินไหมไทย คอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ต่อด้วยสารละลายเอนไซม์เปปซินที่สภาวะต่างๆ คือ อุณหภูมิ (4 และ 25 องศาเซลเซียส) เวลา (24 และ 48 ชั่วโมง) และอัตราส่วนเอนไซม์ต่อคอลลาเจน (1/10, 1/30, และ 1/50 โดยน้ำหนัก) เพื่อกำจัดส่วนเทโลเปปไทด์ซึ่งอาจทำให้เกิดการแพ้เมื่อนำไปใช้ คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) และสกัดต่อด้วยสารละลายเปปซิน (PSC) มีร้อยละผลได้เท่ากับ 76.43±0.69 และ 74.07±2.80 ตามลำดับ การศึกษาค่าศักย์เซต้าของ ASC และ PSC เพื่อประมาณค่าจุดไอโซอิเล็กทริก พบว่ามีค่าประมาณ 5.61±0.02 และ 7.15±0.03 ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน, น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE และโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR พบว่า PSC เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยดูจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE แถบโปรตีนของคอลลาเจนนั้นปรากฏแถบของสาย $\alpha 1$, $\alpha 2$, β และ γ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 127, 110, 230, และ 300 กิโลดาลตัน ตามลำดับ การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค FTIR พบว่าคอลลาเจนมีโครงสร้างเป็นเกลียวสามสายที่มีความคล้ายคลึงกับคอลลาเจนทางการค้า การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของ ASC และ PSC ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis พบว่ามีอุณหภูมิในการเสียสภาพที่ 75.33 และ 72.50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์อุณหภูมิในการเสียสภาพด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimeter พบที่ 92.63 และ 97.50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมจากไหมไทยพันธุ์เหลืองไพโรจน์โดยสกัดด้วยสารละลายลิเธียมโบรไมด์ แล้วนำมาเตรียมเป็นฟิล์มผสมคอลลาเจน/ไฟโบรอินไหมที่อัตราส่วน 99/1, 95/5, 90/10 และ 80/20 โดยน้ำหนัก พบค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจน (PSC) สูงกว่าฟิล์มคอลลาเจน/ไฟโบรอินไหมและฟิล์มไฟโบรอินไหมบ่งบอกว่าฟิล์มคอลลาเจนมีความไม่ชอบน้ำมากกว่า

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา) ลายมือชื่อนิสิต ....

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

5470576421 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS:

TEPPARIT WONGPAKHAM: EXTRACTION OF COLLAGEN FROM PORCINE ACHILLES TENDON FOR PREPARATION OF COLLAGEN/THAI SILK FIBROIN BLENDED FILMS. ADVISOR: ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D., 171 pp.

This study aimed to extract collagen from porcine Achilles tendon and to evaluate its physicochemical properties and its potential to use with Thai silk fibroin. Acid soluble collagen (ASC) was extracted from porcine Achilles tendon using 1 M acetic acid. ASC was then extracted in gastric proteinase pepsin solution at different temperatures (4 and 25°C), times (24 and 48h) and enzyme/collagen weight ratio (1/10, 1/30 and 1/50) to telopeptides, yielded pepsin-treated ASC (PSC). Yields of ASC and PSC extracted were at 76.43±0.69% and 74.07±2.80 (wt), respectively. The isoelectric points of ASC and PSC were estimated at 5.61±0.02 and 7.15±0.03 respectively using zeta potential measurement. Amino acid composition, SDS-PAGE, and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) analysis confirmed that PSC were mainly composed of type I collagen. SDS-PAGE analysis revealed the presence of α1 and α2 chain as well as β and γ chain of collagen type I at Mw of 127, 110, 230, and 300 kDa, respectively. Further analysis with FTIR confirmed the presence of triple helix structure of collagen type I, similar to commercially available collagen. The denaturation temperatures of ASC and PSC were 75.33 and 72.50 °C, respectively, using Thermogravimetric Analysis. However the denaturation temperature evaluated from Differential Scanning Calorimeter of ASC and PSC were found at 92.63 and 97.50 °C, respectively. The extracted Thai silk fibroin (SF, Lueangpiroj) solution was prepared using LiBr. Collagen/silk fibroin (C/SF) films were prepared at the ratio of 99/1, 95/5, 90/10 and 80/20 (wt). Water contact angle on C films were higher those of C/SF films and SF films indicating higher hydrophobicity of films.

Field of Study: Biomedical Engineering Student's Signature ....

Academic Year: 2015 Advisor's Signature ....

Co-Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้โอกาสผู้วิจัยศึกษางานวิจัยนี้ รวมถึงสละเวลาอันมีค่าในการแนะนำสั่งสอนและให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ การออกแบบ วางแผนและแนวทางการดำเนินงานวิจัย การตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ และการอบรมให้ความรู้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้, ขอขอบพระคุณนายแพทย์ ดร.กฤษฎา เหลืองชวพงศ์, รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงศักดิ์กุล, ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ และ ดร.ปิยนุช ฐิติวุฒิเกียรติ ที่ได้ให้คำแนะนำในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ผ่านมาและได้สละเวลาอันมีค่ามาร่วมสอบวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ สำหรับความอนุเคราะห์เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929), ขอขอบคุณ คุณคำปน พิลามัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เส้นไหมและขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนารถ จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์รังไหม , ขอขอบคุณ คุณศุภวิชญ์ จันทน์ขาว รวมทั้งสมาชิกห้องปฏิบัติการชีววัสดุทางการแพทย์ทุกท่าน สำหรับคำปรึกษาและแนะนำ รวมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการชีววัสดุทางการแพทย์, ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน่วยปฏิบัติการวิจัยสารทรงฤทธิ์ชีวภาพเพื่อนวัตกรรมทางคลินิก คณะเภสัชศาสตร์, หน่วยปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์, ห้องปฏิบัติการหน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์, ศูนย์เครื่องมือกลาง (Chula MRC) ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์, หน่วยวิจัยและบริการเครื่องมือกลาง วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์และวัสดุคอมโพสิท ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทรนโต ประเทศอิตาลี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับการให้โอกาสและสนับสนุนในการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยสามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่างๆให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

หน้า

หน้า

หน้า

หน้า

หน้า

สารบัญตาราง

สารบัญรูปภาพ

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

คอลลาเจน (Collagen) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกจากคำว่า “Kolla” ที่แปลว่า กาว ในอดีตมีการทำกาวโดยการนำหนังและเอ็นม้ามาเคี่ยวจนกลายเป็นกาว ตามหลักฐานที่พบมีการใช้งานกาวลักษณะนี้มากว่า 8,000 ปีแล้ว โดยใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตเชือกและตะกร้าสานเพื่อให้มีความแข็งแรง และมีการใช้งานภายในครัวเรือนทั่วไป หนังและเอ็นนั้นองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง พบมากกว่าหนึ่งในสามโดยน้ำหนักของเนื้อเยื่อโปรตีนในร่างกาย เป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ซึ่งเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix, ECM) ที่จัดเรียงตัวเป็นโปรตีนเส้นใยไม่ละลายน้ำทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงแบบให้เซลล์ยึดเกาะเกิดเป็นรูปร่างของเนื้อเยื่อขึ้นมา นอกจากนี้ยังให้ความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน เส้นเอ็น กระดูก กระดูกอ่อน ฟัน ผนังหลอดเลือดและผิวหนัง คอลลาเจนไม่ได้มีรูปร่างเป็นเส้นใยเท่านั้น ยังมีรูปร่างลักษณะอื่น ได้แก่ เยื่อแผ่นบางๆที่อยู่นอกเซลล์ (Basement membrane) แผ่นตาข่ายร่างแหของเส้นใยฝอยที่เกาะกันหลวมๆ ซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกันไป คอลลาเจนเป็นชีววัสดุที่มีศักยภาพสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากที่สุด เนื่องจากมีคุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) การย่อยสลายที่ดีทางชีวภาพ (Biodegradation) มีความเป็นสิ่งแปลกปลอมต่ำ มีการแพ้ต่ำ ไม่เป็นพิษ จึงมีการนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางทางด้านการแพทย์และทางเภสัชกรรม เช่น ไหมเย็บแผล ผ้าปิดแผล ผิวหนังเทียม เพื่อรักษาแผลสด ศัลยกรรมตกแต่งผิวหนัง วุ้นในดวงตา สารช่วยสมานบาดแผล แคปซูลยา เป็นต้น (Friess, W. 1998)การนำมาฉีดบริเวณผิวหนังที่ต้องการ โดยเฉพาะบริเวณหางตา ร่องแก้ม หน้าผาก เพื่อเติมให้ผิวหนังบริเวณดังกล่าวเต็มและเต่งตึงโดยทันที นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางบำรุงผิว เพื่อเป็นการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในชั้นผิวหนังตามธรรมชาติ ปัจจุบัน (Parenteau-Bareil, R. และคณะ 2010) ค้นพบว่าคอลลาเจนมีประมาณ 29 ชนิด โดยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 พบมากที่สุด มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตและเมตาบอลิซึมของเซลล์ในเนื้อเยื่อใหม่ คอลลาเจนชนิดนี้พบมากในเอ็นและผิวหนัง จากการวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในกระดูก เอ็นและหนังของสัตว์ชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นมนุษย์

แล้วพบว่าในเอ็นมนุษย์มีปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับสุกรมาก (Eastoe, J. E. 1955) การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะนำหนัง กระดูก และเอ็นสุกร ไปสกัดคอลลาเจน โดยเอ็นและกระดูกนั้นมีความเสี่ยงจากการติดเชื้อเนื่องจากกระบวนการฆ่าน้อยกว่าผิวหนัง นอกจากนี้การสกัดคอลลาเจนจากกระดูกมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่าการสกัดจากเอ็น เอ็นจากสุกรจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบน่าสนใจในการนำมาสกัดคอลลาเจนเนื่องจากหาได้ง่ายและต้นทุนในการผลิตต่ำ และมีศักยภาพที่จะนำมาสกัดและผลิตในระดับอุตสาหกรรม ในประเทศไทยการผลิตคอลลาเจนเพื่อนำไปใช้งานด้านการแพทย์ยังไม่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องพึ่งพาการนำเข้าจากต่างประเทศด้วยราคาที่ค่อนข้างสูงอีกด้วย

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธีโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบแล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมาโดยใช้กรด เช่น กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์หรือการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เปปซินเนื่องจากสามารถทำงานได้ที่พีเอช (pH) ต่ำ (พีเอช 2-3) และมีความจำเพาะในการตัดส่วนเทโลเปปไทด์ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การสกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจากนั้นจึงนำไปตกตะกอนเพื่อแยกคอลลาเจนออกมา (Friess, W. 1998)

คอลลาเจนมีศักยภาพในการส่งเสริมให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโต แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านคุณสมบัติเชิงกลต่ำและมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่เร็ว จึงจำเป็นต้องปรับปรุงโดยการใช้งานร่วมกับชีววัสดุอื่นๆ เพื่อช่วยคุณสมบัติทางกลที่ดีและการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้าลง ตัวเลือกที่น่าสนใจนำไปใช้งานคือไฟโบรอินจากรังไหมไทย Jetbumpenkul, P. และคณะ (2012) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง ในสภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ร้อยละน้ำหนักคงเหลือเท่ากับ 50 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหม/เจลาตินที่อัตราส่วน 40/60 สามารถถูกย่อยสลายได้หมดภายในเวลา 15 นาที และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหม/เจลาตินอัตราส่วน 60/40 สามารถถูกย่อยสลายได้ภายในเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไฟโบรอินไหมจึงเป็นชีววัสดุที่ช่วยชะลอการย่อยสลายให้ช้าลง

ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ชนิด คือ ไฟโบรอิน (Fibroin) ในเส้นใยและเซริซิน (Sericin) ในกาวไหม ไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบหลักในโปรตีนไหม โดยมีการ

นำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านนอกเหนือจากการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทอผ้าหรือใช้เป็นไหมเย็บแผลทางการแพทย์ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีที่พบในไฟโบรอิน เช่น ความต้านทานต่อแรงดึงสูง คุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การย่อยสลายทางชีวภาพที่ดี มีความเป็นสิ่งแปลกปลอมต่ำ มีการแพ้ต่ำ ไม่เป็นพิษ และมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่ต้องใช้เวลานาน (Kaewprasit, K. และคณะ 2014) การนำไปใช้เป็นผงไหมไฟโบรอิน แล้วจึงนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การนำไปใช้ในเครื่องสำอางหลายประเภท หรือการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ไฟโบรอินที่ผ่านกระบวนการทำเป็นสารละลายหรือทำให้อยู่ในรูปสารไฟโบรอินที่มีความบริสุทธิ์สูง มีงานวิจัยเสนอให้ใช้งานวัสดุทางการแพทย์ เช่น หลอดเลือดเทียม ผิวหนังเทียม คอนแทคเลนส์ วัสดุปลูกถ่ายกระดูก (Bone graft) กระดูกเทียม วัสดุควบคุมการกระจายตัวของยา หรือการใช้เป็นเอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) ในงานด้านไบโอเซนเซอร์และงานด้านอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น (Kundu, B. และคณะ 2013)

จากคุณสมบัติที่ดีของคอลลาเจนและไฟโบรอินดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เพื่อกำจัดเทโลเปปไทด์ ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้ ศึกษาสมบัติด้านเคมี ชีวภาพ และกายภาพและการใช้งานทางด้านการแพทย์ โดยการใช้งานร่วมกับไฟโบรอินไหมไทย เพื่อผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์มนำมาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาสภาวะในการสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรและใช้ในการเตรียมฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมไทย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 สกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรด้วยกรดอะซิติก ในอัตราส่วนเอ็นต่อกรดเป็น 1:50 โดยน้ำหนักเปียกต่อปริมาตร ที่พีเอช 1.56 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง แล้วนำคอลลาเจนที่ได้ไปทรีทด้วยเปปซินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่อัตราส่วนเอนไซม์เปปซิน

ต่อคอลลาเจนเท่ากับ 1:10, 1:30, และ 1:50 โดยน้ำหนัก (w/w) ที่พีเอช 1.18 อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ศึกษาสมบัติดังต่อไปนี้

- ร้อยละผลได้ (Yield)
- น้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
- ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- ความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity) ของสารละลายคอลลาเจนในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องวัดความหนืด ชนิด Ubbelohde
- ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Lowry
- การเกิดเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.4
- ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ที่พีเอชในช่วง 5-8
- การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (FTIR)
- การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน (DSC และ TGA)

1.3.2 เตรียมสารละลายไฟโบรอินจากไหม (*Bombyx mori*) โดยใช้ไหมไทยลูกผสมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ นำมากำจัดกาวไหม (Silk glue) ด้วยการต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และสกัดด้วยสารละลายลิเธียมโบรไมด์ (LiBr) ศึกษาสมบัติดังต่อไปนี้

- ปริมาณไฟโบรอินหลังการกำจัดกาวไหม
- ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ที่พีเอชในช่วง 3-6
- น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของไฟโบรอิน ด้วยวิธี gel permeation chromatography (GPC) และเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
- การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (FTIR)
- การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน (DSC และ TGA)

1.3.3 ศึกษาสมบัติของสารละลายผสมของคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหมไทย (SF) อัตราส่วน 99:1, 95:5, 90:10, และ 80:20

- ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ที่พีเอชในช่วง 3-9
- ความหนืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- พีเอช
- การเกิดเจล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3.4 ผลิตฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมไทย อัตราส่วน 99:1, 95:5, 90:10, และ 80:20 โดยการทำแห้งด้วยอากาศ (Air dry) ศึกษาสมบัติดังนี้

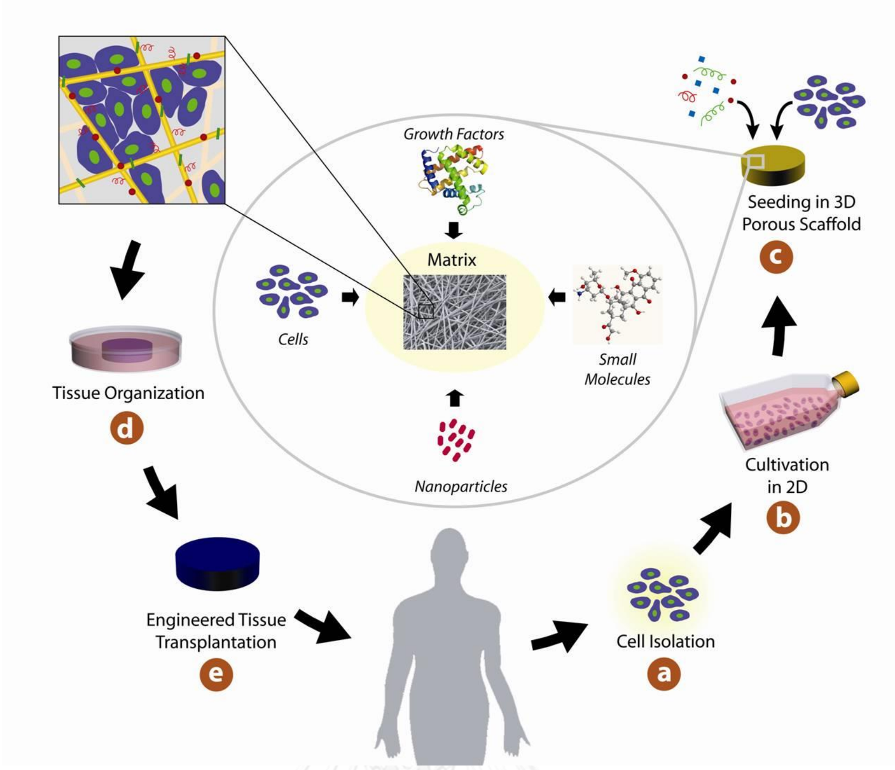
- ค่ามุมสัมผัส (Contact angle) ของน้ำ
- การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

1.3.5 ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ โดยทดสอบการยึดเกาะ (Attachment) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์มในระดับห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) และชีววัสดุ (Biomaterial)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สหสาขาแขนงใหม่ โดยอาศัยความรู้ความก้าวหน้าอันทันสมัยทางชีววิทยาระดับเซลล์ อณูชีววิทยา เคมี ฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ และแพทยศาสตร์ ซึ่งทำการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะใหม่ทดแทนและ/หรือส่งเสริมฟื้นฟูเนื้อเยื่อและอวัยวะเดิมของผู้ป่วย (Honsawek, S. และคณะ 2007) แต่การเข้าถึงผู้ป่วยยังมีช่องวิกฤต (Critical gap) ที่สำคัญระหว่างจำนวนที่เพิ่มขึ้นของผู้ป่วยที่รอคอยการปลูกถ่ายอวัยวะและจำนวนที่จำกัดของการบริจาคอวัยวะ วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์แขนงย่อยของเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อมที่มุ่งเน้นแก้ปัญหาไปยังข้อจำกัดดังกล่าว โดยเป็นการฟื้นฟูและพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อเพื่อตอบสนองความต้องการทางการแพทย์ในปัจจุบัน การพัฒนาวิธีการรักษาสำหรับผู้ป่วยที่มีความรุนแรงและเรื้อรังของโรค ซึ่งจะมีผลต่ออวัยวะสำคัญ เช่น หัวใจ ไต และตับ เพื่อให้ผู้ป่วยที่ยังคงรอคอยการปลูกถ่ายอวัยวะเป็นจำนวนมากได้รับประโยชน์อย่างกว้างขวางจากการนำเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ ดังตัวอย่างที่เห็นได้ชัด เช่น ผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวที่มีกว่า 5 ล้านคนในสหรัฐอเมริกาเพียงประเทศเดียว ซึ่งอาจได้รับประโยชน์จากวิศวกรที่ประสบความสำเร็จจากวิศวกรรมเนื้อเยื่อหัวใจ ในทำนองเดียวกันกับผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีกว่า 16 ล้านคนในสหรัฐอเมริกาและกว่า 217 ล้านคนทั่วโลก โดยผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานประเภท 1 ต้องสูญเสียส่วนใหญ่หรือทั้งหมดของเซลล์ตับอ่อน (b cells) เนื่องจากการโจมตีของภูมิคุ้มกันและอาจจะได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ตับอ่อน (b cells or neo-islets) รายงานล่าสุดจากสถาบันวิทยาศาสตร์ด้านเซลล์ต้นกำเนิดและอนาคตของเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อมแห่งชาติสหรัฐอเมริกาได้ให้ความสำคัญกับผู้ป่วยที่ต้องได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะจากอาการป่วยด้วยโรคต่างๆ เช่น โรคกระดูกพรุน (10 ล้านคน) โรคสมองเสื่อมและโรคพาร์กินสัน (5.5 ล้านคนในแต่ละโรค) ผู้ป่วยที่มีแผลไหม้อย่างรุนแรง (0.3 ล้านคน) ผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บบริเวณไขสันหลัง (0.25 ล้านคน) และ ผู้มีข้อบกพร่องทางร่างกายตั้งแต่กำเนิด (0.15 ล้านคน) การปลูกถ่ายอวัยวะให้กับผู้ป่วยเหล่านี้คือเป้าหมายหลักของเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม (Furth, M. E. และคณะ 2014)



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนโดยทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

(ที่มา :http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/dvir/dvir.html)

องค์ประกอบที่สำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้แก่ เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์และโปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ ในส่วนของเซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้มาจากผู้ป่วย (Autologous) ผู้บริจาคสายพันธุ์ (Species) เดียวกัน (Allogenic) หรือ ผู้บริจาคสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Xenogenic) เซลล์จากผู้ป่วยเป็นแหล่งเซลล์ที่ดีสำหรับการใช้งานในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพราะมีการตอบสนองเกี่ยวกับแอนติเจนหรือปฏิกิริยาโต้ตอบของระบบภูมิคุ้มกันต่ำ รวมทั้งค่าใช้จ่ายต่ำและเป็นที่นิยมในทางคลินิก ในขณะที่เซลล์จากผู้บริจาคมีข้อดีกว่าเซลล์จากผู้ป่วยในด้านความสม่ำเสมอของมาตรฐานในขั้นตอนการควบคุมคุณภาพและค่าใช้จ่าย เมื่อได้เซลล์แล้วจึงนำเพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) ที่ผลิตจากชีววัสดุที่มีลักษณะและสมบัติเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่นำมาเพาะลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ ความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย ขนาดของรูพรุนที่เหมาะสม ความต่อเนื่องของรูพรุน ความแข็งแรงและความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพที่เหมาะสมกับลักษณะการเกิดของเนื้อเยื่อใหม่ที่นำมาปลูกถ่ายเพื่อทดแทนเนื้อเยื่อเดิม จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ทำให้เซลล์สามารถ

เจริญเติบโตใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งปัจจัยสภาวะของสภาพแวดล้อมดังกล่าวมีอยู่หลายหลาก เช่น สารโปรตีนส่งสัญญาณกระตุ้นการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (Growth factors) และการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ช่วยกระตุ้น เพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในรูปแบบต่างๆเป็นต้น แล้วนำมาปลูกถ่ายในผู้ป่วยเพื่อช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาทดแทนเนื้อเยื่อดั้งเดิม (Honsawek, S. และคณะ 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

ชีววัสดุทางการแพทย์ (Biomaterial) เป็นวัสดุอุปกรณ์เพื่อการนำไปใช้ในทางการแพทย์ โดยการนำไปใช้กับร่างกายมนุษย์ ปัจจุบันเทคโนโลยีทางการแพทย์มีเจริญก้าวหน้าเป็นอย่างมาก นอกจากการรักษาโรคต่างๆ เพื่อการรักษาเยียวยาและการมีชีวิตที่ยืนยาวขึ้นแล้ว เทคโนโลยีทางการแพทย์ยังมีบทบาทช่วยสนับสนุนการดำรงชีวิตของมนุษย์ ดังตัวอย่างที่เห็นได้ชัด เช่น การปลูกถ่ายอวัยวะ การสร้างอวัยวะเทียม การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ รวมไปถึงอุปกรณ์และวัสดุต่างๆ ที่ใช้กับร่างกาย เช่น เข็มฉีดยา วัสดุอุดฟัน วัสดุปิดแผลจากไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก ไหมเย็บแผล กระดูกเทียม หลอดเลือดเทียมและท่อขยายหลอดเลือด เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อตอบสนองความต้องการพื้นฐานของมนุษย์ที่ต้องการมีชีวิตที่ยืนยาวและสามารถดำรงชีวิตได้เป็นปกติ ดังนั้นการศึกษาสมบัติทางกายภาพ เชิงกล ชีวภาพและเคมีของวัสดุ จึงเป็นสิ่งสำคัญ สำหรับนำความรู้ที่ได้ไปต่อยอดการวิจัยและพัฒนาวัสดุอุปกรณ์หรือกระบวนการที่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของมนุษย์มากที่สุด และด้วยวิวัฒนาการทางการแพทย์ที่เจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ทำให้ปัจจุบันการปลูกถ่ายอวัยวะและการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อเป็นเรื่องปกติ แต่ปัญหาที่สำคัญและยังมีผลกระทบต่อการผ่าตัดและการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะคือ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเนื้อเยื่อจากของผู้ป่วยเองหรือผู้บริจาคสายพันธุ์เดียวกันหรือผู้บริจาคสายพันธุ์ที่แตกต่าง และข้อจำกัดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่นำมาปลูกถ่าย ด้วยเหตุนี้การพัฒนาเนื้อเยื่อสังเคราะห์หรือวัสดุอุปกรณ์สังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จึงมีบทบาทสำคัญและเป็นที่ต้องการอย่างมาก

2.2 คอลลาเจน

ทางเลือกของชีววัสดุสำหรับเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม (Regenerative medicine) ยังคงเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็วด้วยการค้นพบชีววัสดุใหม่ๆ ซึ่งมักมีการกล่าวอ้างว่าได้ผลดีกว่าชีววัสดุเดิมที่มีอยู่แล้ว ชีววัสดุส่วนใหญ่ที่เลือกใช้จะขึ้นอยู่กับการประยุกต์ใช้งาน แต่หลักๆแล้วจะถูกนำไปใช้งานเพื่อเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) เพื่อส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ การ

เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ส่วนประกอบหรือผลิตผลของเนื้อเยื่อพื้นรวมทั้ง ไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans) ไกลโคโปรตีนนั้น พบว่าสามารถนำมาใช้เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะและเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้

คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบมากในร่างกายของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมด โดยจะพบมากในผิวหนัง เอ็น กระดูก และกระดูกอ่อน โดยปริมาณคอลลาเจนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ ส่วนลักษณะของคอลลาเจนโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันจะต่างกันเพียงเล็กน้อยในองค์ประกอบของกรดอะมิโนซึ่งทำให้คุณสมบัติโดยทั่วไปของคอลลาเจนต่างกันไป ปัจจัยสำคัญที่พบว่ามีอิทธิพล คือ สายพันธุ์และชนิดของเนื้อเยื่อ

คอลลาเจนมีมอนอเมอร์เป็นเกลียวฮีลิกซ์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 กิโลดาลตัน มีความยาวประมาณ 2,800 อังสตรอมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-15 อังสตรอม ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 3 สาย แต่ละสายเรียกว่า สายแอลฟา (α-chain) และถูกสร้างขึ้นจากการรวมกันของสายโซ่พอลิเปปไทด์ (Polypeptide) 10 ชนิด คือ α1(I), α2(I), α1(II), α1(III), α1(V), α1(V), α3(V), α1(XI), α2(XI), และ α3(XI) แต่ละสายประกอบด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 1,000 ตัวต่อกัน (Eyre, D. R. และคณะ 2008) โดยในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยทั่วไปจะประกอบด้วย กรดอะมิโน ชนิดไกลซีน (Glycine, Gly) ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุลคอลลาเจน และมีกรดอะมิโน ชนิดโพรลีน (Proline, Pro) ร้อยละ 12 และไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline, Hyp) ร้อยละ 11 ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนจะมีลักษณะซ้ำๆ กันของ -Gly-X-Y- โดย X และ Y ส่วนใหญ่จะพบเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ แต่สามารถเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นได้เช่นกัน ยกเว้น ทริปโตเฟน (Tryptophan, Trp) การสังเคราะห์ไฮดรอกซีโพรลีนในคอลลาเจนเกิดขึ้นหลังจากการสังเคราะห์สายพอลิเปปไทด์แล้ว โดยโพรลีนจะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (Hydroxylation) ซึ่งถูกเร่งโดยเอนไซม์โพรลีนไฮดรอกซีเลส (Proline hydroxylase) เกิดเป็นไฮดรอกซีโพรลีน และต้องการกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ การขาดวิตามินซีทำให้คอลลาเจนสร้างเส้นใยที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดโรคลักปิดลักเปิด (Scurvy) ไฮดรอกซีไลซีนภายในคอลลาเจนมักอยู่ในรูปที่จับกับคาร์โบไฮเดรตด้วย เช่น กลูโคสและกาแลกโทส (Galactose) โดยมีจำนวนคาร์โบไฮเดรต

ต่างกันไปตามชนิดเนื้อเยื่อ เช่น โทรโพคอลลาเจน ชนิดที่ 9 ซึ่งมีอยู่ในเลนส์ตา มีคาร์โบไฮเดรต มากกว่าชนิดที่ 1 ที่มาจากเส้นเอ็นถึง 18 เท่า

สายของพอลิเปปไทด์แต่ละสายจะวนเป็นเกลียวไปทางซ้าย (Left-hand helix) ด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งแต่ละรอบเกลียวประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 3.3 ตัว และมีระยะห่างระหว่างเกลียวเท่ากับ 0.87 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ก) จากนั้นสายพอลิเปปไทด์ทั้ง 3 สาย พันรอบกันเป็นเกลียววนขวา (Right-hand helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายพอลิเปปไทด์แต่ละสาย เรียกสายเปปไทด์ที่บิดรวมกัน 3 สายนี้ว่า โทรโพคอลลาเจน (Tropocollagen) มีระยะห่างระหว่างเกลียวประมาณ 8.6 นาโนเมตร ความยาว 300 นาโนเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ข) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่บิดเป็นเกลียวเรียกบริเวณนี้ว่า เทโลเปปไทด์โซน (Telopeptide zone) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ค) โทรโพคอลลาเจนจะเรียงตัวขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals force) และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโทรโพคอลลาเจน ทำให้เกิดลักษณะเป็นเส้นใยของคอลลาเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ง) โมเลกุลคอลลาเจนที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันได้คอลลาเจนไฟบริล (Collagen fibril) และคอลลาเจนไฟบริลรวมกันเป็นคอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen fiber) (Friess, W. 1998)

พอลิเปปไทด์ของคอลลาเจน ส่วนใหญ่เป็นเกลียวสามสาย ยกเว้นที่ปลายแต่ละด้านของเกลียวจะมีความแตกต่างจากโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ (α-helical structure) ซึ่งโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์นี้มีความเสถียรภาพอยู่ได้เนื่องจากหมู่โซ่ข้างของโพรลีน ซึ่งเป็นวงแหวนไพร์โรลิดีน (Pyrrolidine) ที่มีขนาดใหญ่ ผลักให้ออกจากกัน นอกจากนี้ยังมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นมาระหว่างพอลิเปปไทด์ทั้ง 3 สาย โดยมีหมู่ N-H ของไกลซีนเป็นตัวให้ไฮโดรเจนและหมู่ C=O บนอีกสายหนึ่งเป็นตัวรับไฮโดรเจน ทิศของพันธะไฮโดรเจนตั้งฉากกับแนวยาวของสายโทรโพคอลลาเจน นอกจากนี้หมู่ไฮดรอกซิลของไฮดรอกซีโพรลีนยังมีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบ ซึ่งช่วยเสริมให้โครงสร้างนี้มีเสถียรภาพมากขึ้น (Lee, C. H. และคณะ 2001) เนื่องจากคอลลาเจนอุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline, Hyp) และโพรลีน (Proline, Pro) ซึ่งเป็นตัวที่เข้าไปสอดแทรกในโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ โมเลกุลของคอลลาเจนจะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (End to end) และสร้างเป็นเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยคอลลาเจนบางที่จัดเรียงตัวแบบขนานกัน เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้มากขึ้น เช่น ในเอ็น หรืออาจมีกิ่งมากและจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เช่น ในหนัง และจากการที่คอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดเดียวที่อุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งมีมากถึงประมาณร้อยละ 10 ของ

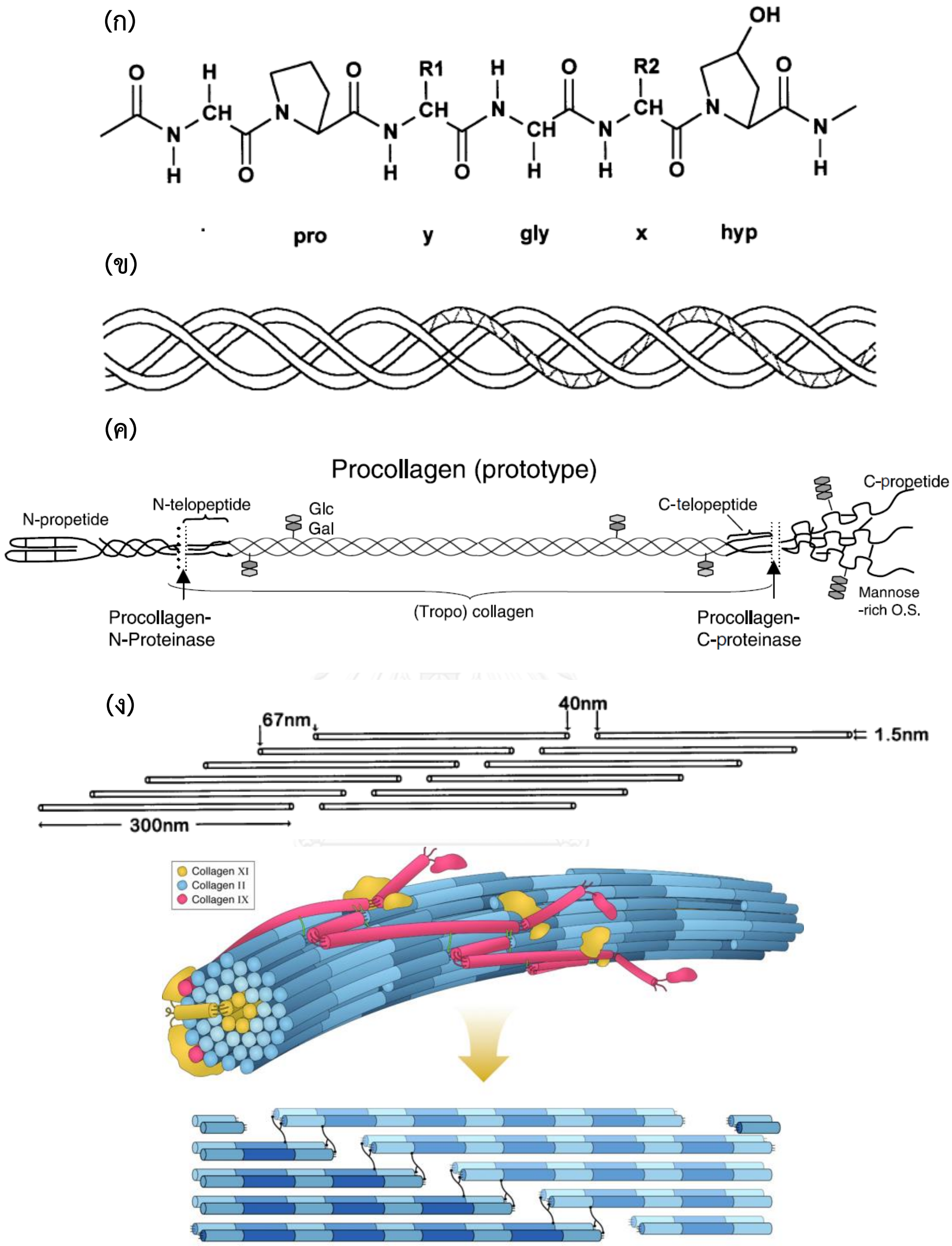
คอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไฮดรอกซีโพรลีนเองจะพบในโปรตีนชนิดอื่นๆปริมาณน้อย (Lee, C. H. และคณะ 2001)

ตารางที่ 2.1 ร้อยละองค์ประกอบของกรดอะมิโนเฉลี่ยในคอลลาเจนที่พบในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ (Eastoe, J. E. 1955, Lin, Y. K. และคณะ 2006)

ชนิดของกรดอะมิโน	กระดูกวัว	หนังวัว	หนังสุกร	เอ็นสุกร	กระดูกมนุษย์	เอ็นมนุษย์	เอ็นปลาวาฬ
กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว							
Alanine, Ala	8.88	14.51	15.17	11.31	9.23	11.05	9.10
Glycine, Gly	21.39	40.75	39.22	33.13	21.86	32.30	21.85
Valine, Val	2.24	1.20	2.04	2.02	2.52	2.53	2.47
Leucine, Leu	3.32	3.67	4.23	2.32	3.05	2.60	3.14
Isoleucine, Ile	1.46	2.65	2.75	0.61	1.59	1.11	1.06
Methionine, Met	0.67	1.20	1.01	1.03	0.71	0.57	0.89
Proline, Pro	12.43	4.93	5.14	12.62	12.96	12.62	12.50
Hydroxyproline, Hyp	11.92	13.31	12.39	10.30	11.95	9.19	11.05
Phenylalanine, Phe	2.43	1.16	1.33	1.211	2.11	1.41	2.41
กรดอะมิโนที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ							
Serine, Ser	3.58	0.24	0.20	3.43	3.44	3.68	3.72
Threonine, Thr	2.13	1.08	1.19	1.72	1.99	1.84	2.18
Tyrosine, Tyr	0.47	0.27	0.42	0.30	0.73	0.36	0.66
Cysteine, Cys	น้อยมาก	0.24	0.31	น้อยมาก	น้อยมาก	น้อยมาก	น้อยมาก
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุบวก							
Lysine, Lys	4.42	5.46	6.29	2.4	4.25	3.04	4.45
Arginine, Arg	7.77	2.58	2.66	4.85	7.45	4.89	8.08
Histidine, His	0.81	1.00	1.27	0.51	0.81	0.54	0.71
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุลบ							
Aspartate, Asp	6.00	3.99	3.42	4.65	5.68	4.83	5.95
Glutamate, Glu	10.06	1.82	0.98	7.57	9.66	7.44	9.78

จากตารางที่ 2.1 แสดงร้อยละองค์ประกอบของกรดอะมิโนเฉลี่ยในคอลลาเจนที่พบในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ พบว่า โมเลกุลของคอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำประมาณร้อยละ 70 และ กรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำประมาณร้อยละ 30 และคอลลาเจนในเอ็นและกระดูกมีกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นลบมากกว่ากรดอะมิโนที่มีประจุบวก ส่วนคอลลาเจนในหนังมีกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวกมากกว่ากรดอะมิโนที่มีประจุลบ

ไกลซีนที่พบบนสายพอลิเปปไทด์ในทุกๆ ตำแหน่งที่สามนั้นเป็นปัจจัยพื้นฐานของการเกิดเกลียวสามสาย เนื่องจากด้านในของเกลียวโทรโพคอลลาเจนเบียดเสียดมาก มีช่องว่างพอให้เฉพาะหมู่โซ่ข้างของไกลซีน ซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดเท่านั้น กรดอะมิโนตัวอื่นๆหันหมู่โซ่ข้างที่มีขนาดใหญ่ออกไปอยู่ด้านนอกของเกลียวโทรโพคอลลาเจน จึงเห็นได้ว่า ไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุดแต่ขนาดที่เล็กนี้มีประโยชน์ต่อโครงสร้างของโปรตีนเช่นกัน ลักษณะเช่นนี้ก็พบในโปรตีนชนิดอื่นๆด้วย เช่น ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) การกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนไกลซีนในคอลลาเจนเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ส่งผลให้โทรโพคอลลาเจนเปลี่ยนไป สมบัติทางชีวภาพก็เปลี่ยนไปด้วย เช่น ในโรค osteogenesis imperfecta ซึ่งทำให้มีการสร้างกระดูกผิดปกติและทำให้กระดูกเปราะ เป็นต้น (Eyre, D. R. และคณะ 2008)

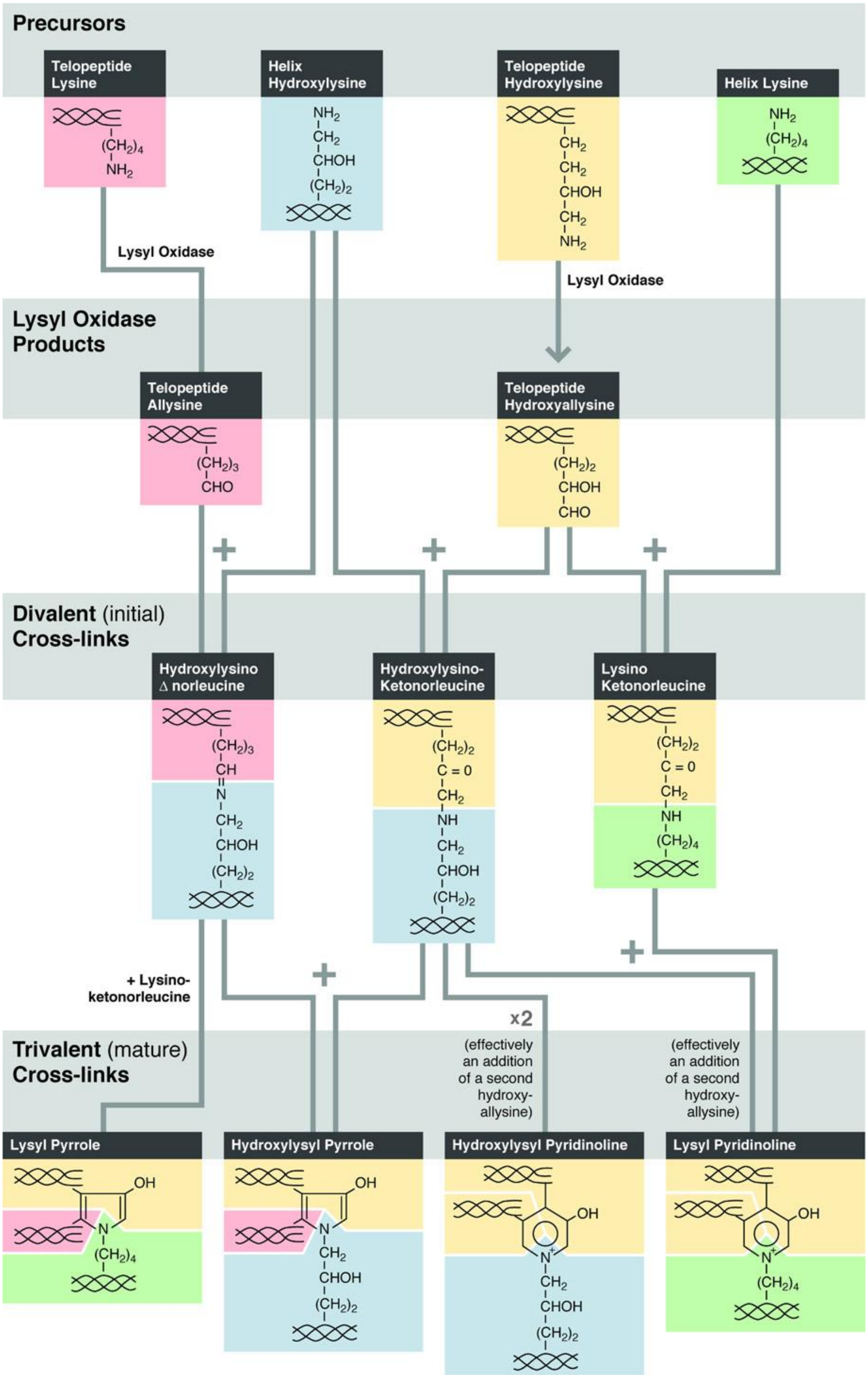


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน (Friess, W. 1998, Von Der Mark, K. 2006, Eyre, D. R. และคณะ 2008)

(ก) ลำดับของกรดแอมิโน (ข) โครงสร้างของโทรโพคอลลาเจน

(ค) โครงสร้างของโปรคอลลาเจน (ง) การจัดเรียงตัวของโทรโพคอลลาเจนเป็นเส้นใยคอลลาเจน

การสร้างคอลลาเจนในเซลล์ถูกสร้างเป็นโปรคอลลาเจน (Procollagen) คือ สายแอลฟาถูกสร้างขึ้นโดยเปปไทด์ส่วนเกินอยู่ที่ปลาย N และ C และเมื่อถูกส่งเข้าไปในร่างแหเอนโดพลาซึม (Endoplasmic reticulum) จะมีเอนไซม์โพรลิล-4-ไฮดรอกซิเลส (Prolyl-4-hydroxylase) และไลซิลไฮดรอกซิเลส (Lysyl hydroxylase) มาเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้แก่โพรลีนและไลซีนบางตัว และมีการเติมหมู่น้ำตาล (Glycosylation) ด้วย แล้วสายแอลฟา 3 สาย ประกอบกันเข้าเป็นโปรคอลลาเจน หลังจากเซลล์หลั่งโปรคอลลาเจนออกสู่เมทริกซ์นอกเซลล์ โปรทีเนส (Proteinase) 2 ชนิดเข้ามาตัดเอาเปปไทด์ส่วนปลาย N และ C ออกได้เป็นโทรโพคอลลาเจน เมื่อโทรโพคอลลาเจนจัดเรียงตัวเป็นเส้นใย ไลซิลออกซิเดส (Lysyl oxidase) จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างสายโทรโพคอลลาเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ด้วยตัวเชื่อมไฮโดรซีไพริดิเนียม (Hydroxypyridinium crosslink) ระหว่างหัวและหางของโทรโพคอลลาเจนที่อยู่ใกล้กัน ทำให้เส้นใยมีความแข็งแรงขึ้น (Eyre, D. R. และคณะ 2008)



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาไลซิลออกซีเดสที่เกิดการเชื่อมกันในโทรโพคอลลาเจน (Eyre, D. R. และคณะ 2008)

2.2.1 โครงสร้างและหน้าที่ของคอลลาเจน

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) เป็นการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะใหม่ทดแทนและ/หรือส่งเสริมฟื้นฟูเนื้อเยื่อและอวัยวะเดิมของผู้ป่วย ซึ่งมีความเจริญก้าวหน้าอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีผ่านมา โดยมีการทำการวิจัยผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่เลียนแบบธรรมชาติมากมายเพื่อหาวัสดุที่มีประสิทธิภาพสำหรับเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ หนึ่งในนั้นคือคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในร่างกายและเป็นองค์ประกอบหลักของเมทริกซ์นอกเซลล์ คอลลาเจนถูกใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) และในร่างกาย (*In vivo*) และได้แสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจนมีบทบาทหน้าที่หลายอย่างภายในร่างกาย แต่หน้าที่ที่โดดเด่น คือ หน้าที่ทางกล (Mechanical function) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวกับเนื้อเยื่อ คือ เป็นโครงให้เซลล์เกาะ ช่วยส่งเสริมให้เซลล์เจริญเติบโต และช่วยซ่อมแซมเซลล์ คอลลาเจนเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน เช่น ในเส้นเอ็น (Tendons or ligaments) โดยในเนื้อเยื่อของเส้นเอ็น คอลลาเจนมีบทบาทในการส่งแรงระหว่างกระดูกและกล้ามเนื้อและจัดเก็บพลังงานส่วนเกิน ซึ่งบทบาทของคอลลาเจนนั้นเป็นสิ่งจำเป็น เพราะถ้าไม่มีการติดต่อกันระหว่างกระดูกและกล้ามเนื้อด้วยคอลลาเจน โครงกระดูกจะไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ นอกจากนี้คอลลาเจนยังพบในเนื้อเยื่อ เช่น ฟัน กระดูก ซึ่งในเนื้อเยื่อเหล่านี้คอลลาเจนจะอยู่รวมกับสารที่มีความแข็งจำพวกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) คอลลาเจนจึงมีบทบาทช่วยให้ความยืดหยุ่นกับเนื้อเยื่อกระดูกและฟัน และต้านทานการแตกหักของกระดูก นอกจากนี้ยังมีบทบาทในเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ในกระดูกอ่อนและกล้ามเนื้อ เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อเหล่านี้ยืดหยุ่น และยังเป็นส่วนประกอบหลักของชั้นผิว มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า เคราติน (Keratin) มีหน้าที่สร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่น เมื่อเคราตินในชั้นผิวลดลง จึงเกิดริ้วรอยแห่งวัยขึ้นบนชั้นผิว นอกจากนี้ เคราตินยังมีหน้าที่สร้างความยืดหยุ่นให้ผนังหลอดเลือด มีส่วนช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ รวมทั้งยังเป็นส่วนประกอบของเยื่อกระจกตาและเลนส์ตาด้วย

2.2.2 ชนิดของคอลลาเจน

ปัจจุบันสามารถแบ่งคอลลาเจนออกเป็น 29 ชนิด โดยแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล ส่วนประกอบของหน่วยย่อย (Subunit) ความยาวของสายฮีลิกซ์ คุณสมบัติและ

ขนาดของส่วนที่ไม่เป็นฮีลิกซ์ (Non-helix portion) (Parenteau-Bareil, R. และคณะ 2010) อีกทั้งแบ่งตามข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและ/หรือโปรตีน (Von Der Mark, K. 2006) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 เช่น คอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นคอลลาเจนชนิด heterotrimer ประกอบขึ้นจากสายพอลิเปปไทด์ α1(I) 2 สาย และ α2(I) 1 สาย ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่พบมากที่สุด ประมาณ 90 % พบได้ทั่วร่างกายยกเว้นในกระดูกอ่อน เป็นส่วนประกอบหลักที่ให้ความแข็งแรงในกระดูก ความยืดหยุ่นในผิวหนัง การเชื่อมต่อในเส้นเอ็นและตัวเชื่อมกระดูก (Ligament) คอลลาเจน ชนิดที่ 2 เป็นคอลลาเจนชนิด homotrimer ประกอบด้วย α1(II) 3 สาย พบในกระดูกอ่อน กระจกตา (Cornea) และวุ้นตา (Vitreous humor) คอลลาเจน ชนิดที่ 3 เป็นคอลลาเจนชนิด homotrimer ประกอบด้วย α1(III) 3 สาย พบในผนังหลอดเลือดและมักจะอยู่ร่วมกับคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ส่วนคอลลาเจน ชนิดที่ 4 เป็นคอลลาเจนชนิด heterotrimer ประกอบด้วย α1(IV) 2 สายและ α2(IV) 1 สาย ทำให้เกิดแผ่นตาข่ายไปเป็นฐานรองรับกั้นระหว่างเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างบางชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อยและตำแหน่งที่พบ (Von Der Mark, K. 2006)

ชนิด	หน่วยย่อย	รูปแบบโมเลกุล	แหล่งที่พบ	คุณลักษณะ
1	α1(I) α2(I)	$\alpha1(I)_2\alpha2$	กระดูก หนังแท้ เส้นเอ็น (ligaments) เอ็น กระจกตา	เส้นใยทนแรงดึงสูง
1	α1(I)	$[\alpha1(I)]_3$	หนังแท้ เนื้อฟัน (dentin)	พบน้อย
2	α1(II)	$[\alpha1(II)]_3$	กระดูกอ่อน (Cartilage) โนโตคอร์ด (notochord) จอประสาทตา	ส่วนใหญ่เป็นกระดูกอ่อน มักปนในเส้นใยที่มีคอลลาเจน ชนิดที่ 9 และ 11
3	α1(III)	$[\alpha\ 1(III)]_3$	เส้นใยร่างแหของเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ในปอด ตับ ม้าม ผิวหนังชั้นหนังแท้ ผนังหลอดเลือด	ส่วนใหญ่พบปนกับคอลลาเจน ชนิดที่ 1
5	α1(V) α2(V) α3(V)	$[\alpha1(V)]_3$ $[\alpha1(V)]_2\alpha3(V)$	เซลล์ปอด กระจกตา กระดูก เยื่อหุ้มทารกในครรภ์	อยู่รวมกับคอลลาเจน ชนิดที่ 1
11	α1(XI) α2(XI) α3(XI)	$[\alpha1(XI)\ \alpha2(XI)\ \alpha3(XI)]$ $[\alpha1(XI)]_2\alpha2(V)$	กระดูกอ่อน วุ้นตา กระดูก	คล้ายคอลลาเจน ชนิดที่ 5

2.2.3 สมบัติของคอลลาเจน

การที่โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียวสามสาย ดังรูปที่ 2.2 (ข) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อม ทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งความแข็งแรงของคอลลาเจนโมเลกุลยังเกิดจากการสร้างพันธะเชื่อมต่อกันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (Intra และ inter molecular cross linkage) คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในกรดหรือเบสเจือจาง แต่จะพองตัวและเมื่อความเข้มข้นของกรดหรือเบสมากขึ้นจะทำให้สมบัติการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากพันธะเชื่อมของคอลลาเจนถูกทำลายบางส่วน แม้ว่าที่สภาวะเป็นกลาง คอลลาเจนจะมีโครงสร้างที่แน่นและมีความแข็งแรงมาก แต่โมเลกุลเดี่ยวๆก็ยังสามารถแยกตัวออกมาได้ โดยการลดความเข้มของความแรงไอออน (ionic strength) และพีเอช เช่น กรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) หรือกรดไฮโดรคลอริก พีเอช 2-3 เป็นผลให้คอลลาเจนเกิดการพองตัวและละลายในที่สุด อย่างไรก็ตามโมเลกุลดังกล่าวยังคงสภาพดั้งเดิม (Native form) คือ ยังคงมีฮีลิกซ์ 3 สายอยู่และหากทำให้สภาวะดังกล่าวกลับมาอยู่ในสภาวะดั้งเดิม ก็มีความเป็นไปได้ที่คอลลาเจนจะสามารถกลับสู่สภาพเดิม แต่สิ่งสำคัญต้องหลีกเลี่ยงความร้อน เนื่องจากฮีลิกซ์จะเสียสภาพที่อุณหภูมิระหว่าง 15-65 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการเสียสภาพขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งที่มาของคอลลาเจน ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โดยอุณหภูมิการเสียสภาพ (Denaturation temperature) ของคอลลาเจนจะขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดอิมิโน (Imino acid) คือ โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนมากกว่าปริมาณของโพรลีน คอลลาเจนที่มีปริมาณกรดอิมิโนต่ำ จะเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าคอลลาเจนที่มีกรดอิมิโนสูง โดยปริมาณกรดอิมิโนและความเสถียรต่อความร้อนของคอลลาเจนในสัตว์ชนิดต่างๆ มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ปริมาณโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนในพันธะเชื่อมในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุล (Intra and intermolecular crosslinking) จะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิการเสียสภาพแล้วยังมีความสัมพันธ์กับความคงตัวของฮีลิกซ์ของแต่ละสายพอลิเปปไทด์ของโทรโปคอลลาเจนด้วย โดยโพรลีนจะทำให้โครงสร้างฮีลิกซ์สามสายเสถียร โดยป้องกันการหมุนตัวของพันธะ N-C และไฮดรอกซีโพรลีนก็ช่วยทำให้โมเลกุลคอลลาเจนเสถียร ส่วนความคงตัวของโทรโพคอลลาเจนเกี่ยวข้องกับพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างโมเลกุล (Lee, C. H. และคณะ 2001)

ตารางที่ 2.3 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนและปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่อยู่	**สายพันธุ์**	**แหล่งที่มา**	**ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (residues/1000)**	**อุณหภูมิการเสียสภาพ (°ซ)**	**แหล่งอ้างอิง**
สัตว์บก	หนู (Wistar rat)	เอ็นส่วนหาง	94	65	(Fathima, N. N. และคณะ 2004)
	ไก่	หนัง	99	41	(Ekblom, B. 1970)
	ลูกวัว	หนัง	94	40.8	(Ikoma, T. และคณะ 2003)
	สุกร (*Sus domesticus*)	หนัง	93	37	
ปลาน้ำจืด	ปลายี่สกเทศและปลากระโห้เทศ (*L. rohita &C. catla*)	เกล็ด	83 และ 84	36.5	(Pati, F. และคณะ 2010)
	ปลานิล (*Oreochromis niloticas*)	เกล็ด	83	35.7	(Ikoma, T. และคณะ 2003)
	ปลาเกล็ดเงิน (ปลาลิ่น) (*Hypophthalmichthys molitrix*)	หนัง	84	34.5	(Rodziewicz-Motowidło, S. และคณะ 2008)
	ปลาไน (*Cyprinus carpio*)	หนัง	76	28	(Duan, R. และคณะ 2009)
		เกล็ด	77	28	
		กระดูก	80	28	
ปลาทะเล	ปลากะพงแดง	เกล็ด	73	29.9	(Ikoma, T.

