ภาคผนวก

1. วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติของไคโตแซน

1.1 ความชื้น (A.O.A.C.,1990)

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
- ตู้อบไฟฟ้า
- โถดูดความชื้น
- เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

วิธีวิเคราะห์

- อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
- กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
- ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัมใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว
- นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 C นาน 5-6 ชั่วโมง
- นำออกจากตู้อบไฟฟ้าใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
- อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาทีและกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
- คำนวณหาความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

1.2 น้ำหนักโมเลกุล (Chen and Hwa, 1996)

วิธีการ

ชั่งไคโตแซนมา 0.20 กรัม

⇓

ละลายใน 1% กรดอะซิติก 100 ml

⇓

กวนให้ละลายด้วยเครื่องกวน(Magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

⇓

กรองผ่านซินเทอร์แกรส

⇓

เจือจางสารละลายไคโตแซนด้วย 1% กรดอะซิติก ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.20%, 0.10%, 0.05%, 0.025% และ 0.01% (W/V) ตามลำดับ

⇓

วัดความหนืดของสารละลายที่อุณหภูมิ 25 C โดยใช้ Ubbelohde viscometer นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณน้ำหนักโมเลกุล แต่ละความเข้มข้นจะทำการทดลอง 5 ซ้ำ

แล้วนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณ

η_{rel} = relative viscosity = t/t_0 ; เมื่อ t = เวลาที่สารตัวอย่างใช้ในการเคลื่อนที่

t_0 = เวลาที่ตัวทำละลายใช้ในการเคลื่อนที่

η_{sp} = specific viscosity = $(t/t_0)/t_0$

$= \eta_{rel} - 1$

η_{sp}/C = specific viscosity per concentration ; เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลาย (g/100 ml)

ln η_{rel} = ln relative viscosity

ln η_{rel} / C = ln relative viscosity per concentration

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{sp}/ C กับ C และค่า ln η_{rel}/C กับ C

ค่า intrinsic viscosity (η) ได้จากค่า η_{sp}/ C ที่มีความเข้มข้นเป็นศูนย์ การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนใช้สมการ

$\text{Log}\,[\eta] = \log K + a \log M$ หรือ $[\eta] = KM^a$

เมื่อ $K = 8.93 \times 10^{-4}$

$a = 0.71$

M = viscosity average – molecular weight

1.3 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล

ตรวจสอบ degree of deacetylation of chitosan โดยวิธี colloid titraticn method(Chen and Hwa, 1996)

สารเคมี

- 5%(v/v) acetic acid
- toluidine blue(indicator)
- n/400 PVSK (potassium polyvinylsulfate) 0.0025 N

วิธีการ

- สารละลายไคโตแซน 0.5 g ในสสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 5% (v/v) 100 ml
- 1.0 g ของ(chitosan/acetic acid) ผสมกับน้ำกลั่น 30 ml
- เติม indicator (TBO)
- ไตเตรทด้วย 0.0025 N PVSK จนถึงจุดยุติ (end-point) ที่มีสีชมพู

<u>การคำนวณ</u>

$$\%DD = \left(\frac{x/161}{x/161 + y/203} \right) * 100$$

เมื่อ $x = 1/1400 * 1/100 * f * 161 * V$

$Y = 0.5 * 1/100 - x$

V = ปริมาตรที่ใช้ไตเตรท

f = factor ของ n/400 (ข้างขวด)

2. **การถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานมิสชัน(Transmission electron microscope)(Johannessen,1981)**