	(*Pagrus major*)				และคณะ 2003)
	ปลาคางคก (*Lagocephalusglo veri*)	หนัง	77	28	(Senaratne, L. S. และคณะ 2006)
	ปลาปักเป้าเสือ (*Takifugu rubripes*)	หนัง	67	16.1	(Nagai, T. และคณะ 2002)
	ปลาแดง (*Sebastes mentella*)	หนัง	64	17.1	(Wang, L. และคณะ 2008)
		เกล็ด	65	17.7	
		กระดูก	61	17.5	
	ปลาคอด (*Gadus morhua*)	หนัง	53	15	(Sadowska, M. และคณะ 2003)

ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการใช้งานชีววัสดุ โดยคอลลาเจนสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenases) ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้คอลลาเจนเป็นที่นิยมในการใช้งานทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง อัตราของการย่อยสลายสามารถควบคุมได้ด้วยวิธีการที่หลากหลาย เช่น เทคนิคการเชื่อมขวาง หรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยสาร epigallocatechin-3-gallate (EGCG) การย่อยสลายของคอลลาเจนสำหรับการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อช่วยให้เกิดการฟื้นฟูโครงสร้างและการทำงานของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ถึง 3 ยังชักนำให้เกิดการสร้างเซลล์สร้างเส้นใย (Human fibroblasts) ด้วย (Gelse, K. และคณะ 2003)

คอลลาเจนรวมกันเป็นเส้นใย เรียกว่า คอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fiber) ซึ่งมีลักษณะเป็นสายเกลียวที่มีหน่วยโมเลกุลเกี่ยวพันกันมากมาย โดยปกติผิวหนังมีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบอยู่มากจึงมีแรงสปริงตัวและยืดหยุ่นได้ดีตามไปด้วย คอลลาเจนไม่ได้มีอยู่ที่ผิวหนังส่วนนอกเท่านั้น

อวัยวะภายในร่างกายก็มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบอยู่มาก ได้แก่ พังผืด (Fascia) กระดูกอ่อน (Cartilage) เส้นเอ็น (Ligaments) เอ็น (Tendons) และกระดูก (Bone) เพื่อให้ความแข็งแรงและเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับเนื้อเยื่อเหล่านี้ เส้นใยคอลลาเจนจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ตั้งแต่ 10-500 นาโนเมตร สมบัติเชิงกลของเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 จากเอ็นหางหนู จะมีค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) 5-11.5 จิกะปาสคาล ในอากาศและที่อุณหภูมิห้อง (Wenger, M. P.E. และคณะ 2007) ได้ทดสอบสมบัติเชิงกลของเส้นใยคอลลาเจนและเปรียบเทียบค่ามอดูลัสของยังในเอ็นสัตว์ที่วัดด้วยวิธีต่างๆ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-200 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2.4 และลักษณะทางกายภาพของคอลลาเจนสรุปดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 ค่ามอดูลัสของยังของคอลลาเจนในเอ็นสัตว์ชนิดต่างๆ (Wenger, M. P.E. และคณะ 2007)

เส้นใยคอลลาเจน	**เทคนิคการวัด**	**สภาวะของเส้นใย**	**ค่ามอดูลัสของยั. (GPa)**
Rat tail tendon	Indentation	Different dehydration states	3.75–11.5
Rat tail tendon	Brillouin	In 0.15 M NaCl solution	9.0
Rat tail tendon	Brillouin	At 30% relative humidit	14.7
Rat tail tendon	Brillouin	At 0% relative humidity	21.5
Rat tail tendon	Brillouin	In 0.15 M NaCl solution	5.1
Rat tail tendon	Brillouin	At 50% relative humidity	11.9
Bovine Achilles tendon	X ray	In 0.15 M NaCl solution	2.96±0.1
Bovine Achilles tendon	Spectroscopy	At 0% relative humidity	2–7
Bovine Achilles tendon	Spectroscopy	In phosphate buffered saline	0.2–0.5
Sea cucumber	Tensile test	In water	12 (high strain)
Sea cucumber	Indentation	<45% relative humidi	1–2
Collagen-like peptide	Simulation	-	4.86±1.0

ตารางที่ 2.5 สรุปลักษณะทางกายภาพของคอลลาเจน

น้ำหนักโมเลกุล	300 กิโลดาลตัน	(Friess, W. 1998)
การดูดกลืนแสง คอลลาเจนจากเท้านก คอลลาเจนจากหนังกบ คอลลาเจนจากหนังวัว หนังสุกร และหนังฉลาม	 190–340 นาโนเมตร 190–270 นาโนเมตร 190–240 นาโนเมตร	(Lin, Y. K. และคณะ 2006)
อุณหภูมิการเสียสภาพ	15-65 องศาเซลเซียส	(Ikoma, T. และคณะ 2003)

2.2.4 การสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธีโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไปเสียก่อน โดยเฉพาะการกำจัดไขมันด้วยอะซิโตนและไดเอทิลอีเทอร์ แล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมา การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดคอลลาเจนมีด้วยกันหลายวิธีโดยอยู่ขึ้นกับวัตถุดิบเริ่มต้นว่ามีองค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากเท่าไร สามารถสรุปได้พอสังเขปดังนี้ การล้างทำความสะอาด การกำจัดโปรตีนบริเวณผิวหน้า การกำจัดไขมัน การกำจัดแคลเซียม การกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน (Non-collagenous proteins) และการกำจัดเม็ดสี (Pigments) (Friess, W. 1998) ส่วนการสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาก็ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์และชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัด ดังนี้

ก. การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายเกลือที่เป็นกลาง (Neutral salt soluble collagen)

คอลลาเจนชนิดนี้จะมีอยู่น้อยหรือไม่มีเลยในเนื้อเยื่อและจะละลายได้ในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง การเติมเกลือที่สมบัติเป็นกลาง ความเข้มข้นประมาณ 0.1-1 โมลาร์ เช่น โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15-2 โมลาร์ จะเกิดแรงดึงดูดระหว่างไอออนของคอลลาเจนและเกลือ ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนและคอลลาเจนลดลง เป็นผลให้มีการละลายของคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า salting in นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดอะซิติกเจือจางร่วมด้วย เช่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์และ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 เนื่องจากคอลลาเจนชนิดนี้พบในเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ที่ยังไม่มีการเชื่อมขวาง (Crosslink) โดยการสกัดจะต้องมี

การควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่าและปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ การทำบริสุทธิ์คอลลาเจนที่สกัดได้แล้วโดยการทำไดอะไลซ์ (Dialysed) การตกตะกอนและการปั่นเหวี่ยง (Friess, W. 1998, Yu, J. C. และคณะ 2010)

ข. การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid soluble collagen)

กรดมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนมากกว่าการใช้สารละลายเกลือ โดยพันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดเจือจาง ทำให้ประจุบนโทรโพคอลลาเจนผลักกัน โครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนมีการพองตัว คอลลาเจนจึงละลายออกมาในสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) หรือกรดไฮโดรคลอริก พีเอชประมาณ 2-3 (Yu, J. C. และคณะ 2010)

ค. การสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin soluble collagen) ที่สภาวะความเป็นกรด พีเอช 2.5

การสกัดชนิดนี้ใช้ได้ทั้งคอลลาเจนที่มีในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สร้างใหม่ (Pre-mature) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เจริญเต็มที่แล้ว (Mature) เนื่องจากการสกัดคอลลาเจนโดยการใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้คอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ที่เรียกว่า ส่วนเทโลเปปไทด์ ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้ เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงใช้เอนไซม์ในการกำจัดเทโลเปปไทด์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ เช่น โปรเนส (Pronase) เปปซิน (Pepsin) และไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) เป็นต้น เอนไซม์เปปซินนั้นประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์เดี่ยวของกรดอะมิโนจำนวน 321 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 35.5 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเปปทิเดส (Endopeptidase) ซึ่งจะตัดภายในสายพอลิเปปไทด์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยในช่วงพีเอช 2 -3 ซึ่งเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับพีเอชที่ใช้ในการสกัด เช่น กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 2.5 โดยใช้เอนไซม์เปปซินต่อซับสเตรทเท่ากับ 1:10 ที่อุณหภูมิ 4-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-72 ชั่วโมง คอลลาเจนจะพองตัวทำให้ส่วนเทโลเปปไทด์ถูกกำจัดได้ง่ายขึ้น เปปซินเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการตัดพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยกรดอะมิโนชนิดที่มีวงแหวน (aromatic amino acid) เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีนและทริปโตเฟน แต่จะไม่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยกรดอะมิโนชนิดวาลีน อะลานีนและไกลซีน โดยตัดที่ส่วนปลายของโทรโพคอลลาเจนทั้งปลาย N- และ C- ออกประมาณ 18 และ 25 หน่วย ส่วนนี้เป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำค่อนข้างสูง ทำให้ได้ส่วนของเปปไทด์เล็กๆละลายอยู่ ส่วนเทโลเปปไทด์จะถูกกำจัดออก ซึ่งมีผลดี คือ

ส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้ถูกกำจัด และการสกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว (Friess, W. 1998)

การทดสอบสมบัติของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ตาม ASTM F2212 (2008) ดังแสดงในภาคผนวก ซ การทดสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยมาตรฐานตาม ASTM กำหนด โดยวิธีการทดสอบคอลลาเจนจะต้องน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป สำหรับคอลลาเจนที่เป็นสารละลายจะต้องมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 98-99 ด้วยลักษณะสมบัติจากการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ น้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE, รูปแบบการเรียงตัวของเปปไทด์ (Peptide mapping), ความเข้มข้นในหน่วยน้ำหนักต่อปริมาตรหรือน้ำหนักต่อน้ำหนัก, การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน ด้วย HPLC, ความบริสุทธิ์ของสารละลายด้วย SDS-PAGE ต้องปรากฏแถบของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 หรือหากย่อยคอลลาเจนด้วยคอลลาจีเนสแล้วยังปรากฏแถบโปรตีน, ความไม่บริสุทธิ์จากการปนเปื้อนในสารละลายคอลลาเจน ตรวจสอบด้วยวิธี Western blots หรือ ELISAs หรือวิธีอื่นๆ ประกอบด้วย อิลาสติน, Endotoxin หรือ สารพิษที่มีอยู่บริเวณด้านนอกของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อถูกทำลายจะปล่อยสารพิษออกมา, ไกลโคอะมิโนไกลแคน, ไขมัน, Host cell, โลหะหนัก, แบคทีเรียและไวรัส, ไวรัสไข้สมองอักเสบ, สารเชื่อมขวางและเอนไซม์, องค์ประกอบของสารที่ถูกใช้ในการสกัด เช่น กรด ตัวทำละลาย สารลดแรงตึงผิว, การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนด้วย DSC, ความหนืด, ข้อมูลลำดับ DNA โดยการแสดงออกของยีน COL1A1 หรือ COL1A2

สมบัติของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 คอลลาเจนชนิดนี้พบมากในเอ็น กระดูกและหนัง มีโครงสร้างเป็นเกลียวฮีลิกซ์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์สามสาย คือ สาย $\alpha 1$ 2 สาย และ $\alpha 2$ 1 สาย แต่ละสายมีกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 1,024 ตัว ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีลักษณะซ้ำๆของ Gly-X-Y โดย X และ Y มักเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนไกลซีน:โพรลีน:ไฮดรอกซีโพรลีน โดยประมาณเป็น 30:10:10 บริเวณส่วนปลาย N และ C มีกรดอะมิโนเรียงต่อกันประมาณ 16 และ 25 ตัว ซึ่งเรียกว่าส่วนเทโลเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5 กิโลดาลตัน

2.2.5 การประยุกต์ใช้งานคอลลาเจน

สิ่งที่น่าสนใจสำหรับคอลลาเจนในการนำมาใช้เป็นวัสดุทางชีวภาพ คือ คอลลาเจนเป็นวัสดุจากธรรมชาติที่ทำให้เกิดการแพ้ต่ำและยังเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของร่างกายอยู่แล้ว คอลลาเจนสามารถผลิตมาใช้ได้หลายรูปแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม ฟองน้ำ (Sponges) ผง หรือสารละลายสำหรับฉีด เป็นต้น ทั้งหมดนี้นำไปใช้ในงานด้านการแพทย์ นอกจากนั้นยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านจักษุวิทยา ตกแต่งบาดแผลฉีกขาดหรือบาดแผลไฟไหม้ รักษาเนื้องอกและช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อ เป็นต้น (Friess, W. 1998)

ฟิล์มคอลลาเจน (Collagen film/ sheet/ disc) มีความหนาประมาณ 0.01–0.5 มิลลิเมตร ที่ผลิตจากคอลลาเจนที่ไม่มีส่วนของเทโลเปปไทด์และมีรูปแบบการปลดปล่อยตัวยาอย่างช้าๆ ตัวยาเหล่านี้สามารถใส่เข้าไปในฟิล์มคอลลาเจน โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน พันธะโควาเลนต์หรือการดักจับในโครงสร้าง (Entrapment) สามารถผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อได้ เมื่อเกิดการย่อยสลาย (Hydrolyzation) จะยังคงรักษาความแข็งแรงพอที่จะทนต่อการใช้งาน เมื่อนำฟิล์มคอลลาเจนมาใช้กับดวงตา ฟิล์มจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายหลังการใช้งาน 5-6 ชั่วโมง (Lee, C. H. และคณะ 2001) ฟิล์มคอลลาเจนยังใช้ในการรักษาเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อได้ เช่น เนื้อเยื่อกระจกตาติดเชื้อหรือมะเร็งตับ โดยการรักษาเนื้อเยื่อกระจกตาติดเชื้อจะใช้สารปฏิชีวนะ เช่น gentamicin และ tetracycline ใส่ไปในฟิล์มคอลลาเจน ผลของการใช้ฟิล์มคอลลาเจนที่มีสาร tetracycline พบว่าสามารถตรวจพบ tetracycline ในพลาสมาเป็นเวลามากกว่า 7 วัน ภายหลังการทดลองใช้ในกระต่าย (Minabe, M. และคณะ 1989) สำหรับการรักษามะเร็ง ฟิล์มคอลลาเจนจะใส่สารยับยั้งมะเร็ง (Ectopocide (VP-16)) พบว่าสามารถรักษาระดับความเข้มข้นของตัวยาที่บริเวณเป้าหมาย (ตับ) ไว้ได้นานขึ้น (Sato, H. และคณะ 1996) นอกจากนี้ฟิล์มคอลลาเจนยังใช้เป็นตัวขนส่งยีน (Gene delivery) ได้อีกด้วย เช่น การกระตุ้นการสร้างกระดูกโดยใช้ recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) และคอลลาเจน พบว่าการใช้ rhBMP-2 ร่วมกับคอลลาเจนจะมีผลในการกระตุ้นการสร้างกระดูก โดยคอลลาเจนมีส่วนช่วยในการยึดเหนี่ยวเซลล์ต่างๆและยังมีส่วนช่วยในการเชื่อมกระดูก แต่ถ้าใช้เพียงคอลลาเจนอย่างเดียวจะไม่มีผลในการสร้างกระดูก

คอลลาเจนชิลด์ (Collagen shields) ถูกออกแบบเพื่อเป็นสิ่งปิดกระจกตา (Corneal bandages) ซึ่งสามารถละลายได้ในกระจกตา เพื่อกระตุ้นการรักษาบาดแผลภายหลังการปลูกถ่ายกระจกตา (Corneal transplantation) หรือการผ่าตัดกระจกตา (Radial keratomy) คอลลาเจน

ชิลด์สำหรับดวงตาผลิตจากเนื้อเยื่อเปลือกลูกตาหมู เนื่องจากมีโมเลกุลคอลลาเจนคล้ายกับคอลลาเจนของตาคนมาก คุณสมบัติทางกายภาพของคอลลาเจนชิลด์คือป้องกันส่วนหน้าของกระจกตา (Corneal epithelium) ที่กำลังรักษาจากการกระทบของหนังตา อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการรักษาส่วนหน้าของกระจกตาจากการปลูกถ่ายกระจกตาและการผ่าตัดกระจกตา การขนส่งตัวยาของคอลลาเจนชิลด์จะขึ้นกับปริมาณของยาและการปลดปล่อยยาของชิลด์ สำหรับตัวยาที่ละลายน้ำได้ โครงสร้างคอลลาเจนจะทำหน้าที่เสมือนที่กักเก็บและตัวยาจะถูกดักจับไว้ในช่องว่างของโครงสร้างคอลลาเจน แต่สำหรับตัวยาที่ไม่ละลายน้ำตัวยาจะเข้าไปรวมกับตัวชิลด์ ขณะที่ตัวยาไหลออกมาจากชิลด์และชิลด์ย่อยสลายจะทำให้มีชั้นของของเหลว ซึ่งทำหน้าที่หล่อลื่นผิวหน้าของตา ลดการเสียดสีของหนังตากับกระจกตา เพิ่มเวลาการสัมผัสระหว่างตัวยากับกระจกตาและช่วยรักษาส่วนหน้าของกระจกตา อย่างไรก็ตามการใช้คอลลาเจนชิลด์เป็นตัวขนส่งตัวยายังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ลดความสามารถในการมองเห็น เนื่องจากการบดบังและระยะเวลาที่อยู่ในบริเวณกำหนดสั้น อีกทั้งผลข้างเคียงของคอลลาเจนชิลด์ ซึ่งได้รายงานว่าการใช้คอลลาเจนชิลด์กับตาของกระต่ายและหนูตะเภาผลที่ได้อาจแสดงความเป็นพิษหรืออาจเกิดจากการอักเสบขณะสอดใส่คอลลาเจนชิลด์ การอักเสบที่เกิดขึ้นในกระต่ายเกิดขึ้นหลังการสอดใส่ 7 วัน ส่วนของหนูตะเภาใช้เวลานานกว่านั้น (Lee, C. H. และคณะ 2001)

คอลลาเจนแบบฟองน้ำ (Collagen sponges) นิยมใช้ในการรักษาบาดแผลไฟไหม้และตกแต่งบาดแผล การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) พบว่าได้ผลดี คอลลาเจนแบบฟองน้ำมีความสามารถในการดูดซับของเหลวจากเนื้อเยื่อได้ปริมาณมากทำให้แผลแห้ง อีกทั้งยังป้องกันการกระแทกและการติดเชื้อ คอลลาเจนแบบฟองน้ำยังใช้เป็นตัวขนส่งตัวยาจำพวกยาคุมกำเนิด โดยมีข้อดีในเรื่องการควบคุมการปลดปล่อยสารฆ่าเชื้ออสุจิและช่วยลดการระคายเคืองของเนื้อเยื่อ คอลลาเจนแบบฟองน้ำสามารถเตรียมได้โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของสารละลายกรดหรือด่างที่มีคอลลาเจนพองตัวอยู่ประมาณร้อยละ 0.1-5 ซึ่งสามารถกำหนดความพรุนของคอลลาแบบฟองน้ำได้โดยกำหนดความเข้มข้นของคอลลาเจนในสารละลายและอัตราการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Patino, M. G. และคณะ 2002)

กระบวนการรักษาบาดแผลเป็นกลไกเชิงซ้อนที่เกี่ยวข้องกับระบบของร่างกายหลายอย่าง ซึ่งรวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการรักษาบาดแผลนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วนคือ haemostasis process และ inflammation process, proliferation และ maturation สุดท้ายคือ remodeling process เมื่อเกิดบาดแผลขึ้นเกล็ดเลือดจะออกมาจากชั้น subendothelial collagen เป็นผลให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดและกระตุ้นให้เกล็ดเลือดนี้เปลี่ยนเป็นก้อนหนาหนืด (Coagulation) ต่อมา fibrin clots จะถูกสร้างขึ้น ซึ่ง fibrin clots นี้มีความจำเป็นต่อการปิดบาดแผลชั่วคราวเพื่อเตรียมสร้างโครงสร้างของเซลล์ต่างๆ เช่น neutrophil, monocyte, fibroblast และ endothelial cell นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของหลอดเลือดการปลดปล่อยสาร prostaglandin, chemotactic substances, complement factor, interleukin-1, tumor necroticfactor-α (TNF-α) และ transforming growth factor-β (TGF-β) ซึ่งเป็น bacterial product โดยมีผลไปกระตุ้นการเคลื่อนย้าย neutrophil ไปยังบาดแผลตามด้วยการเคลื่อนย้าย macrophage, lymphocyte และ fibroblast ตามลำดับ wound macrophage ได้มาจาก blood macrophage ที่เคลื่อนมายังบริเวณบาดแผล macrophage มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ (Inflammatory process) fibroblast จะเคลื่อนที่ไปยังช่องว่างบาดแผลเพื่อสร้างและสะสมไกลโคโปรตีนและคอลลาเจน การเคลื่อนที่เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นผลจาก macrophage derived cytokines เช่น TGF-β, epidermalgrowth factor (EGF) และ platelet derived growth factor (PDGF) (Parenteau-Bareil, R. และคณะ 2010)

หลังจากเกิดบาดแผล 2-3 วันเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บจะเข้าสู่กระบวนการเจริญเติบโต (Proliferation) โดย fibroblast และ endothelial cell ที่อยู่ใกล้ๆบาดแผลจะเริ่มแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนซึ่งเป็นผลจาก growth factors, cytokines derived platelet และ activated macrophage ต่อมา endothelial cell จะเริ่มสร้างเส้นเลือดฝอยและหลอมรวมกับท่อต่างๆหรือ endothelial bud ซึ่งทำให้เลือดไหลเวียนได้อีกครั้ง เซลล์เม็ดเลือดขาวจะเข้าสู่ apoptosis และถูก macrophage ย่อย ดังนั้นเพื่อการรักษาบาดแผลที่สมบูรณ์จึงควรปิดบาดแผลด้วยวัสดุที่มี epidermal analogues และ dermal analogues ที่ผสมตัวยาเอาไว้ ชีววัสดุของ dermal layer ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์จากคอลลาเจนหรือคอลลาเจนที่เชื่อมกับเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น ไกลโคอะมิโนไกลแคน, กรดไฮยาลูรอนิค นอกจากคอลลาเจนจะมีความสำคัญในการเชื่อมติดเซลล์ การเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แล้ว เมทริกซ์นอกเซลล์ยังมีคุณสมบัติหลายอย่างเช่น สามารถปลดปล่อยสารที่ช่วยการเชื่อมติดกระตุ้น fibroblast proliferation และกระตุ้น fibroblast differentiation อีกด้วย (Khan, R. และคณะ 2013)

2.2.6 การทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization)

การทำให้ปราศจากเชื้อมีความสำคัญอย่างยิ่งในทางการแพทย์ เพราะเป็นกระบวนการที่ทำให้จุลินทรีย์ รวมทั้ง ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย อาจปนเปื้อนอยู่ในเวชภัณฑ์ทางการแพทย์นั้นตาย หรือไม่สามารถขยายพันธุ์ได้อีกต่อไป แต่ในทางปฏิบัติมีโอกาสที่จุลินทรีย์จะเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์และการทดสอบความปราศจากเชื้อ (Sterility test) ซึ่งไม่สามารถทดสอบทุกหน่วยผลิตภัณฑ์จึงต้องกำหนดระดับการยอมรับผลการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterility Assurance Level, SAL) ในทางการแพทย์ถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่บรรจุสารฉีดเข้าเส้นเลือด หรือผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสเนื้อเยื่อภายในร่างกาย การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ คือ วิธีการทางกายภาพ เช่น วิธีที่ใช้ความร้อน ได้แก่ การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) การทำให้ปราศจากเชื้อโดยการใช้ไอน้ำ (Steam sterilization) เป็นต้น และวิธีที่ไม่ใช้ความร้อน ได้แก่ การทำให้ปราศจากเชื้อโดยการใช้รังสี (Ionizing radiation) การทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง (sterilization by filtration) และวิธีการทางเคมี การทำให้ปราศจากเชื้อโดยการใช้ก๊าซ (Gas sterilization) (Rutala, W. A. และคณะ 2008)

การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง คือ การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้อากาศที่ร้อนซึ่งไม่มีน้ำหรือไอน้ำอยู่ เครื่องมือที่ใช้อบ (Hot air oven) โดยใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อาจใช้อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างจากนี้ ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อ การทำให้ปราศจากเชื้อวิธีนี้จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เช่น สารเคมีหรือตัวยาบางชนิด การทำให้ปราศจากเชื้อชนิดนี้ไม่เหมาะกับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของยาง พลาสติกบางชนิดที่มีการเสียสภาพที่อุณหภูมิสูง ผลิตภัณฑ์จำพวกเซลลูโลส เช่น ผ้ากอซ สำลี เพราะจะทำให้ไหม้ นอกจากนี้ยังใช้การทำให้ปราศจากเชื้อและทำลายสารก่อไข้ (Pyrogen) ในเครื่องมือที่เป็นแก้วและโลหะ เช่น ภาชนะบรรจุยาจำพวกแก้ว กรรไกร ปากคีบ มีด เข็มฉีดยา โดยใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 220 องศาเซลเซียส เช่น อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที (Matthews, I. P. และคณะ 1989)

การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ไอน้ำ เป็นการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ไอน้ำที่อิ่มตัวภายใต้ความดันสูง เครื่องมือที่ใช้ คือ หม้อนึ่งอัด (Autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาจใช้อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างจากนี้ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อ การทำให้ปราศจากเชื้อวิธีนี้จะใช้กับยาฉีดที่อยู่ในรูป

สารละลายและมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของยางและพลาสติกบางชนิดที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ประสิทธิภาพของการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เวลา และความชื้น หากใช้อุณหภูมิสูงจะใช้เวลาที่น้อย และหากผลิตภัณฑ์มีความชื้นอยู่ด้วยจะใช้อุณหภูมิที่ต่ำลง กลไกในการฆ่าเชื้อ คือ ความร้อนจะทำให้โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์ตกตะกอนขณะที่มีความชื้นอยู่ด้วย ดังนั้นการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ไอน้ำจึงมีประสิทธิภาพดีกว่า และใช้อุณหภูมิต่ำกว่าการใช้ความร้อนแห้ง (Alder, V. G. 1987)

การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้รังสีเป็นการทำลายจุลินทรีย์ด้วยการใช้พลังงานส่วนเกินจากนิวเคลียสของธาตุบางชนิดที่ปลดปล่อยออกมา ธาตุส่วนใหญ่มีสภาวะคงตัวเพราะมีแรงดึงดูดระหว่างนิวตรอนกับโปรตอนในนิวเคลียสที่พอเหมาะ แต่นิวเคลียสของอะตอมบางตัวไม่คงตัว เช่น อะตอมของคาร์บอน-14, โคบอลท์-60, ซีเซียม-137 และยูเรเนียม-235 เพื่อให้อะตอมคงตัว นิวเคลียสจะปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic radiation) ได้แก่ รังสีแกมมา (Gamma ray) หรือรังสีเอกซ์ (X-ray) หรือปล่อยอนุภาคบางชนิด (Particulate radiation) เช่น อนุภาคเบตา (Beta particle) หรืออนุภาคแอลฟา (Alpha particle) หรืออนุภาคนิวตรอน (Neutron) เป็นต้น ซึ่งมีอำนาจทะลุทะลวงผ่านวัตถุได้สูง เมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใดจะไม่ทำให้ตัวกลางนั้นเปลี่ยนเป็นสารรังสี ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการฉายรังสีจึงไม่มีรังสีตกค้างและไม่มีการสะสมของรังสี การทำให้ปราศจากเชื้อทำได้ โดยการใช้รังสีแกมมา ปริมาณ 10–50 กิโลเกรย์ จากธาตุโคบอลต์-60 และรังสีจากเครื่องผลิตลำแสงอิเล็กตรอนพลังงานสูง เป็นตัวกลางในการทำให้ปราศจากเชื้อ เมื่อจุลินทรีย์สัมผัสกับรังสี จะทำให้เกิดการไอออนไนส์ เกิดภาวะกระตุ้นต่อส่วนประกอบต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้สารต่างๆ ภายในเซลล์ถูกทำลาย เช่น โปรตีนตกตะกอน เกิดการตัดโซ่ของ DNA RNA ของเซลล์จุลินทรีย์และตายในที่สุด การทำให้ปราศจากเชื้อวิธีนี้จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูงและต้องการหลีกเลี่ยงสารพิษตกค้างที่จะเกิดขึ้นจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ โดยปริมาณรังสีดูดกลืนสูงสุดที่ลดปริมาณจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค คือ 10 กิโลเกรย์ การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยรังสีมีประสิทธิภาพสูงกว่าการปลอดเชื้อด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การอบด้วยความร้อน เพราะรังสีสามารถทำให้ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์เกือบทุกชนิดปลอดเชื้อได้ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่าง สลับซับซ้อน และที่อยู่ในภาชนะบรรจุขั้นสุดท้ายเรียบร้อยแล้ว โดยวิธีนี้จะช่วยป้องกันการปนเปื้อน ที่เกิดจากการบรรจุหีบห่ออย่างได้ผล ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่นำมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยรังสีมี 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เวชภัณฑ์ เช่น ยาง พลาสติก เซลลูโลส แก้ว รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่

ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น เครื่องมือในห้องผ่าตัด ด้าย ไนล่อน เข็มเย็บแผล กระบอกฉีดยา ผ้าปิดแผล และเครื่องใช้พลาสติกในห้องปฏิบัติการ ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม เช่น ยา สารละลาย น้ำเกลือ รวมทั้งส่วนประกอบอื่นๆ ที่ใช้ผลิตยา เนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของร่างกายที่ใช้รักษาบาดแผลที่เกิดจากความร้อนหรือการปลูกถ่ายอวัยวะ เช่น กระดูก เยื่อหุ้มสมองและผิวหนัง (Munarin, F. และคณะ 2013)

การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองเป็นการกำจัดจุลินทรีย์ออกจากสารละลายโดยใช้แผ่นกรองเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนไม่เกิน 0.22 ไมครอน โดยจะใช้กับสารละลายที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการกรองแล้ว จะต้องบรรจุลงในภาชนะบรรจุที่ปราศจากเชื้อ และปิดผนึกภาชนะบรรจุด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งต้องควบคุมภาวะปลอดเชื้อทั้งในระหว่างการกรองและการบรรจุ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่นิยมทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง เช่น ยาปฏิชีวนะ วัคซีน ข้อควรระวัง คือ อาจมีการดูดซับสารบนตัวกรอง และหากใช้เวลาในการกรองนานเกินไป อาจทำให้เกิดการอุดตันและเกิดปัญหาการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Song, D. และคณะ 2009)

การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ก๊าซ ก๊าซที่นิยมใช้ คือ ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (EtO) เป็นก๊าซที่ติดไฟง่าย และหากสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศจะระเบิดได้ง่าย ดังนั้นการนำมาใช้จึงต้องผสมกับก๊าซเฉื่อย เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฟรีออน ตัวอย่างส่วนผสม เช่น ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ 20% ผสมกับคาร์บอนไดออกไซด์ 80% ก๊าซเอทิลีนออกไซด์12% ผสมกับฟรีออน 88% ก๊าซเอทิลีนออกไซด์มีสมบัติเป็นสารอัลคิเลติง (Alkylating agent) จึงเกิดปฏิกิริยาอัลคิเลชั่น (Alkylation) กับกลุ่มต่างๆ ซึ่งอยู่ในโปรตีนกรดนิวคลิอิกของเซลล์จุลินทรีย์ เช่น กลุ่มซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ไฮดรอกซิล (-OH) คาร์บอกซิล (-COOH) อะมิโน ($-NH_2$) ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้จุลินทรีย์ตาย การทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีนี้จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงนิยมใช้งานกับอุปกรณ์การแพทย์ชนิดต่างๆ เช่น กระบอกฉีดยา เข็มฉีดยา ผ้ากอซ สำลี ข้อเสียของวิธีนี้ คือ การเกิดสารตกค้าง เช่น เอทิลีนไกลคอล (Ethylene glycol) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างก๊าซเอทิลีนออกไซด์กับน้ำ เอทิลีนคลอไรด์ (Ethylene chloride) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างก๊าซเอทิลีนออกไซด์กับคลอไรด์ไอออน ผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีนี้จึงควรทิ้งไว้ระยะหนึ่งก่อนนำไปใช้ เพื่อให้ก๊าซและสารเคมีที่เป็นพิษระเหยออกไป นอกจากนี้ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ยังเป็นสารก่อมะเร็ง จึงจำเป็นต้องระมัดระวังในการใช้ (Mendes, G. C. C. และคณะ 2007) การเลือกวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ จะต้องเลือกให้เหมาะกับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดวิธีที่ใช้โดยไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพ มีประสิทธิภาพในการทำลาย

เชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความเป็นพิษที่เกิดขึ้น และในเชิงอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายด้วย

(Faraj, K. A. และคณะ 2011) ได้ทำการศึกษาผลของการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ การฉายรังสีเบตาและแกมมาบนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน สำหรับการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ โครงเลี้ยงเซลล์ถูกอบด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และปรับความชื้นสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังการทำให้ปราศจากเชื้อ โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาผึ่งด้วยอากาศร้อน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนการฉายรังสีเบตา โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกฉายด้วยรังสีเบตา ปริมาณ 15 หรือ 25 กิโลเกรย์ และการฉายรังสีแกมมา โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกฉายรังสีแกมมาที่ความเข้ม ปริมาณ 15 หรือ 25 กิโลเกรย์ จากโคบอลท์-60 และการฆ่าเชื้อโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเอทานอลร้อยละ 70 จำนวน 3 ครั้ง 1 ชั่วโมง และ 1 ครั้ง 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 5 ครั้ง 1 ชั่วโมง และ 1 ครั้ง 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ และก๊าซเอทิลีนออกไซด์ แถบโปรตีนของคอลลาเจนที่ปรากฏ ยังปรากฏแถบ γ, β, และ α ส่วนการฉายรังสีเบตาและแกมมา ปริมาณ 15 และ 25 กิโลเกรย์นั้น แถบที่ปรากฏจะมีลักษณะ Smear ทั้งแถบ ซึ่งเป็นลักษณะแถบของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทเพราะไม่หลงเหลือแถบของ γ, β, และ α เลย การทำให้ปราศจากเชื้อเป็นสิ่งสำคัญสำหรับงานวิจัยด้านวัสดุชีวการแพทย์ การฆ่าเชื้อด้วยแอทานอลนั้นเป็นการทำลายเชื้อโรคที่มีประสิทธิภาพต่ำ ไม่ได้ทำลายจุลชีพทั้งหมด ส่วนการฉายรังสีแกมมาและเบตา ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพเนื่องจากความร้อนทำใหห้คอลลาเจนกลายเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซท วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีต่างๆและสภาวะในการทำให้ปราศจากเชื้อของคอลลาเจนจากการศึกษาของ (Faraj, K. A. และคณะ 2011) และ (Geutjes, P. J. และคณะ 2010) สรุปดังแสดงในตารางที่ 2.6 งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ เนื่องจากไม่ทำลายโครงสร้าง Triple helices ของคอลลาเจน โดยการอบด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.6 สรุปวิธีการและสภาวะในการทำให้ปลอดเชื้อคอลลาเจน

วิธี	สภาวะของคอลลาเจน:การฆ่าเชื้อ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
EtO	เจล:บรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50-80 ที่ 35-45 °ซ เป็นเวลา 24 ชม.	ไม่ทำลายโครงสร้าง Triple helices	เกิดสารตกค้าง ควรทิ้งให้ก๊าซระเหย เกิดการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์	(Geutjes, P. J. และคณะ 2010)
	ฟองน้ำ:บรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ที่ 33 °ซ เป็นเวลา 16 ชม. และปรับความชื้นสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 80 ที่ 43 °ซ เป็นเวลา 72 ชม.			(Faraj, K. A. และคณะ 2011)
รังสีแกมมา	เจล:ปริมาณรังสี 20 กิโลเกรย์ จากโคบอลท์-60	ไม่มีรังสีตกค้างและไม่มีรังสีสะสมและเกิดการเชื่อมขวาง	เกิดความร้อนและทำลายโครงสร้าง Triple helices	(Geutjes, P. J. และคณะ 2010)
	ฟองน้ำ:ปริมาณรังสี 15 หรือ 25 กิโลเกรย์ จากโคบอลท์-60			(Faraj, K. A. และคณะ 2011)
รังสีเบตา	ฟองน้ำ:ปริมาณ 15 หรือ 25 กิโลเกรย์	ไม่มีรังสีตกค้างและไม่มีรังสีสะสมและเกิดการเชื่อขวาง	เกิดความร้อนและทำลายโครงสร้าง Triple helices	(Faraj, K. A. และคณะ 2011)
H_2O_2	เจล:ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 35 °ซ เป็นเวลา 30 นาที	ไม่ทำลายโครงสร้าง Triple helices	-	(Geutjes, P. J. และคณะ 2010)

2.2.7 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

<u>สิทธิบัตรในประเทศไทย:</u> การสกัดคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อสัตว์ชนิดต่างๆยังไม่มีรายงาน

<u>สิทธิบัตรในต่างประเทศ:</u>

สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา 4894441 ปี 1990

เจ้าของผลงาน Claudio Menicagli (Menicagli, C. 1990)

ชื่อสิทธิบัตร PROCESS FOR THE PREPARATION OF COLLAGEN AND OBTAINED PRODUCT

เอ็นร้อยหวายโคถูกนำไปสกัดคอลลาเจน โดยทำการแยกเอ็นร้อยหวายจากเท้าและแยกไขมันออกจากเอ็น จากนั้นนำเอ็นไปบดด้วยเครื่องบดและล้างเอ็นที่บดแล้วด้วยน้ำปราศจากประจุ 3 ครั้ง และตามด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนัก จำนวน 3 ครั้ง และล้างด้วยนำปราศจากประจุอีกครั้ง นำเอ็นที่บดแล้วใส่สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1-5 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนเอ็นต่อกรดเป็น 0.1:1 ถึง 0.01:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปั่นกวนเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส สารละลายที่สกัดได้นำไปกรองด้วยตะแกรงเบอร์ 50 เพื่อให้ได้ส่วนที่ใส โดยทิ้งส่วนที่ไม่ละลาย จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ 250-1,000 กรัม ในสารละลายที่กรองได้ คอลลาเจนจะตกตะกอนออกมาซึ่งมีลักษณะคล้ายเหนียวคล้ายยาง สีขาวขุ่น กรองเอาตะกอนคอลลาเจนด้วยตะแกรงเบอร์ 40 ล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากประจุ ตะกอนคอลลาเจนถูกนำไปละลายในกรดอะซิติก ความเข้ม 0.1-0.5 โมลาร์ สารละลายคอลลาเจนถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา 20080118947 A1 ปี 2013

เจ้าของผลงาน Ji-Chul Yu, Jae-Deog Jang, Cheong-Ho Chang, Sea-Bom Lee, Se-Geum Yeo และ Chang-Kwon Ko (Yu, J. C. และคณะ 2010)

ชื่อสิทธิบัตร METHOD OF SEPARATING COLLAGEN FROM THE VARIOUS ANIMAL TISSUES FOR PRODUCING COLLAGEN SOLUTION AND SOLUTION PRODUCT USING THE SAME

เนื้อเยื่อสัตว์หลายๆชนิดถูกนำมาสกัดคอลลาเจน สำหรับผลิตสารละลายคอลลาเจนและนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยทำการสกัดคอลลาเจนจากกระดูก กระดูกอ่อน หนัง เอ็นและเอ็นยึดข้อ (ligament) ของสุกร เริ่มจากนำเนื้อเยื่อดังที่กล่าวมา ล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ เอทานอลและอะซิโตน จากนั้นตัดเป็นชั้นเล็กๆขนาด 1-500 ไมครอน แล้วล้างด้วยเอทานอลและน้ำปราศจากประจุอีกครั้ง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้ไปแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 10-100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเปปซินใส่ลงไปในสารละลายด้วยอัตราส่วนเปปซินต่อเนื้อเยื่อ 1:10 ถึง 1:50 (ก่อนนำเปปซินไปใช้งาน เปปซินถูกละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) ปั่นกวนเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้น

สารละลายที่สกัดได้นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 12,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกส่วนที่ใสและนำส่วนนี้ไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5-0.8 โมลาร์ โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง สารละลายที่สกัดนี้นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 12,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทิ้งตะกอนและนำส่วนใสไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.6 โมลาร์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง ชั่วโมง สารละลายที่สกัดนี้นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 12,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทิ้งตะกอนและนำส่วนใสไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.6 โมลาร์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง ชั่วโมง สารละลายที่สกัดนี้นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 12,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทิ้งส่วนใสและเก็บตะกอนคอลลาเจน ตะกอนคอลลาเจนนี้นำไปล้างด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 95% จำนวน 1-2 ครั้ง จากนั้นล้างคอลลาเจนด้วยน้ำปราศจากประจุ และนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อให้คอลลาเจนตกตะกอน แล้วนำคอลลาเจนนี้ไปละลายให้ได้ความเข้มข้น 1-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรดอะซิติกด้วยความเข้มข้นเจือจางหรือ PBS สารละลายคอลลาเจนถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าปรากฏแถบโปรตีนของ $\alpha1$ และ $\alpha2$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 140 และ 130 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดยแถบ $\alpha1$ มีความเข้มเป็นสองเท่าของ $\alpha2$ ซึ่งยืนยันได้ว่าเป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1

สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา 8512756 B2 ปี 2013
เจ้าของผลงาน Sherry L. Voytlk-Harbin, Seth Kreger, Brett Bell และ Jennifer Bailey (Voytik-Harbin, S.L. และคณะ 2013)
ชื่อสิทธิบัตร COLLAGEN PREPARATION AND METHOD OF ISOLATION

การสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร เริ่มจากนำหนังสุกรล้างด้วยน้ำปราศจากประจุและตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1 ตารางเซนติเมตร นำหนังที่ตัดแล้วไปแช่ในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้ครกบด นำเอ็นที่บดแล้วมากำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วนหนังต่อสารละลายเป็น 0.125:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารที่สกัดเพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่

คอลลาเจนมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยทิ้งส่วนใสและนำหนังสุกรที่ได้มาทำซ้ำในขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง จากนั้นนำหนังสุกรที่ได้ไปล้างด้วยน้ำปราศจากประจุเย็น 2 ครั้ง และนำหนังสุกรที่บดแล้วใส่ในสารละลายโซเดียมซิเตรท ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วนหนังต่อสารละลายเป็น 0.125:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,750 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยเก็บส่วนใสไว้และนำไปไดอะไลซ์ โดยใช้ถุงไดอะไลซ์ที่มี MWCO 12,000-14,000 ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการไดอะไลซ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จะได้ตะกอนคอลลาเจนและนำไปล้างด้วยน้ำปราศจากประจุและนาสารละลายคอลลาเจนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนการล้าง 2 ครั้ง ตะกอนคอลลาเจนถูกนำไปละลายในกรดอะซิติก ความเข้ม 0.1 โมลาร์ สารละลายคอลลาเจนถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

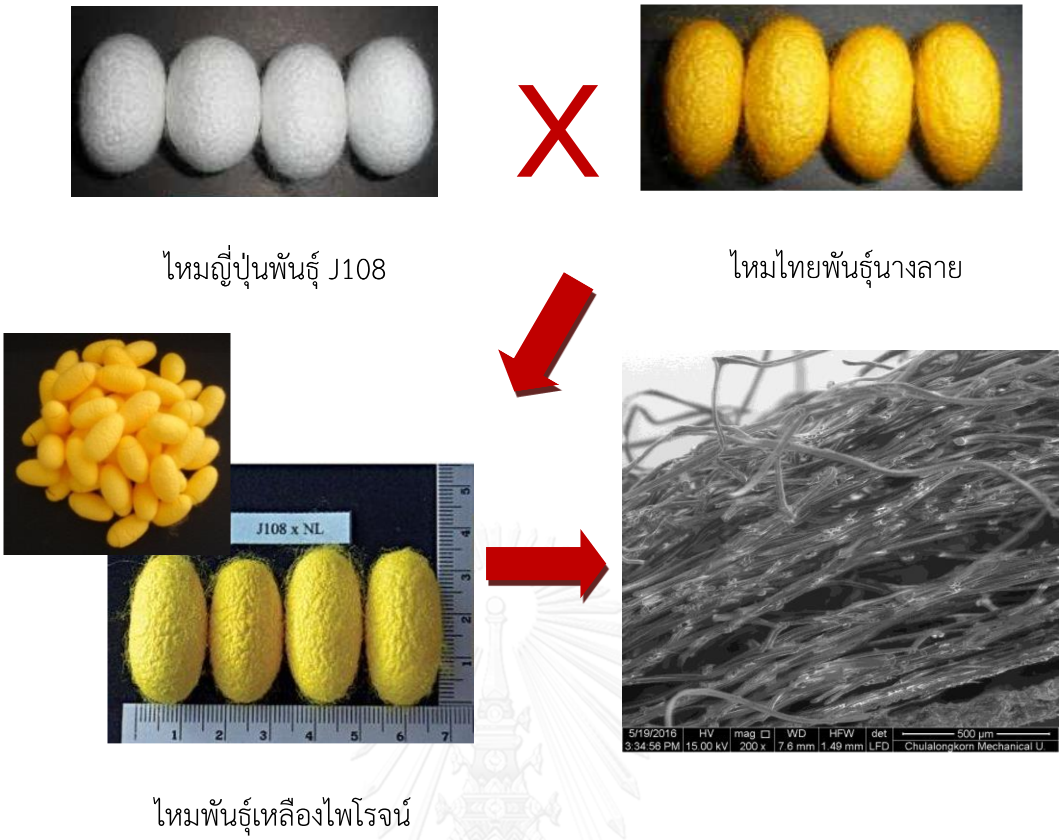
2.3 ไฟโบรอินไหมไทย (Thai Silk Fibroin)

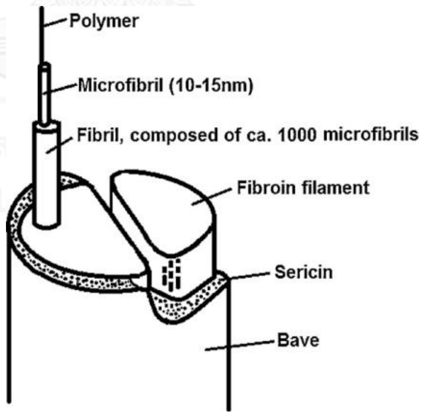
การค้นพบประโยชน์ของไหมสันนิษฐานว่าจีนเป็นชาติแรกที่ค้นพบการสาวไหมออกจากรังเมื่อประมาณ 4,700 ปีมาแล้ว ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติของพอลิเอไมด์ที่พ่นออกมาจากหนอนไหมระยะโตเต็มวัยเพื่อห่อหุ้มตัวและป้องกันศัตรูในขณะที่หนอนไหมลอกคราบกลายเป็นดักแด้และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เส้นใยไหมถูกสร้างจากแมลงในอันดับ (Order) Lepidoptera วงศ์ (Family) Bombycidae หรือไหมบ้าน (Mulberry silk) และ Saturniidae หรือไหมป่า (Non-mulberry หรือ wild silk) ไหมบ้านกินใบหม่อนเป็นอาหาร ส่วนไหมป่ากินใบพืชชนิดอื่น เช่น ใบละหุ่งหรือใบมันสำปะหลัง ไหมเป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Completely Metamorphosis Insect) วงจรชีวิตของไหมแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ไข่ (Silkworm egg) ตัวหนอน (Silkworm) ดักแด้ (Silk Pupa) และผีเสื้อไหม (Silk moth) มีเพียงระยะตัวหนอนเท่านั้นที่กินอาหารและนำสารอาหารที่มีอยู่ในใบหม่อนไปช่วยเสริมสร้างการเจริญเติบโต โดยผ่านการย่อยและการดูดซึมในปริมาณ 1 ใน 3 ของสารอาหารทั้งหมด ครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่ดูดซึมจะถูกนำไปใช้ผลิตเป็นเส้นใย ไหมมีอยู่หลายชนิดด้วยกันขึ้นอยู่กับถิ่นกำเนิดและสรีระของไหม เช่น ไหมในเขตร้อน ไหมในเขตอบอุ่น

ไหมเขตหนาว สำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนจะมีพันธุ์ไหมที่ฟักออกตลอดปี (Polyvoltine) พันธุ์ไหมไทยจะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากพันธุ์ไหมในเขตอบอุ่น ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน เป็นพันธุ์ดั้งเดิมชนิดฟักไข่ออกได้ทั้งปี, ไหมพันธุ์ไทยลูกผสม เป็นไหมชนิด Polyvoltine into bivotine ชนิดฟักไข่ออกได้ทั้งปีและไหมพันธุ์ลูกผสม เป็นไหมชนิด Bivotine ฟักไข่ออกปีละ 2 ครั้ง

เส้นใยไหมนั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ต่อเป็นสายโซ่ยาว (Long chain) ซึ่งมีความแตกต่างกันในองค์ประกอบ โครงสร้างและคุณสมบัติตามแหล่งที่พบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 ไมโครเมตร เส้นใยไหมจากหนอนไหมประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วน คือ โปรตีนไฟโบรอิน (fibroin, $C_{15}H_{26}N_6O_6$) 2 เส้น คิดเป็นน้ำหนักประมาณร้อยละ 70-80 โดยน้ำหนัก และกาวไหมหรือเซริซิน (sericin, $C_{15}H_{23}N_5O_8$) ประมาณร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนัก ทำหน้าที่เป็นกาวไหมเคลือบเส้นใยไฟโบรอินสองเส้นให้อยู่ติดกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอื่นๆ ได้แก่ แว็กซ์ (Wax matter) ประมาณร้อยละ 0.4-0.8 โดยน้ำหนัก คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) ประมาณร้อยละ 1.2-1.6 โดยน้ำหนัก อนินทรียวัตถุ (Inorganic matter) ประมาณร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนัก และสีที่ปรากฏตามธรรมชาติ (Pigment) ประมาณร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก (Mondal, M. และคณะ 2007)

ไฟโบรอินสามารถขึ้นรูปได้หลากหลาย เช่น เจล ผง เส้นใย และเยื่อหุ้ม (Membranes) ไฟโบรอินได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางเพื่อใช้สำหรับทำเครื่องสำอางและวัตถุเจือปนอาหาร และได้รับการค้นพบในไม่นานมานี้ว่ามีศักยภาพในด้านวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์และวิศวกรรม เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวภาพที่โดดเด่น ไฟโบรอินได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ การย่อยสลายทางชีวภาพที่ดีและเกิดการอักเสบน้อย ทำให้ไฟโบรอินถูกนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มีการรายงานว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินถูกนำไปเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใย (Fibroblasts) เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblasts) และเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะ การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในลักษณะที่คล้ายกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจน (Kundu, B. และคณะ 2013)





องค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ในเส้นใยไหม

รูปที่ 2.4 ไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ (J108 x นางลาย) และโครงสร้างของเส้นใยไหม

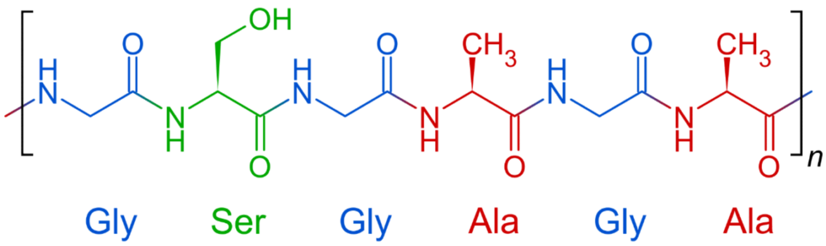
ที่มา : กรมหม่อนไหม และ (Shang, S. และคณะ 2013)

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตไหมไทยมีคุณภาพแต่ราคาถูก เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งมีการเลี้ยงไหมหลากหลายสายพันธุ์มาเป็นเวลายาวนานโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียง

เหนือ ไหมพันธุ์ไทยพื้นเมืองส่วนใหญ่มีชื่อขึ้นต้นด้วยคำว่า “นาง” เนื่องจากเกษตรกรเรียกชื่อตามผู้ที่เลี้ยงมาอย่างต่อเนื่องจนได้ผลผลิตดีและมีคุณสมบัติดีเด่นเฉพาะตัว เกษตรจึงให้เกียรติแก่เจ้าของพันธุ์โดยการเรียกชื่อเจ้าของด้วยคำว่า “นาง” นำหน้าและต่อด้วยชื่อผู้เลี้ยงมาตั้งเป็นชื่อพันธุ์ไหม เช่น นางเหลือง นางเขียว นางลิ่ว นางน้อย เป็นต้น ต่อมาใช้เรียกชื่อตามสถานที่ หมู่บ้าน ตำบล อำเภอ จังหวัดที่นำมา เช่น หนองแก้ว เขียวสกล เป็นต้น ไหมไทยจัดอยู่ในไหมเลี้ยงสายพันธุ์ *Bombyx mori* ซึ่งมีความแตกต่างจากไหม *Bombyx mori* อื่นๆ คือ รังไหมไทยจะมีกาวไหม (Sericin) มากกว่าไหมเลี้ยงชนิดอื่น รังมีลักษณะวงรีสีเหลืองเข้ม ขนาดเล็กเรียว มีปุยมากประมาณร้อยละ 20 สำหรับพันธุ์ไหมไทยลูกผสมเป็นการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อให้ได้รังไหมที่มีคุณภาพและมีความเหมาะสมที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรนำไปเลี้ยง ซึ่งเป็นการผสมระหว่างไหมสายพันธุ์ไทยแท้กับไหมพันธุ์ต่างประเทศ

ปี 2553 กรมหม่อนไหม โดยศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ สระบุรี ได้ดำเนินการเลี้ยงอนุรักษ์และพัฒนาพันธุ์ไหมไทยลูกผสมจากไหมพันธุ์นางลายผสมกับไหมญี่ปุ่นพันธุ์ J108 รังมีลักษณะกลมรีสีขาว และตั้งชื่อเพื่อเป็นเกียรติแก่อธิบดีกรมหม่อนไหมคนแรก คือ นายไพโรจน์ ลิ้มจำรูญ ได้เป็นไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ รังมีลักษณะกลมรีสีเหลืองอ่อน เปลือกรังหนา มีน้ำหนักรังสดเฉลี่ย 1.37 กรัมต่อรัง ยาวประมาณ 3.5 เซนติเมตรและกว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร น้ำหนักรังเปลือก 23.84 เซนติกรัม และเปอร์เซ็นต์เปลือกรัง 17.47% รังไหมสาวง่าย เปอร์เซ็นต์สาวง่าย 82.00% ขนาดเส้นไหม 2.21 ดีเนียร์ เส้นใยยาวประมาณ 745.27 เมตรต่อรัง ยาวกว่าพันธุ์มาตรฐานซึ่งยาวประมาณ 500-600 เมตร รวมทั้งยาวกว่าพันธุ์ไทยพื้นเมืองที่ยาวเพียง 250-350 เมตร กรมหม่อนไหมได้ดำเนินการทดสอบและผลิตไข่ไหมให้เกษตรกรเลี้ยงเพื่อการทดสอบในพื้นที่จังหวัดชัยภูมิ นครราชสีมา ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ศรีสะเกษ ฉะเชิงเทรา อุทัยธานี และจันทบุรี ภายใต้กิจกรรมอนุรักษ์และขยายพันธุ์หม่อนไหม โดยผลการทดสอบเลี้ยงไหมจากเกษตรกรพบว่าได้ผลในระดับที่น่าพอใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรในจังหวัดชัยภูมิพึงพอใจมากต่อการเลี้ยงไหม สีเส้นไหมและปริมาณเส้นไหมที่ได้รับ เนื่องจากหนอนไหมเลี้ยงง่าย แข็งแรง ให้ผลผลิตรังไหมที่ดีและมีคุณภาพ มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง ฝนตกชุก ความชื้นสูงได้ดีเหมาะกับสภาพอากาศในประเทศไทย จึงเป็นพันธุ์ไหมที่มีความเหมาะสมที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงต่อไป (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) จากการปรับปรุงสายพันธุ์ของไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ซึ่งเพิ่งค้นพบไม่นาน ทำให้ยังไม่มีรายงานลักษณะสมบัติของไหมพันธุ์นี้ในงานวิจัย

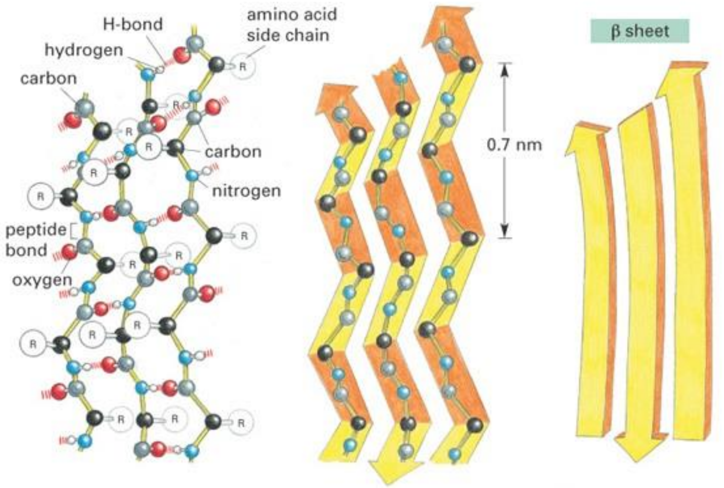
ไหมมีข้อดีที่สำคัญหลายด้านเมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะได้มาจากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เป็นสายพันธุ์ (Specie) เดียวกัน (Allogeneic) หรือจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ (Xenogeneic) ด้วยเหตุจากความเสี่ยงในการติดเชื้อสำหรับวัสดุเหล่านั้นมีความเป็นไปได้สูง กระบวนการในการผลิตทำให้วัสดุดังกล่าวยังมีราคาแพง เนื่องจากมีความเข้มงวดในกระบวนการแยกโปรตีนและการทำให้บริสุทธิ์ ในขณะที่ไหมสามารถถักทอเส้นใยและผลิตเส้นใยจำนวนมากเป็นประจำในทุกปี จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ก่อนนำเส้นใยไหมไปใช้งานต้องทำการกำจัดกาวไหมด้วยด่างหรือเอนไซม์ เนื่องจากเซริซินซึ่งเป็นสาเหตุหลักของปัญหาความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) และปฏิกิริยาการแพ้ชนิดที่ 1 (Type I allergic reaction) ของร่างกายที่มีต่อไหม (Altman, G. H. และคณะ 2003)



รูปที่ 2. 5 โครงสร้างการเรียงลำดับกรดอะมิโนในไฟโบรอินไหม
(ที่มา :http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Silk_fibroin_primary_structure.svg)

ไฟโบรอินไหม มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 391.367 กิโลดาลตัน (Datta, A. และคณะ 2001) ไฟโบรอินไหมประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ heavy chain (H) light chain (L) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ขนาด 25 กิโลดาลตัน ชื่อว่า P25 โดย H-fibroin L-fibroin และ P25 ประกอบกันขึ้น โดยมีอัตราส่วน 6:6:1 ในไหมบ้าน (Kundu, B. และคณะ 2013) โดย heavy chain (H) เป็นสายโซ่โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5263 ตัว ได้แก่ ไกลซีน (Glycine, Gly) ประมาณร้อยละ 43, อะลานีน (Alanine, Ala) ประมาณร้อยละ 30, ซีรีน (Serine, Ser) ประมาณร้อยละ 12 และกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ โดยมีการเชื่อมต่อด้วยพันธะไดซัลไฟท์ (Disulfide bond) ระหว่างกรดอะมิโนซีสเตอีนตำแหน่งที่ 20 ด้านหมู่คาร์บอกซิล หรือ Cys-c20 (twentieth residue from the carboxyl terminus) ของ heavy chain (H) กับกรดอะมิโนซีสเตอีนตำแหน่งที่ 172 หรือ Cys-172 ของ light chain (L) ซึ่ง light chain (L) นั้นมีน้ำหนักโมเลกุล

ประมาณ 25 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 262 ตัว ได้แก่ อะลานีน (Alanine, Ala) ประมาณร้อยละ 14, ซีรีน (Serine, Ser) ประมาณร้อยละ 10, ไกลซีน (Glycine, Gly) ประมาณร้อยละ 9 และกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ (Mondal, M. และคณะ 2007) บริเวณปลายด้านหนึ่งจะมีหมู่คาร์บอกซิล เรียกว่า ปลายซี (C terminal) ส่วน P25 ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-10 โมเลกุล โดยพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลแมนโนส (Mannose) จะเชื่อมอยู่กับหมู่อะมิโนแอสปาราจีน (Asparagine, Asn) ภายในพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่งและจะเชื่อมต่อกับ H-L complex ด้วยโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interraction) ส่วนเซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีขั้วในอัตราส่วนที่สูง นอกจากไกลซีน อะลานีนและซีรีนแล้ว เซริซินยังประกอบด้วย กรดกลูตามิก (Glutamate, Glu) ทรีโอนีน (Threonine, Thr) และไทโรซีน (Tyrosine, Tyr) กรดอะมิโนเหล่านี้จะก่อเป็นบริเวณอสัณฐาน (Amorphous) ไฟโบรอินของเส้นใยไหมนั้นเกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่นของ α-amino acid กลายเป็นพันธะเปปไทด์ ซึ่งเกิดจากการเรียงลำดับของกรดอะมิโนเป็นหน่วยซ้ำๆกัน คือ Gly–Ser–Gly– $(Ala)_2$–Gly–[Ser–Gly–$(Ala–Gly)_n]_8$–Tyr (เมื่อ n เป็น 2 เสมอ) (Mhuka, V. และคณะ 2013) ดังแสดงรูปที่ 2.5 และมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน 2 ตัวและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ 1 โมเลกุล ทำให้มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบแผ่นพลีทหรือโครงสร้างแบบเบตาชีท (β-pleated sheet) ชนิดที่สายเปปไทด์สวนทางกัน (Anti-parallel) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยแผ่นพลีทไฟโบรอินไหมแต่ละแผ่นจะซ้อนทับกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals forces) ระหว่างแผ่นเพื่อเสริมความแข็งแรงอีกทางหนึ่งด้วย ทำให้เส้นใยไฟโบรอินไหมมีความแข็งแรงสูงมากและแต่ละสายโซ่ของเปปไทด์มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สูง โครงสร้างเส้นไหมแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ แบบเบตาชีท (β-sheet) เกลียวแอลฟา (α-helical) จะอยู่ในส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline) และโครงสร้างเกลียวสุ่ม (Random coil) จะอยู่ในส่วนที่เป็นอสัณฐาน โครงสร้างอสัณฐานนี้จะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ด้านกายภาพโดยรวมของเส้นใยไหมและโครงสร้างที่เป็นผลึกเป็นส่วนที่ทำให้เส้นใยไหมมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่น (Altman, G. H. และคณะ 2003, Sashina, E. S. และคณะ 2006)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างเป็นแผ่นพลีทหรือโครงสร้างแบบเบตาชีท (β - pleated sheet)
(ที่มา: http://www.ehinger.nu/undervisning/index.php)

ไฟโบรอินไหมประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 18 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน (Glycine, Gly) ประมาณร้อยละ 43, อะลานีน (Alanine, Ala) ประมาณร้อยละ 30, ซีรีน (Serine, Ser) ประมาณร้อยละ 12, ไทโรซีน (Tyrosine, try) ประมาณร้อยละ 5 และกรดอะมิโนชนิดอื่นๆประมาณร้อยละ 10 (Mhuka, V. และคณะ 2013) โดยร้อยละองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินของไหมที่ได้มาจากไหมสายพันธุ์ต่างๆดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ร้อยละองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินของไหมสายพันธุ์ต่างๆ (Mhuka, V. และคณะ 2013, Kaewprasit, K. และคณะ 2014)

ชนิดกรดอะมิโน	**พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 *(Bombyx mori)***	**พันธุ์ญี่ปุ่น *(Antheraea yamanai)***	**พันธุ์จีน *(Antheraea pernyi)***	**พันธุ์แอฟริกา *Gonometa postica***	**พันธุ์บอตสวานา *Gonometa rufobrunnea***	**พันธุ์ซิมบับเว *Gonometa rufobrunnea***
กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว						
Alanine, Ala	34.29	31.26	29.39	28.14	26.02	28.36
Glycine, Gly	38.32	33.00	35.76	36.89	33.15	35.12
Valine, Val	1.15	1.67	1.53	1.60	1.42	1.61
Leucine, Leu	0.27	0.38	0.43	1.47	1.24	1.42
Isoleucine, Ile	0.20	0.31	0.32	0.82	0.71	0.81
Methionine, Met	0.08	0.13	0.10	0.31	0.30	0.32
Proline, Pro	0.42	0.64	0.64	2.54	2.30	2.38
Tryptophan, Trp	0.21	0.33	0.45	-	-	-
Phenylalanine, Phe	0.98	1.69	1.39	0.77	0.65	0.68
กรดอะมิโนที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ						
Serine, Ser	13.42	16.87	16.30	12.10	13.10	13.36
Threonine, Thr	0.80	1.08	1.08	0.87	0.66	0.77
Tyrosine, Tyr	5.75	7.66	7.16	8.29	9.17	10.88
Cysteine, Cys	0.00	0.00	0.00	0.08	0.08	0.11
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุบวก						
Lysine, Lys	0.20	0.26	0.30	1.06	0.92	1.00
Arginine, Arg	0.30	0.31	0.44	6.54	5.91	5.35
Histidine, His	0.83	0.81	1.02	0.23	0.25	0.27
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุลบ						
Aspartate, Asp	1.63	2.08	2.18	4.22	2.96	2.55
Glutamate, Glu	1.15	1.52	1.51	1.16	1.15	0.93

เซริซิน (Sericin) เป็นโปรตีนที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilic protein) เคลือบเส้นใยไฟโบรอิน น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20-310 กิโลดาลตัน เส้นใยไหมมีเซริซินประมาณร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนัก เซริซินมีสมบัติในการละลายได้ในน้ำร้อน สารละลายกรดหรือเบส หรือเอนไซม์ย่อยโปรตีน ในเส้นใยไหมแบ่งเป็นสองส่วน คือ แอลฟาเซริซิน (α-sericin) และเบตาเซริซิน (β-sericin) โดยแอลฟาเซริซินจะอยู่ในผิวชั้นนอก ส่วนเบตาเซริซินจะอยู่ด้านใน แอลฟาเซริซินมีสมบัติในการละลายในน้ำร้อนได้ดีกว่าเบตาเซริซิน นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งเซริซินตามชั้นผิวของเซริซิน โดยแบ่งจากผิวชั้นนอกเข้าด้านใน ได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ เซริซิน I คือ เซริซินชั้นนอก สามารถละลายออกง่ายสุดด้วยน้ำร้อน เซริซิน II คือ เซริซินชั้นกลาง สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่างอ่อน และเซริซิน III คือ เซริซินชั้นใน เป็นเซริซินส่วนที่ยึดกับแกนเส้นไหมไฟโบรอิน สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่างอ่อน เซเรซินทั้ง 3 ชนิด มีอัตราส่วนการละลายประมาณ 40:40:20 โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสารละลาย (Mondal, M. และคณะ 2007)

การลอกกาวไหมเป็นกระบวนการแรกที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อกำจัดกาวไหม เนื่องจากเซริซินเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไม่สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ ทำให้เกิดการแพ้ตามมา นอกจากนี้ยังเป็นการกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่อาจมีอยู่ในเส้นใยไหม เช่น สารหล่อลื่นหรือสารนุ่มที่เติมลงไปในขั้นตอนการผลิตเป็นเส้นด้าย การทอหรือถักผ้า หรือกำจัดฝุ่นละออง สิ่งสกปรก น้ำมันหรือสีที่อาจเปื้อนติดมาในระหว่างกระบวนการผลิตเพื่อทำให้เส้นใยไหมเกิดความเงามันและนุ่มนวล การลอกกาวไหมหรือ silk degumming คือ การกำจัดสิ่งสกปรกที่มีอยู่ในเส้นใย หลักการลอกกาวไหม คือ การไฮโดรไลซ์กาวไหมหรือทำลายพันธะเปปไทด์ของกาวไหมให้เป็นโมเลกุลเล็กๆที่ละลายน้ำได้ เช่น กรดอะมิโนและโอลิโกเมอร์ของกรดอะมิโน การไฮโดรไลซ์กาวไหมทำได้หลายวิธี เช่น การใช้กรด ด่าง เอนไซม์หรือแม้กระทั่งการใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงภายใต้ความดัน

2.3.1 สมบัติของเส้นใยไฟโบรอินไหม

เส้นใยไฟโบรอินไหมเป็นเส้นใยธรรมชาติที่มีลักษณะทางกายภาพดังแสดงตารางที่ 2.8 กระบวนการเตรียมไฟโบรอินไหมเริ่มจากการกำจัดกาวไหมเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในเส้นใยไหม จากนั้นนำไฟโบรอินไหมที่ได้มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม แต่โครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินทั้งแบบเกลียวแอลฟาและเบตาชีทมีพันธะไฮโดรเจนเป็นจำนวนมาก เส้นใยไฟโบรอินไหมจึงไม่สามารถละลายน้ำ การเตรียมสารละลายไฟโบรอินต้องใช้ตัวทำละลายที่สามารถทำลายพันธะ

ไฮโดรเจนภายในโครงสร้างซึ่งตัวทำละลายมีหลายชนิดทั้งตัวทำละลายเกลืออนินทรีย์ในน้ำ (Aqueous-salt) ตัวทำละลายเกลืออนินทรีย์ในน้ำผสมตัวทำละลายอินทรีย์ (Aqueous-salt-organic) และตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ในสภาวะที่แตกต่างและเหมาะสม การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) กรดฟอร์มิก (Formic acid) เฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (Hexafluoroisopropanol;HFIP) มีความเหมาะสมน้อยเนื่องจากมีความสามารถในการทำละลายไฟโบรอินต่ำและเป็นสารกัดกร่อน การเตรียมไฟโบรอินไหมด้วยตัวทำละลายเกลืออนินทรีย์ในน้ำความเข้มข้นสูง เช่น แคลเซียมไนเตรต (Calcium nitrate) ลิเธียมโบรไมด์ (Lithiumbromide) ลิเธียมไธโอไซยาเนต (Lithium thiocyanate) แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) และแคลเซียมคลอไรด์-เอทานอล (Calcium chloride-ethanol) เป็นต้น (Wadbua, P. และคณะ 2010) โดยตัวทำละลายลิเทียมโบรไมด์นั้นมีข้อดีที่สามารถเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมให้มีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และยังทำให้การละลายน้ำของไฟโบรอินที่เตรียมได้มีความเสถียรต่อตัวทำละลายสูง ไอน้ำและออกซิเจนสามารถผ่านได้ มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ภายในร่างกายจะสามารถย่อยไฟโบรอินไหมได้ตามกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษกับเซลล์และปัญหาในกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย มีความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตเมื่อนำไปปลูกถ่ายในร่างกาย โดยมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่ำ ไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านจากเซลล์อันเป็นสาเหตุของการอักเสบ นอกจากนี้เส้นใยไฟโบรอินไหมยังมีความแข็งแรงสูงและสามารถยืดหยุ่นได้ดี พบว่าเส้นใยมีความสามารถในการทนต่อแรงดึงได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุอื่นๆ แต่น้อยกว่าเส้นใยแมงมุมและเส้นใยเคฟลาร์ สำหรับความสามารถในการทนต่อแรงกดนั้นเส้นใยไฟโบรอินไหมสามารถทนแรงกดได้ดีกว่าวัสดุทุกชนิดรองลงมาจากกระดูกเท่านั้น โดยสมบัติเชิงกลของเส้นใยไฟโบรอินไหมเปรียบเทียบกับชีววัสดุอื่นๆ แสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.8 สรุปลักษณะทางกายภาพของไฟโบรอินไหม (Zhou, C.Z. และคณะ 2000, Kaewprasit, K. และคณะ 2014)

น้ำหนักโมเลกุล	391.367 กิโลดาลตัน
การดูดกลืนแสง	180 - 400 นาโนเมตร
อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว	136-144 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิการเสียสภาพ	165 องศาเซลเซียส
ค่าศักย์เซต้า (พีเอช 7.4)	-3.88 มิลลิโวลต์
ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์ม	58.7 องศา

ตารางที่ 2.9 การเปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่างเส้นใยไฟโบรอินไหมกับชีววัสดุอื่นๆ (Altman, G. H. และคณะ 2003, Ude, A. U. และคณะ 2014)

Material	**Ultimate Tensile Strength (MPa)**	**Modulus (GPa)**
Bombyx mori silk (with sericin) จากสเปน	500	5-12
Bombyx mori silk (without sericin) จากสปน	610-690	15-17
Bombyx mori silk	650–750	16
N. clavipes silk	875-972	11-13
Collagen	0.9-7.4	0.0018-0.046
Collagen X-linked	47-72	0.4-0.8
Polylactic Acid (PLA)	28-50	1.2-3.0
Tendon (comprised of mainlycollagen)	150	1.5
Bone	160	20
Kevlar49	3600–4100	131
Synthetic Rubber	50	0.001
Cotton	287–597	5.5–12.5
Sisal	155–635	9.2–22.0
Coir	175	4.0–6.0
Jute	393–773	26.5

Kaewprasit, K.และคณะ (2014) ได้ทำการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของไฟโบรอินจากไหมบ้าน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) สายพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และสายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ FTIR พบว่า ไฟโบรอินของไหมทั้ง 3 สายพันธุ์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันและไม่พบความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้สมบัติทางความร้อนและค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินพบว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่าต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ NN แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ K8 เมื่อพิจารณาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอินพบว่าสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีค่าผลรวมร้อยละโดยโมลของกรดอะมิโนกลุ่มที่มีความชอบน้ำมากกว่าสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ NN ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีความชอบน้ำมากกว่าสายพันธุ์ NN อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาการยึดเกาะการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนฟิล์มไฟโบรอินให้ผลสอดคล้องกัน คือ ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้ดีกว่าฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอินพบแนวโน้มว่าปริมาณเอนไซม์ ALP และปริมาณแคลเซียมที่สะสมบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีสมบัติความชอบน้ำมากกว่าสายพันธุ์ NN และ K8 ดังนั้นไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการยึดเกาะและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8

Chamchongkaset, J. และคณะ (2008) ได้พัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมพันธุ์ไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โครงเลี้ยงเซลล์ถูกผลิตด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก แล้วนำมาคอนจูเกตด้วยเจลาตินชนิดเอ เพื่อช่วยเพิ่มสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจูเกตเจลาตินมีการเชื่อมต่อของโครงสร้างที่แข็งแรง โดยดูจากค่ามอดูลัสของแรงกดซึ่งมีค่าสูงขึ้น 93% และยังช่วยส่งเสริมการยึดเกาะการเจริญเติบโตของเซลล์ Mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

Vachiraroj, N. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์จากชีววัสดุต่างๆ ได้แก่ ไฮดรอกซีแอปาไทต์/ไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย ไฮดรอกซีแอปาไทต์/เจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย และไฮดรอกซีแอปาไทต์/ไคโตซาน นำไปเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์กระดูก Mouse preosteoblast cell line (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (rat bone marrow-derivedmesen chymal stem cells) พบว่าในเวลา 5 วัน ฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทยนั้น เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด รองลงมาคือฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไฮดรอกซีแอปาไทต์/เจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย การเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกโดยการวิเคราะห์จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) และปริมาณการสะสมของแคลเซียม พบว่า ในเวลา 29 วัน ฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไฮดรอกซีแอปาไทต์/เจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทยให้ค่าสูงสุดทั้งสองค่า

Okhawilai, M. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหม/เจลาตินโดยผ่านกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสาร ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ความต่างศักย์ทางไฟฟ้า (15–25 กิโลโวลต์) และอัตราส่วนไฟโบรอินไหม/เจลาติน (10/90 – 50/50) พบว่าเมื่อความต่างศักย์ทางไฟฟ้าเพิ่มขึ้นทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยลดลงและอัตราส่วนไฟโบรอินไหมน้อยกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยลดลง มีการกระจายตัวของเส้นใยอยู่ในช่วงที่แคบ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมมากขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยจะเพิ่มขึ้น แล้วนำแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหม/เจลาตินที่อัตราส่วน 50/50 30/70 และ 10/90 มาทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าแผ่นเส้นใย 10/90 มีการย่อยสลายทางชีวภาพที่ค่อนข้างเร็ว แผ่นเส้นใย 50/50 มีการย่อยสลายทางชีวภาพช้าที่สุด เนื่องจากมีปริมาณของไฟโบรอินไหมมากเมื่อนำมาทดสอบการควบคุมการปลดปล่อยสาร โดยใช้สารที่มีประจุต่างกัน 2 ชนิด คือ Azo-casein ที่มีประจุลบและ Methylene blue ที่มีประจุบวก พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง แผ่นเส้นใยที่ผลิตได้สามารถควบคุมการปลดปล่อย Azo-casein โดยมีอัตราการปลดปล่อยที่เร็วเนื่องจากมีประจุลบเหมือนกับแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหม/เจลาติน จึงเกิดแรงผลักกันทำให้มีการปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว ส่วน Methylene blue จะถูกดูดซับบนแผ่นเส้นใยเนื่องจากมีประจุตรงข้ามกับแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหม/เจลาตินและถูกปลดปล่อยตามอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใยอย่างช้าๆ

Tungtasana, H. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO 10993 Part 6 บนโครงเลี้ยงเซลล์จากชีววัสดุ 3 ชนิด ได้แก่ ไฟโบรอินไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เจลาตินและไฮดรอกซีแอปาไทต์ โดยขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอิน ไฟโบรอิน/เจลาติน ไฟโบรอิน/ไฮดรอกซีแอปาไทต์ ไฟโบรอิน/เจลาติน/ไฮดรอกซีแอปาไทต์ ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/ไฮดรอกซีแอปาไทต์ มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการได้ช้าที่สุด เนื่องจากมีการเชื่อมขวางทางเคมี (EDC/NHS) และการเชื่อมขวางทางความร้อน ส่วนการย่อยสลายทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินทุกชนิดมีการย่อยสลายทางชีวภาพในสัตว์ทดลองต่ำ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษในหนู พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO10993 Part 6

Jetbumpenkul, P. และคณะ (2012) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินในอัตราส่วนไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินเท่ากับ 0/100, 20/80,40/60, 50/50, 60/40, 80/20 และ 100/0 พบว่าสารละลายไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินในอัตราส่วน 50/50 มีค่าศักย์เซต้าใกล้เคียงศูนย์ทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 5.6 และพีเอช 7.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนผสมดังกล่าวก่อให้เกิดความสมดุลของประจุในสารละลายของไฟโบรอินกับเจลาติน นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินในอัตราส่วน 40/60, 50/50 และ 60/40 มีค่าความต้านทานแรงกดสูงทั้งสภาวะแห้งและเปียก เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนอื่นและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินในอัตราส่วน 50/50 มีค่าความต้านทานแรงกดสูงสุดในสภาวะเปียก สำหรับการทดสอบทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (rat bone marrow-derivedmesenchymal stem cells) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินในทุกอัตราส่วนช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้

Maghdouri-White, Y. และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหม/คอลลาเจน ชนิดที่ 1 ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ด้วยอัตราส่วนไฟโบรอินไหม/คอลลาเจน 100/0, 95/5, 90/10, และ 85/15 โดยผ่านกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต เพื่อนำไปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวมนุษย์ (Human mammary epithelial cells, MCF10A) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหม มีค่ามอดูลัสของสภาพยืดหยุ่น 35 เมกะปาสกาลและการยึดเกาะของเซลล์ร้อยละ

70 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหม/คอลลาเจน 95/5 และ 90/10 มีค่ามอดูลัสของสภาพยืดหยุ่น 40 เมกะปาสกาลและมีร้อยละการยึดเกาะของเซลล์เท่ากับ 90 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหม/คอลลาเจน 85/15 มีค่ามอดูลัสของสภาพยืดหยุ่น 25 เมกะปาสกาลและร้อยละการยึดเกาะของเซลล์เท่ากับ 80

Fauzi, M. B. และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเอ็นแกะด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.35 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์และไดอะไลซ์ แล้วนำคอลลาเจนที่สกัดได้ละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.35 โมลาร์และนำสารละลายคอลลาเจนมาเคลือบใน 12-well culture plate เพื่อนำไปเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์ด้วยความหนาแน่น 1000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์สูงกว่า 90 และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากวันที่ 1 ถึง 7 ประมาณ 0.07 ต่อชั่วโมง โดยมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนและคอลลาเจนจากเอ็นหางหนู เมื่อคำนวณเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ พบว่ามีเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ 9.90 ชั่วโมง

Kim, S. H. และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเท้าเป็ดด้วยกรดซิติก แล้วนำมาผสมกับไฟโบรอินไหม ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมเป็น 100/0, 50/50 และ 0/100 แล้วนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งเพื่อขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำ แล้วนำไปเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังตัวอ่อนของหนู (primary mouse embryonic fibroblast cells, NIH/3T3) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน มีการร้อยละการยึดและการเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์อีกสองชนิด เมื่อนำไปปลูกถ่ายบนหลังหนูพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการย่อยสลายโดยโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมและคอลลาเจน/ไฟโบรอินไหม 50/50 มีการย่อยสลายนาน 21 วัน และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน มีการย่อยสลาย 14 วัน

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- เส้นไหมสายพันธุ์ไทยลูกผสมที่ผ่านการสาวด้วยมือเข้าอัก (พันธุ์เหลืองไพโรจน์, ได้รับจากคุณคำปน พิลามัย ผลิตเมื่อวันที่ 29 มีนาคม 2557 สถานที่ผลิตบ้านห้วยบง อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ) และรังไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (ได้รับจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนารถ จังหวัดนครราชสีมา)
- เอ็นร้อยหวายสุกร (เท้าสุกรจากตลาดสดสามย่าน แช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส)
- Acetic acid (Grade AR, Qrec Chemical Co., Ltd., นิวซีแลนด์, cat# A1020-1-2501)
- Acetone (Grade AR, Qrec Chemical Co., Ltd., นิวซีแลนด์, cat# A1084-1-2501)
- Acrylamide Eectophoresis reagent (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, cat# A3553)
- Bromophenolblue (Merck, เยอรมนี, cat# 1081220005)
- CO_2 gas (Labgaz Co., Ltd, ไทย)
- Collagen BM (Pepsin soluble collagen from porcine skin, ความเข้มข้น 5.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.1, Nitta Gelatin Inc., ญี่ปุ่น, cat#140918)
- Collagen from Bovine Achilles tendon (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, cat#C4387)
- Collagen Solution (Type I, Calf Skin, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, cat#C8919)
- Deionized Water pH 5.5 (DI water)
- Dialysis tube (MWCO 12,000-16,000, Viskase Companies, Inc., ญี่ปุ่น)
- Dulbecco’s modified eagle powder medium (D-MEM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา, cat# SH30003.02)
- Ethanol 99.9% (Qrec Chemical Co., Ltd., นิวซีแลนด์, cat# E7025-1-2501)
- Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, สหรัฐอเมริกา, cat# SV30160.03)
- HEPES free acid (OmniPur®, EMD Chemicals Inc., สหรัฐอเมริกา, cat# 5310)
- Hoechst 33258 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา, cat# H1398)
- Hydrochloric Acid 37% (Qrec Chemical Co., Ltd., นิวซีแลนด์, cat# H8040-1-2501)

- Liquid N_2 gas (Giss Marketing Co., Ltd., ไทย)
- Lithium bromide (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, cat# 213225)
- β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, cat# M6250)
- Pepsin from porcine gastric mucosa (Powder, slightly beige, 600-1200 U/mg, lot result 683 U/mg, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา, cat# 77160)
- Penicillin-Streptomycin solution (Penicillin 10,000 units/ml และ Streptomycin 10,000 ug/ml, Hyclone, สหรัฐอเมริกา, cat# SV30010)
- Phosphate buffered saline (PBS, Bio basic inc., แคนาดา, cat# PD0100)
- Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc., สหรัฐอเมริกา, cat# 161-0363)
- Silver Stain II Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., ญี่ปุ่น, cat# 291-50301)
- Sodium choride (Loba Chemie, อินเดีย, cat# 0582001000)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, เยอรมนี, cat# 822050)
- Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS, Bio basic inc., แคนาดา, cat# SB0485)
- Sodium hydroxide (Loba Chemie Pvt. Ltd., อินเดีย, cat# 0590001000)
- Sodium carbonate (Ajax Finechem, ออสเตรเลีย, cat# 463)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$, Bio basic inc., แคนาดา, cat# SB0482)
- Tissue culture dish, 10 cm (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- Tissue culture plates, 24-well และ 96-well polystyrene (Corning®, สหรัฐอเมริกา)
- Tris (hydroxymethyl) aminmethane, Tris (Merck, เยอรมนี, cat# 108387)
- Trypan blue stain 0.4 % (Gibco, สหรัฐอเมริกา, cat# 15250-061)
- Trypsin/EDTA (0.25 % Trypsin in EDTA.4Na, Hyclone, สหรัฐอเมริกา, cat# SH30042.02)

3.2 อุปกรณ์

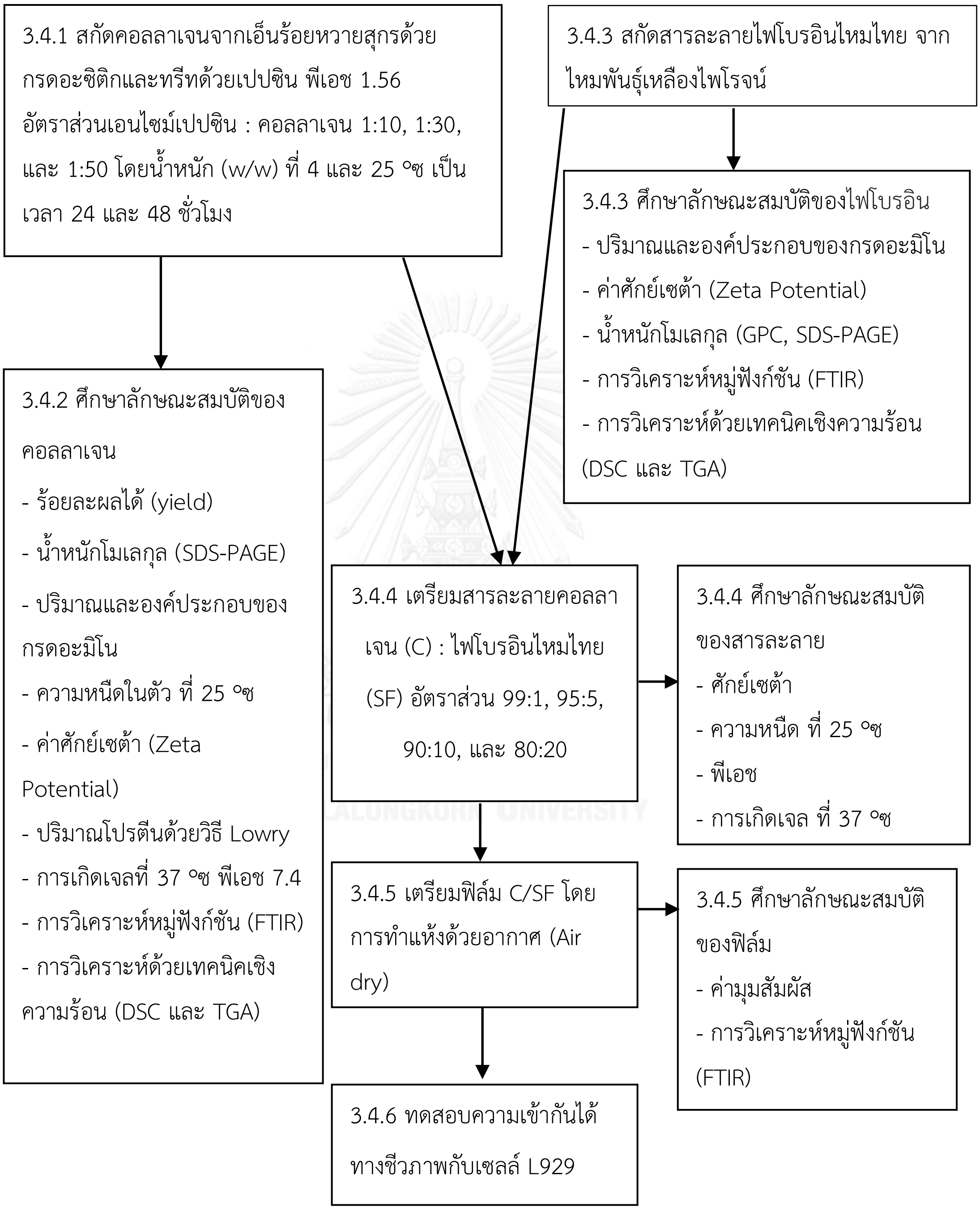
- กล้องถ่ายรูป (D5000, Nikon, ญี่ปุ่น)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge, Universal 320R, Hettich, เยอรมนี)
- เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Freeze dryer, CHRIST®, เยอรมนี)

- ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (NR-BU343, Panasonics, ญี่ปุ่น)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sandenintercool, ไทย)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส (Haier, จีน)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (New Brunswick scientific, สหรัฐอเมริกา)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) (Cabinet, ScanLaf, Mars 1800, เดนมาร์ก)
- ตู้ดูดความชื้น (Patron, ไต้หวัน)
- ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator, HEPA CLASS 100, สหรัฐอเมริกา)
- ตู้อบแห้ง (Binder, เยอรมนี)
- หลอดทดลอง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tubes, Jet Biofil®, จีน)
- Chemical Fume Hood (Dac 2005 plus, ProLAB laboratory Fume Hood, แคนาดา)
- Contact angle meter (Goniometers, JYSP-360, จีน) ส่งวิเคราะห์ที่ หน่วยวิจัยและบริการเครื่องมือกลาง วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- Differential Scanning Calorimeter (DSC, TA Instrument, สหรัฐอเมริกา) วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์และวัสดุคอมโพสิท ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทรนโต อิตาลี
- Digital balance (AL204, Mettler TOLEDO, สหรัฐอเมริกา)
- Fluorescence microplate reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, เยอรมนี)
- Fourier transforms infrared spectroscopy (FT-IR, Spectruum GX, Perkin Elmer, อังกฤษ) ส่งวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Hemocytometer (Counting Chamber, Boeco, เยอรมนี)
- High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น LC – 10A (Shimadzu, ญี่ปุ่น) ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- Inverted Microscopes (Eclipse TS100, Nikon, ญี่ปุ่น)
- Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, สหรัฐอเมริกา)
- Magnetic stirrer / Hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, เยอรมนี)
- NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)

- Sieve (OSAKA IIDA Co., Ltd., ญี่ปุ่น)
- Serological pipet, Nonpyrogenic (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- pH-meter (Mettler TOLEDO, สหรัฐอเมริกา)
- Pump (Model: DOA-P504-BN, Gast Manufacturing Inc., สหรัฐอเมริกา)
- Thermogravimetric analyzer (TGA, TA Instrument, สหรัฐอเมริกา) วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์และวัสดุคอมโพสิท ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทรนโต อิตาลี
- Vortex (Chemoscience, ไทย)
- Water bath (SUB6, Grant, อังกฤษ)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, อังกฤษ)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

แผงผังการดำเนินงานวิจัยทั้งโครงการ แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัยทั้งโครงการ

3.4 การดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกร

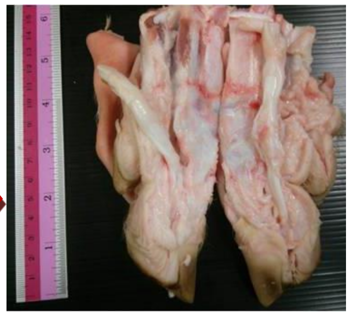
การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี โดยเริ่มจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบแล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมาโดยใช้กรด เช่น กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์หรือการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ (Friess, W. 1998) ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เปปซิน เนื่องจากสามารถทำงานได้ที่พีเอชต่ำ (พีเอช 2-3) และมีความจำเพาะในการตัดส่วนเทโลเปปไทด์ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Lee, C. H. และคณะ 2001)

ก. การแยกเอ็นร้อยหวายสุกร

การแยกเอ็นร้อยหวายสุกร เริ่มต้นนำเท้าสุกรที่ซื้อจากร้านเจ๊จิ๋ว แผงที่ 77 และ 79 ตลาดสดสามย่าน (สุกรอายุ 25 สัปดาห์ น้ำหนัก 100-105 กิโลกรัม จากสามพรานฟาร์ม) และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำปราศจากประจุ (Deionized Water, DI) โดยใช้น้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเท้าสุกรไปแช่ในเอทานอล 70% โดยใช้อัตราส่วนเอทานอล 1 ลิตรต่อน้ำหนักเท้าสุกร 1 กิโลกรัม แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ใช้มีดคัตเตอร์กรีดหนังและเลาะเอ็นออกมา ชั่งน้ำหนักเอ็น โดยเท้าสุกร 1 ข้าง ได้น้ำหนักเอ็นเปียกประมาณ 15-20 กรัม วิธีการแยกเอ็นร้อยหวานสุกร ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยทุกขั้นตอนในการแยกเอ็นร้อยหวายสุกรทำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเอ็นร้อยหวายถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสก่อนนำไปสกัดคอลลาเจน

เท้าสุกรที่เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -40 °ซ ละลายที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ

เท้าสุกรแช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 30 นาที



หนังสุกรถูกกรีดด้วยมีดและเลาะเอ็นออกมา

เอ็นร้อยหวายสุกร

น้ำหนักเอ็นร้อยหวาย โดยเท้าสุกร1 ข้าง จากสุกรอายุประมาณ 25 สัปดาห์ (น้ำหนักประมาณ 250 กรัม) จะได้เอ็นประมาณ 15-20 กรัม (น้ำหนักเปียก)

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเลาะเอ็นร้อยหวายสุกร

ข. การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรด้วยกรดอะซิติก

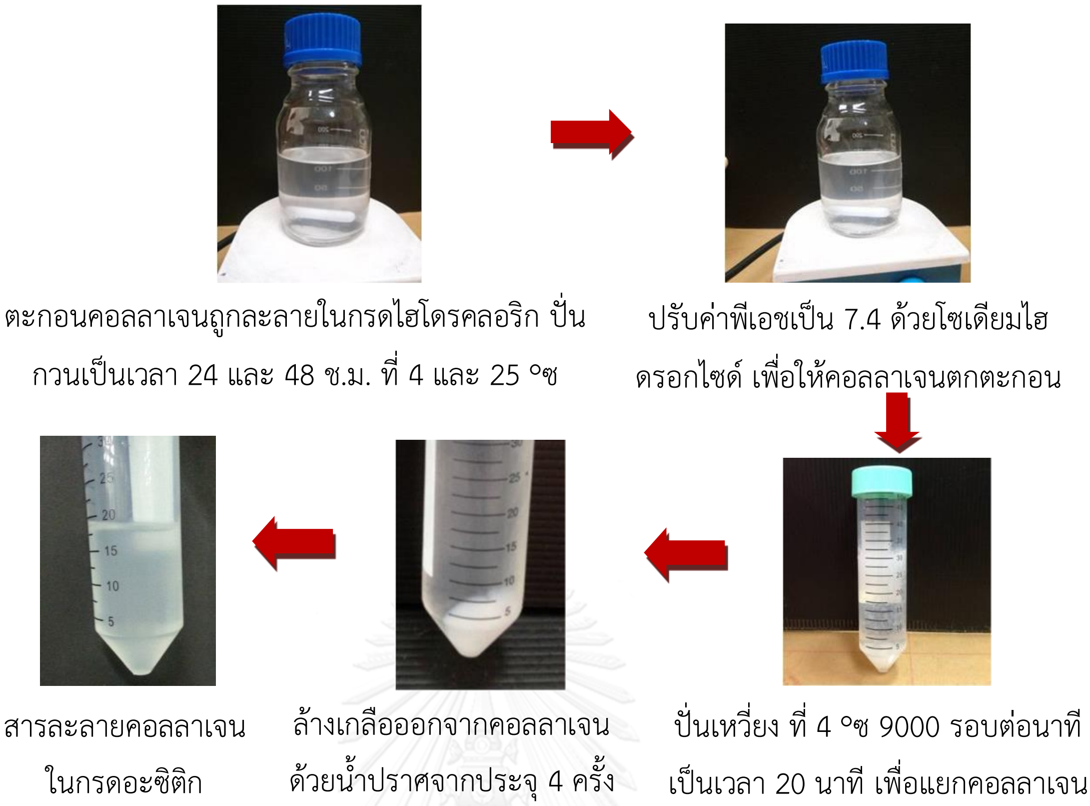
การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกร ดัดแปลงจาก (Ho, H.O. และคณะ 1997) เริ่มต้นจากชั่งน้ำหนักเอ็น 2 กรัม ตัดด้วยกรรไกร ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วบดในไนโตรเจนเหลว โดยเทไนโตรเจนเหลวลงในครกบดยาที่มีเอ็นอยู่แล้วใช้สากบดจนละเอียด กำจัดไขมันที่อยู่ในเอ็นด้วยอะซิโตน โดยใช้อัตราส่วนอะซิโตน ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเปียกของเอ็น 1 กรัม นำเอ็นสุกรลงไปแช่ในอะซิโตนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทอะซิโตนออกแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้อะซิโตนระเหยออกไปจากเอ็น เป็นเวลา 10 นาที ในตู้ดูดควัน ล้างเอ็นด้วยน้ำปราศจากประจุ ตามด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเอ็นเปียก 1 กรัม เพื่อล้างเลือดและสิ่งสกปรก จำนวน 3 ครั้งหรือจนกว่าเอ็นมีลักษณะขาวซีด นำเอ็นที่บดแล้วใส่กรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 1.56 โดยอัตราส่วนของเอ็นต่อกรด 1 : 150 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดคอลลาเจนออกมา จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มากรองด้วยตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร เพื่อให้ได้ส่วนที่ใส โดยทิ้งส่วนที่เหลืออยู่บนตะแกรง ปรับค่าพีเอชของสารละลายที่กรองได้ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ได้พีเอช 7.4 เพื่อตกตะกอนคอลลาเจนที่ละลายอยู่ในกรด คอลลาเจนที่ตกตะกอนได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกคอลลาเจนให้ตกลงที่ก้นหลอดทดลอง จากนั้นล้างเกลือออกจากคอลลาเจนด้วยน้ำปราศจากประจุ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายคอลาเจนไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำการล้างเกลือจำนวน 4 ครั้ง ขั้นตอนการสกัดดังแสดงในรูปที่ 3.3

รูปที่ 3.3 การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรด้วยกรดอะซิติก

ค. การทรีทคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน

การทรีทคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน ดัดแปลงจาก (Yu, J. C. และคณะ 2010) โดยคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะซิติกในข้อ ข. ถูกนำมาผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 1.18 โดยอัตราส่วนของคอลลาเจนต่อกรด 1:150 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเอนไซม์เปปซิน โดยอัตราส่วนของเปปซินต่อคอลลาเจน 1:10, 1:30, และ 1:50 (น้ำหนัก) ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส ปรับค่าพีเอชของสารละลายที่สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ได้พีเอช 7.4 เพื่อให้คอลลาเจนที่ละลายอยู่ในกรดตกตะกอน คอลลาเจนที่ตกตะกอนได้นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกคอลลาเจนให้ตกลงที่ก้นหลอดทดลอง จากนั้นล้างเกลือออกจากคอลลาเจนด้วยน้ำปราศจากประจุ นำสารละลายคอลลาเจนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยทำซ้ำในขั้นตอนการล้างเกลือจำนวน 4 ครั้ง จากนั้นนำคอลลาเจนที่ได้จากข้อ ข. และข้อ ค. ไปละลายในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้ไปหาความเข้มข้นของสารละลายโดยการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของสารละลายคอลลาเจนที่ได้มีค่าประมาณร้อยละ 4-5 โดยน้ำหนัก สารละลายคอลลาเจนถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พีเอช 3.32±0.04 ในหลอดทดลอง ขั้นตอนในการทรีทคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการตัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน

3.4.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของคอลลาเจน

ก. ร้อยละผลได้ (Yield)

ร้อยละผลได้ของคอลลาเจนที่สกัดได้คิดจากน้ำหนักคอลลาเจนแห้งและน้ำหนักเอ็นร้อยหวายแห้ง โดยนำคอลลาเจนที่สกัดได้และเอ็นร้อยหวายสุกรเปียก 2 กรัม ไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอ็นร้อยหวายที่อบแห้งมีน้ำหนัก 0.88±0.02 กรัม แล้วนำไปคำนวณจากสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละผลได้ (Yield)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนแห้ง}}{\text{น้ำหนักเอ็นร้อยหวายแห้ง}} \times 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

ข. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Electrophoresis เพื่อนำไปเปรียบเทียบและวิเคราะห์รูปแบบ (Pattern) ของตัวอย่างโปรตีนจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่มาจากแหล่งต่างๆ เพื่อตรวจสอบความผิดปกติ

ของโปรตีน การแยกและทำให้บริสุทธิ์ การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (Molecular weight) ด้วยเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide Gel) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเชื่อมขวางของมอนอเมอร์อะคริลาไมด์เป็นสายโซ่ยาวและเชื่อมกันเป็นโครงข่ายด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยมีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ (Bi-functional pompound) เช่น N,N'-methylene bisacrylamide โดยโครงสร้างมีลักษณะเป็นรูพรุนที่มีขนาดแตกต่างกันตามขนาดของโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก การแยกโปรตีนด้วยเจลพอลิอะคริลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้าทำให้โมเลกุลโปรตีนถูกคัดแยกด้วยตะแกรงสามมิติ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่จึงช้ากว่าขนาดเล็ก โดยรูพรุนของเจลพอลิอะคริลาไมด์จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ถ้าความเข้มขั้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ขนาดรูพรุนและสัดส่วนของสารเชื่อมขวางโครงข่าย Bisacrylamide จะลดลง ในทางปฏิบัติสัดส่วนสารเชื่อมขวางโครงข่ายจะมีค่าคงที่และประสิทธิภาพของรูพรุนจะเปลี่ยนแปลงไปตามการเลือกใช้ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ การแยกโปรตีนจะใช้เจลที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์อยู่ในช่วงร้อยละ 5-15 เจลที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ต่ำจะมีขนาดรูพรุนใหญ่เหมาะกับการแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นแถบด้วยกระแสไฟฟ้า หากเพิ่มความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ทำให้แยกโปรตีนที่มีขนาดเล็กได้ดีขึ้น

หลักการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Gel electrophoresis คือ โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่ถูกต้านด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหรูพรุนของเจล การเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน การแยกโปรตีนด้วยเจลพอลิอะคริลาไมด์มีสองระบบ คือ ระบบที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ สามารถนำโปรตีนที่แยกได้ไปตรวจหา Activity ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปร่าง ขนาดและประจุของโปรตีนได้ และระบบที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ สามารถบอกน้ำหนักโมเลกุลได้แต่ไม่สามารถนำไปทดสอบหา Activity ได้ การแยกวิธีนี้ได้แก่ วิธี SDS-PAGE การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างกระบวนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และยังเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาและหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือหน่วยย่อย (Subunit)   ของโปรตีน โดย SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่ง (Detergent) ที่มีประจุลบจะไปเกาะกับโปรตีน ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ โปรตีนทุกชนิดจึงมีค่าความหนาแน่นของประจุต่อน้ำหนักโปรตีนที่เท่ากัน นอกจากนี้ SDS ยังทำให้สายของโปรตีนเหยียดออกเป็นเส้นตรง โปรตีนจะมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล จาก

ขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ดังแสดงในสมการที่ 2 โดย Rf คือระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน/ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye front โดยระยะทางที่วัดเริ่มตั้งแต่ปลายด้านบนสุดของเจล หลังการปรากฏของแถบโปรตีนแล้วทำการวัดระยะและนำไปสร้างกราฟระหว่างค่า log MW และ Rf เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log MW และ Rf โดย m เป็นความชันมีค่าเป็นลบ และ b เป็นจุดตัดบนแกน y เมื่อทราบระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการหาแล้วสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (Hames, B. D. 1998) การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE เป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน

$$\text{Log MW} = \text{mRf} + \text{b} \quad (2)$$

วิธีการเริ่มจาก ตัวอย่างโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–5 นาที ในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล (Thiol) เป็นองค์ประกอบ เช่น 2-Mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulphide bond) ในโปรตีน ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ SDS จะจับกับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักคงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อพอลิเปปไทด์ 1 กรัม) จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนแต่ละตัวอย่างใส่ในแต่ละช่องของแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์และนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเจลและ buffer ที่ใช้ในการแยก มี SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสี เช่น สีคูแมซีบลู (Coomassie Blue) หรือ Silver Stain การแยกโปรตีนบนเจลนี้ทำได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน ในกรณีที่มั่นใจว่าน้ำหนักของโปรตีนที่ต้องการแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ อย่างชัดเจน สามารถแยกโปรตีนบนเจลเพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบได้ โดยที่ไม่ต้องเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (Hames, B. D. 1998) โดยผู้วิจัยทดสอบที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยสารทรงฤทธิ์ชีวภาพเพื่อนวัตกรรมทางคลินิก (Bioactive Resources for Innovative Clinical Applications Research Unit) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการหน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของสารละลายคอลลาเจน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีความสำคัญเนื่องจากคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและเปปซินมีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน โดยนำคอลลาเจนที่ละลายในกรดอะซิติกไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและนำสารตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่ง HPLC นั้นเป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในเฟสนิ่ง (Stationary Phase) ของคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับ Detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analyses or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่อง สามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) เฟสนิ่งอาจเลือกใช้ได้ทั้งของเหลวและของแข็ง และเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ซึ่งเฟสนิ่งของคอลัมน์ที่ใช้ในการทดสอบคือ Shim-pack ISC-07/S1504Na และเฟสเคลื่อนที่มี 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซิเตรตในเอทานอล ความเข้มข้น 2 นอร์มอล พีเอช 3.2 โซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 0.6 นอร์มอลผสมกับกรดบอร์ริกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 10 และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (Bondar, B. และคณะ 2008)

ง. ความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity)