1. เตรียมตัวอย่าง โดยหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,000 x g เป็นเวลา 5 นาที
2. การตรึงขั้นต้น ตรึงด้วย 4% พาราฟิร์มัลดีดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2-7.3 ที่อุหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง
3. การตรึงขั้นที่ 2 ตรึงด้วย 1% ออสเตรียมเตตรอกไซด์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
4. การย้อมสี โดยใช้ 2% ยูรานิลอะซิเตต เป็นเวลา 20 นาที
5. การดึงน้ำออก ทำเป็นขั้นตอนดังนี้
   70% เอธานอล 3 ครั้งๆละ 5 นาที
   80% เอธานอล 3 ครั้งๆละ 5 นาที
   90% เอธานอล 3 ครั้งๆละ 5 นาที
   100% เอธานอล 3 ครั้งๆละ 10 นาที
6. การแทรกซึม
   ใช้โพรพิลีนออกไซด์ 2 ครั้งๆละ 15 นาที
   ใช้โพรพิลีนออกไซด์ : อีพอกซีเรซิน, (1:1)เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
   ใช้โพรพิลีนออกไซด์ : อีพอกซีเรซิน, (1:2)เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
   ใช้อีพอกซีเรซินบริสุทธิ์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
7. การฝังตัวอย่าง โดยฝังในแคปซูลแบบปลายแหลม อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส
8. การตัดตัวอย่าง โดยใช้อุลตราไมโครโทม(ultramicrotome) ตัดแต่งตัวอย่างบนกริดทองแดงให้เป็นรูปพีระมิดขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมครอน หลังจากนั้นย้อมด้วยสีโทลูอีนบลู
9. การย้อมสี ใช้ 5% ยูรานิลอะซิเตตที่จำเพาะกับกรดนิวคลิอิกและลีดซิเตรทที่จำเพาะกับองค์ประกอบเซลล์
10. การดูตัวอย่าง ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานมิชชันที่ 80 กิโลโวลต์

3. **การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์(Cytotoxic assay)(Skehan และคณะ, 1995)**

นำเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 human colon ardinocarcinoma cell line มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 3 วัน เตรียมเซลล์ suspension เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลิลิตรโดยการนับ viable cell ด้วย haemacytometer (trypan blue exclusion) แล้วนำเซลล์มาเลี้ยงใน 96- well plate หลุมละ 100 μl (3,000 cell/well) นำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator 18-24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะเป็น monolayer หลังจากนั้นใส่สารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 3.0 mg/ml ลงไปโดยเติมหลุมละ 100 μl ทำซ้ำความเข้มข้นละ 8 หลุมในชุดควบคุมจะใส่เฉพาะตัวทำละลายเลี้ยงใน CO_2 incubator 96 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงหาจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยวิธี Sulphorhodamine B assay(SRB assay) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยใช้ 40%trichloroacetic acid (TCA) ที่ละลายด้วย 1% acetic acid เติมลงไปใน 96-well plate เพื่อทำการ fixed เซลล์ไว้ วาง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นและย้อมสีด้วย SRB stain (สีม่วง) 30 นาที เมื่อครบเวลาใช้น้ำกลั่นล้างสี SRB ออก เซลล์ที่ตายแล้วจะหลุดออกมา ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะถูก fixed ติดอยู่ที่ก้น plate หลังจากวาง plate ไว้จนแห้งแล้ว เติมสารละลาย 10 mM Tris-Base ลงไปใน 96-well

plate หลุมละ 200 µl เขย่า plate ด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ๖% survival) ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารทดสอบ

4. **ศึกษาผลของตัวทำละลายต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*)**

ตัวทำละลายที่ใช้

- Acetic acid
- Lactic acid
- Formic acid
- Dimethylsulfoxide (DMSO)
- Propylene glycol

วิธีการ เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นเอียงมา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10 ml

⇓

บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

ถ่ายเชื้อมา 10% ใส่ลงในอาหารเหลวใหม่ (10 ml)

⇓

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

⇓

เจือจางเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้ได้ขนาดเชื้อ 10^6 CFU/ml

⇓

เติมเชื้อลงในอาหรเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆกัน 7 ระดับ คือ 0 และ 1-0.03% (2-fold dilution) ให้ได้ปริมษณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1 x 10^5 CFU/ml