ความหนืดในตัวของสารละลายคอลลาเจนในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องวัดความหนืดชนิด Ubbelohde ความหนืดเป็นสมบัติหนึ่งของของไหล เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของของไหลเคลื่อนที่ผ่านซึ่งกันและกัน จะมีแรงต้านทานต่อการไหลระหว่างชั้น (Layer) ภายในของเหลวเกิดขึ้น ความหนืดจึงเป็นค่าที่ได้จากการวัดแรงเสียดทานภายในของเหลวนั้น ค่าความต้านทานต่อการไหลของชั้นหนึ่งของของไหลบนอีกชั้นหนึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างและรูปร่างของโมเลกุลของของไหลนั้น ตลอดจน อุณหภูมิ ความดัน เป็นต้น ความหนืดของของเหลวแปรผันโดยตรงกับเวลาที่ของเหลวไหลผ่านหลอดคาปิลลารี การวัดความหนืดโดยการเตรียมสารละลายเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่าง

น้อย 4 ค่า (เพื่อนำไปสร้างกราฟ) โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่สูง ทำการวัดที่อุณหภูมิคงที่ การวัดความหนืดของตัวทำละลายบริสุทธิ์โดยจับเวลาเมื่อของเหลวไหลผ่านขีดวัดปริมาตรที่มากับคาปิลลารี วิธีการทำการวัดโดยเตรียมสารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.3 โดยน้ำหนัก ในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.28±0.05 ต่อมาปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ลงในเครื่องวิเคราะห์ความหนืดชนิด Ubbelohde (No.II 50120) โดยเครื่องกำหนดปริมาตรที่ใช้วัดไว้ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร จากนั้นดูดแล้วปล่อยสารละลายนี้ เพื่อจับเวลาที่สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านหลอดคาปิลลารี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบันทึกค่าดังกล่าว โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟระหว่าง $\frac{\eta_{sp}}{c}$ กับ c และ $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ กับ c เพื่อพิจารณาค่าความหนืดในตัวของสารละลายจากจุดตัดแกน y ที่ได้จากการสร้างสมการเส้นตรงของ Huggins (3) และ Kraemer (4) ตามลำดับ (Kahn, L. D. และคณะ 1996) ตามสมการด้านล่าง

$$\text{Huggins equation: } \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (3)$$

$$\text{Kraemer equation: } \frac{\ln \eta_{rel}}{c} = [\eta] - k_1[\eta]^2 c \quad (4)$$

เมื่อ c คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

t คือ เวลาที่สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านหลอดคาปิลลารี

t_0 คือ เวลาที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านหลอดคาปิลลารี

η คือ ความหนืดในตัว (intrinsic viscosity) ของสารละลายตัวอย่าง

k_H และ k_1 คือ ค่าคงที่ของ Huggins และ Kraemer ตามลำดับ

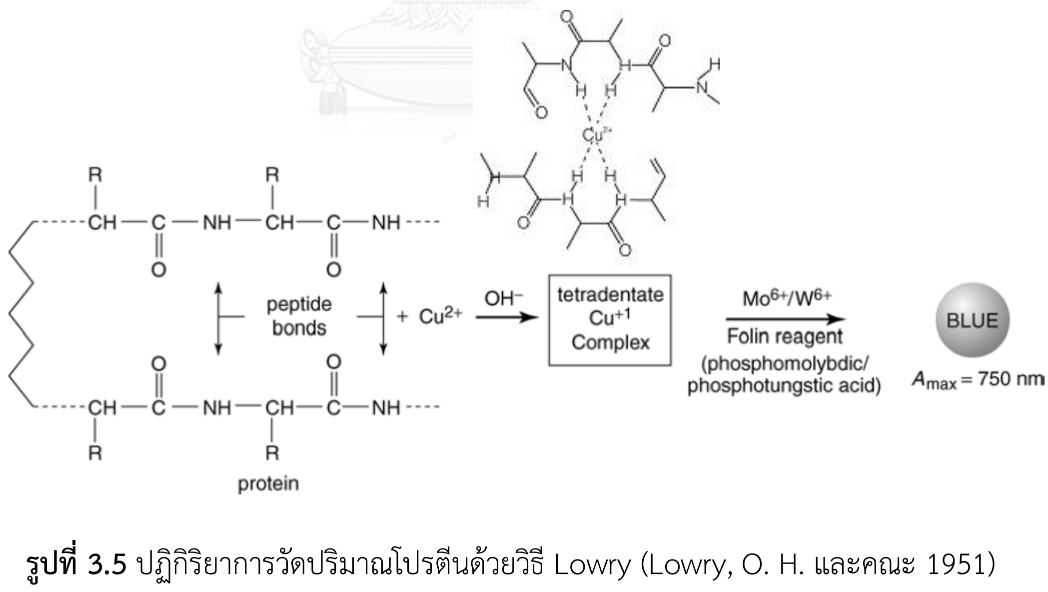
จ. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของคอลลาเจนที่สกัดได้ในสารละลายกรดอะซิติก ด้วยวิธี Lowry ซึ่งเป็นวิธีของ Lowry, O. H. และคณะ (1951) วิธีการวัดทำได้โดยผสมตัวอย่างกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, สารละลายโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_8Na_2O_8$) ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตหรือจุนสี ($CuSO_4$•$5H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปผสมกับสารละลายโฟลิน (โฟลิน-ซีออคาลโท (Folin-Ciocalteau) หรือเกลือฟอสโฟโมลิบเดตฟอสโฟทังสเทต

(Phosphomolybdate Phosphotungstate) ที่อยู่ในรูปสารละลายกรด) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล สารละลายโฟลินเป็นสารละลายสีเหลืองที่สามารถเปลี่ยนสีเป็นสารละลายสีน้ำเงินได้เมื่อเกิดการรับอิเล็กตรอน

หลักการของการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry คือโปรตีนในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับคูปริคไอออน (Cupric : Cu^{2+}) ของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในสภาวะที่เป็นด่าง ที่สภาวะนี้คูปริคไอออนได้รับอิเล็กตรอน 1 ตัว เกิดเป็นคูปรัสไอออน (Cuprous : Cu^{1+}) โดยคูปรัสไอออนที่เกิดขึ้นมีความสามารถในการจับกับหมู่เอมีนในกรดอะมิโนของโปรตีน เมื่อเติมสารละลายโฟลินซึ่งเดิมมีสีเหลืองลงไป ทำให้สารละลายโฟลินได้รับอิเล็กตรอน 1 ตัวจากคูปรัสไอออน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Heteropolymolybdenum Blue) ทำให้สารละลายทั้งหมดมีสีน้ำเงิน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงในรูปที่ 3.5

โปรตีนแต่ละชนิดให้ความเข้มของสีแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีน การคำนวณปริมาณโปรตีนจะคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงจากการสแกนโดยใช้ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ และใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 3.5 ปฏิกิริยาการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry, O. H. และคณะ 1951)

ฉ. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี ใช้หลักการกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสง เมื่อแสงอิฟราเรด (Infrared) ที่มีค่าความยาวคลื่นต่างๆผ่านสารอินทีย์ พันธะเคมีในโมเลกุลของสารจะดูดกลืนพลังงานที่ค่าความยาวคลื่นหนึ่ง ข้อมูลนี้จะถูกประมวลโดยคอมพิวเตอร์โดยการใช้สมการดิฟเฟอร์เรนเชียล (Differentail Equation) ที่เรียกว่า Fourier transform ซึ่งจะคำนวณพลังงานของแต่ละความยาวคลื่นและแปรผลออกมาเป็นสเปกตรัมของสารที่มีอยู่ในฐานข้อมูลเพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์และบ่งชี้ชนิดของสารและโครงสร้างภายในของสารที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันไป โดยโมเลกุลที่มีอะตอมต่างชนิดกันและมีพันธะต่างกัน เช่น C-H, C=O และ O-H จะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ต่างกันและให้ผลเป็นสเปคตรัม IR การศึกษาโครงสร้างทางเคมี (Chemical Structure) ของคอลลาเจน โดยนำสารละลายคอลลาเจนไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR) วิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น (Wave Number) 4,000-500 เพื่อวิเคราะห์พีคเอไมด์ (Amide) ได้แก่ 3,300 (Amide A), 3,100 (Amide B), 1,690-1,600 (amide I), 1,575-1,480 (amide II) และ 1,301-1,229 (amide III) (Movasaghi, Z. และคณะ 2008) โดยส่งวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช. การวัดการเกิดเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ0.5 โดยน้ำหนัก ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมกับ PBS ความเข้มข้น 10 เท่า โดยใช้อัตราส่วนสารละลายคอลลาเจนต่อ PBS เป็น 8 : 1 ปรับค่าพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer โดยดัดแปลงจาก (Suzuki, Y. และคณะ 1999) และวัดการเกิดเจลจากครึ่งหนึ่งของเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างฉับพลัน

ซ. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน ด้วยวิธี Differentitail Scanning Calorimetry (DSC) และ Thermogravimetric Analysis (TGA)

DSC เป็นเทคนิคการศึกษาปริมาณความร้อนและการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันจากการใส่พลังงานเข้าไปในสารตัวอย่างกับสารอ้างอิงในบรรยากาศไนโตรเจน สมบัติทางความร้อนของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิจะถูกตรวจวัดและแปรผล การวิเคราะห์โดยใช้คอลลาเจนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและถูกวิเคราะห์โดย DSC อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 30-340 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีและอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 100 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน TGA เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ความเสถียรของสารตัวอย่างเมื่อได้รับความร้อน โดยการวัดน้ำหนักอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง (Thermobalance) ในระหว่างการวิเคราะห์อุณหภูมิของตัวอย่างซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในบรรยากาศปกติหรือก๊าซเฉื่อย การสูญเสียน้ำหนักในช่วงแรกของการวิเคราะห์ หรือที่อุณหภูมิต่ำอาจเกิดจากการระเหยของน้ำหรือตัวทำละลาย แต่ที่อุณหภูมิสูงมักเกิดจากการสลายตัวของพอลิเมอร์ การวิเคราะห์โดยใช้คอลลาเจนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและถูกวิเคราะห์โดย TGA อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 30-300 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีและอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 100 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4.3 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย

ก. การกำจัดกาวไหม

การเตรียมไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ ไหมพันธุ์นี้เป็นไหมสายพันธุ์ไทยลูกผสมระหว่างไหมพันธุ์นางลายและพันธุ์ญี่ปุ่น J108 โดยเป็นเส้นไหมที่ผ่านการสาวด้วยมือเข้าอักที่ได้รับจากคุณคำปน พิลามัย ผลิตเมื่อวันที่ 29 มีนาคม 2557 สถานที่ผลิตบ้านห้วยบง อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ และรังไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ที่รับจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนารถ จังหวัดนครราชสีมา เริ่มจากการชั่งเส้นไหมและรังไหม น้ำหนัก 40 กรัม กำจัดเซริซินหรือกาวไหม นำเส้นไหมและรังไหมไปต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเส้นไหมต่อสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1:25 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Chamchongkaset, J. และคณะ 2008) นำเส้นไหมที่ต้มไปล้างด้วยน้ำ

ปราศจากประจุ (Deionized Water, DI) 4 - 5 ครั้ง เพื่อกำจัดกาวไหมออก ทำซ้ำในขั้นตอนที่กล่าวมาอีกครั้ง แล้วนำเส้นไหมไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 2 วัน เมื่อเส้นไหมแห้งแล้วนำไปตัดด้วยกรรไกร ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อเตรียมทำสารละลายไฟโบรอินไหม

ข. การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหม

เส้นใยไหมที่ผ่านการกำจัดกาวไหมน้ำหนัก 8 กรัม นำมาละลายในสารละลายลิเธียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ น้ำหนัก 24 กรัม แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.52±0.20 ชั่วโมง นำสารละลายไฟโบรอินไหมไปทำการไดอะไลซ์โดยใช้ถุงไดอะไลซ์ที่มี MWCO เท่ากับ 12,000 – 16,000 ในน้ำปราศจากประจุ เพื่อกำจัดลิเธียมโบรไมด์ (ดัดแปลงจาก (Kim, U. J. และคณะ 2005) โดยวันแรกเปลี่ยนน้ำทุก 20 นาที จำนวน 3 ครั้ง วันต่อมาเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้งต่อวัน คือ เช้า กลางวัน และเย็น จนค่าการนำไฟฟ้าของน้ำที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้วมีค่าเท่ากับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำปราศจากประจุ นำสารละลายไฟโบรอินไหมไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดตะกอนและฝุ่นละออง จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินไหมไปหาความเข้มข้นของสารละลายโดยการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินไหมที่ได้มีค่าประมาณ 7.37±0.19% โดยน้ำหนัก พีเอช 6.16±0.05 และนำสารละลายไฟโบรอินไหมเก็บ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขั้นตอนในการลอกกาวไหมและการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหม แสดงในรูปที่ 3.6

รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหม

ค. การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การหาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของไฟโบรอินไหม โดยนำสารละลายไฟโบรอินไหมไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary Evaporator) จนได้ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักและนำสารตัวอย่างส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.2 ค โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ง. ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ที่พีเอชในช่วง 3-6

ศักย์เซต้าเป็นความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆ อนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ การหาค่าศักย์เซต้าทำได้โดยการวัดอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาค เมื่ออยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า โดยใช้เทคนิค Laser Doppler Velocimetry (LDV) การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินไหม เริ่มจากนำ

สารละลายไฟโบรอินไหมไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากประจุให้ได้ปริมาณของของแข็งรวมร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก เพื่อลดความเข้มข้นและความหนืด ซึ่งอาจมีผลต่ออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาค สารละลายไฟโบรอินไหมมีพีเอชในช่วง 3-6 โดยปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เมื่อปรับพีเอชเสร็จแล้วปิเปตสารละลายไฟโบรอินไหม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Sample Cell ชนิด Disposable Zeta Cell ที่มีรูปร่างเป็นคาปิลลารีและต่อขั้วไว้ที่ปลายทั้งสองข้างเพื่อให้ไฟฟ้ากระแสสลับ วัดค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 3.7 โดยทำการวัดที่หน่วยปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำค่าศักย์เซต้าที่วัดได้ที่พีเอชต่างๆ มาสร้างกราฟระหว่างค่าประจุทางไฟฟ้ากับค่าพีเอชของสารละลายไฟโบรอินไหม เพื่อประมาณค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point, IEP) ของสารละลายไฟโบรอินไหม (Lu, Q. และคณะ 2011)

(ก). (ข).

รูปที่ 3.7 (ก). Sample Cell ชนิด Disposable Zeta Cell (ข). เครื่อง Zetasizer Nano ZS

จ. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล(molecular weight) ของไฟโบรอินด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ Gel Permeation Chromatography (GPC)

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ข. โดยใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 15 ส่วน Gel Permeation Chromatography (GPC) หรือ Size exclusion chromatography (SEC) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยอาศัยหลักการแยกโมเลกุลตามขนาดที่ต่างกัน ซึ่งเกิดขึ้นภายในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคที่มีรูพรุน ส่วนใหญ่เป็นเจลพอลิสไตรีนที่มีโครงสร้างแบบร่างแหสูง (Highly crosslinked polystyrene) ปกติอนุภาคของเจลมีรูพรุนที่มีขนาดอยู่ในช่วง 0.5-10^5 นาโนเมตร สามารถแยกพอลิเมอรที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10^2- 4x10^7 ได้ การวิเคราะห์ด้วยวิธี GPC วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์และวัสดุคอมโพสิท ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทรนโต ประเทศอิตาลี เริ่มจากนำสารละลายไฟโบรอินไหมเจือจางด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วฉีดสารละลายดังกล่าวลงในคอลัมน์ที่มี Shodex SB805HQ เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และวัดปริมาณของไฟโบรอินไหมที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 224 นาโนเมตร จากนั้นเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของไฟโบรอินไหมกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของมวลโมเลกุลของไฟโบรอิน โดยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายยูเรีย (urea) ที่มีความเข้มข้น 4 โมลาร์ สารละลายทริส (Tris) ที่ปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกแล้ว (Tris-HCl) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.5 (Bondar, B. และคณะ 2008)

ฉ. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

การศึกษาโครงสร้างทางเคมี (Chemical Structure) ของไฟโบรอิน โดยนำสารละลายไฟโบรอินไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ฉ. โดยส่งวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน ด้วยวิธี Differentitail Scanning Calorimetry (DSC) และ Thermogravimetric Analysis (TGA)

การวิเคราะห์ด้วยวิธี DSC และ TGA ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ซ โดยไฟโบรอินไหมที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งถูกนำไปวิเคราะห์โดย DSC ทดสอบด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ซ ส่วน TGA อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 30-700 องศาเซลเซียส และใช้สภาวะอื่นๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ซ

3.4.4 การศึกษาสมบัติของสารละลายผสมของคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF)

Lerdchai, K. และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยดูจากร้อยละน้ำหนักคงเหลือของไฮโดรเจลหลังแช่ด้วยในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิกรัม พบว่าการมีไฟโบรอินไหมเพียงร้อยละ 5 จะช่วยชะลอการย่อยสลายของเจลาตินได้อย่าง โดยมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือเพิ่มขึ้นจาก 67 เป็น 80 งานวิจัยนี้จึงผสมสารละลายไฟโบรอินไหมเพียงร้อยละ 1-20

ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ที่พีเอชในช่วง 3-8

การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายคอลลาเจนโดยเจือจางในกรดอะซิติกและไฟโบรอินไหม ที่มีปริมาณของของแข็งรวมร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก พีเอชช่วง 3-8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราส่วน 99/1, 99/5, 90/10 และ 80/20 นำไปวัดค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer ด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 ง โดยทำการวัดที่หน่วยปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

การศึกษาโครงสร้างทางเคมี (Chemical Structure) ของคอลลาเจนผสมไฟโบรอิน โดยนำสารละลายผสมของคอลลาเจนและไฟโบรอินไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total

Reflection (ATR) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ฉ. โดยส่งวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

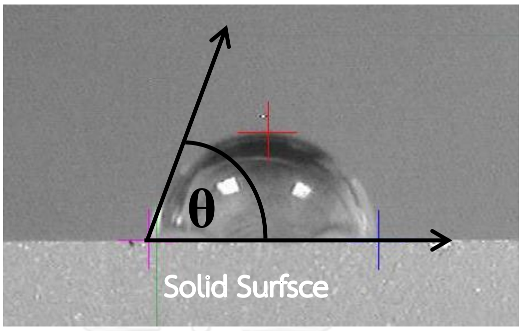
3.4.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์มคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF)

ก. การขึ้นรูปฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอิน

การขึ้นรูปฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินนำสารละลายคอลลาเจนและไฟโบรอินไปเจือจางที่มีปริมาณของแข็งรวมร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ผสมกันในอัตราส่วน 99/1, 99/5, 90/10 และ 80/20 พีเอช 3.43±0.13 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปั่นกวนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายผสมคอลลาเจน/ไฟโบรอินไหม 100 ไมโครลิตร ปิเปตลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24 - well polystyrene tissue culture plate) แล้วเกลี่ยให้ทั่วโดยใช้ปลายปิเปต ผึ่งไว้ให้แห้งด้วยอากาศ (Air dry) เป็นเวลา 1 วัน ในตู้ดูดควันและล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ผึ่งไว้ให้แห้งด้วยอากาศ (Kim, E. Y. และคณะ 2015)

ข. ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมไทย (Contact Angle)

การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัส (Contact Angle) ของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินดัดแปลงจาก Kim, E. Y. และคณะ (2015) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยการหยดน้ำกลั่น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของตัวอย่างที่เคลือบบนแผ่นกระจก ขนาด 2.5 × 7.5 เซนติเมตร การขึ้นรูปฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินไหม โดยมีปริมาณของของแข็งรวมร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 99/1, 99/5, 90/10 และ 80/20 การเคลือบสารละลายคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมบนแผ่นกระจก เริ่มจากผสมสารละลายคอลลาเจนและไฟโบรอินไหม ในอัตราส่วนดังที่กล่าวข้างต้น ปิเปตสารละลายผสม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นกระจก แล้วใช้ปลายทิปเกลี่ยให้สารละลายกระจายจนทั่วแผ่นกระจก นำแผ่นกระจกผึ่งไว้ให้แห้งด้วยอากาศในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำฟิล์มแห้งไปวัดค่ามุมสัมผัส (θ) ของน้ำที่เปลี่ยนไป ค่ามุมสัมผัสของน้ำถูกวัดทันทีที่หยดน้ำลงไป และวัดค่าที่เวลา 15 วินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและความดันบรรยากาศปกติ การวัดค่ามุมสัมผัสของน้ำ แสดงดังรูปที่ 3.8 โดยใช้วิธี Static sessile drop ด้วยเครื่อง Contact angle meter โดยส่งวิเคราะห์ที่หน่วยวิจัยและบริการเครื่องมือกลาง วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รูปที่ 3.8 การวัดค่ามุมสัมผัส (θ) ของน้ำ

3.4.6 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929)

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) จะทำการทดสอบเพื่อศึกษาการยึดเกาะ (attachment) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24-well polystyrene tissue culture plate) ที่เคลือบคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม ความเข้มข้นของของแข็งรวมร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 99/1, 99/5, 90/10 และ 80/20 การเคลือบสารละลายคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม เริ่มจากผสมสารละลายคอลลาเจนและไฟโบรอินไหม ในอัตราส่วนดังที่กล่าวข้างต้น ปิเปตสารละลายผสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม แล้วใช้ปลายทิปเกลี่ยให้สารละลายกระจายทั่วก้นหลุม แล้วนำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ผึ่งไว้ให้แห้งด้วยอากาศในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ล้างด้วยสาละลาย PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อล้างกรดอะซิติกบนฟิล์ม จำนวน 3 ครั้ง และนำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปผึ่งไว้ให้แห้งด้วยอากาศในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (Fauzi, M. B. และคณะ 2016)

ก. การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929)

การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ที่เคลือบคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม ในอัตราส่วน 99/1, 99/5, 90/10 และ 80/20 เริ่มจากการเตรียมเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ด้วยการนำเซลล์ที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียออกมาละลายทันทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้เลี้ยง ชนิด Dulbecco’s-modified Eagle’s medium (DMEM) ที่ผสมเซรั่ม 10% fetal bovine serum (FBS) เพนิซิลลิน (penicillin) ความเข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ใน T25 tissue culture flask โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถแบ่งเซลล์ (subculture) โดยล้างเซลล์ด้วย PBS ก่อน จากนั้นปิเปต Trypsin ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก ที่มี EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนัก ลงไปใน flask นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 5 นาที โดยแบ่งเซลล์อัตราส่วน 1:3 แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ตามที่ต้องการนำไปทดสอบ

การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) โดยทำการเพาะเซลล์ลงบนถาดเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม (1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) นำไปเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ที่เคลือบคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม ในตู้บ่มด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม โดยอาหารที่ใช้เลี้ยง ชนิด Dulbecco’s-modified Eagle’s medium (DMEM) ที่ผสมเซรั่ม 10% fetal bovine serum (FBS) เพนิซิลลิน (penicillin) ความเข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เพื่อตรวจสอบจำนวนเซลล์ยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง และจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 10 วัน โดยวิธีการวัดปริมาณเซลล์ด้วยวิธี DNA assay ซึ่ง

เป็นวิธีการประมาณการเปลี่ยนแปลงของประชากรเซลล์ด้วยการใช้สารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติจับจำเพาะกับ DNA เช่น Bisbenzidine (Hoechst) มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 533.88 โดยย้อมบริเวณเบส A-T ให้เรืองแสงได้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีการกระตุ้นด้วยความถี่ 340-380 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานแสงที่ 430-450 นาโนเมตร (Paul, J. H. และคณะ 1982) โดยล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารละลาย SDS 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม โดยสารละลาย SDS เตรียมได้จาก Sodium dodecyl sulfate 20 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลาย SSC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ซึ่งเตรียมจากการนำ Hoechst ปริมาตร 20 ไมโครลิตร น้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 19 มิลลิลิตร และ SSC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกัน จากนั้นนำสารมาตรฐานและตัวอย่างไปวัดปริมาณ DNA โดยนำตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปิเปตสารละลายในตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Hoechst 33258 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader ช่วงความยาวคลื่น 350-460 นาโนเมตร และหาปริมาณของเซลล์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเซลล์

ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์คิดจากสมการด้านล่าง (Monod, J. 1949)

- ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ (% Cell attachment) คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Cell attachment} = (N_1/N_0) \times 100 \quad \text{...(5)}$$

เมื่อ N_0 คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้น

N_1 คือ จำนวนเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ, หน่วย: ต่อชั่วโมง) คำนวณได้จาก

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad \text{...(6)}$$

เมื่อ X_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

X_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

- ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population doubling time, PDT, หน่วย: ชั่วโมง) คำนวณได้จากสูตร

$$\text{PDT} = \frac{\ln 2}{r} \quad \text{...(7)}$$

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้มีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3-5 ครั้ง และการวิเคราะห์บางอย่างมีข้อจำกัดจึงมีการทำซ้ำเพียงครั้งเดียว แล้วนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ย (Average) และค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) เพื่อศึกษาว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

บทที่ 4
ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสมบัติของคอลลาเจน

ก. ร้อยละผลได้ (yield)

ร้อยละผลได้ของคอลลาเจนที่สกัดได้คิดจากน้ำหนักคอลลาเจนแห้งและน้ำหนักเอ็นร้อยหวายแห้ง โดยนำคอลลาเจนที่สกัดได้และเอ็นร้อยหวายสุกรเปียก 2 กรัม ไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอ็นร้อยหวายที่อบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 0.88±0.02 กรัม ร้อยละผลได้ (yield) ต่อน้ำหนักแห้งของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) และทรีทด้วยเปปซิน (Pepsin-treated ASC) ที่สภาวะต่างๆ (n=4) แสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3

Aparecida de Aro, A. และคณะ (2012) ได้รายงานว่าเอ็นมนุษย์ประกอบด้วยน้ำประมาณร้อยละ 55-70 และ ของแข็ง (Solid) ประมาณร้อยละ 30-45 มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 60-85, คอลลาเจนชนิดที่ 1 ประมาณร้อยละ 60, คอลลาเจนชนิดที่ 3 ประมาณร้อยละ 0-10, คอลลาเจนชนิดที่ 4 ประมาณร้อยละ 2, โปรติโอไกลแคน (Proteoglycan) ประมาณร้อยละ 1 และเส้นใยอีลาสติน (Elastic fibers) ประมาณร้อยละ 2 Lin, T. W. และคณะ (2004) พบว่าเอ็นมนุษย์ประกอบด้วยคอลลาเจนประมาณร้อยละ 86, โปรติโอไกลแคนประมาณร้อยละ 1-5, และอีลาสตินประมาณร้อยละ 2 Wang, J. H. (2006) รายงานว่าเอ็นมนุษย์ประกอบด้วยคอลลาเจนประมาณร้อยละ 60 โดยคอลลาเจนชนิดที่ 1 ประมาณร้อยละ 95 และ คอลลาเจนชนิดที่ 3 และ 5 ประมาณร้อยละ 5 Mos, M.de และคณะ (2007) รายงานว่า เอ็นร้อยหวายมนุษย์ ประกอบด้วยน้ำประมาณร้อยละ 66.2 และของแข็งร้อยละ 33.8 โดยมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 64.5 Schulze-Tanzil, G. และคณะ (2012) พบว่าเอ็นสุกรมีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 95 โดยตารางสรุปองค์ประกอบของคอลลาเจนในเอ็นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 การสกัดคอลลาเจนนั้น Techatanawata, S. และคณะ (2011) ได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเอ็นหางหนูและเอ็นร้อยหวายโคด้วยเอนไซม์เปปซินในอัตราส่วนเอนไซม์เปปซินต่อเอ็น 1:20 ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ร้อยละผลได้ 21.8±14.9 และ 5.4±0.40 ตามลำดับและการศึกษาของ Nagai, T. และคณะ (2002) พบว่าการสกัด

คอลลาเจนจากเอ็นกวาง Yezo Sika ด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ให้ร้อยละผลได้ 41.8 และนำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยกรดมาสกัดต่อด้วยเปปซิน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (3,085 หน่วยต่อมิลลิกรัม) ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน พบว่าให้ร้อยละผลได้ 35.7 โดยคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดทั้งสองวิธีรวมเป็นร้อยละผลได้ 77.5

ตารางที่ 4.1 สรุปองค์ประกอบของคอลลาเจนในเอ็นต่างๆ

แหล่งที่มา	องค์ประกอบ	อ้างอิง
เอ็นมนุษย์	คอลลาเจน 86%, โปรติโอไกลแคน 1-5%, และอีลาสติน 2%	(Lin, T. W. และคณะ 2004)
เอ็นมนุษย์	คอลลาเจน 60% โดยประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 1 95% และคอลลาเจนชนิดที่ 3 และ 5 5%	(Wang, J. H. 2006)
เอ็นมนุษย์	น้ำ 66.2% และของแข็ง 33.8% โดยประกอบด้วยคอลลาเจน 64.5%	(Mos, M.de และคณะ 2007)
เอ็นมนุษย์	น้ำ 55-70% และของแข็ง (Solid) 30-45% โดยประกอบด้วยคอลลาเจน 60-85%, คอลลาเจนชนิดที่ 1 60%, คอลลาเจนชนิดที่ 3 0-10%, คอลลาเจนชนิดที่ 4 2%, โปรติโอไกลแคน 1% และเส้นใยอีลาสติน 2%	(Aparecida de Aro, A. และคณะ 2012)
เอ็นสุกร	คอลลาเจน 95%	(Schulze-Tanzil, G. และคณะ 2012)

การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดทำให้ร้อยละผลได้เพิ่มขึ้น โดยมีร้อยละผลได้ 58.20, 69.38 และ 76.43 ตามลำดับ และคอลลาเจนที่สกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะให้ร้อยละผลได้สูงที่สุด โดยเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่พบในเอ็น ซึ่งพบประมาณร้อยละ 60-85 ของน้ำหนักแห้ง การสกัดให้ได้ร้อยละผลได้ที่มากขึ้นหากใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกวิธีการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีร้อยละผลได้สูงสุด จากนั้นคอลลาเจนถูกนำไปทรีทด้วยเอนไซม์เปปซิน ด้วยอัตราส่วนของเปปซินต่อคอลลาเจน 1:10, 1:30 และ 1:50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มเวลา อุณหภูมิและปริมาณเปปซิน จะทำให้ร้อยละผลได้ลดลง โดยร้อยละผลได้อยู่ในช่วง 68-74 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากร้อยละผลได้ในการสกัดคอลลาเจนมีปริมาณใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่มีอยู่ในเอ็น ซึ่งมีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 60-85 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการร้อยละผลได้ที่สกัดเป็นปริมาณโปรตีนไม่ใช่คอลลาเจนทั้งหมด นอกจากนี้ในขั้นตอนการกำจัดไขมันในเอ็นก่อนการสกัดโดยการใช้อะซิโตนซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงและเกิดการตกตะกอน อาจทำให้คอลลาเจนที่อยู่ในเอ็นลดลงไป ทำให้ร้อยละผลได้ลดลงด้วย (Ho, H.O. และคณะ 1997)

ตารางที่ 4.2 ร้อยละผลได้ต่อน้ำหนักแห้งของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) ที่เวลาต่างๆ พีเอช 1.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	ร้อยละผลได้
24	58.20±1.66[a]
48	69.38±1.27[b]
72	76.43±0.69[c]

(a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

ตารางที่ 4.3 ร้อยละผลได้ต่อน้ำหนักแห้งของคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน (Pepsin-treaated ASC) ที่สภาวะต่างๆ พีเอช 1.12

เวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	**อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (○ซ)**	**ปริมาณเปปซินต่อคอลลาเจนที่ใช้ (w/w)***	**ร้อยละผลได้**
24	4	1:10	73.10 ± 2.54^{a}
		1:30	73.73 ± 1.52^{a}
		1:50	74.07 ± 2.80^{a}
	25	1:10	70.25 ± 1.35^{ac}
		1:30	70.87 ± 1.25^{ac}
		1:50	71.80 ± 0.92^{a}
48	4	1:10	72.03 ± 1.12^{ac}
		1:30	72.65 ± 1.32^{ac}
		1:50	73.34 ± 1.60^{ac}
	25	1:10	68.67 ± 2.29^{bcd}
		1:30	70.62 ± 3.13^{ad}
		1:50	71.11 ± 2.08^{ad}

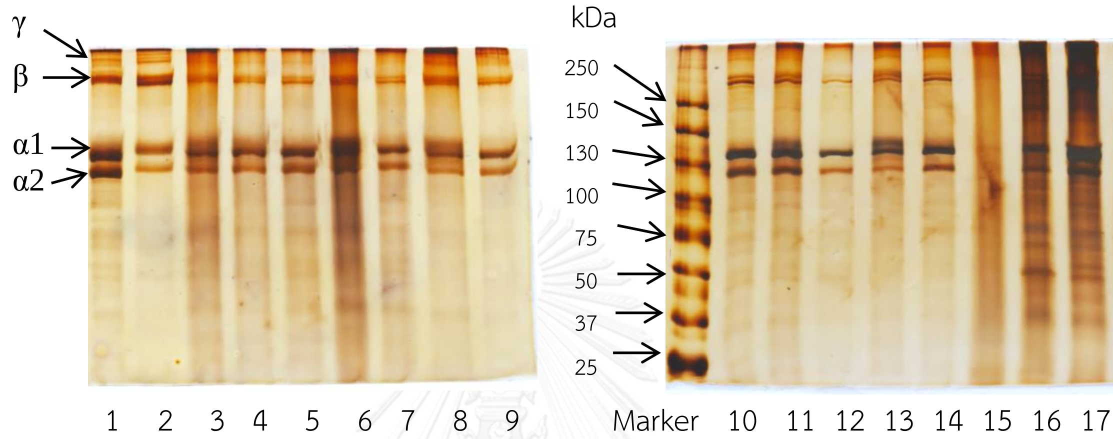
*เอนไซม์เปปซินจากเนื้อเยื่อกระเพาะหมู (Pepsin from porcine gastric mucosa) โดย 1 มิลลิกรัมประกอบด้วยเอนไซม์เปปซิน 683 หน่วย
(a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

เอนไซม์เปปซินเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่พีเอชต่ำ โดยเปปซินเป็นเอนไซม์ชนิดมอโนเมอริก (Monomeric enzyme) ซึ่งประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์เพียงสายเดียวและมีสัดส่วนของกรดอะมิโน (Amino acid residue, กรดอะมิโนที่ถูกดึงโมเลกุลของน้ำหนึ่งโมเลกุลโดยไฮโดรเจนไอออนจากหมู่อะมิโนและไฮดรอกไซด์ไอออนจากหมู่คาร์บอกซิล) สูง ประมาณ 43 ตัวจาก 327 ตัว ซึ่งจะทำให้มีจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point, IEP) ต่ำ ประมาณ 1 (Guzman, M. L. และคณะ 2016) ได้รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานด้วยการจำลองในกระเพาะอาหาร (Simulated gastric fluid) พีเอช 1.2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์เปปซินจากสุกรทำงานได้เหมาะสมที่พีเอชประมาณ 1-2 และพีเอชในช่วง 2-4 การทำงานของเอนไซม์เปปซินจะไม่มีผลต่อการทำงานเมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิระหว่าง 4-37 องศาเซลเซียส งานวิจัยนี้จึงเลือกสภาวะในการสกัดคอลลาเจนด้วยเปปซินที่พีเอช 1.2 เปปซินนั้นเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการตัดพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยกรดอะมิโนชนิดที่มีวงแหวน (aromatic amino acid) เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีนและทริปโตเฟน แต่จะไม่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยกรดอะมิโนชนิดวาลีน อะลานีนและไกลซีน โดยตัดที่ส่วนปลายของโทรโพคอลลาเจน ทั้งปลาย N- และ C- ออกประมาณ 18 และ 25 หน่วย ส่วนนี้เป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำค่อนข้างสูง ทำให้ได้ส่วนของเปปไทด์เล็กๆละลายอยู่ ส่วนเทโลเปปไทด์จะถูกกำจัดออก

ข. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 8 ดังแสดงรูปที่ 4.1 ซึ่งมาจากคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกและทรีทด้วยเปปซินด้วยอุณหภูมิ พีเอช และเวลาที่ต่างกันเปรียบเทียบกับคอลลาเจน BM จากหนังสุกรที่สกัดด้วยเปปซิน (Niita Gelatin Inc.,ญี่ปุ่น, cat#140918) คอลลาเจนจากหนังลูกโคและเอ็นร้อยหวายโค (Sigma) และคอลลาเจนจากหนังสุกรที่ทรีทด้วยเปปซิน พบสาย α1 และ α2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (จากรูปที่ 4.2) จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เวลาและอุณหภูมิในการสกัดเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มของแถบโปรตีนของสาย α1, α2, β (ไดเมอร์ของสาย α) และ γ (ไตรเมอร์ของสาย α) จางลง การสกัดด้วยกรดอะซิติกได้คอลลาเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าการทรีทด้วยเอนไซม์เปปซิน และการทรีทด้วยเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้พันธะเปปไทด์บางส่วนถูกตัดออกไปมากกว่าการทรีทด้วยเปปซินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า โดยสังเกตได้จากแถบโปรตีนปรากฏแถบย่อยขึ้นดังเช่นแถบคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินต่อคอลลาเจนในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นแถบโปรตีนย่อยปรากฏขึ้นมาก และแถบที่ 17 ซึ่งเป็นคอลลาเจนจากหนังสุกรที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1:10 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คอลลาเจนถูกตัดเป็นเปปไทด์ แถบโปรตีนที่ปรากฏจึงมีแถบย่อยปนอยู่มาก ส่วนคอลลาเจนจากหนังลูกวัวและเอ็นร้อยหวายโค ในแถบที่ 15 และ 16

(Sigma) นั้นแถบโปรตีนของคอลลาเจนจากเอ็นลูกวัวปรากฏแถบของสาย α1 และ α2 ที่บางมาก และถูกบดบังด้วยแถบโปรตีนย่อยๆจนเกือบหมด โดยแถบโปรตีนของคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโคจะปรากฏแถบของสาย α1 และ α2 ที่สังเกตได้ชัดเจนกว่า แต่ยังคงถูกบดบังด้วยแถบโปรตีนย่อยๆด้วยเช่นกัน ความเข้มของแถบนั้นบ่งบอกถึงปริมาณของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลออยู่ในช่วงนั้นเป็นจำนวนมาก



รูปที่ 4.1 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 8 เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลคอลลาเจนที่สกัดด้วยสภาวะต่างๆ โดยแถบ 1:คอลลาเจน BM, 2:คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, 3-5:คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1 : 10, 1 : 30, และ 1 : 50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง,

6-8:คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1 : 10, 1 : 30, และ 1 : 50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง,

9-11:คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1 : 10, 1 : 30, และ 1 : 50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง,

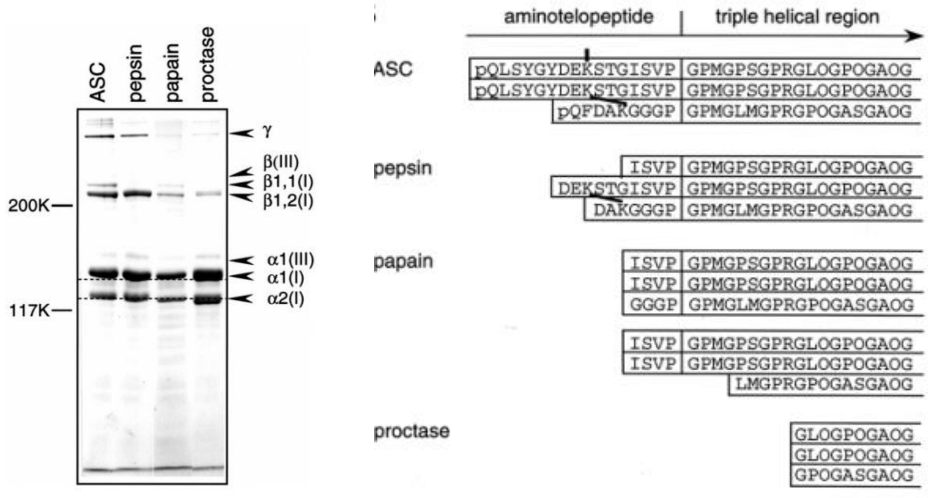
12-14:คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1 : 10, 1 : 30, และ 1 : 50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง,

15:Collagen Solution ที่สกัดด้วยกรด (Type I, Calf Skin, Sigma),

16:คอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโคที่สกัดด้วยกรด (Sigma),

17:คอลลาเจนจากหนังสุกรที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1 : 10 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Sato, K. และคณะ (2000) ได้ทำการสกัดคอลลาเจนจากหนังโคด้วยกรดกรดอะซิติก ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งและนำมาทรีทด้วยเอนไซม์สามชนิดได้แก่ เปปซิน ปาเปน (Papain) และพรอกเทส (Proctase) โดยใช้คอลลาเจน ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดทรีทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน การทรีทด้วยเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ การทรีทด้วยเอนไซม์พรอกเทส ความเข้มข้น 0.2 มิลลิรัมต่อมิลลิลิตรในกรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์-โซเดียมทาร์ทาเรต (Sodium tartarate) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 2.8 และการทรีทด้วยเอนไซม์ปาเปน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าการทรีทด้วยเอนไซม์พรอกเทสทำให้โครงสร้าง Triple Helices ถูกทำลาย ส่วนการทรีทด้วยเอนไซม์ปาเปน ทำให้โครงสร้าง Triple Helices ถูกทำลายบางส่วนคือสาย $\alpha 2$ และการทรีทด้วยเอนไซม์เปปซิน โครงสร้างของคอลลาเจนส่วนที่เป็น Triple Helices ยังคงอยู่แต่ส่วนที่เป็นเทโลเปปไทด์ถูกทำลายไป ดังแสดงรูป 4.2 (ก) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเอนไซม์เปปซินและปาเปนพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละสาย α เท่ากันคือ สาย $\alpha 1$ มีน้ำหนักโมเลกุล 137 กิโลดาลตัน และสาย $\alpha 2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 125 กิโลดาลตัน โดยรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังโคที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ รวมทั้งลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างของคอลลาเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดนั้นในเทโลเปปไทด์มีกรดอะมิโน 44 ตัว และคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีกรดอะมิโนลดลงเหลือ 21 ตัว โดยถูกตัดออกไป 23 ตัว และน้ำหนักโมเลกุลของเทโลเปปไทด์ลดลงจาก 5,437 ดาลตัน เป็น 2,415 ดาลตัน ตามลำดับปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเทโลเปปไทด์ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ชนิดของกรดอะมิโนในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดเมื่อถูกทรีทด้วยเปปซินทำให้กรดอะมิโนบางชนิดที่ลดลง



(ก) (ข)

รูปที่ 4.2 (ก) รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังโคที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ (ข) ลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างของคอลลาเจน (Sato, K. และคณะ 2000)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในเทโลเปปไทด์จากคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน (Sato, K. และคณะ 2000)

สัญลักษณ์ของกรดอะมิโน	ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (ตัว)	
		เทโลเปปไทด์จากคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด	เทโลเปปไทด์จากคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน
p	Proline	6	3
Q	Glutamine	3	-
L	Luecine	2	-
S	Serine	6	3
Y	Tyrosine	4	-
G	Glycine	7	4
D	Aspartic	3	2
E	Glutamic	2	1
K	Lysine	3	2
T	Threonine	2	1
I	Isoleucine	2	2
V	Valine	2	2
A	Asparagine	1	1
F	Phenylalnine	1	-
น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)		5,437	2,415

เมื่อนำแถบโปรตีนที่ได้จากรูปที่ 4.1 ทำการวัดระยะและนำไปสร้างกราฟระหว่างค่า log Mw และ Rf โดย Rf คือระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน/ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye front โดยเริ่มวัดระยะทางตั้งแต่ปลายด้านบนสุดของเจล เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log Mw และ Rf โดย m เป็นความชันมีค่าเป็นลบ และ b เป็นจุดตัดบนแกน y เมื่อทราบระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการหาแล้วสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว กราฟมาตรฐานระหว่าง log MW และ Rf ของโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก ข.1 และน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจน แสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) และทรีทด้วยเปปซิน (Pepsin-treaated ASC) ที่สภาวะต่างๆ โดยคำนวณจากรูปที่ 4.1 จากการวัดระยะและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก รูปที่ ข.1

ชนิดของคอลลาเจน	เวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (°ซ)	ปริมาณเปปซินต่อคอลลาเจนที่ใช้ (w/w)	น้ำหนักโมเลกุลของ $\alpha 1$ (kD)	น้ำหนักโมเลกุลของ $\alpha 2$ (kD)
คอลลาเจน BM	-	-	-	126.96	108.16
ASC	72	25	-	129.61	110.90
PSC	24	4	1:10	124.09	109.55
			1:30	126.38	110.66
			1:50	126.96	110.66
		25	1:10	124.09	108.16
			1:30	125.52	109.40
			1:50	128.42	110.66
	48	4	1:10	121.38	107.83
			1:30	126.35	106.70
			1:50	126.35	107.83
		25	1:10	123.06	107.83
			1:30	125.69	107.83
			1:50	127.02	107.83

จากรูปที่ 4.1 แสดงแถบโปรตีนของคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1:50 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏแถบคล้ายกับคอลลาเจน BM มากที่สุด และจากตารางที่ 4.3 พบว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจนที่แตกต่างกัน มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน จากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนโดยสนใจเฉพาะแถบ α1 และ α2 และคิดจากน้ำหนักโมเลกุลของ α1 2 สาย และ α2 1 สาย พบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 370 กิโลดาลตัน และคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1:50 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีน้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ ประมาณ 365 กิโลดาลตัน ส่วนคอลลาเจน BM มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 362 กิโลดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลที่ลดลงของคอลลาเจนที่สกัดด้วยเปปซินสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของเทโลเปปไทด์ที่ได้จากการศึกษาของ Sato, K. และคณะ (2000) หากเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนกับงานวิจัยนี้ พบว่าคอลลาเจนจากหนังโคที่ตัดด้วยเปปซินมีน้ำหนักโมเลกุลของสาย α1 และ α2 สูงกว่าคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่ตัดด้วยเปปซิน ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของเทโลเปปไทด์ที่ปลายของ Triple helices บางส่วนยังหลงเหลืออยู่ และจากการศึกษาของ Sato, K. และคณะ (2000) การตัดด้วยเปปซินด้วยนั้นไม่ใช่สภาวะที่รุนแรงจนทำให้น้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนลดลงมากหรือเกิดแถบย่อยจำนวนมาก ผู้วิจัยจึงเลือกสภาวะนี้ในการสกัดคอลลาเจนโดยการสกัดด้วยอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1:50 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค. ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายคอลลาเจน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์หาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายคอลลาเจน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ด้วยข้อจำกัดในการวิเคราะห์จึงทำซ้ำเพียงครั้งเดียว ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากการวิเคราะห์พบว่ามีกรดอะมิโนชนิดไกลซีนมากที่สุด โดยไกลซีนนั้นเป็นองค์ประกอบหนึ่งในสามของกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจน ตามด้วยโพรลีนและอะลานีนตามลำดับ โดยไม่พบทริปโตเฟนและซีสเตอีน ซีสเตอีนนั้นเชื่อว่าไม่พบในโครงสร้างของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 แต่อาจถูกพบได้เล็กน้อยในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและสกัดด้วยเปปซิน

เนื่องวัตถุดิบที่นำมาสกัดอาจมีอีลาสติน (Elastin) ที่ไม่ละลายน้ำอยู่สูงและยังสามารถละลายอยู่ในสารละลายเกลือในกระบวนการตกตะกอนคอลลาเจน (Moreno, H. M. และคณะ 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า ไลซีนในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีปริมาณที่สูงกว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน เนื่องจากกรดอะมิโนชนิดนี้พบมากในส่วนเทโลเปปไทด์และจะถูกทรีทออกไปด้วยเปปซิน ไลซีนจึงมีปริมาณลดลงในคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน นอกจากนี้เปปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการตัดพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยกรดอะมิโนชนิดที่มีวงแหวน (aromatic amino acid) เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน ซึ่งมีอยู่ในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดร้อยละ 2.50 และลดลงเหลือร้อยละ 2.04 ในคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน ส่วนกรดอะมิโนชนิดไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากในคอลลาเจนนั้น การวิเคราะห์ที่ทำโดยศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยาไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดนี้จึงไม่ได้รายงานในงานวิจัย

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน พบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินมีอัตราส่วน 2.97:1.07:1 และ 3.08:1.11:1 ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน สรุปได้ว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดและเปปซินทำให้อัตราส่วนกรดอะมิโนสามชนิดนี้เปลี่ยนแปลงน้อยมาก Nagai, T. และคณะ (2012) ได้สกัดคอลลาเจนที่สกัดด้วยเปปซิน (Pepsin soluble collagen, PSC) จากเอ็นกวาง Yezo sika พบว่าปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ โดยแสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน พบว่ามีอัตราส่วน 2.90:1.09:1 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ Sato, K. และคณะ (2000) พบว่าส่วนเทโลเปปไทด์ในคอลลาเจนจากหนังโคก่อนและหลังการสกัดด้วยเปปซิน มีอัตราส่วนระหว่างไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน ที่ลดลงจาก 7:6:0 เป็น 4:3:0 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ร้อยละโดยโมลของปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) และทรีทด้วยเปปซิน (Pepsin-treaated ASC)

ชนิดของกรดอะมิโน	**ASC**	**Pepsin-treaated ASC**	**PSC จากเอ็นกวาง Nagai, T. และคณะ (2012)**
กรดอะมิโนมีหมู่โซ่ข้างที่ไม่มีขั้วและเป็นอะลิฟาติก			
Alanine, Ala	11.78	11.89	11.5
Glycine, Gly	35.00	36.61	33.2
Valine, Val	2.89	2.96	2.2
Leucine, Leu	2.47	1.90	2.5
Isoleucine, Ile	1.21	1.31	1.1
Methionine, Met	0.63	0.38	0.6
Proline, Pro	12.59	13.14	12.5
กรดอะมิโนมีหมู่โซ่ข้างเป็นอะโรมาติก			
Phenylalanine, Phe	1.82	1.68	1.3
Tyrosine, Tyr	0.73	0.36	0.2
กรดอะมิโนที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ			
Serine, Ser	4.21	4.29	3.1
Threonine, Thr	2.17	2.29	1.9
Cysteine, Cys	-	-	-
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุบวก			
Arginine, Arg	6.01	5.72	5.1
Histidine, His	0.77	0.66	0.4
Lysine, Lys	2.89	2.63	2.4
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุลบ			
Aspartate, Asp	5.79	5.64	4.5
Glutamate, Glu	8.97	8.49	7.2

ง. ความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity)

สารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.3 โดยน้ำหนัก ถูกวัดความหนืดในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 3.28±0.05 (n= 3) การหาความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity) สามารถหาได้จากการสร้างกราฟระหว่าง $\frac{\eta_{sp}}{c}$ กับ c และ $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ กับ c เพื่อพิจารณาค่าความหนืดในตัวของสารละลายจากจุดตัดแกน y โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายที่มีหลายความเข้มข้น โดย η_{rel} หรือความหนืดสัมพัทธ์ (Relative viscosity) หาได้จากระยะเวลาที่สารละลายคอลลาเจนไหลผ่านหลอดคาปิลลารีต่อระยะเวลาที่ตัวทำละลาย (กรดอะซิติก) ไหลผ่านหลอดคาปิลลารี ส่วน η_{sp} หรือความหนืดจำเพาะ (Specific viscosity) หาได้จากค่าความหนืดสัมพัทธ์ลบด้วยหนึ่ง นำค่าทั้งสองไปสร้างกราฟและหาจุดตัดบนแกน y จะได้ความหนืดในตัว โดยมีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อกรัมหรือลิตรต่อกรัม ค่าความหนืดในตัวของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าคอลลาเจน BM มีความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity) 1,802.08±12.08 มิลลิลิตรต่อกรัม คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด มีความหนืดในตัว 1,107.04±13.60 มิลลิลิตรต่อกรัม และคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน มีความหนืดในตัว 1,064±9.17 มิลลิลิตรต่อกรัม ซึ่งมีค่าต่ำที่สุด เนื่องจากคอลลาเจนถูกทรีทด้วยเอนไซม์เปปซินทำให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง ค่าความหนืดในตัวจึงต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด

ความหนืดในตัวของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล (Viscosity-average molecular weight, Mv) ตามสมการของ Mark-Houwink คือ $\eta = kM_v^a$ โดย k และ a เป็นค่าคงที่เฉพาะของแต่ละคู่พอลิเมอร์และตัวทำละลายที่อุณหภูมิหนึ่งๆ (Kahn, L. D. และคณะ 1996) จากผลการวัดความหนืดในตัวของคอลลาเจน BM สูงกว่าคอลลาเจนอีกสองชนิด บ่งบอกถึงคอลลาเจน BM มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า โดยสังเกตได้จากรูปแบบของโปรตีนแถบที่ 1 จากรูปที่ 4.1 คือแถบมีความเข้มมาก แสดงว่ามีปริมาณของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงนั้นเป็นจำนวนมากและยังมีแถบ β ซึ่งเป็นไดเมอร์ของ α ที่มีความเข้มมากด้วย การวัดน้ำหนักโมเลกุลรวมของคอลลาเจนเป็นการวัดจากทุกโมเลกุลในคอลลาเจน ทำให้คอลลาเจน BM มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และเมื่อเปรียบเทียบค่าความหนืดในตัวของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินพบว่า คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีความหนืดในตัวสูงกว่า บ่งบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่า และจากรูปแบบโปรตีนยังปรากฏแถบ β และ α ที่เข้มและไม่มีแถบย่อยเกิดขึ้นทด้านล่างแถบ α อีกด้วย ในขณะที่

แถบของคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีแถบย่อยๆที่อยู่ด้านล่างแถบ α อยู่มาก น้ำหนักโมเลกุลรวมจึงต่ำกว่า

ตารางที่ 4.7 ความหนืดในตัวของคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรด (ASC), ทรีทด้วยเปปซิน (Pepsin-treaated ASC) และคอลลาเจน BM ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.28±0.05 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชนิดของคอลลาเจน	ค่าความหนืดในตัว (มิลลิลิตรต่อกรัม)
ASC	1,107.04±13.60[a]
Pepsin-treaated ASC	1,064.96±9.17[b]
คอลลาเจน BM	1,802.08±12.08[c]

(a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

จากการศึกษาของ Oechsle, A. M. และคณะ (2016) ซึ่งได้ทำการศึกษาความหนืดในตัวของสารละลายคอลลาเจนจากหนังและกระดูกไก่ ที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 กรัมต่อลิตร มีความหนืดในตัว 0.31 และ 0.13 ลิตรต่อกรัม ตามลำดับ โดยคำนวณจากสมการ Huggins และเมื่อคำนวณด้วยสมการ Kraemer พบว่ามีค่าความหนืดในตัว 0.28 และ 0.13 ลิตรต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนจากโคที่มีเทโลเปปไทด์ต่ำ (Telopeptide-poor collagen) มีค่าความหนืดในตัวเมื่อคำนวณด้วยสมการ Huggins และ Kraemer เป็น 3.26 และ 3.16 ลิตรต่อกรัม ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากแหล่งที่มาของคอลลาเจน การสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน อุณหภูมิ พีเอช และบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่าง ซึ่งทำให้ค่าความหนืดในตัวแตกต่างกัน นอกจากนี้ Kahn, L. D. และคณะ (1966) ได้ศึกษาความหนืดในตัวของสารละลายคอลลาเจนจากหนังลูกวัวในซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.44 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารละลายคอลลาเจนมีพฤติกรรมการไหลแบบนิวโตเนียนคือของไหลมีกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นเฉือนและอัตราเฉือนเป็นเส้นตรง เมื่อนำสารละลายคอลลาเจนจากหนังลูกวัวไปหาค่าความหนืดในตัวที่สภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่าความหนืดในตัว 2.7 ลิตรต่อกรัม เมื่อเทียบกับคอลลาเจนที่

สกัดในงานวิจัยนี้พบว่าค่าความหนืดในตัวที่ได้มีค่าต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพีเอชและตัวทำละลายที่ใช้แตกต่างกัน

จ. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry คือโปรตีนในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับคูปริคไอออน (Cupric : Cu^{2+}) ของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในสภาวะที่เป็นด่าง ที่สภาวะนี้คูปริคไอออนได้รับอิเล็กตรอน 1 ตัว เกิดเป็นคูปรัสไอออน (Cuprous : Cu^{1+}) โดยคูปรัสไอออนที่เกิดขึ้นมีความสามารถในการจับกับหมู่เอมีนของโปรตีน การวัดปริมาณโปรตีนนั้นเพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สกัดได้เทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานคือสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และสารละลายคอลลาเจนในกรดอะซิติกที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน, คอลลาเจน BM และคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค (Sigma) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก หรือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 4.8 (n=3)

ตารางที่ 4.8 ร้อยละปริมาณโปรตีนในสารละลายคอลลาเจน (โดยน้ำหนัก) จากการวัดด้วยวิธี Lowry โดยใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ชนิดของคอลลาเจน	**ร้อยละปริมาณโปรตีน**
คอลลาเจน BM	88.75 ± 1.02^{a}
ASC	51.46 ± 1.41^{b}
Pepsin-treaated ASC	59.60 ± 1.69^{b}
คอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค (Sigma)	48.85 ± 9.88^{b}

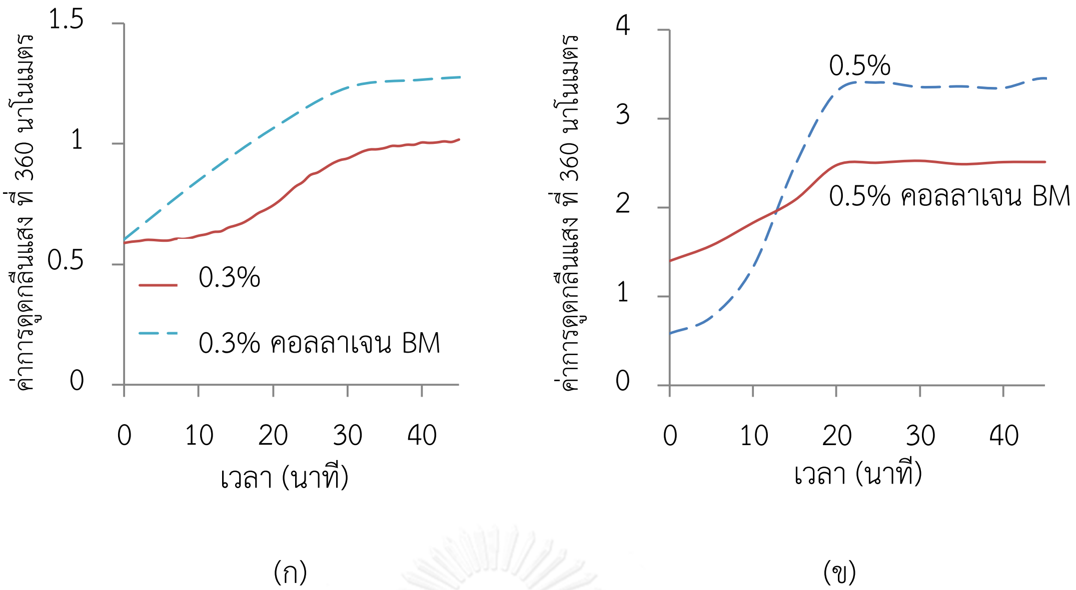
(a,b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนแต่ละชนิด พบว่า คอลลาเจน BM และคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 88.75±1.02 และ 48.85±9.88 ตามลำดับ โดย

คอลลาเจน BM นั้นมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ส่วนคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน มีปริมาณโปรตีน 51.46±1.41 และ 59.60±1.69 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโคและคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry อาจมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากการใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดย BSA มีโครงสร้างเป็นทรงกลม (Globular protein) ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างของคอลลาเจนที่เป็น Triple helices คาดว่าความสามารถในการจับระหว่างคู่ปรัสไอออนกับหมู่เอมีนของ BSA สูงกว่าในคอลลาเจน การวัดปริมาณโปรตีนจึงอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford แต่ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากคอลลาเจนตกตะกอน จากการรายงานของ Fauzi, M.B. และคณะ (2016) ได้ทำการวัดโปรตีนด้วยวิธี BCA เทียบกับ Collagen Sircol assay พบว่าปริมาณคอลลาเจนจากเอ็นแกะมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณโปรตีน คือ 1.2 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาณโปรตีน นอกจากการวัดปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนแล้วการวัดปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนก็สามารถทำได้เช่นกันเนื่องจากปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในคอลลาเจนมีอยู่ประมาณร้อยละ 10

ฉ. การเกิดเจลของคอลลาเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.4

การเกิดเจลเป็นคุณสมบัติหนึ่งของคอลลาเจน โดยโมเลกุลของคอลลาเจนมีโครงสร้างที่รวมตัวกับน้ำได้ดีจึงกลายเป็นเจล การเกิดเจลของคอลลาเจนนั้น Wallace, D.G. และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาโดยการปรับพีเอชและความแรงไอออน (physiological ionic strength) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1ชั่วโมง คอลลาเจนจะกลายเป็นเจล โดยเรียกเจลนี้ว่า Heat gel คอลลาเจนเมื่อกลายเป็นเจล สีจะขุ่นขึ้นทำให้สามารถวัดการเกิดเจลได้จากการวัดความขุ่น การวัดการเกิดเจลโดยใช้สารละลายคอลลาเจน ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 โดยน้ำหนัก ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมกับ PBS ความเข้มข้น 10 เท่า โดยใช้อัตราส่วนสารละลายคอลลาเจนต่อ PBS เป็น 8:1 ปรับค่าพีเอชเป็น 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงได้ค่าดังแสดงในรูปที่ 4.3 และเวลาในการแจลแสดงในตารางที่ 4.9 (n=3)



รูปที่ 4.3 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอลลาเจนและคอลลาเจน BM ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 (ข) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.9 เวลาในการเกิดเจลของสารละลายคอลลาเจน พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยนำรูปที่ 4.3 มาคำนวณจากเวลาครึ่งหนึ่งของค่าการดูดกลืนสูงสุดลบค่าการกลืนแสงต่ำสุด

ร้อยละความเข้มข้นของคอลลาเจน	เวลาในการเกิดเจล (นาที)
0.3	26.33±0.29[a]
0.5	13.90±1.02[b]
คอลลาเจน BM ความเข้มข้นร้อยละ 0.3	14.17±1.44[b]
คอลลาเจน BM ความเข้มข้นร้อยละ 0.5	13.67±1.26[b]

(a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

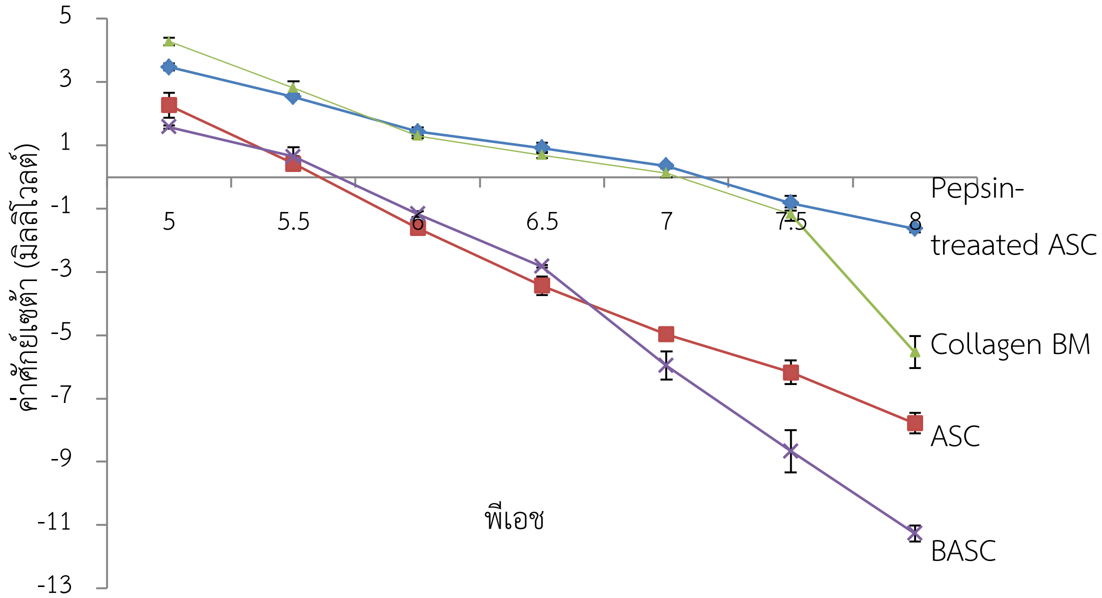
เวลาในการเกิดเจลบ่งบอกถึงความสามารถในการเชื่อมต่อกันของสายโซ่พอลิเมอร์ โดยคำนวณจากครึ่งหนึ่งของเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สารละลายคอลลาเจนเกิดเจลเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย โดยสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 1 โดยน้ำหนัก ใช้เวลาในการเกิดเจล 26.33±0.29 และ 13.09±1.02 นาที ตามลำดับ และคอลลาเจน BM ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 ใช้เวลาในการเกิดเจล 14.17±1.44 และ

13.67±1.26 นาที ตามลำดับ จากรายงานของ Suzuki, Y. และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการเกิดเจลของคอลลาเจนโดยใช้สารละลายคอลลาเจนจากหนัง (ASC) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ PBS ความเข้มข้น 3 เท่า ปรับค่าพีเอชเป็น 7 แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 หรือ 30 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 หรือ 520 นาโนเมตร จะเกิดเจลในเวลาประมาณ 15 นาที และเมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายและคอลลาเจน BM พบว่าใช้เวลาในการเกิดเจลใกล้เคียงกันแต่คอลลาเจนจากหนังใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าแสดงว่ามีความสามารถในการเชื่อมต่อกันของสายโซ่พอลิเมอร์ได้เร็วกว่า การเกิดเจลของคอลลาเจนเกิดจากโมเลกุลคอลลาเจนรวมตัวกันและเชื่อมต่อกันเป็นโครงร่างสามมิติ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเจลได้แก่ ความแรงไอออน (ionic strengt) พีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น การเกิดเจลของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 จะเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 องศาเซลเซียส เป็น 28 องศาเซลเซียส และหากลดอุณหภูมิลงเจลคอลลาเจนจะกลายเป็นสารละลาย (Gómez-Guillén, M. C. และคณะ 2011)

ช. ค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจน

การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 5-8 (n=3) ค่าศักย์เซต้าเป็นความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ ค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจนที่พีเอชต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.4 โดยค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจนลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น และจะมีประจุบวกหรือลบสุทธิสูงหรือต่ำกว่าจุดที่ค่าศักย์เซต้ามีค่าเท่ากับศูนย์ ซึ่งจุดที่ค่าศักย์เซต้ามีค่าเท่ากับศูนย์หรือจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point, IEP) ของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีค่าพีเอชประมาณ 5.61±0.02 สารละลายคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีค่าพีเอชประมาณ 7.15±0.03 ส่วนสารละลายคอลลาเจน BM และสารละลายคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโคที่สกัดด้วยกรดซึ่งเป็นสารละลายคอลลาเจนทางการค้า มีค่าพีเอชประมาณ 7.04±0.04 และ 5.66±0.06 ตามลำดับ คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีจุดไอโซอิเล็กทริกที่ต่ำกว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินเนื่องจากส่วนเทโทเปปไทด์ถูกกำจัดออกไปด้วยเปปซิน การเปลี่ยนแปลงค่าศักย์เซต้าหรือค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายจะขึ้นอยู่กับความสมดุลของประจุลบและประจุบวก การปรับค่าด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเพื่อให้พีเอชต่ำลงนั้น โมเลกุลของไฮโดรคลอริคจะแตกตัวให้ประจุบวก ทำให้ค่าประจุทางไฟฟ้ามีค่าเป็นบวกเมื่อพีเอชต่ำลง และเมื่อปรับค่าพีเอชให้

สูงขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โมเลกุลจะแตกตัวให้ประจุลบ ค่าประจุทางไฟฟ้าจึงมีค่าเป็นบวก



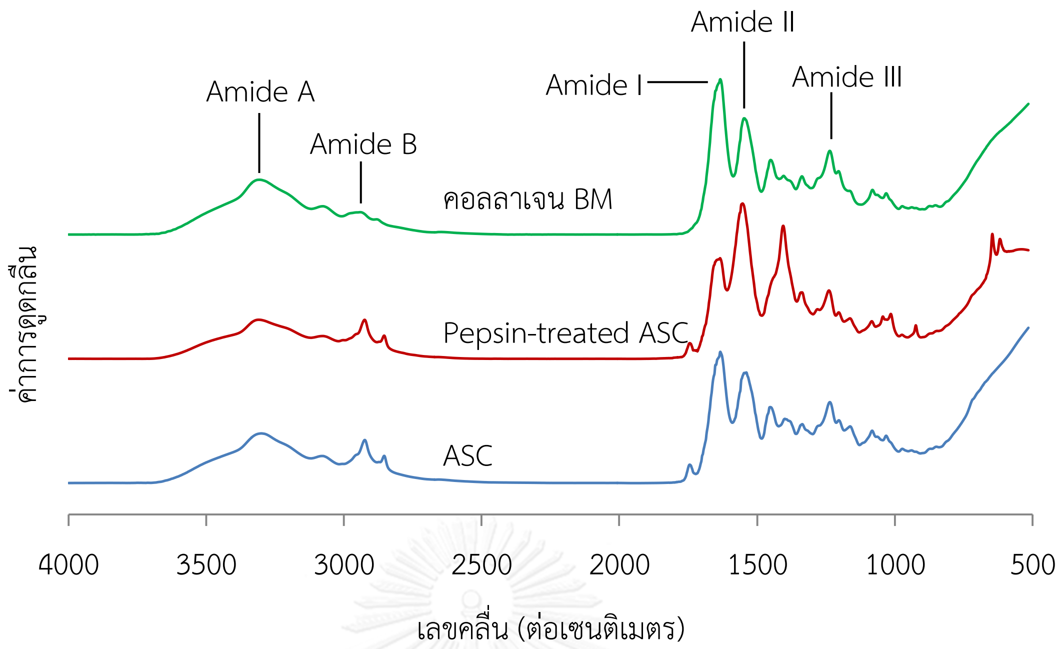
รูปที่ 4.4 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจน ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่พีเอชต่างๆ

*BASC : Acid soluble collagen from bovine achilles tendon, Sigma-Aldrich

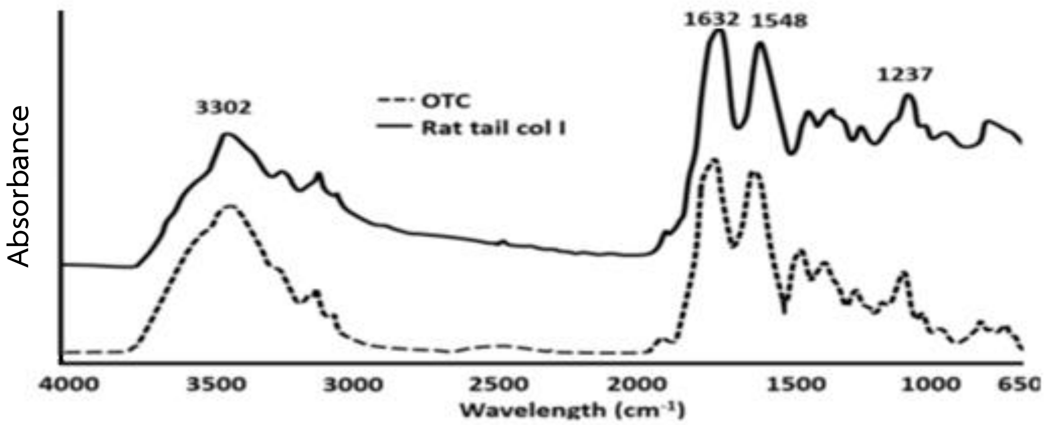
จากการศึกษาของ Oechsle, A. M. และคณะ (2016) พบว่าสารละลายคอลลาเจนจากโคที่มีเทโลเปปไทด์ต่ำ (Telopeptide-poor collagen) มีจุดไอโซอิเล็กทริกที่ค่าพีเอชประมาณ 4.62±0.07 ส่วนสารละลายคอลลาเจนจากกระดูกและหนังไก่ มีจุดไอโซอิเล็กทริกที่ค่าพีเอชประมาณ 5.09±0.09 และ 6.54±0.32 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากแหล่งที่มาและวิธีการสกัดคอลลาเจนที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยนี้คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีจุดไอโซอิเล็กทริกต่ำกว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินเนื่องจากกรดอะมิโนที่มีประจุลบ เช่น แอสพาเตท กลูตาเมท ที่พบบริเวณเทโลเปปไทด์และเมื่อถูกกำจัดออกไปด้วยเปปซิน ประจุลบจึงลดลง จุดไอโซอิเล็กทริกจึงสูงขึ้น โดยปริมาณของกรดอะมิโนที่มีประจุลบในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด ร้อยละ 14.76 และลดลงเหลือ 14.13 ในคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน

ซ. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR) เพื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM โดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แสดงดังในรูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนของคอลลาเจนทั้งสามชนิดปรากฏพีคการดูดกลืนหลัก 5 ตำแหน่ง คือ เอไมด์ A, เอไมด์ B, เอไมด์ I, เอไมด์ II, และ เอไมด์ III ตำแหน่งเอไมด์ A ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 3300, 3309, และ 3307 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ A เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง N-H หากตำแหน่งนี้ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน (free N-H) จะปรากฏพีคการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น 3400-3440 ต่อเซนติเมตร และถ้าตำแหน่ง N-H เกิดพันธะไฮโดรเจนจะเกิดพีคการดูดกลืนที่เลขคลื่นต่ำลงที่ประมาณ 3300 ต่อเซนติเมตร ตำแหน่งเอไมด์ B ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 2924, 2925, และ 2941 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ B เกี่ยวข้องกับการยืดตัวแบบไม่สมมาตรของ CH_2 ตำแหน่งเอไมด์ I ของคอลลาเจนสกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 1634 ต่อเซนติเมตร โดยเอไมด์ I มาจากการสั่นสะเทือนจากการยืดตัวของ C=O และการหดตัวของ N-H ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจน คือ แอลฟาฮีลิกซ์ ตำแหน่งเอไมด์ II ของคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 1539, 1553, และ 1547 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ II เกี่ยวข้องกับการงอของ N-H และการยืดตัวของ C-N และตำแหน่งเอไมด์ III ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 1235, 1239, และ 1236 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ III เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของ N-H และ C-N ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน โดยตำแหน่งพีคการดูดกลืนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ดังแสดงในตารางที่ 4.10



(ก)



(ข) (Fauzi, M. B. และคณะ 2016)

รูปที่ 4.5 (ก) สเปกตรัมการดูดกลืนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, ทรีทด้วยเปปซินและคอลลาเจน BM ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (ข) สเปกตรัมการดูดกลืนของคอลลาเจนจากเอ็นแกะและเอ็นหางหนู

ตารางที่ 4.10 ตำแหน่งพีคการดูดกลืนของคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรด (ASC), ทรีทด้วยเปปซิน (pepsin-treated ASC) และคอลลาเจน BM

การดูดกลืน	เลขคลื่น (ต่อเซนติเมตร)			หมู่ฟังก์ชัน
	คอลลาเจน BM	ASC	Pepsin-treated ASC	
เอไมด์ A	3307	3300	3309	การยืดตัวของ N-H
เอไมด์ B	2941	2924	2925	การยืดตัวแบบไม่สมมาตรของ CH_2
เอไมด์ I	1634	1634	1634	การยืดตัวของ C=O และการหดตัวของ N-H
เอไมด์ II	1547	1539	1553	การงอของ N-H และการยืดตัวของ C-N
เอไมด์ III	1236	1235	1239	การงอของ N-H และการยืดตัวของ C-N
Pyrrolidine ring	1451	1452	1405	วงแหวนของโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน

Nagai, T. และคณะ (2011) รายงานว่าคอลลาเจนจากเอ็นกวาง Yezo Sika ที่สกัดด้วยเปปซิน มีพีคการดูดกลืนของตำแหน่งเอไมด์ A, B, I, II, และ III ที่เลขคลื่น 3306, 2964, 1640, 1541 และ 1235 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยมีแอลฟาฮีลิกซ์, เบต้าชีท, เบต้าเทิร์นและอื่นๆร้อยละ 15, 33, 22 และ 24 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาของ Fauzi, M.B. และคณะ (2016) รายงานว่าคอลลาเจนจากเอ็นแกะมีพีคการดูดกลืนของตำแหน่งเอไมด์ A, B, I, II, และ III ที่เลขคลื่น 3302, 2923, 1632, 1548 และ 1237 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีพีคการดูดกลืนใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากเอ็นหางหนู ดังแสดงในรูป 4.6 (ข) และการศึกษาของ Silva Junior, Z. S. และคณะ (2015) รายงานว่าอัตราส่วนการดูดกลืนระหว่างตำแหน่งเอไมด์ III กับพีคที่เลขคลื่น 1450 ต่อเซนติเมตร (วงแหวน pyrrolidine ของโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน) ของคอลลาเจน มีค่าประมาณ 1.03±0.01 หมายถึงคอลลาเจนมีโครงสร้างเป็น Triple Helix ผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด ,ตัดด้วยเปปซิน และคอลลาเจน BM พบว่าอัตราส่วนการดูดกลืนระหว่างตำแหน่งเอไมด์ III กับพีคของวงแหวน pyrrolidine มีค่าเท่ากับ 1.07, 0.51 และ 0.89 ตามลำดับ พีคของวงแหวน pyrrolidine ที่สูง

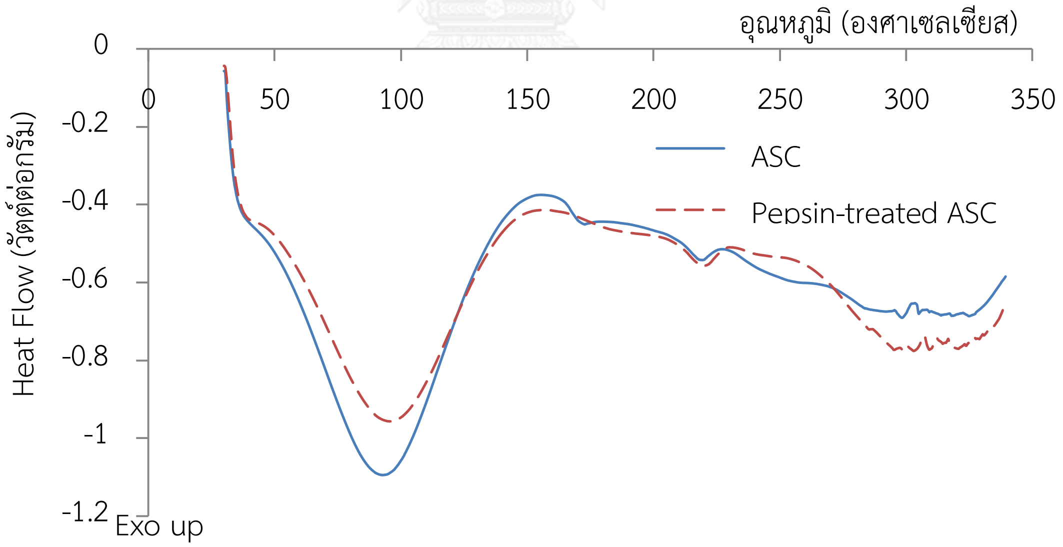
บ่งบอกถึงปริมาณโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนที่สูงด้วย จากอัตราส่วนการดูดซับระหว่างตำแหน่งเอไมด์ III กับพีคของวงแหวน pyrrolidine ในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีค่าเท่ากับ 1.07 แสดงว่าโครงสร้างของคอลลาเจนยังเป็น Triple helices โดยอัตราส่วนนี้มีค่าลดลงในคอลลาเจน BM และคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีค่าต่ำสุด แสดงว่าโครงสร้าง Triple helices ถูกทำลายไปบางส่วน ซึ่งสอดคล้องกับอัตราส่วนของไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน ในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน เท่ากับ 2.97:1.07:1 และ 3.08:1.11:1 พบว่าปริมาณโพรลีนในคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น

ฌ. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) และ Thermogravimetric analysis (TGA)

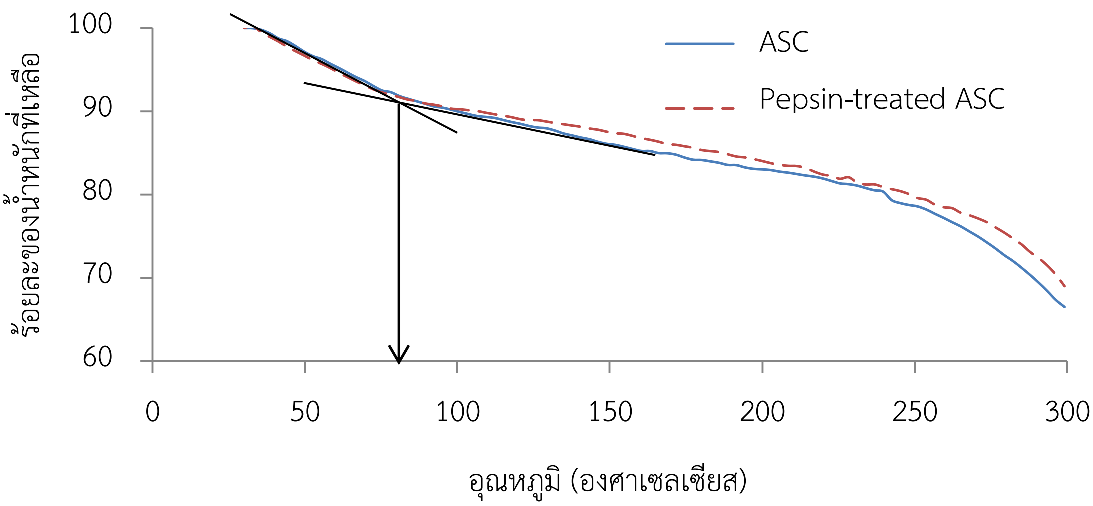
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อนด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน ดังแสดงในรูป 4.6 เมื่อพิจารณาเทอร์โมแกรม DSC ในช่วงอุณหภูมิ 30-150 องศาเซลเซียส จะพบ Endothermic peak หรือการเปลี่ยนแปลงแบบดูดพลังงาน โดยค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์ Endothermic ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน เท่ากับ 92.63 และ 97.50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับการเสียสภาพของโครงสร้างคอลลาเจนจาก Triple helices เป็น random coil การเสียสภาพของคอลลาเจนเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนโดยการให้ความร้อนทำให้เกิดพีคที่ใหญ่และกว้าง เนื่องจากต้องใช้พลังงานจำนวนมากในการสลายพันธะไฮโดรเจนและแรงวันเดอร์วาลในโครงสร้างของคอลลาเจน (Uskoković, V. และคณะ 2003) โดยอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อนด้วยวิธี Thermogravimetric analysis (TGA) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน ดังแสดงในรูป 4.7 TGA เป็นการวิเคราะห์ความเสถียรของวัสดุเมื่อได้รับความร้อน โดยการวัดน้ำหนักของวัสดุที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงอุณหภูมิด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง จากเทอร์โมแกรมของ TGA น้ำหนักของคอลลาเจนที่ลดลงประมาณร้อยละ 10 เกิดจากการสลายพันธะของโมเลกุลน้ำชนิด bound water โดยเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 75.33 และ 72.50 องศาเซลเซียส ในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน ซึ่งเป็นอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนด้วยวิธี TGA (Uskoković, V. และคณะ 2003)

แม้ว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีน้ำหนักโมกุลที่ลดลง แต่เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนแล้วอุณหภูมิในการเสียสภาพไม่ได้ลดลงตามน้ำหนักโมเลกุล เนื่องจากปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนและโพรลีน หรือเรียกรวมกันว่ากรดอิมิโน มีสัดส่วนสูงขึ้นโดยสังเกตได้จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR จะมีพีคการดูดกลืนของโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนที่เกิดขึ้นชัดเจนและสูงกว่าพีคของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนยังพบว่ามีคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นด้วย จากการศึกษาของ Ikoma, T. และคณะ (2003) พบว่ากรดอะมิโนสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในการเสียสภาพ หากคอลลาเจนมีปริมาณกรดอิมิโนต่ำทำให้อุณหภูมิในเสียสภาพต่ำกว่าคอลลาเจนที่มีกรดอิมิโนสูง ดังตัวอย่างเช่นในสัตว์น้ำและในสัตว์บกจะมีปริมาณกรดอิมิโนสูง ส่งผลให้อุณหภูมิในการเสียสภาพสูง โดยปริมาณกรดอิมิโนและความเสถียรต่อความร้อนของคอลลาเจนในสัตว์ชนิดต่างๆนั้น มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ปริมาณโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนในพันธะเชื่อมในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุล (Intra and intermolecular crosslinking) จะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิการเสียสภาพ



รูปที่ 4.6 เทอร์โมแกรม DSC ของคอลลาเจนจที่สกัดด้วยกรดและทรีทเปปซิน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) ในช่วงอุณหภูมิ 30-340 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 100 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.7 เทอร์โมแกรม TGA ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทเปปซิน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Thermogravimetric analysis (TGA) ในช่วงอุณหภูมิ 30-300 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 100 มิลลิลิตรต่อนาที

(Bozec, L. และคณะ 2011) ได้ทำการศึกษาการเสียสภาพด้วยความร้อน (Thermal Denaturation) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดจากเอ็นหางหนูที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่ามีอุณหภูมิในการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 65±10 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้

การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดที่เวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมงได้ร้อยละผลได้มากที่สุด จึงเลือกคอลลาเจนจากการสกัดในสภาวะนี้ไปทรีทด้วยเปปซินด้วยอัตราส่วนของเปปซินต่อคอลลาเจน 1:10, 1:30 และ 1:50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มเวลา อุณหภูมิและปริมาณเปปซิน จะทำให้ร้อยละผลได้ลดลง โดยร้อยละผลได้อยู่ในช่วง 68-74 เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1:50 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีแถบ $\alpha1$, $\alpha2$ และ β ซึ่งเป็นโครงสร้าง Triple helices ในคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ซึ่งคล้ายคลึงกับคอลลาเจนเชิงพาณิชย์ที่นำมาเปรียบเทียบมากที่สุด และมีน้ำหนักโมเลกุลลดลงจากการตัดเทโลเปปไทด์ ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน พบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินมีอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันคือ 2.97:1.07:1 และ 3.08:1.11:1 ตามลำดับ การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีพบว่าหากค่าอัตราส่วนการดูดกลืนระหว่าง

ตำแหน่งเอไมด์ III กับพีคของวงแหวน pyrrolidine (ในโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน) มีค่าประมาณ 1 คอลลาเจนยังมีโครงสร้างเป็น Triple Helix และผลจากการวิเคราะห์พบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน มีค่าอัตราส่วนนี้เป็น 1.07 และ 0.51 ตามลำดับ แสดงว่าโครงสร้างของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดยังเป็น Triple helices แต่ในคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีค่าลดลง แสดงว่า Triple helices ถูกทำลายไปบางส่วน จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point, IEP) ของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีค่าพีเอชประมาณ 5.61±0.02 และเพิ่มขึ้นเป็น 7.15±0.03 ในสารละลายคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน

4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของไฟโบรอินไหมไทย

ก. ปริมาณกาวไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์

เมื่อนำเส้นไหมที่ผ่านการสาวด้วยมือและรังไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ไปผ่านกระบวนการกำจัดกาวไหม พบว่าร้อยละโดยน้ำหนักของกาวไหมจากรังไหมมีปริมาณที่สูงกว่ากาวไหมในเส้นไหม ดังแสดงในตารางที่ 4.11 โดยรังไหมมีร้อยละโดยน้ำหนักของกาวไหม 29.05±0.07 และเส้นไหมมีร้อยละโดยน้ำหนักของกาวไหม 23.19±0.31 เนื่องจากเส้นไหมที่ผ่านการสาวด้วยมือด้วยการต้มด้วยน้ำร้อน ทำให้กาวไหมบางส่วนถูกกำจัดออกไป ร้อยละโดยน้ำหนักของกาวไหมจึงน้อยกว่า เนื่องจากได้รับเส้นไหมมาเป็นจำนวนมากและกาวไหมบางส่วนถูกกำจัดออกไปแล้ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกเส้นไหมไปใช้ในการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมต่อไป

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักไหมก่อนและหลังการกำจัดกาวไหมและร้อยละโดยน้ำหนักของกาวไหม

	เส้นไหม (สาวแล้ว) (n=25)	**รังไหม (n=4)**
น้ำหนักไหมก่อนกำจัดกาวไหม (กรัม)	40.04±0.05	40.01±0.01
น้ำหนักไหมหลังกำจัดกาวไหม (กรัม)	30.75±0.33	28.38±0.07
ร้อยละโดยน้ำหนักของกาวไหม	23.19±0.31	29.05±0.07

ข. ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอินไหม

การวิเคราะห์หาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอินไหม ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ด้วยข้อจำกัดในการวิเคราะห์จึงมีการทำซ้ำเพียงครั้งเดียว โดยปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอินไหม ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 (Kaewprasit, K. และคณะ 2014) ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังแสดงในตารางที่ 4.12 ไฟโบรอินไหมประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 18 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ชนิด คือ ไกลซีน อะลานีน ซีรีนและไทโรซีน โดยในไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ พบว่ามี ไกลซีน ร้อยละ 47.82, อะลานีน ร้อยละ 28.32, ซีรีน ร้อยละ 11.02, ไทโรซีน ร้อยละ 4.76 และกรดอะมิโนชนิดอื่นๆร้อยละ 8.08 เมื่อเปรียบเทียบกับไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ซึ่งเป็นไหมสายพันธุ์ไทยแท้ พบว่าปริมาณของกรดอะมิโนชนิดอะลานีนและไกลซีนสูงกว่า ส่วนปริมาณของกรดอะมิโนชนิดซีรีนและไทโรซีนต่ำกว่า เมื่อพิจารณาปริมาณของกรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำและมีความไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินไหมทั้งสองชนิดพบว่า ไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีปริมาณกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำร้อยละ 84.83 (โดยโมล) และปริมาณกรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำร้อยละ 15.18 (โดยโมล) ตามลำดับ ส่วนไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 มีปริมาณกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำร้อยละ 81.67 (โดยโมล) และปริมาณกรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำร้อยละ 18.33 (โดยโมล) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.12 ร้อยละโดยโมลปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1

ชนิดของกรดอะมิโน	**ร้อยละโดยโมล**	
	พันธุ์เหลืองไพโรจน์	**พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 (Kaewprasit, K. และคณะ 2014)**
กรดอะมิโนมีหมู่โซ่ข้างที่ไม่มีขั้วและเป็นอะลิฟาติก		
Alanine, Ala	28.32	34.29
Glycine, Gly	47.82	38.32
Isoleucine, Ile	0.43	0.20
Leucine, Leu	0.37	0.27
Methionine, Met	0.04	0.08
Proline, Pro	0.37	0.42
Valin, Val	1.99	1.15
กรดอะมิโนมีหมู่โซ่ข้างเป็นอะโรมาติก		
Phenylalanine, Phe	0.55	0.98
Tyrosine, Try	4.76	5.75
Tryptophan, Trp	0.18	0.21
กรดอะมิโนที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ		
Serine, Ser	11.02	13.42
Threonine, Thr	0.84	0.80
Cysteine, Cys	0.00	0.00
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุบวก		
Arginine, Arg	0.37	0.30
Histidine, His	0.23	0.83
Lysine, Lys	0.23	0.20
กรดอะมิโนที่มีขั้วและมีประจุลบ		
Aspartic acid, Asp	1.46	1.63
Glutamic acid, Glu	1.03	1.15

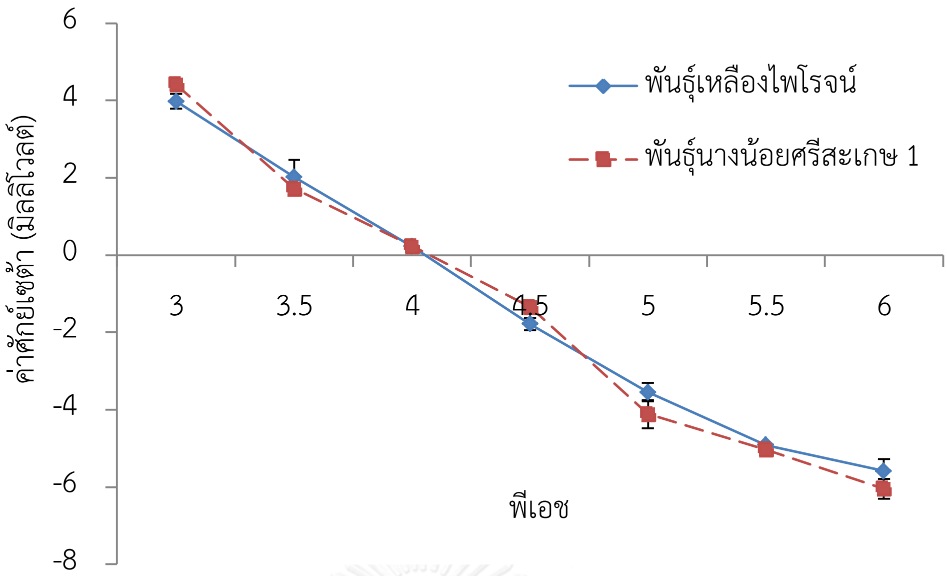
Goto, Y. และคณะ (1990) ได้ศึกษาปริมาณและองค์ประกอบกรดอะมิโมของไฟโบรอินไหมด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography) พบว่าไฟโบรอินไหมที่เตรียมด้วยตัวทำละลายลิเธียมไธโอไซยาเนต (Lithium thiocyanate, LiSCN) ในสภาวะแตกต่างกันมีปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Tsukada, M. และคณะ (1990) พบว่าไฟโบรอินไหมที่เตรียมด้วยตัวทำละลายลิเธียมโบรไมด์ในสภาวะแตกต่างกันมีปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนไม่แตกต่างกัน ส่วน Furuhata, K. และคณะ (1994) ทำการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมด้วยสารละลายเอ็น,เอ็น-ไดเมทิลอะเซตาไมด์ (N,N-dimethyacetamide, DMA) และตัวทำละลายลิเธียมคลอไรด์ (Lithium chloride, LiCl) โดยนำตะกอนไฟโบรอินไหมน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric, HCl) ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้สารละลายดังกล่าวแห้ง และนำตะกอนนั้นมาละลายซ้ำด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลายลิเธียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (Lithium citrate buffer) พีเอช 3.5 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ที่มี Lithium-type cation-exchange resin เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) และสารละลายลิเธียมซิเตรตบัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) พบว่าปริมาณและองค์ประกอบกรดอะมิโนของตะกอนไฟโบรอินไหมทั้งสองส่วนแตกต่างกันเล็กน้อย โดยตะกอนไฟโบรอินจากรังไหมส่วนที่สามารถละลายด้วยตัวทำละลายดังกล่าวมีปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำมากกว่าตะกอนไฟโบรอินจากรังไหมส่วนที่ไม่สามารถละลายด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ชนิด คือ ไกลซีน อะลานีน ซีรีนและไทโรซีน พบว่าไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ มีอัตราส่วน 10:6:2:1 ส่วนไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 มีอัตราส่วน 7:6:2:1 เมื่อเทียบกับไฟโบรอินไหม *Bombyx mori* จากไหมในเขตอบอุ่น Suzuki, Y. (1997) ได้ทำการศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในไฟโบรอินไหมจากประเทศญี่ปุ่นพบว่าอัตราส่วน ไกลซีน อะลานีน ซีรีนและไทโรซีน เป็น 9:6:2:1 ซึ่งใกล้เคียงกับไฟโบรอินจากไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ เนื่องจากไหมพันธุ์เหลืองเป็นไหมพันธุ์ลูกผสมจากพันธ์ไทยและพันธุ์ญี่ปุ่น ทำให้มีความคล้ายคลึงกันในองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มาจากไหมพันธุ์ญี่ปุ่น นอกจากนี้ไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีไกลซีนสูงกว่าไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยไกลซีนนั้น

เป็นกรดอะมิโนที่เล็กที่สุดเมื่ออยู่ในโครงสร้างของไฟโบรอินไหม จะเกิดการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ชิดกันมากขึ้น โครงสร้างของไฟโบรอินไหมจึงมีความแข็งแรงสูง

ค. ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหม

การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในน้ำปราศจากประจุ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 3-6 โดยปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (n=3) โดยค่าศักย์เซต้าเป็นความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมแสดงในรูปที่ 4.8 โดยค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น จุดที่ค่าศักย์เซต้ามีค่าเท่ากับศูนย์หรือจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point, IEP) ของสารละลายไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีค่าพีเอชประมาณ 4.04±0.02 ส่วนสารละลายไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 มีค่าพีเอชประมาณ 4.06±0.01 ความแตกต่างของประจุไฟฟ้าหรือศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมขึ้นอยู่กับความสมดุลของประจุบวกและประจุลบที่อยู่ในโมเลกุล การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินไหมโดยการปรับพีเอชให้ต่ำลงด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งจะแตกตัวให้โปรตอนที่แสดงประจุบวก ค่าศักย์เซต้าเมื่อพีเอชต่ำลงจึงมีค่าบวก และเมื่อปรับค่าพีเอชให้สูงขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะแตกตัวได้ประจุลบจากหมู่ไฮดรอกซิลส่งผลให้ค่าศักย์เซต้าที่พีเอชสูงจึงมีค่าเป็นลบ สารละลายไฟโบรอินมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุลบ คือ กรดแอสพาติคและกรดกลูตามิค สูงกว่ากรดที่มีประจุบวก ทำให้จุดไอโซอิเล็กทริกเป็นกรดด้วย

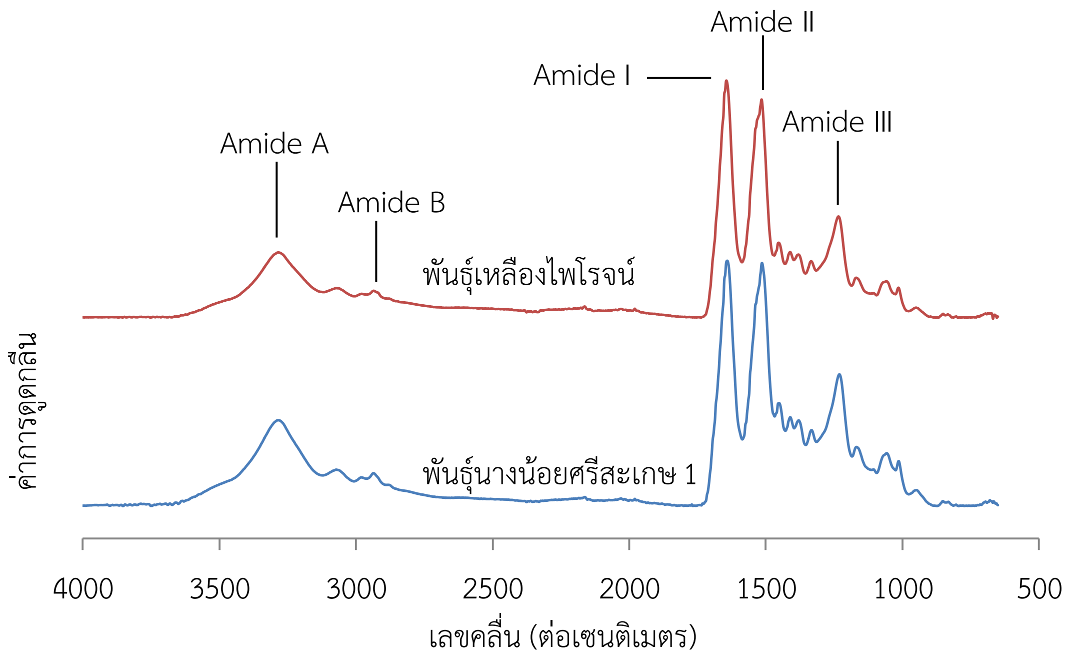


รูปที่ 4.8 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่พีเอชต่างๆ

จากการศึกษาของ Ayub, Z.H. และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาจุดไอโซอิเล็กทริกของสารละลายไฟโบรอินไหม ซึ่งเป็นไหมจากประเทศญี่ปุ่น โดยการนำสารละลายไฟโบรอินไหม ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก พีเอช 7.6-7.9 มาปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีค่าพีเอช 1.5-13 แล้วทิ้งให้สารละลายที่ได้กลายเป็นเจลที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 56-64 พบว่าสารละลายไฟโบรอินไหมที่พีเอชในช่วงดังกล่าวตกตะกอน โดยสารละลายไฟโบรอินไหมตกตะกอนที่พีเอช 3.8-3.9 แสดงให้เห็นว่าสารละลายไฟโบรอินไหมมีจุดไอโซอิเล็กทริกที่พีเอชนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Malay, O. และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาจุดไอโซอิเล็กทริกของสารละลายไฟโบรอินไหมจากประเทศตุรกี โดยนำสารละลายไฟโบรอินไหมที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, KCl) ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ นำไปวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าสารละลายไฟโบรอินไหมที่พีเอช 3.8-4.2 มีค่าประจุทางไฟฟ้าเท่ากับศูนย์ ซึ่งเป็นจุดไอโซอิเล็กทริกของสารละลายดังกล่าว

ง. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR) เพื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แสดงดังรูปที่ 4.9 สเปกตรัมการดูดกลืนของไฟโบรอินไหมทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีตำแหน่งเอไมด์ I ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 1644 และ 1641 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ I มาจากการสั่นสะเทือนจากการยืดตัวของ C=O และการหดตัวของ N-H ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินไหม คือ random coil ตำแหน่งเอไมด์ II ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 1515 และ 1514 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ II เกี่ยวข้องกับการงอของ N-H และการยืดตัวของ C-N ที่มีโครงสร้างแบบเบต้าชีท และตำแหน่งเอไมด์ III ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ปรากฏพีคที่เลขคลื่น 1234 และ 1230 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยเอไมด์ III เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของ N-H และ C-N ซึ่งแสดงถึงโครงสร้าง random coil จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าไม่พบความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันจากไฟโบรอินไหมทั้งสองชนิด โดยตำแหน่งพีคการดูดกลืนของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 แสดงดังตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.9 สเปกตรัมการดูดกลืนของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี

ตารางที่ 4.13 ตำแหน่งพีคการดูดกลืนของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1

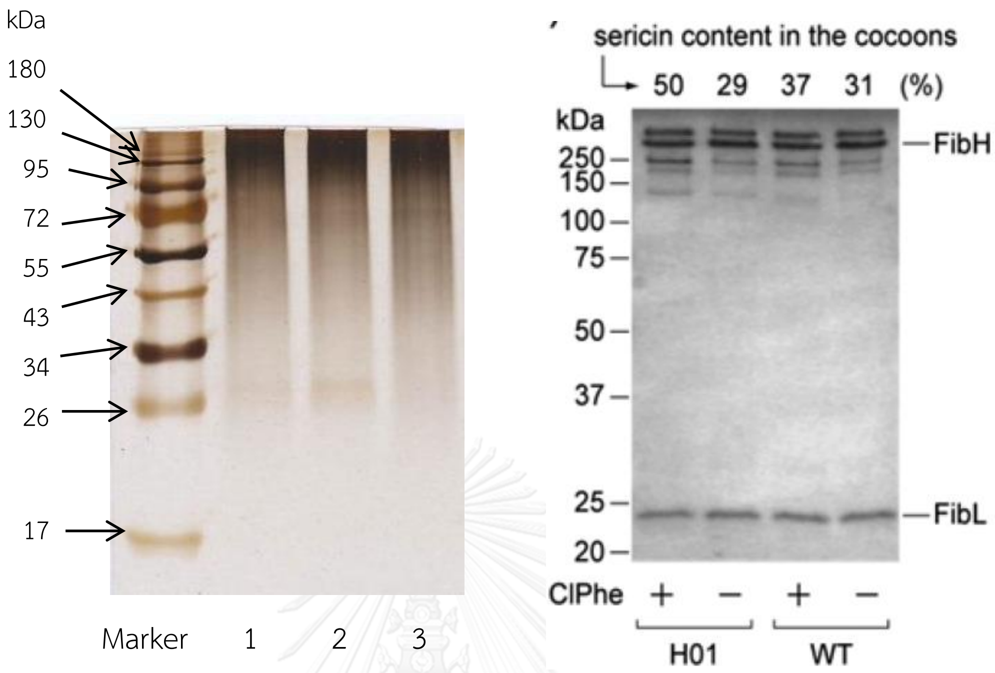
การดูดกลืน	**เลขคลื่น (ต่อเซนติเมตร)**			**หมู่ฟังก์ชัน**
	Bombyx mori (Silva, R. และคณะ 2016)	**พันธุ์เหลืองไพโรจน์**	**พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1**	
เอไมด์ I	1640	1644	1641	การยืดตัวของ C=O และการหดตัวของ N-H
เอไมด์ II	1517	1515	1514	การงอของ N-H และการยืดตัวของ C-N
เอไมด์ III	1236	1234	1230	การงอของ N-H และการยืดตัวของ C-N

Silva, R. และคณะ (2016) ได้ศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค ATR-FTIR ของไฟโบรอินไหมจากประเทศเยอรมนี ที่สกัดจากสารละลายลิเธียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.6 โมลาร์ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยพบพีคของเอไมด์ I, II และ III ที่เลขคลื่น 1640, 1517, และ 1236 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีโครงสร้างแบบ random coil, เบต้าชีท และ random coil ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ สำหรับตำแหน่งของเอไมด์ I พีคที่เลขคลื่น 1650 ต่อเซนติเมตร นั้นเป็นโครงสร้าง random coil และที่ 1630 ต่อเซนติเมตร เป็นโครงสร้างเบต้าชีท ส่วนตำแหน่งของเอไมด์ II พีคที่เลขคลื่น 1540 ต่อเซนติเมตร เป็นโครงสร้าง random coil และที่ 1520 ต่อเซนติเมตร เป็นโครงสร้างเบต้าชีท และตำแหน่งของเอไมด์ III พีคที่เลขคลื่น 1230 ต่อเซนติเมตร เป็นโครงสร้าง random coil และที่ 1270 ต่อเซนติเมตร เป็นโครงสร้างเบต้าชีท

จ. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินไหมด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ Gel permeation chromatography (GPC)

รูปแบบโปรตีนของไฟโบรอินไหมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 แสดงดังรูปที่ 4.10 (ก) โดยนำไฟโบรอินจากเส้นและรังไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และจากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล พบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏมีลักษณะเป็นแถบ Smear ตั้งแต่น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตันขึ้นไป โดยแถบ Smear ตั้งแต่ 130 กิโลดาลตันขึ้นไปจะมีลักษณะเข้มกว่าแถบส่วนอื่น โดยคาดว่าเป็นแถบของ Heavy chain ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน แถบดังกล่าวนี้ปรากฏในตัวอย่างทั้งสามชนิด และมีแถบโปรตีนปรากฏที่น้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน โดยเป็นแถบของ Light chain ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 กิโลดาลตัน แถบนี้ปรากฏในไฟโบรอินจากเส้นและรังไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ โดยไม่ปรากฏในไฟโบรอินจากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลโดยปรากกฏเป็นแถบ Smear ตั้งแต่น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตันขึ้นไป ถึง 200 กิโลดาลตัน ซึ่งเกิดจากผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นของเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่แตกต่างจากงานวิจัยของ Teramoto, H. และคณะ (2014) ดังแสดงในรูปที่ 4.10 (ข) ที่ส่งผลให้การแยกไฟโบรอินไหมด้วยวิธีนี้จึงไม่สามารถทำได้ ส่วนการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินไหมด้วยเทคนิค GPC ดังแสดงในรูปที่ 14.11 พบว่ามีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลเป็นช่วงกว้าง โดยไม่ได้มีการกระจุกตัวของ

น้ำหนักโมเลกุลที่ชัดเจนเช่นเดียวกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่เกิดพีคอย่างชัดเจน



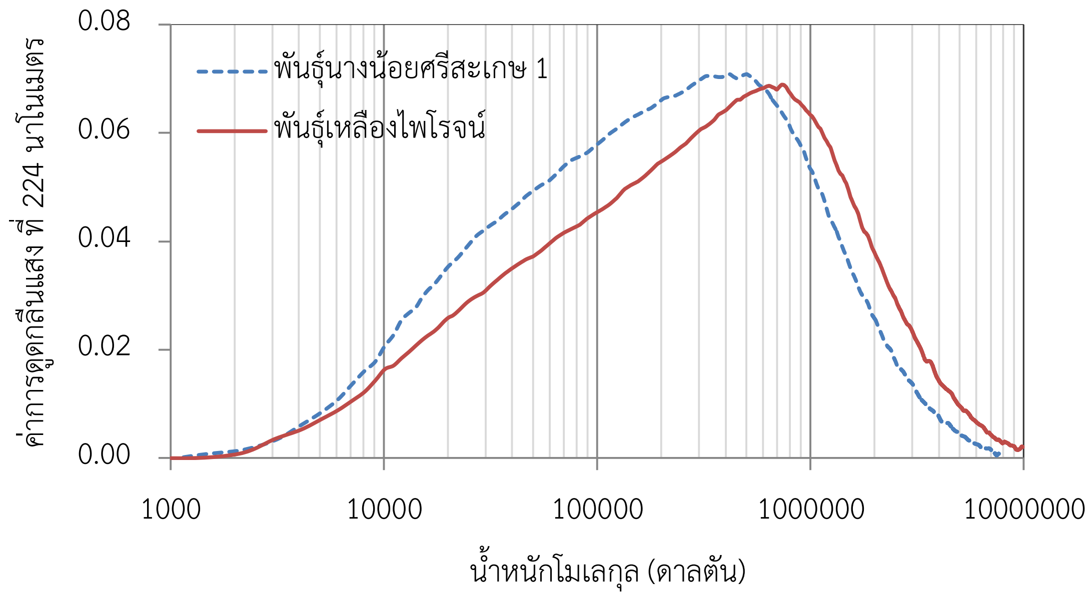
(ก) (ข) (Teramoto, H. และคณะ 2014)

รูปที่ 4.10 รูปแบบโปรตีนของไฟโบรอินไหมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 (ก) 1:เส้นไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์, 2:รังไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์, 3:รังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (ข) โปรตีนจากไหมพันธุ์ *Bombyx mori* ที่ดัดแปลงพันธุกรรม (H01) และไหมตามธรรมชาติ (WT) ที่ให้และไม่ให้ p-chloro-L-phenylalanine (ClPhe) ในระยะตัวหนอน

การศึกษาของ Wadbua, P. และคณะ (2010) พบว่าการเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากรังไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ ด้วยตัวทำละลายและสภาวะต่างๆ ในอัตราส่วน 1:30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) คือ สารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์-เอทานอล (อัตราส่วนแคลเซียมคลอไรด์:เอทานอล:น้ำ เท่ากับ 1:2:8) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส, สารละลายลิเธียมไธโอไซยาเนต ความเข้มข้น 9 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส, สารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, สารละลายลิเธียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 60 และ 75 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ สารละลายลิเธียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 85 ที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส มีเพียงการเตรียมไฟโบรอินไหมด้วยสารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์-เอทานอล เท่านั้นที่สามารถรักษาไฟโบรอินทั้งสองสายได้ โดยปรากฏแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล

ประมาณ 350 และ 25 กิโลดาลตัน ส่วนการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมด้วยตัวทำละลายอื่นนั้นปรากฏเพียงแถบชัดเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน โดยการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินไหมด้วยวิธีเดียวกัน

Teramoto, H. และคณะ (2014) ได้ศึกษาชนิดของโปรตีนจากไหมพันธุ์ *Bombyx mori* ที่ดัดแปลงพันธุกรรม (H01) และไหมตามธรรมชาติ (WT) ที่ให้และไม่ให้ p-chloro-L-phenylalanine (ClPhe) ในระยะตัวหนอน เมื่อหนอนไหมพ่นเส้นใยออกมาแล้วนำเส้นใยที่ไม่ได้กำจัดกาวไหมหรือเซริซินมาสกัดสารละลายไฟโบรอิน โดยละลายด้วยสารละลายลิเธียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 8 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยปรากฏแถบโปรตีนของ Heavy chain (FibH), Light chain (FibL) และเซริซิน น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350, 25 และ 250 กิโลดาลตัน ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลไฟโบรอินจากไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินไหมด้วยเทคนิค Gel permeation chromatography (GPC) ดังแสดงในรูป 4.11 โดยวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์และวัสดุคอมโพสิท ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทรนโต ประเทศอิตาลี พบว่าไฟ

โบรอินไหมจากพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยตามน้ำหนัก (Mw) 372,021 ดาลตัน, น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยตามจำนวน (Mn) 199,372 ดาลตัน และดัชนีการกระจายน้ำหนักของพอลิเมอร์ (Polydispersity index, PDI) 1.87 ส่วนไฟโบรอินไหมจากพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยตามน้ำหนัก (Mw) 355,738 ดาลตัน, น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยตามจำนวน (Mn) 183,354 ดาลตัน และดัชนีการกระจายน้ำหนักของพอลิเมอร์ (Polydispersity index, PDI) 1.94 ค่า PDI หาอัตราส่วนระหว่าง Mw และ Mn โดยหาจาก $\mathbf{Mw} = \frac{\Sigma(\mathrm{NM}^2)}{\Sigma(\mathrm{NM})}$ และ $\mathbf{Mn} = \frac{\Sigma(\mathrm{NM})}{\Sigma\mathrm{N}}$ เมื่อ N คือจำนวนโมเลกุลในสารตัวอย่าง และ M คือ น้ำหนักโมเลกุลของแต่ละสายโซ่ (Crowley, T.J. และคณะ 1997)จากผลการวิเคราะห์พบว่าไหมทั้งสองสายพันธุ์ มีค่า PDI ประมาณ 2 แสดงว่า Mw มีค่ามากกว่า Mn 2 เท่า หาก PDI มีค่าใกล้เคียง 1 ทุกสายของพอลิเมอร์ในไฟโบรอินมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ค่า Mw และ Mn ของไฟโบรอินจากไหมพันธุ์เหลืองโพโรจน์สูงกว่าค่า Mw และ Mn ของไฟโบรอินพันธ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 บ่งบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์สูงกว่าไฟโบรอินจากไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1

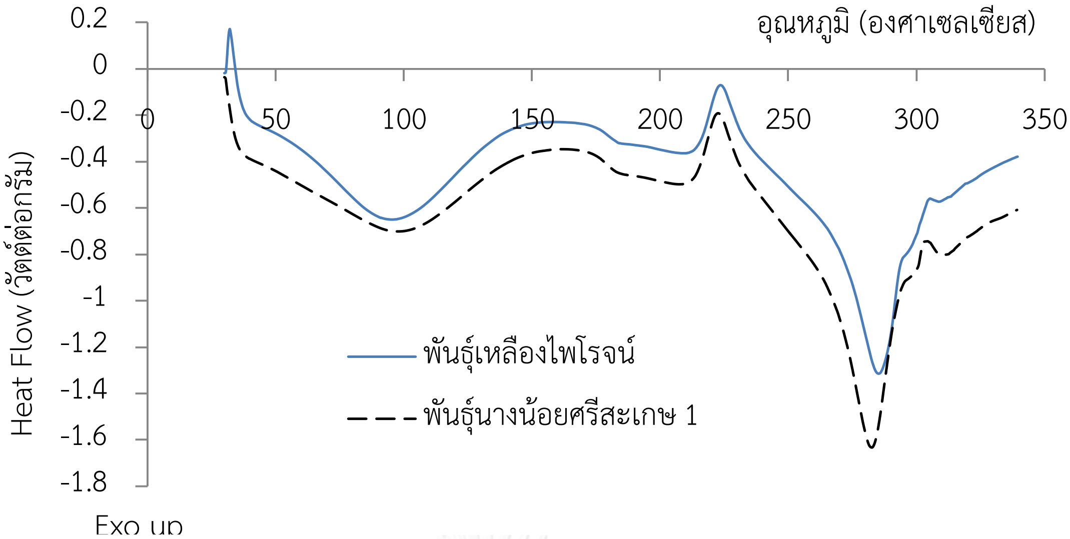
จากการศึกษาของ Cho, H.J. และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษามวลโมเลกุลของไฟโบรอินโดยนำไฟโบรอินไหมมาละลายด้วยสารละลายยูเรีย ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปวิเคราะห์นำหนักโมเลกุลไฟโบรอินไหมด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ที่มี Superdex 200 10/300 GL เป็นเฟสคงที่ และสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ของเฟส 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดปริมาณของไฟโบรอินไหมที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่าไฟโบรอินไหมที่เตรียมด้วยตัวทำละลายลิเธียมโบรไมด์ มีน้ำหนักโมเลกุล 450 กิโลดาลตัน

ฉ. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) และ Thermogravimetric analysis (TGA)

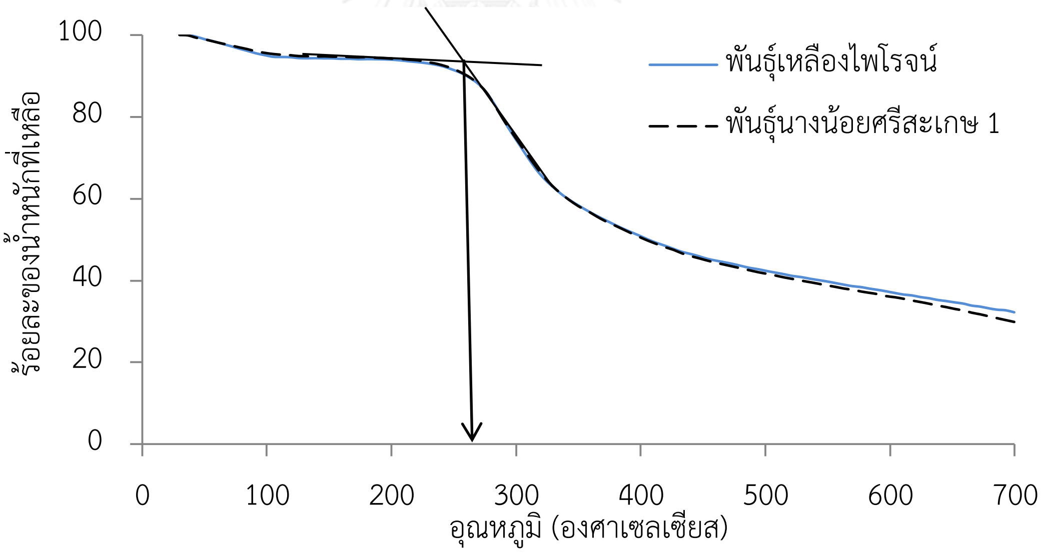
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ดังแสดงในรูปที่ 4.12 เมื่อพิจารณาเทอร์โมแกรม DSC ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ในช่วงอุณหภูมิ 30-150 องศาเซลเซียส จะพบ Endothermic peak หรือการเปลี่ยนแปลงแบบดูดพลังงาน ซึ่งเกิดจากการสลายพันธะของโมเลกุลน้ำชนิด Non-freezing bound water ในไฟโบรอิน

ไหม โดยค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์ Endothermic ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เท่ากับ 96.47 และ 99.47 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ช่วงอุณหภูมิ 150-200 องศาเซลเซียส จะพบ Exothermic peak หรือการเปลี่ยนแปลงแบบคายพลังงานของ Glass transition หรือการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว โดยพบค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์นี้ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เท่ากับ 179.14 และ 179.17 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ช่วงอุณหภูมิ 200-250 องศาเซลเซียส จะพบ Exothermic peak ของอุณหภูมิในการตกผลึกหรือ Crystallization temperature จากของแข็งคล้ายแก้วเป็นของยืดหยุ่นคล้ายยาง โดยพบค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์นี้ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เท่ากับ 223.41 และ 222.44 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และช่วงอุณหภูมิ 250-300 องศาเซลเซียส จะพบ Endothermic peak ของอุณหภูมิในการสลายตัวหรือ Degradation temperature โดยพบค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์นี้ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เท่ากับ 285.42 และ 282.66 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อน ด้วยวิธี Thermogravimetric analysis (TGA) ดังแสดงในรูปที่ 4.13 เมื่อพิจารณาเทอร์โมแกรมของ TGA พบว่าในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส จะเกิดการสูญเสียน้ำหนักจากการสลายตัวของโมเลกุลน้ำ ซึ่งเป็นตัวทำละลายไฟโบรอินไหม และช่วงอุณหภูมิ 200-300 องศาเซลเซียส จะเกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลไฟโบรอินไหม ซึ่งอุณหภูมิในการสลายตัวหรือ Degradation temperature ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เท่ากับ 289.67 และ 282.83 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยเกิดจากการสลายตัวของเบต้าชีทในไฟโบรอินไหมและมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิในการสลายตัวจากเทอโมแกรม DSC และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงความร้อนทั้งสองวิธี พบว่าไฟโบรอินไหมทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีอุณหภูมิในการสลายตัวสูงกว่าไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1



รูปที่ 4.12 เทอร์โมแกรม DSC ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) ในช่วงอุณหภูมิ 30-340 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 100 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.13 เทอร์โมแกรม TGA ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Thermogravimetric analysis (TGA) ในช่วงอุณหภูมิ 30-700 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 100 มิลลิลิตรต่อนาที

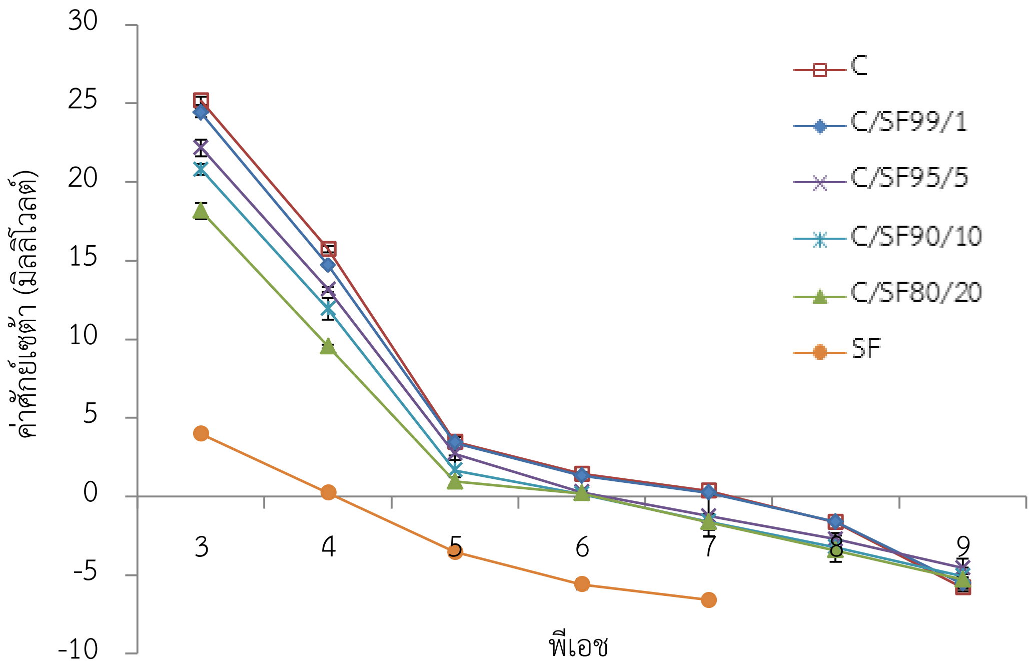
Mhuka, V. และคณะ (2013) ได้ศึกษาสมบัติทางความร้อนของไฟโบรอินไหม สายพันธุ์ *Bombyx Mori* จากประเทศแอฟริกาใต้ ด้วยเทคนิค TGA และ DSC โดยเทอร์โมแกรม DSC ในช่วงแรกจะพบ Endothermic peak จากการสลายพันธะของโมเลกุลน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และพบ Endothermic peak ของอุณหภูมิในการสลายตัวหรือ Degradation temperature โดยพบค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์นี้ที่ 320 องศาเซลเซียส ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของโครงสร้างแบบเบต้าชีทในไฟโบรอินไหม ส่วนเทอร์โมแกรม TGA ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส จะเกิดการสูญเสียน้ำ และอุณหภูมิในการสลายตัวหรือ Degradation temperature ของไฟโบรอินไหม ที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส ส่วน Lu, Q. และคณะ (2010) ทำการศึกษาสมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอินไหมจากประเทศญี่ปุ่น ด้วยเทคนิค DSC โดยเทอร์โมแกรม DSC ในช่วงแรกจะพบ Endothermic peak จากการสลายพันธะของโมเลกุลน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิ 200-220 องศาเซลเซียส จะพบ Exothermic peak ของอุณหภูมิในการตกผลึกหรือ Crystallization temperature จากของแข็งคล้ายแก้วเป็นของยืดหยุ่นคล้ายยาง โดยพบค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์นี้คือ 213 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิ 250-300 องศาเซลเซียสจะพบ Endothermic peak ของอุณหภูมิในการสลายตัวหรือ Degradation temperature โดยพบค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์นี้คือ 257 องศาเซลเซียส ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของโครงสร้างแบบเบต้าชีทในไฟโบรอินไหม ส่วนเทอร์โมแกรม TGA ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส จะเกิดการสูญเสียน้ำ

จากการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของไฟโบรอินไหมทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์แตกต่างจากพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 คือ ไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีปริมาณไกลซีนและน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ โดยมีลักษณะสมบัติด้านโครงสร้างทางเคมีและจุดไอโซอิเล็กทริกที่ไม่แตกต่างกัน และไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีความคล้ายคลึงกับไฟโบรอินไหมจากญี่ปุ่นในองค์ประกอบและปริมาณของกรดอะมิโน และคุณสมบัติเชิงความร้อน เนื่องจากไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์เป็นไหมลูกผสมจากไหมพันธุ์ญี่ปุ่น

4.3 การศึกษาสมบัติของสารละลายคอลลาเจน (C) ผสมกับไฟโบรอินไหม (SF)

ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential)

การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายไฟโบรอินไหม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในอัตราส่วน 99/1, 95/5, 90/10, และ 80/20 ที่พีเอช 3-9 (n=3) โดยค่าศักย์เซต้าดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจนและไฟโบรอินไหม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่พีเอชต่างๆ

การศึกษาค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายคอลลาเจนผสมสารละลายไฟโบรอินไหม ซึ่งแสดงถึงค่าประจุทางไฟฟ้าบริเวณระนาบเฉือนของอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายผสม โดยวัดออกมาในรูปค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าของสาระลายผสม โดยค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจนที่พีเอชต่ำกว่า 7 มีค่าเป็นบวก ค่าศักย์เซต้าของสารละลายคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมนั้นจะมีค่าลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น โดยจะมีประจุบวกหรือลบสุทธิสูงหรือต่ำกว่าจุดที่ค่าศักย์เซต้ามีค่าเท่ากับศูนย์ โดยจุดที่ค่าศักย์เซต้ามีค่าเท่ากับศูนย์หรือจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point, IEP) ของสารละลายคอลลาเจน มีค่าพีเอชประมาณ 7.15±0.03 โดยจุดไอโซอิเล็กทริกลดลงเรื่อยๆ เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหมเข้าไป คือ C/SF99/1, C/SF95/5, C/SF90/10, C/SF80/20, และ SF มีค่าพีเอชประมาณ 7.13±0.04, 6.17±0.05, 6.11±0.03, 6.09±0.01, และ 4.04±0.02 ตามลำดับ เนื่องจากไฟโบรอินไหมมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุลบ เช่น แอสพาเตท กลูตาเมท มากกว่ากรดอะมิโนที่มีประจุบวก เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินเข้าไปในสารละลายคอลลาเจนจึงทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุลบเพิ่มสูงขึ้น จุดไอโซอิเล็กทริคจึงลดลง

ข. ความหนืดของสารละลายคอลลาเจน (C) ผสมไฟโบรอินไหม (SF)

ความหนืดของสารละลายคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF) ได้จากการวัดค่าความหนืดแบบต้านการหมุน (Rotational Brookfield Viscometer) โดยวัดสารละลายความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 99/1, 95/5, 90/10, และ 80/20 พีเอช 3.39±0.12 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความหนืดของสารละลายคอลลาเจนและไฟโบรอินไหม (n=3) ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ความหนืดของสารละลายคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก พีเอช 3.39±0.12 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชนิดของสารละลาย	**ความหนืด (เซนติพอยส์, cP)* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส**
คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC)	14.17±.076[a]
คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน (C)	12.00±0.08[b]
คอลลาเจน BM	70.23±0.50[c]
คอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค (Sigma)	15.53±1.51[a]
C/SF99/1	11.38±0.10[bd]
C/SF95/5	10.30±0.02[bd]
C/SF90/10	9.83±0.08[be]
C/SF80/20	8.16±0.11[e]
SF	1.00±0.04[f]

(a-e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

* พอยส์ (Poise, P) เป็นหน่วยวัดความหนืด (Viscosity) ของของเหลวในระบบเมตริก คือ 1 P = 1 dyne.sec.cm^{-2} หรือ 1 P = 1 g.cm^{-1}.sec^{-1} โดยเป็นแรงที่ทำให้ของเหลวที่มีพื้นที่หน้าตัด 1 ตารางเซนติเมตร หนา 1 เซนติเมตร เคลื่อนที่ด้วยความเร็ว 1 เซนติเมตรต่อวินาที นิยมใช้หน่วย centipoise ความหนืดของน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้องมีค่าประมาณ 1 centipoise

สารละลายคอลลาเจนมีความหนืดในช่วง 12-70 เซนติพอยส์ โดยคอลาเจน BM มีความหนืดสูงสุด คือ 70.23±0.50 เซนติพอยส์ โดยคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค, คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด, และทรีทด้วยเปปซิน (C) มีความหนืด 15.53±1.51, 14.17±.076, และ 12.00±0.08 เซนติพอยส์ ตามลำดับ คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีความหนืดลดลงเนื่องจากส่วนเทโลเปปไทด์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,437 ดาลตัน ถูกทรีทออกด้วยเปปซินทำให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง ความหนืดจึงลดลงด้วย เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหมเข้าไปจะทำให้ความหนืดลดลงอีก เนื่องจากสารละลายไฟโบรอินไหมมีความหนืดต่ำกว่า โดยมีความหนืดเพียง 1.00±0.04 เซนติพอยส์

ค. การเกิดเจลของสารละลายคอลลาเจน (C) ผสมไฟโบรอินไหม (SF) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สารละลายคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 99/1, 95/5, 90/10, และ 80/20 พีเอช 3.39±0.12 ผสมกับ PBS ความเข้มข้น 10 เท่า โดยใช้อัตราส่วนสารละลายคอลลาเจนต่อ PBS เป็น 8:1 ปรับค่าพีเอชเป็น 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงได้ จากนั้นคำนวณเวลาในการเกิดเจลซึ่งได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 4.15 (n=3)

ตารางที่ 4.15 การเกิดเจลของสารละลายคอลลาเจน (C) ผสมไฟโบรอินไหม (SF) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชนิดของเจล	เวลาในการเกิดเจล (นาที)
คอลลาเจน BM	13.67 ± 1.26^{a}
C	13.90 ± 1.02^{a}
C/SF99/1	14.17 ± 1.44^{a}
C/SF95/5	15.50 ± 0.87^{a}
C/SF90/10	16.50 ± 0.50^{a}
C/SF80/20	21.67 ± 3.82^{b}

(a,b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

การเกิดเจลเป็นคุณสมบัติหนึ่งของโปรตีน โดยโมเลกุลของโปรตีนมีโครงสร้างที่รวมตัวกับน้ำได้ดี เมื่อรวมตัวกันจะเกิดเป็นเจล มีโครงสร้างแบบสามมิติที่กักเก็บน้ำไว้ภายในโครงสร้างซึ่งมีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง สารละลายคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม เมื่อเกิดเจล สีจะขุ่นขึ้นทำให้สามารถวัดการเกิดเจลได้จากการวัดความขุ่น โดยคำนวณจากครึ่งหนึ่งของเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เวลาที่ใช้ในการเกิดเจลไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีเพียง C/SF80/20 เท่านั้นที่มีเวลาในการเกิดเจลที่แตกต่างจากอัตราส่วนอื่น โดยเวลาในการเกิดเจลประมาณ 21.67±3.82 นาที การเกิดเจลของสารละลายคอลลาเจนเกิดจากโมเลกุลของเส้นใยของคอลลาเจนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่อผสมไฟโบรอินไหมเข้าไป คอลลาเจนและไฟโบรอินไหมไม่ได้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ แต่ไฟโบรอินไหมที่ผสมเข้าไปจะไปขวางการเกิดพันธะไฮโดรเจนในคอลลาเจน ทำให้เกิดเจลช้าลง

4.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์มคอลลาเจน (C) ผสมไฟโบรอินไหม (SF)

ก. ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมไทย (Contact Angle)

ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF) ดังแสดงในตารางที่ 4.16 ผลการศึกษาค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF) ดังแสดงในตารางที่ โดยค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน (C), คอลลาเจน BM

และคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค มีค่า 104.28±2.19, 93.34±1.96, 96.07±3.96, และ 101.52±1.57 องศา ตามลำดับ เมื่อผสมไฟโบรอินไหมกับคอลลาเจน ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มจะค่อยๆลดลงตามอัตราส่วนของไฟโบรอินไหม โดย C/SF99/1, C/SF95/5, C/SF90/10, และ C/SF80/20 มีค่ามุมสัมผัสของน้ำ 92.33±4.20, 89.08±0.64, 88.26±3.78, และ 84.04±3.11 องศา ตามลำดับ โดยค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินไหม มีค่า 67.99±1.90 องศา

ค่ามุมสัมผัสของของเหลวบนผิววัสดุจะบ่งบอกถึงความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำของผิววัสดุ โดยมุมสัมผัสของของเหลวมีค่าน้อยบ่งบอกถึงผิววัสดุมีความชอบน้ำ และถ้ามุมสัมผัสของของเหลวมีค่าสูงบ่งบอกถึงผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำ ซึ่งค่ามุมสัมผัสของของเหลวมีค่าเท่ากับศูนย์องศาบ่งบอกถึงผิววัสดุมีความชอบน้ำมาก Yuan, Y. และคณะ (2013)รายงานว่าค่ามุมสัมผัสของของเหลวมีค่าระหว่าง 0 ถึง 90 องศา บ่งบอกถึงผิววัสดุมีความชอบน้ำ ถ้าค่ามุมสัมผัสของของเหลวมีค่ามากกว่า 90 ถึง 150 องศา บ่งบอกถึงผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำ และถ้าค่ามุมสัมผัสของของเหลวมีค่ามากว่า 150 องศา บ่งบอกถึงผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำมาก เมื่อพิจารณาจากค่ามุมสัมผัสของน้ำของฟิล์มชนิดต่างๆจะพบว่าคอลลาเจนมีความไม่ชอบน้ำสูงกว่าไฟโบรอินไหม จากการศึกษาของ Friess, W. (1998) พบว่าโครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็น Triple helices โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมคอลลาเจนจึงไม่สามารถละลายน้ำ ส่วนโครงสร้างไฟโบรอินไหมแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ แบบเบตาชีท (β-sheet) เกลียวแอลฟา (α-helical) จะอยู่ในส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline) และโครงสร้างเกลียวสุ่ม (Random coil) จะอยู่ในส่วนที่เป็นอสัณฐาน โดยโครงสร้างเกลียวสุ่มซึ่งพบในไฟโบรอินไหมสามารถละลายน้ำและมีความชอบน้ำ การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมเป็นการทำลายโครงสร้างแบบเบตาชีทให้เป็นเกลียวสุ่มที่สามารถละลายน้ำได้ด้วยสารละลายลิเธียมโบรไมด์ ไฟโบร อินไหมจึงมีความชอบน้ำมากขึ้น ส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสของน้ำมีค่าต่ำ เมื่อนำคอลลาเจนผสมไฟโบรอินทำให้ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มลดลง มีความชอบน้ำมากขึ้นเนื่องมาจากโครงสร้างของไฟโบรอินไหม เมื่อเปรียบเทียบคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินพบว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินมีความชอบน้ำมากกว่า เนื่องจากการตัดด้วยเปปซินทำให้กรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำถูกกำจัดออกไป คอลลาเจนจึงมีความชอบน้ำมากขึ้น

ตารางที่ 4.16 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจน (C) และไฟโบรอินไหม (SF) ที่เวลา 15 วินาที

ชนิดของฟิล์ม	ค่ามุมสัมผัสของน้ำ (องศา)
คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC)	104.28 ± 2.19^{a}
คอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน (C)	93.34 ± 1.96^{bc}
คอลลาเจน BM	96.07 ± 3.96^{bd}
คอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโค (Sigma)	101.52 ± 1.57^{ad}
C/SF99/1	92.33 ± 4.20^{bc}
C/SF95/5	89.08 ± 0.64^{bce}
C/SF90/10	88.26 ± 3.78^{ce}
C/SF80/20	84.04 ± 3.11^{e}
SF	67.99 ± 1.90^{f}

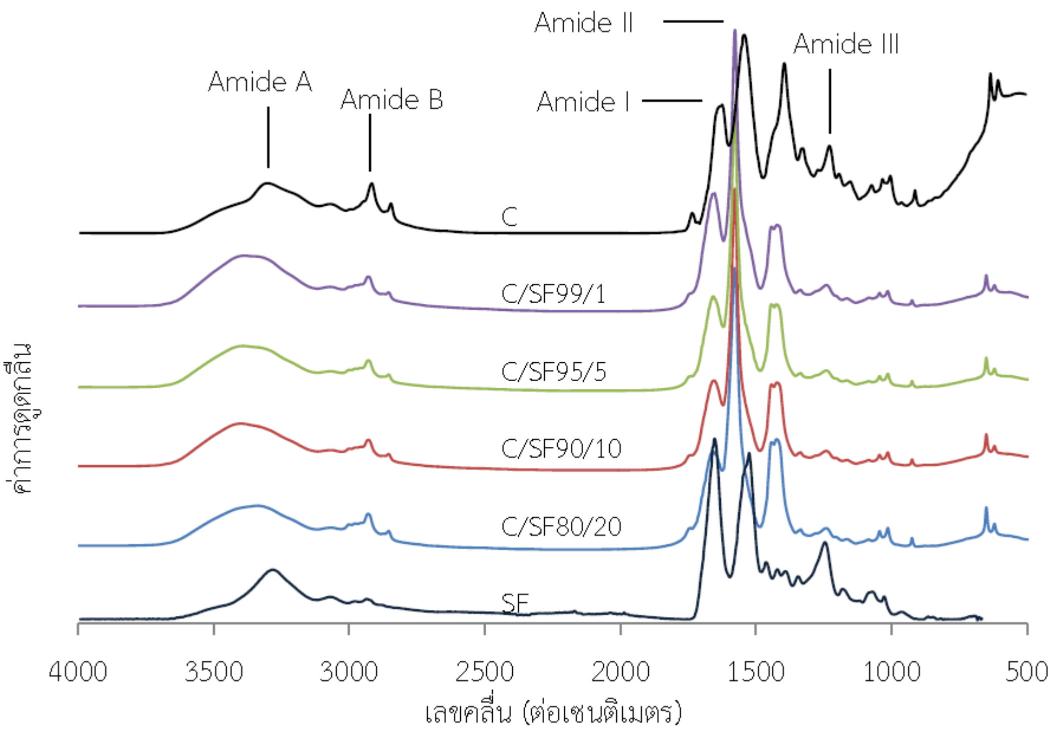
(a-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

Kim, E. Y.และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม ไฟโบรอินไหมและถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากพอลิสไตรีน พบว่า ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์มีความชอบน้ำมากกว่าไฟโบรอินไหมและคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม โดยที่เวลา 0 นาที ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหม (C/SF50/50), ไฟโบรอินไหมและถาดเพาะเลี้ยงเซลล์มีค่าประมาณ 80, 78 และ 74 องศาตามลำดับ และที่เวลา 1 นาที มีค่ามุมสัมผัสของน้ำประมาณ 77, 74 และ 60 องศาตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไปค่ามุมสัมผัสของน้ำจะลดลงเรื่อยๆ บ่งบอกถึงฟิล์มของคอลลาเจน/ไฟโบรอินไหมมีการดูดซับน้ำ

ข. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ด้วยโหมด Attenuated Total Reflection (ATR)

เมื่อนำคอลลาเจนมาผสมกับไฟโบรอินไหม แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งและวิเคราะห์ด้วย FTIR โดยสเปกตรัมการดูดกลืนของคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมด้วยอัตราส่วนต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.15 จากผลการวิเคราะห์ FTIR พบว่าเมื่อผสมคอลลาเจนและไฟโบร

อินไหมที่อัตราส่วน 99/1, 95/5, 90/10 และ 80/20 นั้น พีคการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันต่างๆไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้มีการทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมเปลี่ยนแปลง ยกตัวอย่างเช่น การเชื่อมขวาง การชักนำให้เกิดโครงสร้างแบบเบตาชีทในไฟโบรอินไหม จากการศึกษาของ (Sionkowska, A. และคณะ 2016) ได้ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมจากประเทศโปแลนด์และไฟโบรอินไหมผสมคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ซึ่งเป็นคอลลาเจนจากเอ็นหางหนู นำมาผสมกันด้วยอัตราส่วน 50:50, 75:25 และ 90:10 โดยไม่ได้ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง พบว่าพีคการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 4.15 สเปกตรัมการดูดกลืนของคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี

4.5 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929)

การทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) บนฟิล์มคอลลาเจน/ไฟโบรอินไหม มีการติดเชื้อไมโคพลาสมาที่รุนแรงในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้เซลล์มี Lag time นานผิดปกติ ผลการทดลองนี้จึงไม่อาจเชื่อถือได้ ทั้งนี้ได้แสดงผลการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนูในภาคผนวก ฉ.

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซิน โดยต้องการกำจัดส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้หรือเทโลเปปไทด์เพื่อการนำไปใช้ พบว่ามีร้อยละผลได้ที่น่าพอใจ โดยคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีร้อยละผลได้สูง คือ ร้อยละ 76.43±0.69 ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณคอลลาเจนที่อยู่ในเอ็น และนำคอลลาเจนจากการสกัดด้วยกรดมาทรีทด้วยเอนไซม์เปปซิน ด้วยอัตราส่วนของเปปซินต่อคอลลาเจน 1:10, 1:30 และ 1:50 (น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มเวลา อุณหภูมิและปริมาณเปปซิน จะทำให้ร้อยละผลได้ลดลง โดยร้อยละผลได้อยู่ในช่วง 68-74

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบสาย α1 และ α2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 การเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนพบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน เนื่องจากเอนไซม์เปปซินจะทำให้พันธะเปปไทด์บางส่วนถูกตัดออก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลายของ Triple helices ซึ่งเป็นบริเวณเทโลเปปไทด์ เมื่อพิจารณาจากแถบโปรตีนของคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินททุกๆสภาวะพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนมีค่าใกล้เคียงกัน การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนโดยการคิดรวมกันของน้ำหนักโมเลกุลของสาย α1 2 สาย และ α2 1 สาย จะพบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 370 กิโลดาลตัน และคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินในอัตราส่วนเปปซินต่อคอลลาเจน 1:50 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีน้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ ประมาณ 365 กิโลดาลตัน ส่วนคอลลาเจน BM นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 362 กิโลดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลที่ลดลงของคอลลาเจนที่ตัดด้วยเปปซินนี้สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของเทโลเปปไทด์ ผู้วิจัยจึงเลือกสภาวะนี้ในการสกัดคอลลาเจน

การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจน และเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน พบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินมีอัตราส่วน 2.97:1.07:1 และ 3.08:1.11:1 ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดและเปปซินทำให้อัตราส่วนกรดอะมิโนสามชนิดนี้เปลี่ยนแปลงน้อย โดยเปรียบเทียบกับ

งานวิจัยของ Nagai, T. และคณะ (2012) ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่สกัดด้วยเปปซินจากเอ็นกวาง Yezo sika พบว่ามีอัตราส่วนระหว่างไกลซีน:โพรลีน:อะลานีน เป็น 2.90:1.09:1 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่สกัดได้ จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนทั้งสองชนิดด้วยเทคนิค FTIR พบว่า อัตราส่วนการดูดกลืนระหว่างตำแหน่งเอไมด์ III กับพีคของวงแหวน pyrrolidine (ในโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน) ของคอลลาเจน หากมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าคอลลาเจนยังมีโครงสร้างเป็น Triple Helix โดยมีค่าอัตราส่วนนี้ในคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด เท่ากับ 1.07 แสดงว่าโครงสร้างยังเป็น Triple helices และอัตราส่วนนี้มีค่าเท่ากับ 0.51 ในคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซิน แสดงว่าโครงสร้าง Triple helices ถูกทำลายไปบางส่วน ค่าประจุทางไฟฟ้าหรือค่าศักย์เซต้าของคอลลาเจนทั้งสองชนิดแตกต่างกัน เนื่องจากคอลลาเจนที่ทรีทด้วยเปปซินแล้ว เทโลเปปไทด์ซึ่งมีกรดอะมิโนที่มีประจุลบอยู่จะถูกทรีทออกด้วยเปปซิน ทำให้จุดไอโซอิเล็กทริกสูงขึ้นและมีค่าใกล้เคียงกับคอลลาเจนเชิงพาณิชย์ การวัดความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบสาย α1 และ α2 โดยไม่ปรากฏแถบของโปรตีนชนิดอื่น แสดงถึงคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่พบมากในเอ็น การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อน พบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดและทรีทด้วยเปปซินมีอุณหภูมิในการเสียสภาพใกล้เคียงกัน การสกัดคอลลาเจนออกมาใช้งานในสารละลายกรดอะซิติกแล้วก่อนนำไปควรทำให้ปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้งาน หากโครงเลี้ยงเซลล์ควรอบด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ก่อน ซึ่งวิธีการนี้เป็นการทำให้ปราศจากเชื้อโดยไม่ทำคอลาเจนเสียสภาพ

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมจากเส้นไหมพันธุ์ไทยลูกผสมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ด้วยสารละลายลิเธียมโบรไมด์ พบว่าสารละลายไฟโบรอินไหมที่เตรียมได้มีความเข้มข้นร้อยละ7.37±0.19 โดยน้ำหนัก พีเอช 6.16±0.05 มีจุดไอโซอิเล็คทริกประมาณ 4.04±0.02 1 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนพบว่ามีกรดอะมิโนจำนวน 18 ชนิดและที่สำคัญ 4 ชนิด คือ ไกลซีน อะลานีน ซีรีนและไทโรซีน โดยอัตราส่วนกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ชนิดนี้ มีค่าเป็น 10:6:2:1 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงไฟโบรอินไหม *Bombyx mori* จากญี่ปุ่น ทั้งนี้เนื่องจากเป็นไหมลูกผสมไทยกับญี่ปุ่น โดยมีปริมาณของกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำร้อยละ 84.83 (โดยโมล) และมีความชอบน้ำร้อยละ 15.18 (โดยโมล) ตามลำดับ โครงสร้างทางเคมี ของไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์และนางน้อยศรีสะเกษ 1 ด้วยเทคนิค FTIR พบว่าโครงสร้างทางเคมีไม่มีความแตกต่างกัน การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลไฟโบรอินไหมด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนของ Light chain และแถบ Smear ซึ่งคาดว่าเป็น

แถบของ Heavy chain และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GPC พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยตามน้ำหนัก (Mw) 372,021 ดาลตัน, น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยตามจำนวน (Mn) 199,372 ดาลตัน และดัชนีการกระจายน้ำหนักของพอลิเมอร์ (Polydispersity index, PDI) 1.87 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค DSC และ TGA พบว่า อุณหภูมิในการตกผลึกและอุณหภูมิในการสลายตัวของไฟโบรอินไหมทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์มีอุณหภูมิในการสลายตัวสูงกว่าไฟโบรอินไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1

เมื่อนำคอลลาเจนผสมกับสารละลายไฟโบรอินไหมพันธุ์เหลืองไพโรจน์ พบว่าสารละลายคอลลาเจน มีจุดไอโซอิเล็กทริคประมาณ 7.15±0.03 และจุดไอโซอิเล็กทริกจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหมเข้าไป ค่าความหนืดของสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เท่ากับ 14.17±.076 เซนติพอยส์ เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหมเข้าไปจะทำให้ความหนืดลดลงตามสัดส่วนของสารละลายไฟโบรอินไหม โดยสารละลายไฟโบรอินไหมมีความหนืดเพียง 1.00±0.04 เซนติพอยส์ และเวลาในการกิดเจลของสารละลายคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมไม่มีความแตกต่างโดยมีเพียง C/SF80/20 เท่านั้นที่มีเวลาในการเกิดเจลที่แตกต่างจากอัตราส่วนอื่น โดยใช้เวลาในการเกิดเจลประมาณ 21.67±3.82 นาที

การศึกษาค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มคอลลาเจนและไฟโบรอินไหม พบว่า คอลลาเจนมีความชอบน้ำน้อยกว่าไฟโบรอินไหมและเมื่อผสมไฟโบรอินเข้าไปจะทำให้ฟิล์มมีความชอบน้ำมากขึ้นตามสัดส่วนของไฟโบรอิน และเมื่อนำคอลลาเจนมาผสมกับไฟโบรอินไหมมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR พบว่าหมู่ฟังก์ชันไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้มีการทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนและไฟโบรอินไหมเปลี่ยนแปลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ขั้นตอนในการเตรียมเอ็นร้อยหวายสุกรก่อนการสกัดด้วยกรด เพื่อให้ร้อยละผลได้สูงขึ้นควรกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกก่อน เนื่องจากการเลาะเอาพังผืดที่ติดบนเอ็นร้อยหวายอาจทำได้ไม่ดีพอ และการตัดเอ็นร้อยหวายสุกรมีดคัตเตอร์ ยังทำให้เป็นชิ้นเล็กไม่พอเนื่องจากเอ็นร้อยหวายเหนียวและแข็งมาก ทั้งนี้ควรแช่ในน้ำก่อนนำไปตัด เพื่อให้เอ็นพองตัวและสามารถตัดได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การบดในไนโตรเจนเหลวยังทำได้ลำบากเนื่องจากเอ็นกระเด็นออกจากครกบด ทำให้ร้อยละผลได้ลดลง ควรใช้เครื่องบดเนื้อช่วยในการบดด้วย ทั้งนี้หากต้องการสกัดคอลลาเจนในปริมาณสูง

ควรแช่เย็นในกรดก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เอ็นพองตัวอย่างเต็มที่ในกรดก่อนหลังจากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดอาหาร เพื่อให้การสกัดคอลลาเจนได้ร้อยละผลได้ที่สูงขึ้น

2. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีโครงสร้างเป็นทรงกลม (Globular protein) มีความแตกต่างจากโครงสร้างของคอลลาเจนที่มีโครงสร้างเป็น Triple helices การวัดปริมาณโปรตีนจึงอาจเกิดความคลาดเคลื่อน ทั้งนี้เพื่อความแม่นยำในการวัดควรเปรียบเทียบกับการวัดด้วยวิธีอื่นและเทียบกับ วิธี Collagen Assay

3. การทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L292) ยังทำไม่สำเร็จ เนื่องจากมีการติดเชื้อไมโคพลาสมา จึงต้องทำการทดสอบอีกครั้ง

4. เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในการนำคอลลาเจนไปใช้ได้ผลจริง ต้องทำการทดสอบการแพ้ในระดับห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง ด้วยการวัดปริมาณสารสื่อการอักเสบที่หลั่งจากเซลล์หรือสัตว์ทดลอง

รายการอ้างอิง

Alder, V. G. (1987). "The formaldehyde/low temperature steam sterilizing procedure." Journal of Hospital Infection 9: 194-200.

Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, et al. (2003). "Silk-based biomaterials." Biomaterials 24: 401–416.

Aparecida de Aro, A., C. Vidal Bde and E. R. Pimentel (2012). "Biochemical and anisotropical properties of tendons." Micron 43(2-3): 205-214.

Ayub, Z. H., M. Arai and K. Hirabayashi (1993). "Mechanism of the gelation of fibroin solution." Bioscience Biotechnology and Biochemistry 57: 1910-1912.

Bondar, B., S. Fuchs, A. Motta, C. Migliaresi and C. J. Kirkpatrick (2008). "Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size." Biomaterials 29(5): 561-572.

Bozec, L. and M. Odlyha (2011). "Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy." Biophys J 101(1): 228-236.

Chamchongkaset, J., S. Kanokpanont, D. L. Kaplan and S. Damrongsakkul (2008). "Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering." Advanced Materials Research 55-57: 685-688.

Cho, H. J., C. S. Ki, H. Oh, K. H. Lee and I. C. Um (2012). "Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions." International Journal of Biological Macromolecules 51: 336-341.

Crowley, T. J. and K. Y. Choi (1997). "Calculation of Molecular Weight Distribution from Molecular Weight Moments in Free Radical Polymerization." Industrial & Engineering Chemistry Research 36(5): 1419–1423.

Datta, A., A. K. Ghosh and S. C. Kundu (2001). "Purification and characterization of fibroin from the tropical Saturniid silkworm, Antheraea mylitta." Insect Biochemistry and Molecular Biology 31(10): 1013-1018.

Duan, R., J. Zhang, X. Du, X. Yao and K. Konno (2009). "Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (Cyprinus carpio)." Food Chemistry 112(3): 702-706.

Eastoe, J. E. (1955). "The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin." Biochemical Journal 61(4): 589-600.

Ekblom, B. (1970). "Effect of physical training on circulation during prolonged severe exercise." Acta Physiol Scand 78(2): 145-158.

Eyre, D. R., M. A. Weis and J. J. Wu (2008). "Advances in collagen cross-link analysis." Methods 45(1): 65-74.

Faraj, K. A., K. M. Brouwer, P. J. Geutjes, E. M. Versteeg, R. G. Wismans, et al. (2011). "The effect of ethylene oxide sterilisation, beta irradiation and gamma irradiation on collagen fibril-based scaffolds. Evaluation of biological, physical and chemical parameters." Tissue Engineering and Regenerative Medicine 8(5): 460-470.

Fathima, N. N., B. Madhan, J. R. Rao, B. U. Nair and T. Ramasami (2004). "Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability." Int J Biol Macromol 34(4): 241-247.

Fauzi, M. B., Y. Lokanathan, B. S. Aminuddin, B. H. I. Ruszymah and S. R. Chowdhury (2016). "Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thin films for tissue engineering applications." Materials Science and Engineering: C 68: 163-171.

Friess, W. (1998). "Collagen – biomaterial for drug delivery1." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45(2): 113-136.

Furth, M. E. and A. Atala (2014). "Tissue Engineering." 83-123.

Furuhata, K., A. Okada, Y. Chen, Y. Y. Xu and M. Sakamoto (994). "Dissolution of silk fibroin in lithium halide/organic amide solvent systems." Journal of Sericultural Science of Japan 63: 315-322.

Gelse, K., E. Poschl and T. Aigner (2003). "Collagens—structure, function, and biosynthesis." Advanced Drug Delivery Reviews 55(12): 1531-1546.

Geutjes, P. J., J. A. van der Vliet, K. A. Faraj, N. de Vries, H. T. van Moerkerk, et al. (2010). "Preparation and characterization of injectable fibrillar type I collagen and evaluation for pseudoaneurysm treatment in a pig model." J Vasc Surg 52(5): 1330-1338.

Gómez-Guillén, M. C., B. Giménez, M. E. López-Caballero and M. P. Montero (2011). "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review." Food Hydrocolloids 25(8): 1813-1827.

Goto, Y., M. Tsukada and N. Minoura (1990). "Molecular cleavage of silk fibroin by an aqueous solution of lithium thiocyanate." Journal of Sericultural Science of Japan 59: 402-409.

Guzman, M. L., M. R. Marques, M. E. Olivera Me and E. S. Stippler (2016). "Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin." Results Pharma Sci 6: 15-19.

Hames, B. D. (1998). "Gel Electrophoresis of Proteins." Oxford University Press 3**rd ed**.

Ho, H. O., L.-H. Lin and M.-T. Sheu (1997). "Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier." Journal of Controlled Release 44: 103–112.

Honsawek, S. and V. Parkpian (2007). "Tissue engineering for bone regeneration: stem cellsand growth factors in biomaterial scaffolds." Asian Biomedicine 1(3): 229-238.

Ikoma, T., H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh and S. Mann (2003). "Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromis niloticas." International Journal of Biological Macromolecules 32(3-5): 199-204.

Jetbumpenkul, P., P. Amornsudthiwat, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul (2012). "Balanced electrostatic blending approach--an alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold." Int J Biol Macromol 50(1): 7-13.

Kaewprasit, K., A. Promboon, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul (2014). "Physico-chemical properties and in vitro response of silk fibroin from various domestic races." J Biomed Mater Res B Appl Biomater 102(8): 1639-1647.

Kahn, L. D. and L. P. Witnauer (1966). "The Viscometric Behavior of Solubilized Calf Skin Collagen at Low Rates of Shear." Journal of biological chemistry 241(8): 1784-1789.

Kahn, L. D. and L. P. Witnauer (1996). "The Viscometric Behavior of Solubilized Calf Skin Collagen at Low Rates of Shear." The Journal Of Biological chemistry 241(8): 1784-1789.

Khan, R. and M. H. Khan (2013). "Use of collagen as a biomaterial: An update." J Indian Soc Periodontol 17(4): 539-542.

Kim, E. Y., N. Tripathy, S. A. Cho, C. K. Joo, D. Lee, et al. (2015). "Bioengineered neo-corneal endothelium using collagen type-I coated silk fibroin film." Colloids Surf B Biointerfaces 136: 394-401.

Kim, S. H., H. S. Park, O. J. Lee, J. R. Chao, H. J. Park, et al. (2016). "Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering." Int J Biol Macromol 85: 442-450.

Kim, U. J., J. Park, H. J. Kim, M. Wada and D. L. Kaplan (2005). "Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin." Biomaterials 26(15): 2775-2785.

Kundu, B., R. Rajkhowa, S. C. Kundu and X. Wang (2013). "Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations." Adv Drug Deliv Rev 65(4): 457-470.

Lee, C. H., A. Singla and Y. Lee (2001). "Biomedical applications of collagen." International Journal of Pharmaceutics 221(1–2): 1-22.

Lerdchai, K., J. Kitsongsermthon, J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul (2016). "Thai Silk Fibroin/Gelatin Sponges for the Dual Controlled Release of Curcumin and Docosahexaenoic Acid for Anticancer Treatment." J Pharm Sci 105(1): 221-230.

Lin, T. W., L. Cardenas and L. J. Soslowsky (2004). "Biomechanics of tendon injury and repair." J Biomech 37(6): 865-877.

Lin, Y. K. and D. C. Liu (2006). "Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species." Food Chemistry 99(2): 244-251.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Radall (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Lu, Q., X. Hu, X. Wang, J. A. Kluge, S. Lu, et al. (2010). "Water-insoluble silk films with silk I structure." Acta Biomater 6(4): 1380-1387.

Lu, Q., Y. Huang, M. Li, B. Zuo, S. Lu, et al. (2011). "Silk fibroin electrogelation mechanisms." Acta Biomater 7(6): 2394-2400.

Maghdouri-White, Y., G. L. Bowlin, C. A. Lemmon and D. Dreau (2014). "Mammary epithelial cell adhesion, viability, and infiltration on blended or coated silk fibroin-collagen type I electrospun scaffolds." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 43: 37-44.

Malay, O., O. Bayraktar and A. Batigun (2007). "Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid." Int J Biol Macromol 40(4): 387-393.

Matthews, I. P., C. Gibson and A. H. Samuel (1989). "Enhancement of the kinetics of the aeration of ethylene oxide sterilized polymers using microwave radiation." Journal of Biomedical Materials Research, 23: 143-156.

Mendes, G. C. C., T. R. S. Brandao and C. L. M. Silva (2007). "Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review." Am J Infect Control 35(9): 574-581.

Menicagli, C. (1990). "Process for the preparation of collagen and obtained product " United States Patent 4894441 A.

Mhuka, V., S. Dube and M. M. Nindi (2013). "Chemical, structural and thermal properties of Gonometa postica silk fibroin, a potential biomaterial." Int J Biol Macromol 52: 305-311.

Minabe, M., K. Takeuchi, T. Tamura, T. Hori and T. Umemoto (1989). "Subgingival Administration of Tetracycline on a Collagen Film." Journal of Periodontology 60(10): 552-556.

Mondal, M., K. Trivedy and S. N. Kumar (2007). "The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review." Caspian Journal of Environmental Sciences 5(2): 63-76.

Monod, J. (1949). "The Growth of Bacterial Cultures." Annual Review of Microbiology 3: 371-394.

Moreno, H. M., M. P. Montero, M. C. Gomez-Guillen, F. Fernandez-Martin, T. Morkore, et al. (2012). "Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture." Food Chem 134(2): 678-685.

Mos, M. d., B. v. El, J. D. Groot, H. Jahr, H. T. v. Schie, et al. (2007). "Achilles tendinosis: changes in biochemical composition and collagen turnover rate." Am J Sports Med 35(9): 1549-1556.

Movasaghi, Z., S. Rehman and I. ur Rehman (2008). "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues." Applied Spectroscopy Reviews 43(2): 134-179.

Munarin, F., S. Bozzini, L. Visai, M. C. Tanzi and P. Petrini (2013). "Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin." Food Hydrocolloids 31(1): 74-84.

Nagai, T., Y. Araki and N. Suzuki (2002). "Collagen of the skin of ocellate puffer fish (Takifugu rubripes)." Food Chemistry 78(2): 173-177.

Oechsle, A. M., D. Akgün, F. Krause, C. Maier, M. Gibis, et al. (2016). "Microstructure and physical–chemical properties of chicken collagen." Food Structure 7: 29-37.

Okhawilai, M., R. Rangkupan, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul (2010). "Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications." Int J Biol Macromol 46(5): 544-550.

Parenteau-Bareil, R., R. Gauvin and F. Berthod (2010). "Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications." Materials 3(3): 1863-1887.

Pati, F., B. Adhikari and S. Dhara (2010). "Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability." Bioresour Technol 101(10): 3737-3742.

Patino, M. G., M. E. Neiders, S. Andreana, B. Noble and R. E. Cohen (2002). "Collagen as an implantable material in medicine and dentistry." Journal of Oral Implantology 28(5): 220-225.

Paul, J. H. and B. Myers (1982). "Fluorometric Determination of DNA in Aquatic Microorganisms by Use of Hoechst 33258." Applied and environmental microbiology 43(6).

Rodziewicz-Motowidło, S., A. Śladewska, E. Mulkiewicz, A. Kołodziejczyk, A. Aleksandrowicz, et al. (2008). "Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp Hypophthalmichthys molitrix." Aquaculture 285(1-4): 130-134.

Rutala, W. A., D. J. Weber and T. H. I. C. P. A. Committee (2008). "Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities."

Sadowska, M., I. Kołodziejska and C. Niecikowska (2003). "Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (Gadus morhua)." Food Chemistry 81(2): 257-262.

Sashina, E. S., A. M. Bochek, N. P. Novoselov and D. A. Kirichenko (2006). "Structure and solubility of natural silk fibroin." Russian Journal of Applied Chemistry 79(6): 869-876.

Sato, H., H. Kitazawa, I. Adachi and I. Horikoshi (1996). "Microdialysis Assessment of Microfibrous Collagen Containing a P-Glycoprotein-Mediated Transport Inhibitor, Cyclosporine A, for Local Delivery of Etoposide." Pharmaceutical Research 13(10): 1565-1569.

Sato, K., T. Ebihara, E. Adachi, S. Kawashima, S. Hattori, et al. (2000). "Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases." J Biol Chem 275(33): 25870-25875.

Schulze-Tanzil, G., O. Al-Sadi, W. Ertel and A. Lohan (2012). "Decellularized tendon extracellular matrix-a valuable approach for tendon reconstruction?" Cells 1(4): 1010-1028.

Senaratne, L. S., P. J. Park and S. K. Kim (2006). "Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (Lagocephalus gloveri) skin." Bioresour Technol 97(2): 191-197.

Shang, S., L. Zhu and J. Fan (2013). "Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein." Carbohydr Polym 93(2): 561-573.

Silva Junior, Z. S., S. B. Botta, P. A. Ana, C. M. Franca, K. P. Fernandes, et al. (2015). "Effect of papain-based gel on type I collagen--spectroscopy applied for microstructural analysis." Sci Rep 5: 11448.

Silva, R., R. Singh, B. Sarker, D. G. Papageorgiou, J. A. Juhasz, et al. (2016). "Soft-matrices based on silk fibroin and alginate for tissue engineering." Int J Biol Macromol.

Sionkowska, A., K. Lewandowska, M. Michalska and M. Walczak (2016). "Characterization of silk fibroin 3D composites modified by collagen." Journal of Molecular Liquids 215: 323-327.

Song, D., C. Dong, A. Ragauskas and Y. Deng (2009). "Filler Modification with Polysaccharides or Their Derivatives for Improved Paper Properties." Journal of Biobased Materials and Bioenergy 3(4): 321-334.

Suzuki, Y. (1997). "Differentiation of the Silk Gland A Model System for the Study of Differential Gene Action." Results and Problems in Cell Differentiation 8: 1-44.

Suzuki, Y., I. Someki, E. Adachi, S. Irie and S. Hattori (1999). "Interaction of Collagen Molecules from the Aspect of Fibril Formation: Acid-Soluble, Alkali-Treated, and MMP1-Digested Fragments of Type I Collagen." J. Biochem. 128: 54-67.

Techatanawata, S., R. Surarit, T. Suddhasthira and S. P. Khovidhunkita (2011). "Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: a comparative study." Asian Biomedicine 5: 787-798

Teramoto, H. and K. Kojima (2014). "Production of Bombyx mori silk fibroin incorporated with unnatural amino acids." Biomacromolecules 15(7): 2682-2690.

Tsukada, M., Y. Goto and N. Minoura (1990). "Characterization of the regenerated silk fibroin from Bombyx mori " Journal of Sericultural Science of Japan 59: 325-330.

Tungtasana, H., S. Shuangshoti, S. Shuangshoti, S. Kanokpanont, D. L. Kaplan, et al. (2010). "Tissue response and biodegradation of composite scaffolds prepared from Thai silk fibroin, gelatin and hydroxyapatite." J Mater Sci Mater Med 21(12): 3151-3162.

Ude, A. U., R. A. Eshkoor, R. Zulkifili, A. K. Ariffin, A. W. Dzuraidah, et al. (2014). "Bombyx mori silk fibre and its composite: A review of contemporary developments." Materials & Design 57: 298-305.

Uskoković, V., N. Ignjatović and N. Petranović (2003). "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Collagen Biocomposite Materials." Materials Science Forum 413: 269-274.

Vachiraroj, N., J. Ratanavaraporn, S. Damrongsakkul, R. Pichyangkura, T. Banaprasert, et al. (2009). "A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on in vitro biocompatibility for bone substitutes." Int J Biol Macromol 45(5): 470-477.

Von Der Mark, K. (2006). CHAPTER 1 - Structure, Biosynthesis and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition). Robins, S. P. and J. P. Bilezikian. Burlington, Academic Press: 3-40.

Voytik-Harbin, S. L., S. Kreger, B. Bell and J. Bailey (2013). "Collagen preparation and method of isolation " Unlted States Patent 8512756(B2).

Wadbua, P., B. Promdonkoy, S. Maensiri and S. Siri (2010). "Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of Bombyx mori." Int J Biol Macromol 46(5): 493-501.

Wallace, D. G. and J. Rosenblatt (2003). "Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering." Advanced Drug Delivery Reviews 55(12): 1631-1649.

Wang, J. H. (2006). "Mechanobiology of tendon." J Biomech 39(9): 1563-1582.

Wang, L., X. An, F. Yang, Z. Xin, L. Zhao, et al. (2008). "Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (Sebastes mentella)." Food Chem 108(2): 616-623.

Wenger, M. P. E., L. Bozec, M. A. Horton and P. Mesquida (2007). "Mechanical properties of collagen fibrils." Biophys J 93(4): 1255-1263.

Yu, J. C., J.-D. Jang, C.-H. Chang, S.-B. Lee, S.-G. Yeo, et al. (2010). "Method of Separating Collagen From the Various Animal Tissues for Producing Collagen Solution and Product Using the Same." United States Patent Patent N0.: US 7,781,158 B2.

Yuan, Y. and T. R. Lee (2013). "Contact Angle and Wetting Properties." 51: 3-34.

Zhou, C. Z., F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, et al. (2000). "Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene." Nucleic Acids Research 28(12): 2413-2419.

ภาคผนวก

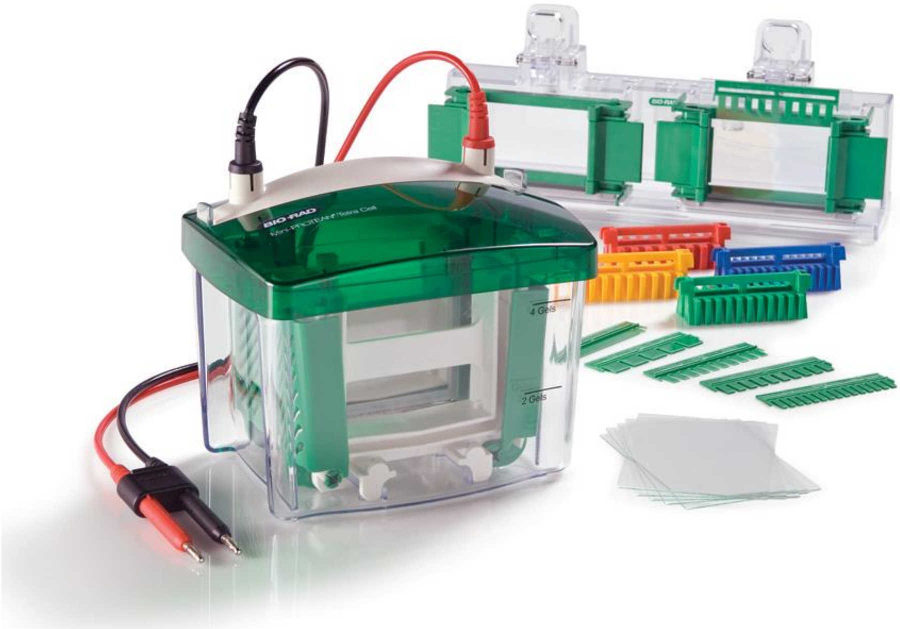
ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ผู้วิจัยทดสอบที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยสารทรงฤทธิ์ชีวภาพเพื่อนวัตกรรมทางคลินิค (Bioactive Resources for Innovative Clinical Applications Research Unit) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการหน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ ก.1 ซึ่งประกอบด้วย

1. Cell with electrode assembly
2. Casting Stand
3. Casting Frame
4. Short Plate
5. Space Plate (0.75 mm, 1.0 mm)
6. Combs 10 wells (0.75 mm, 1.0 mm)
7. Razor Blade or Gel Releaser
8. Sample Loading Guide



รูปที่ ก.1 อุปกรณ์ Mini P-4 Vertical Electrophoresis System

การเตรียมอุปกรณ์ในการเตรียมแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์ เริ่มจากการทำความสะอาดแผ่นกระจก (Short Plate และ Space Plate) แท่นวาง (Casting Stand) และกรอบวาง (Casting Frame) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% ให้สะอาดและแห้งก่อนทำการประกอบแผ่นกระจก จากนั้นนำแผ่นกระจก 2 แผ่น มาประกบกัน โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้บน Spacer Plate ที่มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร โดยตั้งแผ่นกระจกที่มีลูกศรชี้ขึ้นไว้ด้านบน แล้วนำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่น วางลงใน Casting Flame โดยวางแผ่นสั้น (Short Plate) ไว้ด้านหน้า Casting Flame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อยๆกดล็อคด้วย Prassure Cams ด้วยความระมัดระวัง เพราะกระจกอาจแตกจากการประกอบไม่เข้ารูป และนำ Gel Cassette Assembly ที่ประกอบใน Casting Flame วางบน Casting Stand ที่มี Gray Casting Stand Gasket รองอยู่ด้านล่าง โดยกดส่วน Spring Loaded Lever ให้ Gel Cassette Assembly แนบสนิทและตั้งฉากกับ Casting Stand จากนั้นตรวจสอบการรั่วของแผ่นกระจก โดยใช้น้ำปราศจากประจุทดสอบการรั่วของแผ่นกระจก ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที หารเกิดการรั่วขึ้น ระดับน้ำในแผ่นกระจกจะลดลง หากกระจกไม่รั่วแล้วให้ใช้ไม้บรรทัดวัดระดับความสูงของส่วน Separating Gel โดยให้มีความสูงห่างจากปลายกระจกแผ่นเล็ก 2 เซนติเมตร และทำเครื่องหมายไว้

การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ สำหรับ Separating Gel ความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับกระจก Spacer Plate ที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร โดยเตรียมปริมาตรเจลรวม 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้แผ่นเจล 2 แผ่น โดยเตรียมจากน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 4.6 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (อะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 29.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ N,N'-Methylenebisacrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Soduim Dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Amonium Persulphate (APS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และสารละลาย N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TMEDA or *TEMED*) ปริมาตร 0.006 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ทำให้เกิดฟอง จากนั้นปิเปตสารละลายใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จนกระทั่งเจลมีความสูงเท่ากับระยะทำเครื่องหมายไว้สำหรับส่วน separating gel เติมน้ำปราศจากประจุ เบาๆบนผิวหน้าเจล เพื่อให้

ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 25 นาที เทน้ำกลั่นที่ปิดผิวหน้าของเจลทิ้ง สังเกตที่ผิวหน้าเจลจะเรียบสม่ำเสมอ

การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ สำหรับ Separating Gel ความเข้มข้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับกระจก Spacer Plate ที่มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร โดยเตรียมปริมาตรเจลรวม 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้แผ่นเจล 3 แผ่น โดยเตรียมจากน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (อะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 29.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ N,N'-Methylenebisacrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Soduim Dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Amonium Persulphate (APS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และสารละลาย N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TMEDA or *TEMED*) ปริมาตร 0.006 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ทำให้เกิดฟอง จากนั้นปิเปตสารละลายใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จนกระทั่งเจลมีความสูงเท่ากับระยะทำเครื่องหมายไว้สำหรับส่วน separating gel เติมน้ำปราศจากประจุ เบาๆบนผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 25นาที เทน้ำกลั่นที่ปิดผิวหน้าของเจลทิ้ง สังเกตที่ผิวหน้าเจลจะเรียบสม่ำเสมอ

การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ สำหรับ stacking gel ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับกระจก Spacer Plate ที่มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร โดยเตรียมปริมาตรเจลรวม 4 มิลลิลิตร สำหรับเจล 3 แผ่น โดยเตรียมจากน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 2.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (อะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 29.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ N,N'-Methylenebisacrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปริมาตร 0.67 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Soduim Dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Amonium Persulphate (APS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และสารละลาย N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TMEDA or

TEMED) ปริมาตร 0.006 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ทำให้เกิดฟอง จากนั้นปิเปตสารละลายเจลพอลิอะคริลาไมด์ ส่วน stacking gel ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก จนกระทั่งท่วมฟันของ comb โดยวาง comb ให้ตรง อย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว เป็นเวลา 25 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ดึง comb ออกช้าๆ และล้าง sample well ด้วยน้ำปราศจากประจุหรือ running buffer โดยสามารถวางแผ่นกระจกพักไว้ที่ stand ก่อนได้ ในกรณีทำเจลหลายแผ่น

การประกอบแผ่นเจลเข้ากับเครื่อง Electrophoresis โดยนำ Gel Cassette Assemblies ออกจาก Casting Stand แล้วนำไปต่อเข้ากับ Electrode Assembly ซึ่งจะหันด้าน Short Plate ของ Gel Cassette Sandwich เข้าด้านในตรงส่วนของ U-shaped Gaskets จากนั้นนำ gel cassette sandwiches และ electrode assembly เลื่อนใส่เข้าไปใน clamping frame และกด electrode assembly ลงใน clamping frame พร้อมทั้งกดล็อคด้วย cam levers เพื่อประกอบเป็นส่วน inner chamber แล้วนำส่วน Inner Chamber เข้าไปข้างในส่วน Mini Tank และเท running buffer ลงใน upper buffer chamber ปริมาตร 125 มิลลิลิตร จนกระทั่งถึงระดับกึ่งกลางแผ่นกระจก โดยสังเกตว่ามีส่วนของ running buffer รั่วหรือไม่ แล้วเท running buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงใน lower buffer chamber ของ MiniTank และไล่ฟองอากาศออกให้หมด

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการผสมสารละลายตัวอย่าง (Loading buffer) โดยเตรียมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ โดยละลาย Tris-base น้ำหนัก 3 กรัม ด้วยน้ำปราศจากประจุ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายดังกล่าวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 ผสม Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 4 กรัม กับซูโครส 10 กรัม ด้วยสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย bromophenol blue จนได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม ผสมสารละลาย 2-mercaptoethanol ลงในสารละลายที่เตรียมได้ด้วยอัตราส่วน 1 : 9 ก่อนการทดลองทันที จากนั้นเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจากสารละลายคอลลาเจนที่เตรียมได้ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แล้วผสมสารละลายนี้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการผสมสารละลายตัวอย่าง (Loading buffer) ด้วยอัตราส่วนเท่ากับ 1:10 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายผสมที่เตรียมได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพ

จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บเฉพาะสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์

รูปที่ ก.2 อุปกรณ์อิเล็กโตรโฟริซิสที่เชื่อต่อกับแหล่งกำเนิดไฟฟ้า

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลื่อนที่ของโปรตีน (Running buffer) โดยผสม Tris-base น้ำหนัก 1.515 กรัม กับไกลซีน น้ำหนัก 7.2 กรัม และ sodium dodecyl sulfate (SDS) น้ำหนัก 0.5 กรัม ด้วยน้ำปราศจากประจุปริมาตร 500 มิลลิลิตร การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยประกอบอุปกรณ์สำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิสกับแผ่นเจลและนำ Sample Loading Guide วางระหว่างเจลทั้งสองในส่วนของ Electrode Assembly เพื่อใส่ตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และสารตัวอย่างปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องตัวอย่างแต่ละช่อง โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลื่อนที่ของโปรตีนท่วมอยู่ ปิดฝา Lid บน Mini Tank ต่อสายขั้วไฟฟ้าให้สีตรงส่วนของ Banana Plugs และ Jacks ให้ถูกต้องเชื่อมต่ออุปกรณ์สำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิสกับแหล่งกำเนิดไฟฟ้า โดยตั้งค่าความต่างศักย์ 120 โวลต์ ดังแสดงในรูปที่ ก.2 เริ่มต้นการทำ SDS-PAGE โดยสังเกตสี tracking dye เริ่มเคลื่อนที่เป็นแถบ (band) สีน้ำเงิน bromophenol blue จากขั้วลบลงสู่ขั้วบวก แล้วรอให้สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างเคลื่อนที่ลงมาจนกว่าแถบสีน้ำเงินจะเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบด้านล่างของแผ่นเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 80 นาที จึงหยุดการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นนำเจลออกจาก Gel Cassette Sandwich และวัด

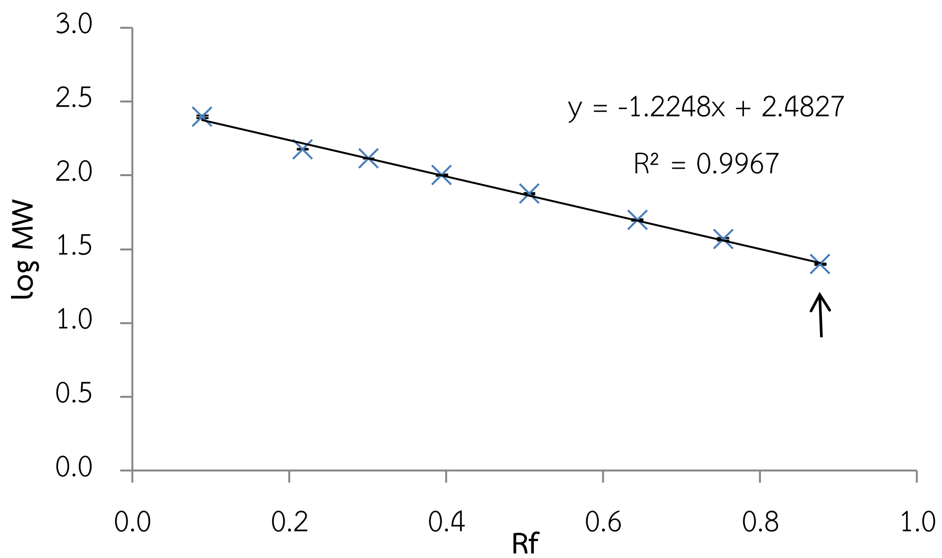
ระยะทางการเคลื่อนที่ของ tracking dye ด้วยการใช้ไม้บรรทัดวัด เพื่อไปคำนวณหา relative mobility โดยนำแผ่น gel ออกจากแผ่นกระจกด้วย plastic gel releaser ช่วยในการแยกแผ่นกระจกสองแผ่นออกจากกัน และตัดส่วน stacking gel ทิ้งไปและนำเจลไปย้อมสี

การย้อมสีโปรตีนด้วยวิธี silver staining เริ่มจากนำ fixing solution I ซึ่งประกอบด้วยเมทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, กรดอะซิติก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร, และน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ fixing solution II ซึ่งประกอบด้วยเมทานอล ปริมาตร 23.75 มิลลิลิตร, กรดอะซิติก ปริมาตร 4.75 มิลลิลิตร, สารละลาย fixing reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร, และน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 19 มิลลิลิตร โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ enhancing solution ซึ่งประกอบด้วยเมทานอล ปริมาตร 23.75 มิลลิลิตร, สารละลาย enhancing reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร, และน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 23.75 มิลลิลิตร โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายเป็นเวลา 10 นาที และล้างแผ่นเจลด้วยน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ silver staining solution ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย staining solution A ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร, สารละลาย staining solution B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร, และน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายเป็นเวลา 15 นาที และล้างแผ่นเจลด้วยน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำ developing solution ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย developing stock solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร กับน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายจนกว่าจะปรากฏแถบโปรตีนบนแผ่นเจลอย่างชัดเจนแล้วเติมสารละลาย stopping solution ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไป เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 3 รอบ

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของการวัดน้ำหนักโมเลกุลจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

แถบโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE มาทำการวัดระยะและนำไปสร้างกราฟระหว่างค่า log MW และ Rf โดย Rf คือระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน/ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye front โดยระยะทางที่วัดเริ่มตั้งแต่ปลายด้านบนสุดของเจล หลังการปรากฏของแถบโปรตีนแล้วทำการวัดระยะและนำไปสร้างกราฟระหว่างค่า log MW และ Rf เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log MW และ Rf โดย m เป็นความชันมีค่าเป็นลบและ b เป็นจุดตัดบนแกน y เมื่อทราบระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการหาแล้วสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (Hames, B. D. 1998) แถบโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ในรูปที่ 4.1 ถูกนำมาสร้างกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของการวัดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการวัดน้ำหนักโมเลกุลจากน้ำหนักโมเลกุลเล็กสุดถึงใหญ่สุดเรียงลำดับตามลูกศรชี้ดังนี้ 25kD:Triosephosphate isomerase, 37kD:Carbonic anhydrase, 50kD:Ovalbumin, 75kD:Bovine serum album, 100kD:Phosphorylase b, 150kD:β-Galactosidase, และ 250kD:Myosin

ตัวอย่างการหาน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจน

หาค่า Rf จาก Rf = ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน/ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye front

ระยะการเคลื่อนที่ของ $\alpha 1$: 190 มิลลิเมตร, $\alpha 2$: 225 มิลลิเมตร, β: 57.5 มิลลิเมตร

ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye front เท่ากับ 615 มิลลิเมตร

ดังนั้น $\alpha 1$, Rf= 190 /615 = 0.31

$\alpha 2$, Rf= 225 /615 = 0.37

β, Rf= 57.5 /615 = 0.09

สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานคือ $y = -1.2248x + 2.4827$

x = Rf ของ $\alpha 1$, $\alpha 2$, β = 0.31, 0.37, 0.09

$y = \log MW$

แทนค่าหา MW $\alpha 1 = 10^{y} = 10^{-1.2248(0.31) + 2.4827} = 127.15$ kD

$\alpha 2 = 10^{-1.2248(0.37) + 2.4827} = 108.29$ kD

$\beta = 10^{-1.2248(0.09) + 2.4827} = 233.45$ kD

ภาคผนวก ค

การวัดความหนืดในตัวของสารละลายคอลลาเจน

การวัดความหนืดโดยการเตรียมสารละลายเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 4 ค่า โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่สูง ทำการวัดที่อุณหภูมิคงที่ การวัดความหนืดของตัวทำละลายบริสุทธิ์โดยจับเวลาเมื่อของเหลวไหลผ่านขีดวัดปริมาตรที่มากับคาปิลลารี วิธีการทำการวัดโดยเตรียมสารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.3 โดยน้ำหนัก ในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ต่อมาปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ลงในเครื่องวิเคราะห์ความหนืดชนิด Ubbelohde (No.II 50120) โดยเครื่องกำหนดปริมาตรที่ใช้วัดไว้ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร จากนั้นดูดแล้วปล่อยสารละลายนี้ เพื่อจับเวลาที่สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านหลอดคาปิลลารี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบันทึกค่าดังกล่าวโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟระหว่าง $\frac{\eta_{sp}}{c}$ กับ c และ $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ กับ c เพื่อพิจารณาค่าความหนืดในตัวของสารละลายจากจุดตัดแกน y ที่ได้จากการสร้างสมการเส้นตรงของ Huggins (ค.1) และ Kraemer (ค.2) ตามลำดับ ดังแสดงในรูป ค.1 (Kahn, L. D. และคณะ 1996)

$$\text{Huggins equation: } \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + \mathrm{k_H}[\eta]^2\mathrm{c} \qquad (ค.1)$$

$$\text{Kraemer equation: } \frac{\ln \eta_{rel}}{c} = [\eta] - \mathrm{k_1}[\eta]^2\mathrm{c} \qquad (ค.2)$$

เมื่อ c คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

t คือ เวลาที่สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านหลอดคาปิลลารี

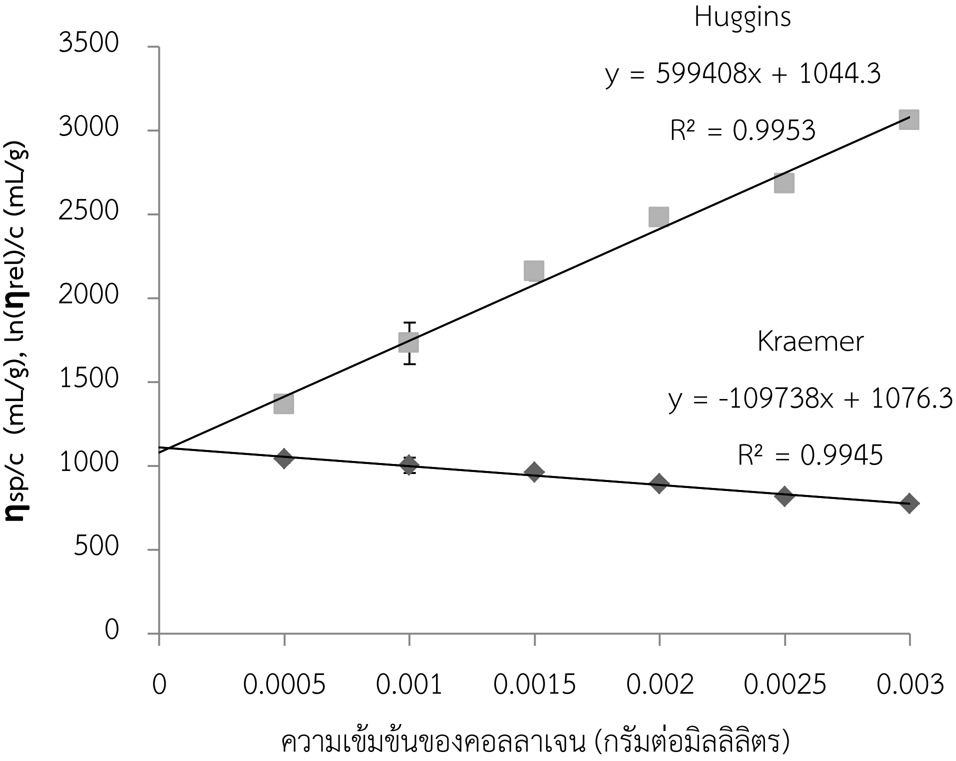
t_0 คือ เวลาที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านหลอดคาปิลลารี

η คือ ความหนืดในตัว (intrinsic viscosity) ของสารละลายตัวอย่าง

$\mathrm{k_H}$ และ $\mathrm{k_1}$ คือ ค่าคงที่ของ Huggins และ Kraemer ตามลำดับ

η_{sp} คือ Specific viscosity หน่วยมิลลิลิตรต่อกรัม

η_{rel} คือ Relative viscosity หน่วยมิลลิลิตรต่อกรัม



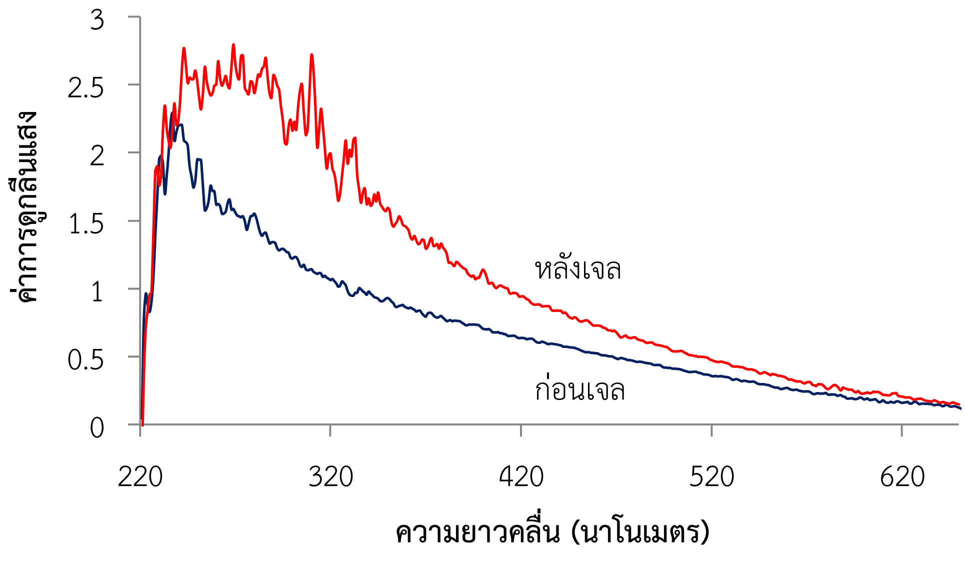
รูปที่ ค.1 ความหนืดในตัวของสารละลายคอลลาเจน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

*η_{sp}/c (mL/g) เส้นบน และ ln (η_{rel})/c (mL/g) เส้นล่าง

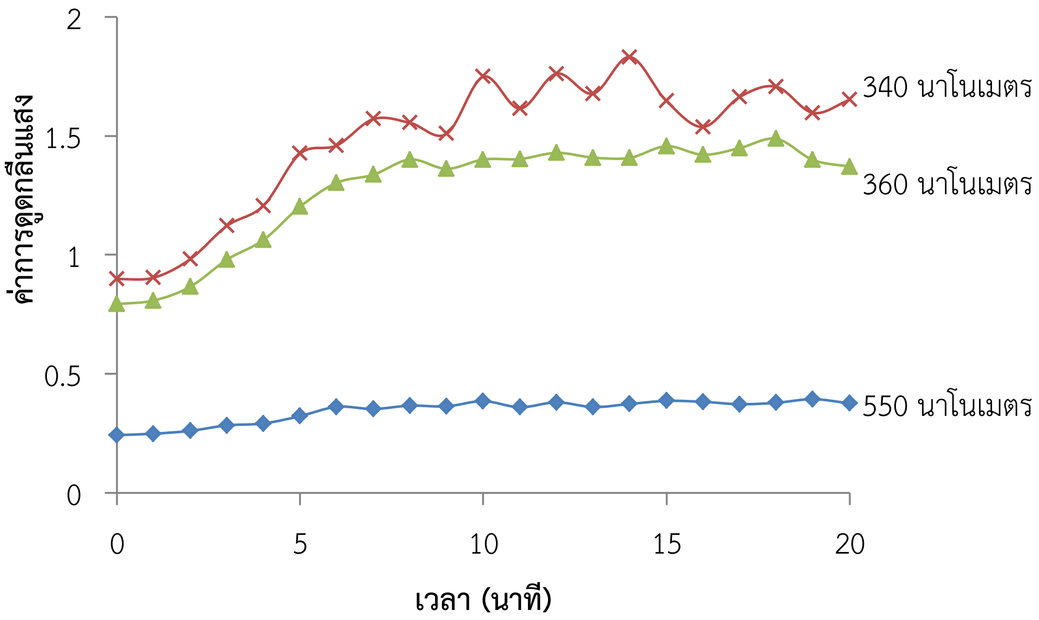
ภาคผนวก ง

กราฟค่าการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนก่อนและหลังเจล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ช่วงความยาวคลื่น 220-650 นาโนเมตร

การสแกนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอลลาเจนก่อนและหลังเจล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ช่วงความยาวคลื่น 220-650 นาโนเมตร โดยใช้ Quartz Cuvette และวัดด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer ซึ่งจะได้กราฟค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในรูปที่ ง.1 เมื่อคอลลาเจนเกิดการเจล การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 340 นาโนเมตร มีค่าไม่เสถียร จึงเลือกนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงกว่า 340 นาโนเมตร มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่าการดูดกลืนแสง และจากการศึกษาของ Suzuki, Y. และคณะ (1999) ซึ่งได้ทำการศึกษาการเกิดเจลของคอลลาเจน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 หรือ 520 นาโนเมตร ผู้วิจัยจึงได้ลองเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340, 360 และ 550 นาโนเมตร มาสร้างกราฟความมัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในรูปที่ ง.2(Suzuki, Y. และคณะ 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Someki et al. 1999)(Suzuki, Y. และคณะ 1999)(Suzuki, Y. และคณะ 1999)(Suzuki, Y. และคณะ 1999)



รูปที่ ง.1 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ก่อนและหลังเจล



รูปที่ ง.2 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 340, 360 และ 550 นาโนเมตร ณ เวลาต่างๆ

เมื่อพิจารณากราฟค่ากรดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 340, 360 และ 550 นาโนเมตร พบว่า ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หลังการเกิดเจล การดูดกลืนแสงมีค่าไม่เสถียร และที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ก่อนและหลังการเกิดเจล ค่าการดูดกลืนแสงแทบจะไม่มีความแตกต่าง จึงไม่สามารถแยกออกได้ว่าช่วงเวลาใดเกิดเจล และที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ก่อนและหลังการเจลค่า ค่าการดูดกลืนแสงมีความเสถียรและแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวัดการเกิดเจลของคอลลาเจนที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

การวัดปริมาณโปรตีน เริ่มจาก การเตรียมสารละลาย fresh reagent และสารละลายโฟลิน โดยสารละลาย fresh reagent ประกอบด้วยสารละลาย 3 ส่วน คือ

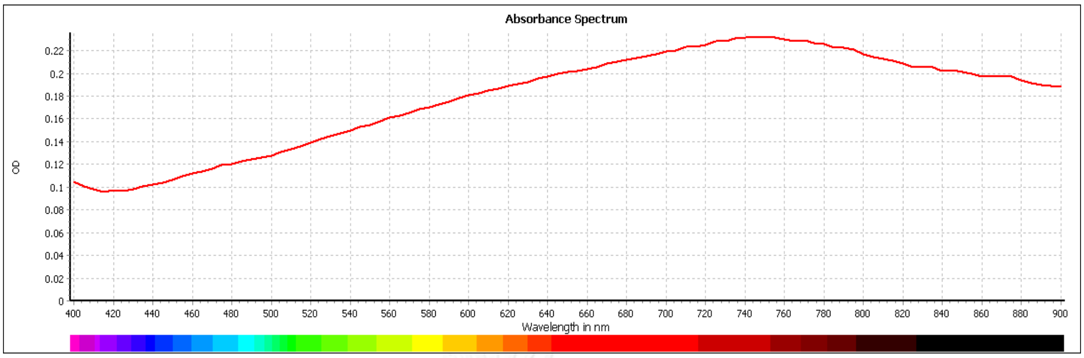
- สาร A เตรียมจากสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
- สาร B เป็นสารละลายโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_8Na_2O_8$) ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- สาร C เป็นสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตหรือจุนสี ($CuSO_4{\bullet}5H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากนั้นนำสาร A, B และ C ผสมกันตามลำดับในอัตรส่วน 200:1:1 การเก็บรักษาสารละลาย fresh reagent ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

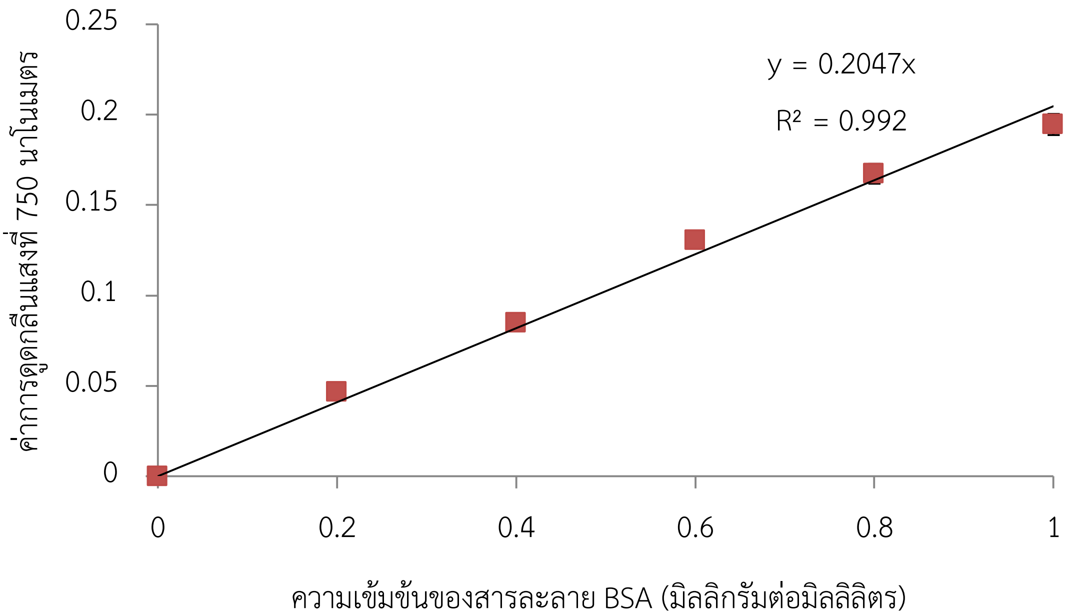
สารละลายโฟลิน (โฟลิน-ซีออคาลโท (Folin-Ciocalteau) หรือเกลือฟอสโฟโมลิบเดตฟอสโฟทังสเทต (Phosphomolybdate Phosphotungstate) ที่อยู่ในรูปสารละลายกรด) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล โดยเตรียมจากสารละลายโฟลินความเข้มข้น 2 นอร์มอล 1 ส่วน ผสมกับน้ำปราศจากประจุ 1 ส่วน

การวัดปริมาณโปรตีน โดยนำสารละลายโปรตีนมาตรฐานคือสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และสารละลายคอลลาเจนในกรดอะซิติกที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก หรือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย fresh reagent ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายโฟลิน ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารละลายที่ได้มีสีแตกต่างกัน โดยสีน้ำเงินมีปริมาณโปรตีนน้อย ส่วนสีน้ำตาลเข้มมีปริมาณโปรตีนมาก จากนั้นปิเปตสารละลายลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well polystyrene tissue culture plate) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader เพื่อสแกนหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด คือ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ จ.1 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และนำมาสร้างกราฟ

มาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆจากความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ จ.2 (n=3)



รูปที่ จ.1 กราฟสแกนหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุดจากการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยวัดสารละลายโปรตีนมาตรฐานคือสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

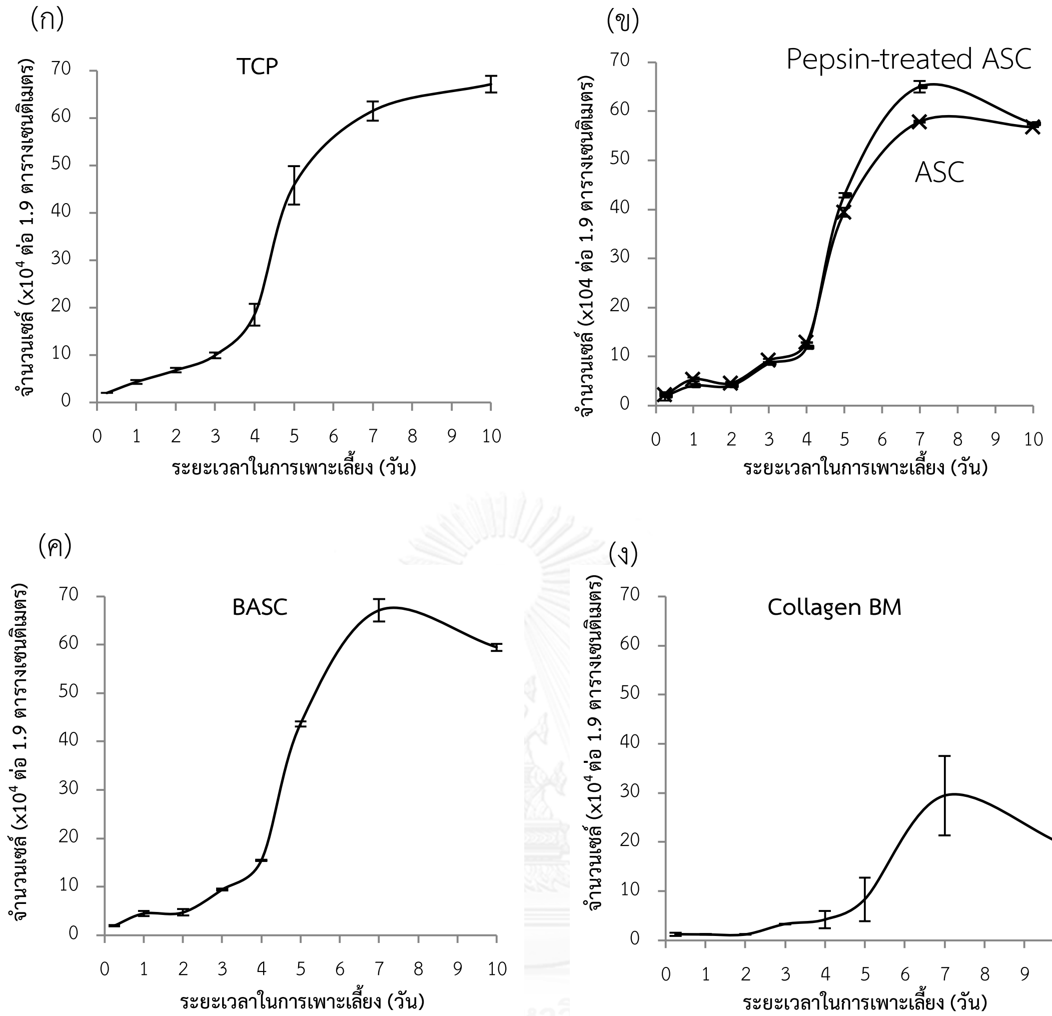


รูปที่ จ.2 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

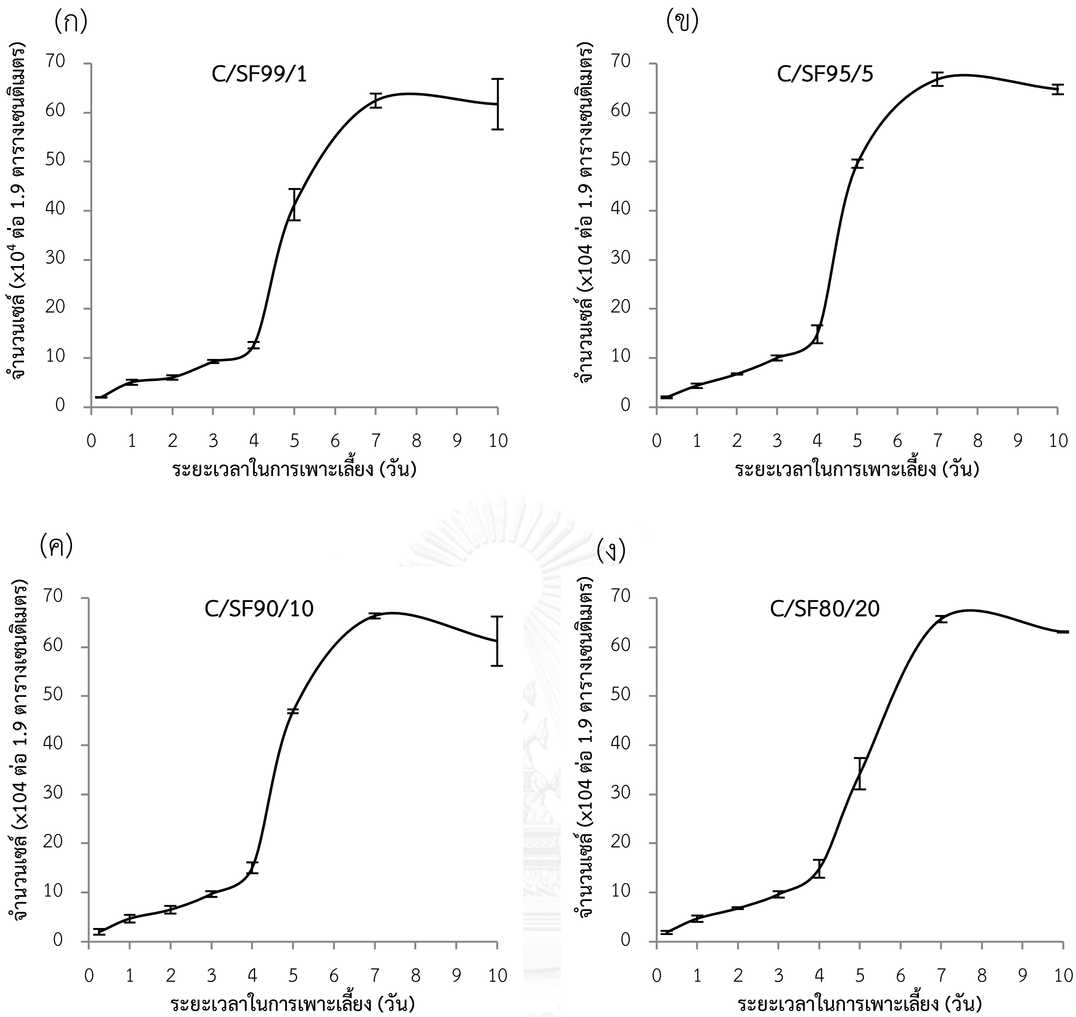
ภาคผนวก ฉ

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929)

การทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) บนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP), ฟิล์มคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) และทรีทด้วยเปปซิน (pepsin-treated ASC, C), คอลลาเจน BM, และคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโคที่สกัดด้วยกรด (BASC, Sigma) แสดงดังรูปที่ ฉ.1 ส่วน C/SF99/1, C/SF95/5, C/SF90/10 และ C/SF80/20 แสดงดังรูปที่ ฉ.2 เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ โดยวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA และร้อยละการยึดเกาะ, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู ดังแสดงในตารางที่ ฉ.1



รูปที่ ฉ.1 การเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ที่เลี้ยงบนฟิล์มชนิดต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน (ก) TCP, (ข) คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (ASC) และทรีทด้วยเปปซิน (Pepsin-treated ASC), (ค) คอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายโคที่สกัดด้วยกรด (BASC, Sigma), (ง) คอลลาเจน BM



รูปที่ ฉ.2 การเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ที่เลี้ยงบนฟิล์มชนิดต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน (ก) C/SF99/1, (ข) C/SF95/5, (ค) C/SF90/10 และ (ง) C/SF80/20

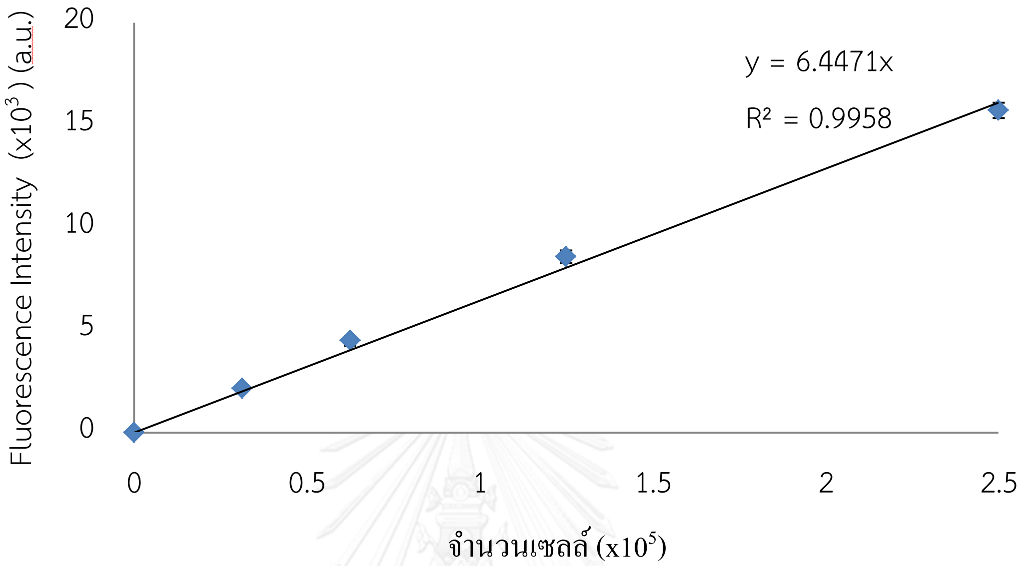
ตารางที่ ฉ.1 ร้อยละการยึดเกาะ, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ที่เลี้ยงบนฟิล์มชนิดต่างๆ

ชนิดของวัสดุ	Lag time (ชั่วโมง)	ร้อยละการยึดเกาะ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	Log phase
TCP	72	101.76 ± 0.31^{a}	0.0190 ± 0.0004^{c}	36.59 ± 0.82^{e}	72-168 ชม.
ASC	96	107.98 ± 0.39^{a}	0.0209 ± 0.0001^{c}	33.20 ± 0.05^{ef}	96-168 ชม.
Pepsin-treated ASC, C	96	96.20 ± 1.02^{a}	0.0237 ± 0.0001^{cd}	29.27 ± 0.17^{fg}	96-168 ชม.
BASC	96	96.55 ± 4.55^{a}	0.0204 ± 0.0006^{c}	33.97 ± 0.93^{ef}	96-168 ชม.
Collagen BM	120	62.82 ± 14.54^{b}	0.0277 ± 0.006^{d}	25.85 ± 6.00^{g}	120-168 ชม.
C/SF99/1	96	102.44 ± 2.79^{a}	0.0222 ± 0.0005^{c}	31.25 ± 0.65^{efg}	96-168 ชม.
C/SF95/5	96	100.57 ± 3.46^{a}	0.0209 ± 0.0019^{c}	33.28 ± 3.02^{ef}	96-168 ชม.
C/SF90/10	96	98.18 ± 1.90^{a}	0.0206 ± 0.0011^{c}	33.66 ± 1.73^{ef}	96-168 ชม.
C/SF80/20	96	96.77 ± 1.31^{a}	0.0207 ± 0.0019^{c}	33.61 ± 2.91^{ef}	96-168 ชม.

(a-e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$)

ภาคผนวก ช

กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ด้วยวิธี DNA



รูปที่ ช.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของของหนู (L929) ด้วยวิธี DNA

ภาคผนวก ซ

มาตรฐานการทดสอบลักษณะสมบัติของคอลลาเขนิด I ใน ASTM F2212

Designation: F 2212 – 08$^{\epsilon 1}$

INTERNATIONAL

Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)[1]

This standard is issued under the fixed designation F 2212; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon (ϵ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

ϵ[1] NOTE—Mercury warning was editorially added in April 2008.

INTRODUCTION

Collagen-based medical products are becoming more prevalent, especially in the area of soft tissue augmentation. The use of collagen in surgery dates back to the late 1800s, with the use of catgut sutures, human cadaveric skin, and fascia. More recently, collagen has been used in hemostatic sponges, dermal equivalents, injectables for soft tissue augmentation, as a matrix for cell-based products and as a vehicle for drug delivery. It is because of the versatility of collagen in medical applications that specific characterizations should be performed as a way to compare materials.

1. Scope

1.1 This guide for characterizing collagen-containing biomaterials is intended to provide characteristics, properties, and test methods for use by producers, manufacturers, and researchers to more clearly identify the specific collagen materials used. With greater than 20 types of collagen and the different properties of each, a single document would be cumbersome. This guide will focus on the characterization of Type I collagen, which is the most abundant collagen in mammals, especially in skin and bone. Collagen isolated from these sources may contain other types of collagen, for example, Type III and Type V. This guide does not provide specific parameters for any collagen product or mix of products or the acceptability of those products for the intended use. The collagen may be from any source, including, but not limited to animal or cadaveric sources, human cell culture, or recombinant sources. The biological, immunological, or toxicological properties of the collagen may vary depending on the source material. The properties of the collagen prepared from each of the above sources must be thoroughly investigated, as the changes in the collagen properties as a function of source materials is not thoroughly understood. This guide is intended to focus on purified Type I collagen as a starting material for surgical implants and substrates for tissue engineered medical products (TEMPs); some methods may not be applicable for gelatin nor for tissue implants. This guide may serve as a template for characterization of other types of collagen.

1.2 The biological response to collagen in soft tissue has been well documented by a history of clinical use (**1, 2**)[2] and laboratory studies (**3, 4, 5, 6**). Biocompatibility and appropriateness of use for a specific application(s) is the responsibility of the product manufacturer.

1.3 **Warning—**Mercury has been designated by EPA and many state agencies as a hazardous material that can cause central nervous system, kidney, and liver damage. Mercury, or its vapor, may be hazardous to health and corrosive to materials. Caution should be taken when handling mercury and mercury-containing products. See the applicable product Material Safety Data Sheet (MSDS) for details and EPA's website (http://www.epa.gov/mercury/faq.htm) for additional information. Users should be aware that selling mercury or mercury-containing products, or both, in your state may be prohibited by state law.

1.4 The following precautionary caveat pertains only to the test method portion, Section 5, of this guide. *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any,*

[1] This guide is under the jurisdiction of ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.42 on Biomaterials and Biomolecules for TEMPs.

Current edition approved Feb. 1, 2008. Published March 2008. Originally approved in 2002. Last previous edition approved in 2007 as F 2212 – 02 (2007) $^{\epsilon 1}$.

[2] The boldface numbers in parentheses refer to the list of references at the end of this standard.

associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory requirements prior to use.

2. Referenced Documents

2.1 *ASTM Standards:* [3]

E 1298 Guide for Determination of Purity, Impurities, and Contaminants in Biological Drug Products
F 619 Practice for Extraction of Medical Plastics
F 720 Practice for Testing Guinea Pigs for Contact Allergens: Guinea Pig Maximization Test
F 748 Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices
F 749 Practice for Evaluating Material Extracts by Intracutaneous Injection in the Rabbit
F 756 Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials
F 763 Practice for Short-Term Screening of Implant Materials
F 813 Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices
F 895 Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity
F 981 Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone
F 1251 Terminology Relating to Polymeric Biomaterials in Medical and Surgical Devices
F 1439 Guide for Performance of Lifetime Bioassay for the Tumorigenic Potential of Implant Materials
F 1903 Practice for Testing For Biological Responses to Particles ***in vitro***
F 1904 Practice for Testing the Biological Responses to Particles ***in vivo***
F 1905 Practice For Selecting Tests for Determining the Propensity of Materials to Cause Immunotoxicity
F 1906 Practice for Evaluation of Immune Responses In Biocompatibility Testing Using ELISA Tests, Lymphocyte Proliferation, and Cell Migration
F 1983 Practice for Assessment of Compatibility of Absorbable/Resorbable Biomaterials for Implant Applications
F 2148 Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)

2.2 *ISO Standards:*[4]

ISO 10993–1 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing
ISO 10993–3 Tests for Genotoxicity, Carcinogenicity and Reproductive Toxicity
ISO 10993–9 Framework for Identification and Quantification of Potential Degradation Products
ISO 10993–10 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 10: Tests for Irritation and Delayed-Type Hypersensitivity
ISO 10993–17 Methods for Establishment of Allowable Limits for Leachable Substances Using Health-Based Risk Assessment
ISO 13408–1 Aseptic Processing of Health Care Products—Part 1: General Requirements
ISO 14971 Medical Devices—Application of Risk Management to Medical Devices

2.3 *EN (European Norm) Documents:*[5]

EN 12442–1 Animal Tissues and their Derivatives Utilized in the Manufacture of Medical Devices—Part 1: Analysis and Management of Risk
EN 12442–2 Controls on Sourcing, Collection and Handling
EN 12442–3 Validation of the Elimination and/or Inactivation of Virus and Transmissible Agents

2.4 *U. S. and European Pharmacopeia Documents:*[6]

United States Pharmacopeia (USP), Edition XXX (30)
USP 30/NF 19 Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin
European Pharmacopeia 5.0

2.5 *Code of Federal Regulations:*[7]

21 CFR 312 Investigational New Drug Application
21 CFR Part 820 Quality System Regulation
Federal Register Vol. 43, No. 141, Friday, July 21, 1978
21 CFR Parts 207, 807, and 1271 Human Cells, Tissues and Cellular and Tissue-Based Products, Establishment Registration and Listing
Federal Register, Vol. 66, No. 13, Jan 19, 2001/Rules and Regulations, p. 5447
Federal Register, Vol. 72, No. 8, Jan. 12, 2007, pp. 1581–1619, Proposed Rule: Use of Materials Derived from Cattle in Medical Products Intended for Use in Humans and Drugs Intended for Use in Ruminants
21 CFR Part 1271, Part C Suitability Determination for Donors of Human Cell and Tissue-based Products, Proposed Rule
Current Good Tissue Practice for Manufacturers of Human Cellular and Tissue-Based Products, Inspection and Enforcement. Proposed Rule. Federal Register/Vol. 66, No. 5/January 8, 2001/Proposed Rules, pp. 1552-1559
Guidance for Screening and Testing of Donors of Human Tissue Intended for Transplantation, Availability. Federal Register/Vol. 62, No. 145/July 29, 1997/NoticesDraft Guidance for Preclinical and Clinical Investigations of Urethral Bulking Agents used in the Treatment of Urinary

[3] For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, www.astm.org, or contact ASTM Customer Service at service@astm.org. For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

[4] Available from International Organization for Standardization (ISO), 1 rue de Varembé, Case postale 56, CH-1211, Geneva 20, Switzerland, http://www.iso.ch.

[5] Available from European Committee for Standardization (CEN), 36 rue de Stassart, B-1050, Brussels, Belgium, http://www.cenorm.be.

[6] Available from U.S. Pharmacopeia (USP), 12601 Twinbrook Pkwy., Rockville, MD 20852-1790, http://www.usp.org.

[7] Available from U.S. Government Printing Office Superintendent of Documents, 732 N. Capitol St., NW, Mail Stop: SDE, Washington, DC 20401, http://www.access.gpo.gov.

Incontinence. November 29, 1995. (ODE/DRARD/ULDB), Document No. 850

Guidance for Industry and for FDA Reviewers, Medical Devices Containing Materials Derived from Animal Sources (Except for *In Vitro* Diagnostic Devices), November 6, 1998, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health

CFR 610.13(b) Rabbit Pyrogen Assay

2.6 *ICH Documents:*[8]

ICH M3 Guidance for Industry M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals 62 FR 62922 (1997)

ICH S2A Guideline for Industry S2A Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. 61 FR 18199 (1996)

ICH S2B Guidance for Industry S2B Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals 62 FR 62472 (1997)

ICH S5A Guideline for Industry S5A Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products. 59 FR 48746 (1994)

ICH S5B Guidance for Industry S5B Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products: Addendum on Toxicity to Male Fertility. 61 FR 15360 (1996)

ICH S1A Guideline for Industry S1A The Need for Long-term Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. 61 FR 8153 (1996)

ICH S1B Guidance for Industry S1B Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. 63 FR 8983 (1998)

ICH S1C Guideline for Industry S1C Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. 60 FR 11278 (1995)

ICH S1C(R) Guidance for Industry Addendum to Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals: Addition of a Limit Dose and Related Notes. 62 FR 64259 (1997)

ICH Q1A ICH Harmonized Tripartite Guidance for Stability Testing of New Drug Substances and Products (September 23, 1994)

U.S. Food and Drug Administration (FDA and Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), 1998 International Conference on Harmonization (ICH), Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, Consensus Guideline ICH Viral Safety Document: Step 5

2.7 *FDA Documents:*[9]

FDA Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Health-care Products, DHHS, December 1987

U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 1993 Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals

U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 1997 Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, 94D-0259

FDA Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals, Kinetic LAL techniques, DHHS, July 15, 1991

2.8 *AAMI Documents:*[10]

ANSI/AAMI/ISO 11737-1: 2006 Sterilization of Medical Devices—Microbiological Methods—Part 1: Estimation of Bioburden on Product

ANSI/AAMI/ISO 11737-2: 1998 Sterilization of Medical Devices—Microbiological Methods—Part 2: Tests of Sterility Performed in the Validation of a Sterilization Process

AAMI TIR No. 19-1998 Guidance for ANSI/AAMI/ISO 10993-7: 1995, Biological Evaluation of Medical Devices—Part 7: Ethylene Oxide Sterilization Residuals

AAMI/ISO 14160-1998 Sterilization of Single-Use Medical Devices Incorporating Materials of Animal Origin—Validation and Routine Control of Sterilization by Liquid Chemical Sterilants

AAMI ST67/CDV-2: 1999 Sterilization of Medical Devices—Requirements for Products Labeled "Sterile"

2.9 *Other References:*

Draft Guidance for Preclinical and Clinical Investigations of Urethral Bulking Agents Used in the Treatment of Urinary Incontinence, November 29, 1995. (ODE/DRARD/ULDB), Document No. 850[11]

Council Directive 93/42/EEC, with Respect to Medical Devices Using Tissues of Animal Origin[12]

Commission Directive 2003/32/EC, with Respect to Medical Devices Manufactured Using Tissues of Animal Origin[12]

EMEA/410/01-rev.2, Committee for Proprietary Medical Products, Note for Guidance on Minimizing the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medical Products[13]

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, (EMEA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) Guidance Document for Decision Trees for the Selection of Sterilisation Methods (CPMP/QWP/054/98 corr 2000) and Annex to Note for Guidance on

[8] Available from International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), ICH Secretariat, c/o IFPMA, 15 ch. Louis-Dunant, P.O. Box 195, 1211 Geneva 20, Switzerland, http://www.ich.org.

[9] Available from Food and Drug Administration (FDA), 5600 Fishers Ln., Rockville, MD 20857, http://www.fda.gov.

[10] Association for the Advancement of Medical Instrumentation, 1110 N. Glebe Rd., Suite 220, Arlington, VA 22201-4795.

[11] Available from the FDA, 5600 Fishers Ln., Rockville, MD 20857. http://www.fda.gov/cdrh/ode/oderp850.html.

[12] Available from Office for Official Publications of the European Communities—European Law, 2, rue Mercier, L-2985, Luxembourg, http://eur-lex.europa.eu/en/ index.htm.

[13] Available from European Medicines Agency (EMEA), 7 Westferry Circus, Canary Wharf, London E14 4HB, U.K., http://www.eudora.org/emea.html, and http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/TSE%20NFG%20410-rev2.pdf.

Development Pharmaceutics (CPMP/QWP/155/96)[14]

3. Terminology

3.1 *Definitions:*

3.1.1 *adventitious agents*, *n*—an unintentionally introduced microbiological or other infectious contaminant. In the production of TEMPs, these agents may be unintentionally introduced into the process stream or the final product, or both.

3.1.2 *biocompatibility*, *n*—a material may be considered biocompatible if the material performs with an appropriate host response in a specific application (**7**).

3.1.3 *collagen*, *n*—Collagens form a family of secreted proteins with predominantly structural function. At least twenty genetically different family members have been identified so far. Several groups of collagen molecules have been classified based upon protein domain structures, macromolecular assemblies, and exon structures of the corresponding genes. All collagens have a unique triple helical structure configuration of three polypeptide units known as alpha-chains. Proper alignment of the alpha chains of the collagen molecule requires a highly complex enzymatic and chemical interaction *in vivo*. As such, preparation of the collagen by alternate methods may result in improperly aligned alpha chains and, putatively, increase the immunogenicity of the collagen. Collagen is high in glycine, L-alanine, L-proline, and 4-hydroxyproline, low in sulfur, and contains no L-tryptophan. When heated (for example, above 60°C), the helical structure of collagen is denatured irreversibly to single α chains with some β and γ bands (gelatin). At each end of the chains are short non-helical domains called telopeptides, which are removed in some collagen preparations. Through non-covalent interactions with sites on adjacent helixes, fibrillogenesis is achieved. Subsequently, non-reducible cross-links are formed. This guide will focus on the characterization of Type I collagen, which is the most abundant collagen in mammals. Type I collagen is part of the fibrillar group of collagens. It derives from the COL1A1 and COL1A2 genes, which express the alpha chains of the collagen. Type I collagen can be associated with Type III and Type V collagen and also with the other non-collagenous proteins like elastin and other structural molecules like glycosaminoglycans and complex lipoproteins and glycoproteins.

3.1.4 *degradation*, *n*—change in chemical, physical, or molecular structure or appearance (that is, gross morphology) of material.

3.1.5 *endotoxin*, *n*—a high molar mass lipopolysaccharide (LPS) complex associated with the cell wall of gram-negative bacteria that is pyrogenic in humans. Though endotoxins are pyrogens, not all pyrogens are endotoxins.

3.1.6 *medical product*, *n*—any diagnostic or therapeutic treatment that may be regulated as a device, biologic, drug or combination product.

3.1.7 *microorganism*, *n*—bacteria, fungi, yeast, mold, viruses, and other infectious agents. However, it should be noted that not all microorganisms are infectious or pathogenic.

3.1.8 *solubility*, *n*—a measure of the extent to which the material can be dissolved. Any colloidal system without obvious phase separation can be considered soluble. In the context of collagen, refers to the dissociation of the fibrillar aggregates of collagen molecules into a solution. Native Type I collagen, which is soluble in dilute acids, but not soluble at physiological conditions, is termed “insoluble” or “acid soluble,” while simple aggregates of non-fibrillar collagen soluble in neutral salt solutions are termed “neutral salt soluble.” Post translational surface charge modifications may alter the solubility of collagen in neutral pH condition.

3.1.9 *sterilization*, *n*—the destruction or removal of all microorganisms in or about an object, as by chemical agents, electron beam, gamma irradiation, or filtration. If the medical product collagen permits, terminal sterilization is preferential to aseptic processing.

3.1.10 *suspension*, *n*—the dispersion of a solid through a liquid with a particle size large enough to be detected by purely optical means.

4. Significance and Use

4.1 The objective of this guide is to provide guidance in the characterization of Type I collagen as a starting material for surgical implants and substrates for tissue engineered medical products (TEMPs). This guide contains a listing of physical and chemical parameters that are directly related to the function of collagen. This guide can be used as an aid in the selection and characterization of the appropriate collagen starting material for the specific use. Not all tests or parameters are applicable to all uses of collagen.

4.2 The collagen covered by this guide may be used in a broad range of applications, forms, or medical products, for example (but not limited to) medical devices, tissue engineered medical products (TEMPs) or cell, drug, or DNA delivery devices for implantation. The use of collagen in a practical application should be based, among other factors, on biocompatibility and physical test data. Recommendations in this guide should not be interpreted as a guarantee of clinical success in any tissue engineered medical product or drug delivery application.

4.3 The following general areas should be considered when determining if the collagen supplied satisfies requirements for use in TEMPs. These are source of collagen, chemical and physical characterization and testing, and impurities profile.

4.4 The following documents relating to the production, regulation and regulatory approval of TEMPs products should be considered when determining if the collagen supplied satisfies requirements for use in TEMPs:

FDA CFR:
21 CFR 3: Product Jurisdiction:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=3
21 CFR 58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58

FDA/CDRH CFR and Guidances:
21 CFR Part 803: Medical Device Reporting:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=803
21 CFR 812: Investigational Device Exemptions:

[14] Available from European Medicines Agency (EMEA), 7 Westferry Circus, Canary Wharf, London E14 4HB, U.K., http://www.eudora.org/emea.html, and http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/005498en.pdf.

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=812
21 CFR 814: Premarket Approval of Medical Devices :
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=814
21 CFR 820: Quality System Regulation:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=820
Design Control Guidance for Medical Device Manufacturers:
http://www.fda.gov/cdrh/comp/designgd.pdf
Preproduction Quality Assurance Planning Recommendations for Medical Device Manufacturers (FDA 90-4236):
http://www.fda.gov/cdrh/manual/appende.html
The Review and Inspection of Premarket Approval Applications under the Bioresearch Monitoring Program—Draft Guidance for Industry and FDA Staff:
http://www.fda.gov/cdrh/comp/guidance/1602.pdf

FDA/CDRH Search Engines:
CDRH Guidance Search Engine:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfggp/search.cfm
CDRH Premarket Approval (PMA) Search Engine:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMA/pma.cfm
CDRH 510(k) Search Engine:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm
CDRH Recognized STANDARDS Search Engine :
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfStandards/search.cfm

FDA/CBER CFR and Guidances:
21 CFR 312: Investigational New Drug Application :
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=312
21 CFR 314: Applications for FDA Approval to Market a New Drug:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=31
21 CFR 610: General Biological Products Standards:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=610
21 CFR 1271: Human Cells, Tissues and Cellular and Tissue-Based Products:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=1271
Cellular & Gene Therapy Guidances and Other Publications:
http://www.fda.gov/cber/genetherapy/gtpubs.htm
Human Tissue Guidances and Other Publications:
http://www.fda.gov/cber/tissue/docs.htm
CBER Product Approval Information:
http://www.fda.gov/cber/efoi/approve.htm
21 CFR 600, 601 BLA Regulations:
http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_07/21cfrv7_07.html
21 CFR 210, 211 GMP Regulations:
http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_07/21cfr210_07.html

5. Chemical and Physical Characterizations

5.1 These methods are suggested assays; however, other validated assay methods may be used. Selection of assay systems will vary depending on the configuration of the collagen (that is, soluble or insoluble). The user should ensure that the method selected is reliable and commonly accepted in protein chemistry. A review of collagen materials may be found in Li, 2000 (**8**), while a review of the collagen family of proteins may be found in Refs (**9-14**). When selecting an appropriate test method, the user should note that impurities in highly purified collagen are low or lower than 1 to 2 %, so sensitive test methods need to be utilized. For soluble collagen, the following represents a non-inclusive list of assay systems available: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE); peptide mapping; and physicochemical analysis. A similar list for insoluble collagen may include, but not be limited to, assay methods for hexosamine (that is, detection of glycoproteins), lipid, total sugar, desmosine (that is, elastin), and amino acid composition (that is, collagen composition profile; non-collagenous amino acids). Additionally, methods such as transmission electron microscopy may be helpful in characterizing the collagen fibers or collagen superstructure.

5.2 The concentration of collagen should be expressed in mass/volume or mass/mass. Colorometric assays or amino acid analysis for hydroxyproline are commonly used methods to measure collagen content.

5.3 Amino acid analysis will provide information on the composition of the amino acids of collagen (that is, the amino acids must be within the range of published data for highly purified collagen preparations, generally in the acid soluble form). Amino acid analysis is routinely performed on hydrolyzed collagens by reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This method can be used to quantify hydroxyproline, tyrosine, tryptophan, and cysteine. There are other methods available for amino acid analysis.

5.4 Purity of soluble collagen can be analyzed by SDS-PAGE, either on the collagen directly or after digestion of the collagen with purified bacterial collagenase to detect any remaining proteins.

5.5 *Elastin Assay*—Elastin can be a component of the impurities in an insoluble collagen preparation. One method to assay for elastin, although other methods are available, involves the detection of desmosine (**15**). These impurities can be detected by Western blots, ELISAs, and other types of assays.

5.6 Peptide mapping is one possible method to identify Type I collagen. The most commonly used peptide mapping method utilizes Cyanogen Bromide (CNBr) digestion. The digest can be analyzed by SDS-PAGE or HPLC.

5.7 *Impurities Profile*—The term impurity relates to the presence of extraneous substances and materials in the collagen. These impurities can be detected by Western blots, ELISAs, GC-MS, and other types of assays. The user is also directed to Guide E 1298 for additional information. If there is a concern for the presence of processing aids or other impurities associated with the collagen, they should be addressed with the supplier. The major impurities of concern include, but are not limited to the following: endotoxins, glycosaminoglycans, elastin, lipids, improperly aligned collagen molecules, host cell contaminants, cell culture contaminants, heavy metals, bioburden, viruses, transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents, cross-linking and enzymatic agents, and components used in extraction or solubilization (for example, acids, surfactants, solvents, and so forth). Type III collagen may also be associated with Type I collagen. While its presence may have no adverse effect on product quality, levels should be evaluated and controlled for lot-to-lot consistency. At minimum, any protein impurity of greater than 1 % in the final collagen preparation should be identified and quantified.

5.8 *Crosslinking Reactions with Collagen*—Collagen is a very stable protein due to its triple-helical structure, imparting resistance to most proteolytic enzymes. It is still sensitive to collagenase, however. The stability can be enhanced by crosslinking the molecule by physical or chemical means. Both inter- and intrachain crosslinking can occur due to propensity of collagen fibers to naturally crosslink. Crosslinking agents and methods include aldehydes, carbodiimides, epoxides, diisocyanates, non-enzymatic glycosylation, dehydrothermal treatment (DHT), radiation (for example, gamma, electron beam) and ultraviolet light. For chemical crosslinking, excess crosslinker should be removed and quantitated before or at the final product stage. A crosslinker may be cytotoxic and any component in the final product needs to be quantitated. There are several methods available, including, mass spec (MS), GC/MS, or other assays. A cytotoxicity assessment will also provide a measure of acceptable crosslinker levels. Physical crosslinking may result in unwanted changes to the structure of the collagen molecule and should be assessed with qualification assays appropriate to the clinical indication under consideration. Direct measurement of collagen crosslinking can be performed looking at the altered amino acid composition and using methods appropriate for the crosslinker. One method, for example, (other methods exist) to measure degree of crosslinking when lysine residues are involved include detecting free lysines and hydroxylysines by labeling the ε-amino acid groups with 2.4.6 trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), where the TNBS-labeled amino acids absorb at 345 nm with a molar absorptivity of 1.46×10^4 L/mole × cm. Amino acid composition can also be examined by analysis of sodium borohydride-treated collagen. The thermal denaturation characteristics can also be measured by Differential Scanning Calorimetry (DSC) (**16**). The thermal denaturation characteristics can sometimes be correlated with the crosslink density. The % water uptake (% swell), using the equation $(W_W–W_D)/W_W$, where W_D = dry weight and W_W = wet weight, is also an indirect measure of collagen crosslinking. The tensile strength can be altered by crosslinking. Measurements using an Instron or a rheometer will note a change in properties after crosslinking. Collagen crosslinking imparts a resistance to the proteolytic enzyme collagenase. Collagenase is the one enzyme that will digest triple-stranded collagen. When collagen is crosslinked, it is more resistant to breakdown and extensive crosslinking will afford the greatest resistance to collagenase.

5.9 *Endotoxin Content*—Endotoxin contamination is difficult to prevent because it is ubiquitous in nature, stable and small enough to pass through sterilizing filters (0.22 μm). Endotoxin tests for collagen include the gel clot, endpoint assay and the kinetic assay. The gel clot test is the simplest and easiest of the Limulus amebocyte lysate (LAL) test methods, although much less sensitive than the kinetic assay. The quantitative kinetic assay, which measures the amount of time required to reach a predetermined optical density, is the most sensitive (Food and Drug Administration, Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Healthcare Products). Each new lot of reagents should meet acceptance criteria established by appropriate qualification or validation studies (for investigational or licensed/cleared products, respectively). The endotoxin level in collagen will ultimately be critical to its use in biomedical applications where there are regulatory limits to the amount of endotoxin that can be implanted into humans. Relevant FDA guidance for allowable levels and information regarding validation of endotoxin assays should be consulted if human trials are contemplated (Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals). The user is also directed to CFR 610.13(b) for information pertaining to the rabbit pyrogen assay.

5.10 *Heavy Metal Content by the USP Method*—This test is provided to demonstrate that the content of heavy metal impurities does not exceed a limit in the individual product specification. This method is based on <231> Heavy Metals, 1st and 6th Supplement USP-NF. Substances that typically respond to this test are lead, mercury, bismuth, arsenic, antimony, tin, cadmium, silver, copper, and molybdenum. Under the specified test conditions, the limit is determined by a concomitant visual comparison of metals that are colored by sulfide ion with a control prepared from a Standard Lead Solution. Additional heavy metal contaminants may be present due to processing. If necessary, the user may detect these contaminants by various methods that may include, but are not limited to, spectrographic, chromatographic, and flame atomic absorption techniques.

5.11 *Microbiological Safety*—Bacteria, viruses, and fungi are also contaminants that can arise in an a biological sample. User will validate sterilization and characterize its effect on the product. The presence of bacteria may also contribute to the presence of endotoxins. The following Microbiological Tests in USP 30 are of particular relevance: Microbial Limit Tests <61>, Sterility Tests <71>, Sterilization and sterility assurance of compendial articles <12211>, and the Biological Tests and Assays: Bacterial Endotoxins Tests <85>. The user should also consider other relevant standards, such as, but not limited to, Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) standards and international standards, of which the following are examples: ANSI/AAMI/ISO 11737-1: 2006; ANSI/AAMI/ISO 11737-2: 1998; and ISO 13408–1. The collagen is first dissolved in a sterile, aqueous solution, then filtered using sterile techniques through a 0.45 µm membrane filter. The filters are subsequently incubated on Tryptic Soy Agar to determine the presence of bacteria, and on Sabouraud Dextrose Agar to determine the presence of yeast and mold. If collagen products are intended to serve as a barrier to microorganisms, this function will need to be validated with specific experiments.

5.12 Carbohydrate analysis of collagens can be carried out by classical gas-liquid chromatographic methods or spectrophotometric methods. If using a novel source, then glycosylation of proteins may need to be considered.

5.13 Trypsin Susceptibility will detect that portion of collagen that has been denatured during purification steps such as acid and base treatment, solvent treatment, and so forth. Trypsin will digest that portion of the collagen and can be measured by assaying the hydroxyproline content of the supernatant. Triple helical collagen is resistant to digestion by most proteases. Susceptibility to trypsin or other appropriate proteases is determined by exposing the collagen to the enzyme and assaying the digest for degradation. There are several methods for this test.

5.14 Differential Scanning Calorimetry (DSC) determines dissociation temperature of collagens in fibrils, as well as detecting microfibrils and denatured collagen at lower melting temperatures. (See also 5.8, crosslinking reactions with collagen).

5.15 Viscosity is more applicable to gels or suspensions but may be useful with collagen configured in forms such as, but not limited to, pastes or films **(17)**. Viscosity of collagen-based materials depends on a number of factors which may include, but are not limited to, the following: solution or dispersion/suspension, concentration, temperature, operating condition, and so forth. It is not feasible to determine the viscosity of films. This is a routine test performed with a viscometer (not a u-tube). The user must clearly state the conditions of the test.

5.16 Transmission electron microscopy may be used to show the quality of collagen fibers. Unraveling or changes in banding will be obvious.

5.17 DNA sequence data on recombinant or transgenic source cells: Verify sequence data for expression gene, that is, COL1A1 or COL1A2.

5.18 The collagen material shall have specifications for an extensive set of chemical and physical properties such as, but not limited to, those listed in Table 1. The table represents methods which may or may not be appropriate for characterizing a particular collagen sample. Not all the methods listed may be required to characterize the sample, and the specificity and sensitivity vary among the methods listed. The user should be familiar with the limitations of the appropriate test methods.

5.19 *Analysis for Type II, IV, and Other Collagens*—Tissues commonly used to isolate Type I collagen typically contain some Type III collagen which coexists in many tissues. Type II collagen is found primarily in cartilage, while Type IV collagen is found in basement membranes and has been associated with Goodpasture's Syndrome (Wieslander, J., et al, **(18)**). The purity of collagen is important in determining the potential for safety problems and providing criteria for the consistency of the manufacturing process. For example, skin collagen is composed of approximately 90 % type I, 8–10 % type III, and the reminder is made up of trace amounts of the less abundant collagens, primarily type IV, V, and VI (Holbrook and Smith, **(19)**). As all collagens contain triple helical domains, the properties of different collagen types can be very similar. Detection by Western Blot analysis, therefore, requires the use of antibodies that recognize epitopes in the more diverse

TABLE 1 Characterization Methods for Type I Collagen

Characterization Method	Applicable to
Chemical	
Appearance	Soluble or Insoluble
Concentration	Soluble or Insoluble
Purity	Soluble or Insoluble
Amino acid analysis	Soluble or Insoluble
Peptide mapping	Soluble or Insoluble
Impurities profile, includes Heavy Metal Analysis	Soluble or Insoluble
Carbohydrate analysis	Soluble or Insoluble
Trypsin resistance	Soluble or Insoluble, Mainly Insoluble
Collagenase resistance	Soluble or Insoluble, Mainly Insoluble
pH of implantable	Soluble or Insoluble
Additives (cross-linkers, lubricants, drugs, sterilents)	Soluble or Insoluble
Physical	
Shrink Temperature (DSC)	Insoluble
Viscosity	Mainly soluble
TEM	Insoluble
SDS-PAGE	Soluble or Insoluble
Moisture Content (5 to 20 %), dependent on storage environment	Insoluble
Electron Micrograph (native banded 640 Å structure for fibrils)	Insoluble
Biochemical	
Endotoxin level	Soluble or Insoluble
Bioburden	Soluble or Insoluble
% Type I collagen/Total Protein	Soluble or Insoluble
% Other Types Collagen and List of which Types present	Soluble or Insoluble
Total DNA (ppm or %)	Soluble or Insoluble
Total Lipid	Soluble or Insoluble
% native collagen (by trypsin resistance, circular Dichroism)	Soluble or Insoluble

Abbreviation in Table:
DSC = Differential Scanning Calorimetry
TEM = Transmission Electron Microscopy
SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

non-helical regions. Antibodies are available for Types I–VI collagens, and possibly others, for use in Western Blot analyses following SDS gel electrophoresis. The extent of analysis required will depend upon the risk of other collagen types being present as impurities in a particular collagen product.

6. Product Development Considerations

6.1 *Storage Conditions/Shelf Life Stability of Collagen*—For collagen, the most relevant stability-indicating parameters are those related to the functionality of the polymer. Dependent upon what function the collagen will have in the final formulation, parameters such as viscosity (apparent and intrinsic) and biological activity, along with other parameters deemed relevant, may also be considered. Storage conditions are of importance, especially for collagen solutions. International Conference on Harmonization (ICH) guidance documents should be consulted for information on stability testing of pharmaceuticals (that is, ICH Q1A ICH).

6.2 *Sterilization Method, if Applicable, and Effects of Sterilization on Product*—The user should verify that the sterilization method does not adversely effect the collagen end product. Collagen can be sterilized by gamma irradiation, electron-beam, or by ethylene oxide, or prepared using aseptic processing steps. Potential degradation of the collagen or sterilization residuals should be evaluated to determine the impact on the product. Solutions of collagen may be *(1)* filter sterilized if the viscosity of the collagen solution permits; or *(2)* gamma-irradiated. Any changes in viscosity may reflect an alteration of the molecular mass and should be evaluated. The method of sterilization is primarily dictated by the effect on the product effectiveness. The method chosen must be validated to determine the effectiveness of sterilization. The reader should refer to the most current version of the relevant standards regarding the sterilization of healthcare products by radiation, steam and ethylene oxide gas, such as AAMI TIR No. 19-1998; AAMI/ISO 14160-1998; and AAMI ST67/CDV-2: 1999; The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, (EMEA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) guidance document for Decision Trees for the Selection of Sterilisation Methods (CPMP/QWP/054/98 corr 2000), and Annex to Note for guidance on Development Pharmaceutics (CPMP/QWP/155/96).

6.3 *Sourcing*—The criteria to consider for safe sourcing include appropriate human or animal donor selection and the tissue collection procedures to assure that the source material is unlikely to contain TSE infectivity. Additional information can be obtained from the following documents: EN 12442–1, EN 12442–2, EN 12442–3; 21 CFR Parts 207, 807, and 1271, 21 CFR Part 820, and 21 CFR Part 1271, Part C; Federal Register Vol. 43; Federal Register Vol. 62; Federal Register Vol. 66, No. 5, January 8, 2001, pp. 1552–1559; Federal Register, Vol. 66, No. 13, January 19, 2001, p. 5447; ISO 13408–1. Council Directive 93/42/EEC with respect to medical products using tissues of animal origin; Commission Directive 2003/32/EC with respect to medical products manufactured using tissues of animal origin; EMEA/410/01-rev.2: Committee for Proprietary Medical Products, Note for guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medical products. Additional documents may be available. The user should verify the most current version of the document.

6.3.1 For further information, the user is referred to Appendix X2, Sourcing Issues: X2.1 Tissue for collagen or collagen-containing devices; X2.2 Requirements for a closed herd; X2.3 Documentation for the tissue.

6.3.2 The collagen can be isolated from tissues or cell cultures by any method, including, but not limited to extraction by dilute acids or dilute salt solutions or by enzymatic digestion of the tissue (**20-23**). The user should be aware that even though Type III collagen is less abundant, it is often associated with Type I, except in bones and tendons. Type V collagen is also associated with Type I.

6.4 *Viral and Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) Agent Inactivation*—Viruses and TSE agents can be introduced into a product as a result of raw materials sourcing or through adventitious means. Appropriate measures should be taken so that the resultant product is free from viruses and TSE agents. For further guidance on viral or TSE clearance, or both, the user is directed to the references throughout this guide as well as USP 30/NF 19 <1050>, and other pertinent references, as appropriate. Additional information may be found in the following FDA Guidance Document, FDA points to consider and International Conference on Harmonization (ICH) documents: Guidance for Industry and for FDA Reviewers: Medical Devices Containing Materials Derived from Animal Sources (Except for *In Vitro* Diagnostic Devices); U.S. Food and Drug Administration (FDA and Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), 1998; "International Conference on Harmonization (ICH), Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin." Consensus Guideline ICH Viral Safety Document: Step 5; U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 1993; "Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals; U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 1997; "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use." 94D-0259. The European Pharmacopoeia 5.0 has a monograph describing methods to minimize TSE risks (5.2.8 Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents Via Human and Veterinary Medicinal Products).

6.4.1 *Viral Clearance*—The sources of raw materials from humans or animals should be screened for known viral pathogens to reduce or eliminate the potential infectivity. Viral clearance methods can include, but not be limited to methods such as detergent treatment, high or low pH, urea treatment, other chemical treatments, and filtration or other purification methods. However, even these harsh treatments may not ensure complete viral inactivation. Viral clearance should be demonstrated by an appropriately validated viral clearance study protocol. The user should verify that the viral clearance procedure is compatible with the starting material or the configured end product. For human tissue sources for manufacturing into collagen, the observance of Good Tissue Practices should be considered.

6.4.2 *TSE Clearance*—Due diligence should be made to the sourcing of raw materials, process design to remove potential TSE agents and treatments to inactivate TSE agents for those products which can withstand the harsh treatments required to inactivate TSE agents. The user is referred to the "Meeting Report, International Workshop on Clearance of TSE Agents from Blood Products and Implanted Tissues," (**24**) and the FDA Guidance Document "Guidance for Industry and for FDA Reviewers: Medical Devices Containing Materials Derived from Animal Sources (Except for *In Vitro* Diagnostic Devices)" for additional guidance on recommended practices for sourcing and for TSE clearance. Technology is under development for quantitation of TSE agents in biological materials. The following references are cited as examples of two of the many methods for detecting TSE agents (**25, 26**). The user should be aware that although detection of the protease resistant form of the ubiquitous prion protein in a tissue generally indicates that it contains the transmissible agent and is not suitable for preparing collagen for human or animal implantation, the converse is not necessarily true. Therefore, a negative test for the protease resistant prion alone may not be sufficient to assure that the source material is safe for producing collagen.

6.4.3 *Source Documentation*—Guidance for viral inactivation validation and CBER guidances. See also the following Reference Sections for additional information: Section 2.1 (Guide E 1298); Section 2.3 (EN 12442–3); Section 2.4 (USP 30/NF 19); Section 2.6 (U.S. Food and Drug Administration (FDA and Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), 1998 International Conference on Harmonization (ICH), Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, Consensus Guideline ICH Viral Safety Document: Step 5); and Refs (**27, 28**). Additional resources may be available, as this list is not comprehensive. The user should use the current version of all documents.

7. Safety and Toxicology Aspects of Collagen

7.1 The safety of collagen in biomedical and pharmaceutical applications and in TEMPs should be established according to current guidelines such as ISO 10993 and Practice F 748. Suppliers of collagen may have such documentation on file. Preclinical safety studies specific to the clinical application under consideration must be done in accordance with 21 CFR 312.

7.1.1 A database generated to support the safety of collagen-containing pharmaceuticals should reflect consideration of the proposed clinical route of administration and product formulation, although it may be appropriate for certain studies to involve a route of administration or formulation which differ from the clinical situation. Guidance on the need for, timing, and conduct of the nonclinical toxicology studies is available in the ICH (International Conference on Harmonization) guidelines on the respective topics. Such studies may include but are not limited to: acute toxicology testing, repeated dose toxicology testing with a treatment regimen and duration that is relevant to the proposed clinical use (ICH M3), hypersensitivity testing, and genetic toxicology testing (ICH S2A and ICH S2B). Additional studies that may be relevant to a proposed pharmaceutical use include reproductive/developmental toxicology testing (ICH S5A and ICH S5B) and carcinogenicity testing (ICH S1A, ICH S1B, ICH S1C, and ICH S1C(R)). Additional testing may be specific to the route of administration, for example, application or injection site irritation, ocular irritation, dermal carcinogenicity testing, or studies of photoirritation and photo co-carcinogenicity potential. Other testing may be appropriate, depending on the results of early studies and the intended clinical use of the product. For instance, the user may consider the following, among other documents: Practice F 2148, or Draft Guidance for Preclinical and Clinical Investigations of Urethral Bulking Agents Used in the Treatment of Urinary Incontinence. Specific guidance on the development or marketing of drug products, biologics, or medical devices in the United States may be obtained by contacting the Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, or the Center for Devices and Radiological Health, respectively, of the U.S. Food and Drug Administration.

7.2 *Biocompatibility*:

7.2.1 Many materials have been shown to produce a well-characterized level of biological response following long term clinical use in laboratory animals. There are few interspecies differences in the structure of Type I collagen. The extensive similarity in primary and higher-order structure of Type I collagen may explain why collagen obtained from animal species is acceptable as a material for human implantation (**8**). When new applications of a material, or modifications to the material or physical forms of the material are being considered, then the recommendations and test methods of the following standards should be considered: Practices F 619, F 748, F 749, F 756, F 763, F 813, F 981, F 1439, F 1903, F 1904, F 1905 and F 1906, as well as Test Method F 895, Terminology F 1251, and ISO 10993–1, ISO 10993–9, Part 9, ISO 10993–17, EN 12442–1, EN 12442–3.

7.3 *Immunogenicity*—The immunogenicity of the collagen may vary depending on the source material (that is, extracted versus recombinant collagen), though, for reasons noted in the preceding paragraph, immune reactions due to species differences alone are uncommon. Products from different manufacturers may vary in properties such as, but not limited to, fiber quality and percentage hydroxyproline. The user should be aware that differences in collagen structure and chemistry may result in potential variability to the immunological responses. The manufacturer should ascertain to what degree modifications of the structure of native collagen (for example, by chemical crosslinking or methods not limited to biomimetics) may modify (enhance or reduce) immunogenicity when implanted *in vivo*. When new applications of a material, or modifications to the material or physical forms of the material are being considered, then the immunogenicity testing should include the following standards for testing potential skin sensitizers: Practice F 720 and ISO 10993–10.

7.4 Collagen for use in biomedical and pharmaceutical applications and in Tissue Engineered Medical Products (TEMPs) should ideally be documented in a Device or Drug Master File to which end users may obtain a letter of cross reference from suppliers of collagen. Such a Master File should be submitted to the US FDA and to other regulatory authorities, both national and international. ISO 14971 should also be referenced when appropriate.

8. Keywords

8.1 biomaterials; characterization; collagen; natural materials; TEMPs

APPENDIXES

(Nonmandatory Information)

X1. BACKGROUND

X1.1 Background

X1.1.1 This short review of the collagen family of proteins is largely based on two review papers (**1, 2**). Please refer to these articles and their listed references for further details.

X1.2 Overview/Introduction

X1.2.1 Collagens form a family of secreted proteins with predominantly structural function. At least twenty genetically different family members have been identified so far. Several groups of collagen molecules have been classified based upon protein domain structures, macromolecular assemblies and exon structures of the corresponding genes. This classification will be detailed in a later section of this appendix. Collagen types are indicated by Roman numerals (for example, collagen Type I), the associated polypeptide chains (or subunits) as alpha chains with arabic numbers (for example, alpha2(I)) and the genes by COL[arabic numeral]A[arabic numeral] (for example, COL1A2).

X1.2.2 Several inherited and acquired diseases have been linked to these proteins and emphasize the importance of collagen molecules (**3**). Among those diseases are osteogenesis imperfecta, some forms of Ehlers-Danlos syndrome, epidermolysis bullosa, Goodpasture syndrome, Alport syndrome and relapsing polychondritis.

X1.2.3 The basic structural entity contains three polypeptide chains of left-handed helices that form a right-handed triple helix. In order to form such a triple helix, the basic building block of the polypeptide chain is an amino acid triplet of the general sequence Gly-X-Y with prolines often occupying the X position, and hydroxyproline in the Y position. The high amount of proline and hydroxyproline allows for the formation of the left-handed helix (polyproline helix II). In order to form a triple helix, every third position has to be taken by glycine, since the size of any side chain other than a hydrogen atom would interfere sterically with the close proximity of the three chains. Hydroxyproline, forming intramolecular hydrogen bonds, is important for the stability of the triple helix. Underhydroxylation of prolines results in lowering the temperature at which the collagen triple helix destabilizes or "melts."

X1.2.4 It is important to clarify that other proteins contain collagenous domains, but are not classified as collagen family members. Among these proteins are the complement subunit C1q, acetylcholine esterase, Type I macrophage scavenger receptor and the mannose-binding protein.

X1.2.5 The biosynthesis of collagen molecules has been studied in most detail in fiber forming collagens (Type I, II, III, V, and XI). Collagen polypeptide chains are synthesized in the rough ER; hydroxylation of proline and lysine side chains occurs concomitantly with chain elongation and continues until the triple helix forms. This formation in the ER requires cis-trans isomerization of the hydroxyproline residues and is catalyzed by an enzyme. Non-collagenous domains are found at the N- and C-termini of the formed triple helices. Collagen molecules are glycosylated and exported to the extracellular space. Further processing, consisting of lysyl oxidation and proteolytic cleavage of the non-collagenous N- and C-termini, is catalyzed by specific extracellular enzymes and results in the formation and stabilization of collagen fibers. Crosslinks form non-enzymatically between lysine and oxidized lysine residues and connect alpha chains of different triple helices. See (**1**) for further details. Not all of these processing steps occur for all collagen types.

X1.3 Collagen Classification

X1.3.1 As indicated above, the members of the collagen family are grouped according to protein domain structures, macromolecular assemblies and exon structures of the corresponding genes. Six groups are currently identified (**2**):

X1.3.2 *Fibrillar Collagens*—This group contains collagens Type I, II, III, V, and XI, important for the mechanical support of multicellular organisms. These collagens (formed by either homotrimers [Types II and III] or alpha chain heterotrimes) participate in the formation of staggered fibrils of varying diameter. The central triple helical domain (around 100kDa size) usually contains 300 repeats of the Gly-X-Y triplet, forming long, rigid structures. After extracellular processing, the single collagen molecules aggregate to fibrils. Extent of processing may be important in determining the diameter of the fibril.

X1.3.3 *FACIT Collagens*—The fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACIT) collagen group is comprised of collagen Types IX, XII, XIV, XVI, XIX, and XX. Collagen IX has been shown to be associated with Collagen II and XI fibrils. Collagen Types XII and XIV have been associated with Collagen I fibrils. FACIT collagens contain large non-collagenous domains connecting relatively short triple-helical domains. Their associations with fibrils are thought to be important in regulation of fibril diameter and connection of fibrils with other extracellular molecules.

X1.3.4 *Short Chain Collagens*—Collagen Types VIII and X contain short triple helical domains of 50 to 60kDa flanked by globular domains. Collagen Type VIII forms the backbone of the hexagonal network in Descemet's membrane, Type X is found in hypertrophic cartilage matrix. Both are thought to provide open structures resisting compressive forces.

X1.3.5 *Basement Membrane Collagens*—Collagen Type IV forms the network structures found in basement membranes. Triple helical domains are frequently interrupted by non-collagenous domains, allowing for flexibility within the rod-like molecules. The triple helices interact at the N- and C-termini forming a three-dimensional network; collagen Type IV also directly binds to other basement membrane molecules like laminin and BM-40. Six different alpha chains have been identified for Collagen Type IV. The most prevalent collagen Type IV is formed by a heterotrimer of two alpha1 and one alpha2 chain. Specific basement membranes (kidney glomerular basement membrane, neuromuscular junction, and so forth) contain heterotrimers containing the alpha3-6 chains. The exact composition of these heterotrimers is not clear. Goodpasture and Alport syndromes have been associated with Collagen IV (**4, 5**). Collagen Type VII (see below), although not classified as a basement membrane collagen, forms tight associations (anchoring fibrils) with basement membranes in skin, the oral mucosa and the cervix.

X1.3.6 *Multiplexins*—Collagen Types XV and XVIII have been grouped as Multiplexins (collagens containing multiple-triple-helix domains with interruptions). Both collagens are expressed widely. A fragment of Collagen XVIII, called endostatin, has been shown to inhibit angiogenesis.

X1.3.7 *MACITs*—Two members form the group of membrane-associated collagens with interrupted triple helices. Types XIII and XVII both contain triple helices in the extracellular domain and globular domains with transmembrane domains, attaching the molecules to the cell surface. Type XIII is widespread, and Type XVII is found in hemidesmosomes. It also presents as an autoantigen in the blistering disease bullous pemphigoid.

X1.3.8 *Other Collagens*—Collagen Types VI and VII do not belong to the other classifications and have been grouped separately. Collagen Type VI is the major component of beaded microfibrils. The heterotrimeric molecule contains a central triple helix flanked by globular domains. Dimers and tetramers are formed by disulfide exchange. Collagen Type VII is the major component of anchoring fibrils connecting the basement membrane in stratified squamous epithelia with adhesion plaques in the papillary dermis. The acquired and dystrophic forms of epidermolysis bullosa are associated with collagen VII (**15**).

X1.4 Occurrences

X1.4.1 Table X1.1 summarizes the location of major collagen types (**1**). Collagen Types XIII–XX are less well characterized and are excluded.

X1.5 Sources

X1.5.1 Major sources of collagens are skin, tendon, cartilage and placenta, both from animals (bovine and porcine for larger quantities) and human tissues. More recently, human cell cultures and recombinant collagen from yeast and insect cell cultures have become potential additional raw material sources.

TABLE X1.1 Occurrences of Types I to XII Collagen

Collagen Type	Alpha Chains	Distribution
I	a1-2(I)	widespread; skin, bone, tendon, cornea, etc.
II	a1(II)	cartilage, vitreous body of the eye
III	a1(III)	skin, tendon, aorta, cornea
IV	a1-6(IV)	all basement membranes
V	a1-3(V)	widespread; skin, bone, tendon, ligament, etc.
VI	a1-3(VI)	widespread; skin, bone, cornea, etc.
VII	a1(VII)	skin, oral mucosa, cervix
VIII	a1-2(VIII)	Descemet's membrane
IX	a1-3(IX)	cartilage, vitreous body
X	a1(X)	hypertrophic and mineralizing cartilage
XI	a1-3(XI)	cartilage
XII	a1(XII)	all collagen type I containing tissues

X2. SOURCING ISSUES

X2.1 Tissue for Collagen or Collagen-Containing Medical Devices

X2.1.1 Tissues which have been obtained to produce collagen or collagen-containing medical products must be carefully selected, tested, and controlled. The age of the tissue may affect the degree of crosslinking of the collagen as well as the quantity of collagen. Using tissues from the same species and age will provide better process controls for collagen production. The safety of the animal tissues is also of utmost concern. Reference to 9 CFR 113 (FDA) for animal sourced material should be considered, as well as reference to ISO 12442 (current version). The United States Food & Drug Administration implemented new guidelines in 2007 to minimize the danger of contamination of transmissible spongioform encephalopathies (TSE's), Proposed Rule: Use of Materials Derived from Cattle in Medical Products Intended for Use in Humans and Drugs Intended for Use in Ruminants (Federal Register, Vol. 72, Number 8, Jan 12, 2007, pp. 1581-1619). These include:

X2.1.1.1 Elimination of risk materials including skull, brain, trigeminal ganglia, eyes, vertebral column, spinal cord, dorsal root ganglia of animals over 30 months of age and the small intestine and tonsils of cattle of all ages.

X2.1.1.2 Any material from "downer" cattle—those that cannot walk.

X2.1.1.3 Use of advanced meat recovery methods to prevent spinal cord contamination.

X2.1.1.4 Prevention of air-injection stunning.

X2.1.2 Animals must be subjected to ante and postmortem inspection and be fit for human consumption.

X2.2 Requirements for a Closed-Herd

X2.2.1 Tissues obtained from animals should be obtained from well documented herds. It is highly desirable to use closed cattle herds to maximize biosecurity. A closed cattle herd preferably includes the following:

X2.2.1.1 Enclosed property which is chosen to minimize exposure to environmental hazards around the land including the soil and water supply.

X2.2.1.2 Animals born, raised and live their entire lives in the closed herd in isolation from other cattle, sheep, pigs, and deer and elk.

X2.2.1.3 The source and lineage of each animal is documented.

X2.2.1.4 The female parent of each new animal is a member of the herd.

X2.2.1.5 Artificial insemination from registered stock is the primary breeding method.

X2.2.1.6 Animals forage on closed herd pastures. Only purchased grain or hay from selected sources may be used to supplement closed herd pasture forage.

X2.2.1.7 The animals have never been fed ruminant (animal-derived) protein and therefore have not been exposed to the primary suspected source of BSE infection.

X2.2.2 Animal parts are harvested and controlled under documented procedures to minimize contact with brain and spinal cord tissues.

X2.3 Documentation

X2.3.1 Animal tissues serving as the raw material for downstream processing or fabrication into medical products should be well documented. A description of the animal species, the specific tissue used, and the geographical history of the animal need to be fully disclosed. Maintenance of the herd is important to the consistency and quality of the raw material. As such, information on the long term health of the herd, frequency and type of veterinarian inspections, breeding history, animal traceability, animal feed history records, absence of TSE disease, and standard vaccinations such as live modified viruses which could co-purify in the desired tissue should be documented. Animal feed has the potential for introducing adventitious agents and the animal feed composition, diet, and labeling of feed composition at distribution locations should all be documented.

X2.3.2 When the animal is sacrificed the age of the animal should be documented, as well as the USDA status of the slaughter house, measures taken to reduce the risk of contaminating non-TSE tissues with material from tissues that could contain TSE, and the results of the pre and/or post mortem inspection. The test used to release the tissue for further processing or incorporation into other tissues or medical products should be disclosed as well as the Certificate of Analysis. Records of the test results for each lot of material should be maintained at the manufacturing facility and submitted in regulatory documents when appropriate. Methods for maintaining records of the source material and testing should be disclosed in regulatory submissions.

X3. RELATED MATERIAL

X3.1 Kielty, C. M., Hopkinson, I., and Grant, M. E., "Collagen: The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix, in Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects," P. M. Royce and B. Steinmann, Editors, 1993, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 103–149.

X3.2 Olsen, B. R., and Ninomiya, Y., "Collagens, in Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins," T. Kreis and R. Vale, Editors, 1999, Sambrook &

Tooze Publication at Oxford University Press: Oxford, pp. 380–408.

X3.3 Myllyharju, J., and Kivirikko, K. I., "Collagens and Collagen-Related Diseases," *Ann Med*, Vol 33, No. 1, 2001, pp. 7–21.

X3.4 Hudson, B. G., Reeders, S. T., and Tryggvason, K., "Type IV Collagen: Structure, Gene Organization, and Role in Human Diseases. Molecular Basis of Goodpasture and Alport Syndromes and Diffuse Leiomyomatosis," *J Biol Chem*, Vol 268, No. 35, 1993, pp. 26033–26036.

X3.5 Turner, A. N., and Rees, A. J., "Goodpasture's Disease and Alport's Syndromes," *Annu Rev Med*, Vol 47, 1996, pp. 377–386.

X3.6 Bruckner-Tuderman, L., Hopfner, B., and Hammami-Hauasli, N., "Biology of Anchoring Fibrils: Lessons from Dystrophic Epidermolysis Bullosa," *Matrix Biol*., Vol 18, No. 1, 1999, pp. 43–54.

REFERENCES

(1) Pachence, J. M., "Collagen-Based devices for Soft Tissue Repair," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 33, 1996, pp. 35–40.

(2) Kamer, F. M., and Churukian, M. M., "Clinical use of Injectable Collagen: A Three-year retrospective," *Arch Otolaryngol*, Vol 110, 1984, pp. 93–98.

(3) Grosh, S. K., Hanke, C.W., DeVore, D.P., and Gibbons, D.G., "Variables Affecting the Result of Xenogenic Collagen Implantation in an Animal Model," *J Am Acad Dermatol*, Vol 13, 1985, pp. 792–798.

(4) Cedron, M., Sant, G. R., Klauber, C. T., Connolly, R., and DeVore, D. P., "The Biological Behavior of Autologous Collagen Injected into the Rabbit Bladder," *J. Urol*., Vol 154, 1995, p. 808.

(5) Gunasekaran, S., "Collagen Based Wound Dressing: How to control infection and Immune Response," 1995, Chapter in the Book: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part-A: Materials, Volume 2, pp. 1267–1284, Eds. Wise, D. L., Trantolo, D. J., Altobelli, D. E., Yaszemski, M. J., Gresser, J. D., and Schwartz, E. R., Marcel-Dekker, New York, USA.

(6) Cozzolino, D. J., Cedron, M., DeVore, D. P., and Hoops, D. J., "Long-Term Persistence of Autologous Collagen in the Bladder Wall of Rabbits," *Neurourology and Urodynamics*, Vol 18, 1999, pp. 487–495.

(7) Williams, D. F., *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, 1999.

(8) Li, S., "Biologic Biomaterials: Tissue-Derived Biomaterials (Collagen): Structure and Properties of Collagen and Collagen-Rich Tissues," 2000, Chapter in Book: The Biomedical Engineering Handbook Second Edition, Volume I, (pp. 42-1 to 42-23), Ed. Joseph D. Bronzino, CRC Press.

(9) Kreis, T., and Vale, R., Eds., "Collagens," *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, Second Edition, Oxford University Press, 1999, pp. 380–408.

(10) Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M., Kadler, K., and Shuttleworth, C., "Collagen Type I," *The Extracellular Matrix: Facts Book*, Academic Press, Harcourt Brace and Company, New York, Second Edition, 1998, pp. 43–47.

(11) Miller, E. J., and Gay, S., "Collagen: an Overview," *Methods in Enzymology*, Vol 82, 1982, pp. 3–32.

(12) Piez, K. A., "Collagen," *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol 3, 1985, pp. 699–727.

(13) Nimni, M. E., ed., *Collagen*, Vol 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1988.

(14) Silver, F. H., and Garg, A. K., "Chapter 17. Collagen: Characterization, Processing and Medical Applications," *Handbook of Biodegradable Polymers*, A. J. Domb, J. Kost, and D. M. Domb, eds., Harwood Academic Publishers, Australia, 1997.

(15) Baig, K. M, Vlaovic, M., Anwar, R. A., "Amino Acid Sequences C-terminal to the Cross-Links in Bovine Elastin," *Biochem. J.*, Vol 185, 1980, pp. 611–616.

(16) McClain, P. E., and Wiley, E. R., "Differential Scanning Calorimeter Studies of the Thermal Transitions of Collagen," *J. Biol. Chem*., Vol 247, 1972, pp. 692–697.

(17) Yuen, D., Morris, T. H., and Li, S. T., "Characterization of a Collagen Dispersion by Rheological and Enzymatic Methods," *Trans. Soc. Biomat*., 1991, p. 238.

(18) Wieslander, J., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci*., Vol 81; 1984, p. 3838.

(19) Holbrook and Smith, in: *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects*, 1993.

(20) Rubin, A., et al., *Biochemistry*, Vol 4, 1965, pp. 181–190.

(21) Helseth, D. L., and Veis, A. J., *Biol. Chem*., Vol 256, 1981, pp. 7118–7128.

(22) Capaldi, M. J., and Chapman, J. A., *Biopolymers*, Vol 21, 1982, pp. 2291–2313.

(23) Gelman, R. A., Poppke, D. C., and Piez, K. A., *J. Biol. Chem*., Vol 254, 1979, pp. 11741–11745.

(24) Hellman, K. B. and Asher, D. M., "Meeting Report: International Workshop on Clearance of TSE Agents from Blood Products and Implanted Tissues," *Biologicals*, Vol 28, 2000, pp. 189–192.

(25) Cooley, W. A., et al., "Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK," *J. Comp. Pathol*., Vol 125, No. 1, 2001, pp. 64–70.

(26) Handley, J., and Zubritsky, E., "Blood-based Prion Test," *Anal. Chem*., Vol 73, No. 9: 252A, 2001.

(27) The Viral Safety Imperative, *BioProcess International Supplement* Vol 7, No. 3, November 2005, pp. 4–47 (entire issue).

(28) Bergmann, K., and Rosenblatt, B., "Design and Performance of Viral Clearance Studies," *BioProcess International*, Vol 4, November 2006, pp. 56–64.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ เกิดเมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2528 ภูมิลำเนาจังหวัดสกลนคร สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมยานยนต์ วิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา) คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

ผลงานในการประชุมวิชาการ

Wongpakham, T. and Kanokpanont, S. Physicochemical Characteristic of Collagen Extracted from Porcine Achilles Tendons, Poster Presentation, The 41st Congress on Science and Technology of Thailand (STT41), Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, 6-8 November 2015