⇓

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

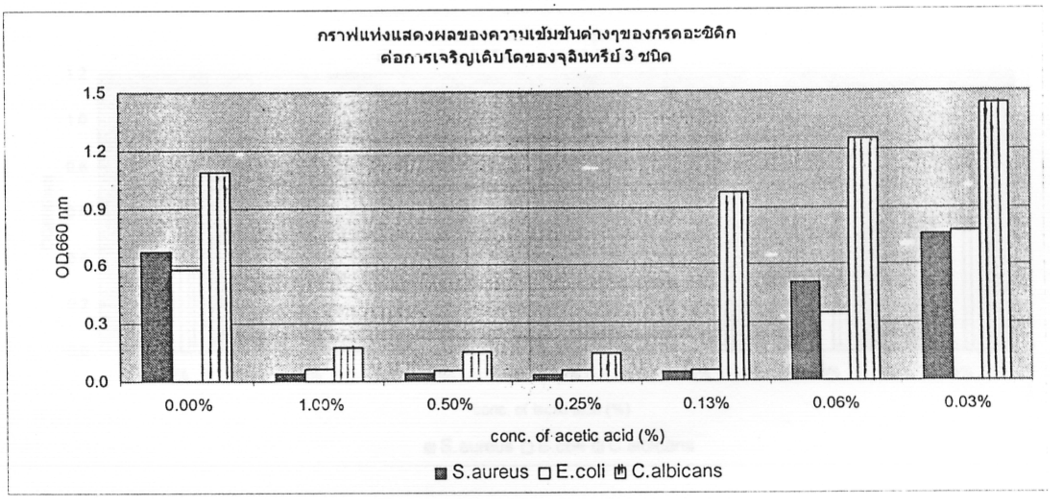
วัดค่าความขุ่นดูการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm

⇓

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวทำละลายกับค่า OD 660 nm

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลของกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*, *S.aureus* และ *C.albicans*

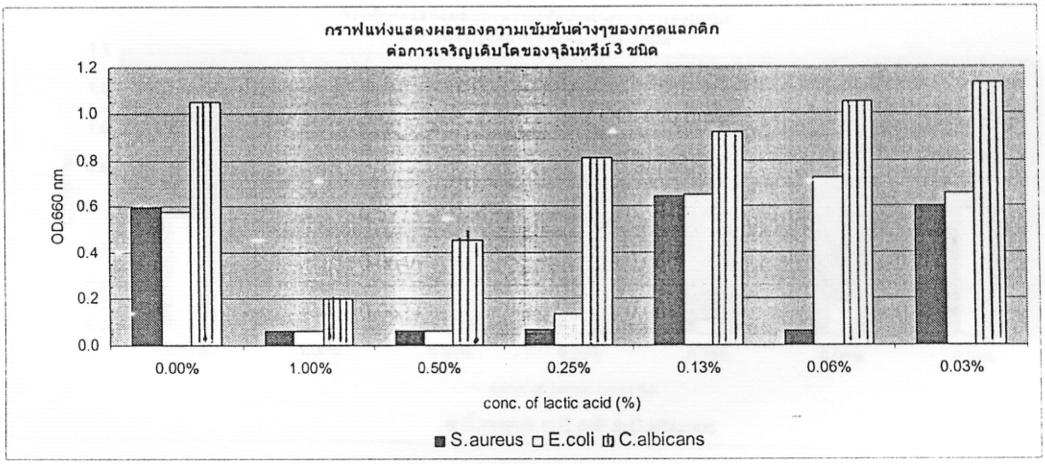
Conc. Of Acetic acid	OD. 660 nm		
	E.coli	*S.aureus*	*C.albicans*
0%	0.5772	0.672	1.089
1%	0.06463	0.04345	0.177
0.50%	0.0585	0.03925	0.1495
0.25%	0.058	0.0336	0.1465
0.13%	0.0578	0.0476	0.9755
0.06%	0.353	0.5048	1.255
0.03%	0.78	0.7608	1.4335



ภาพภาคผนวกที่ 1 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดอะซิติกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *E.coli*, *S.aureus* และ *C.albicans*

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลของกรดแลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*

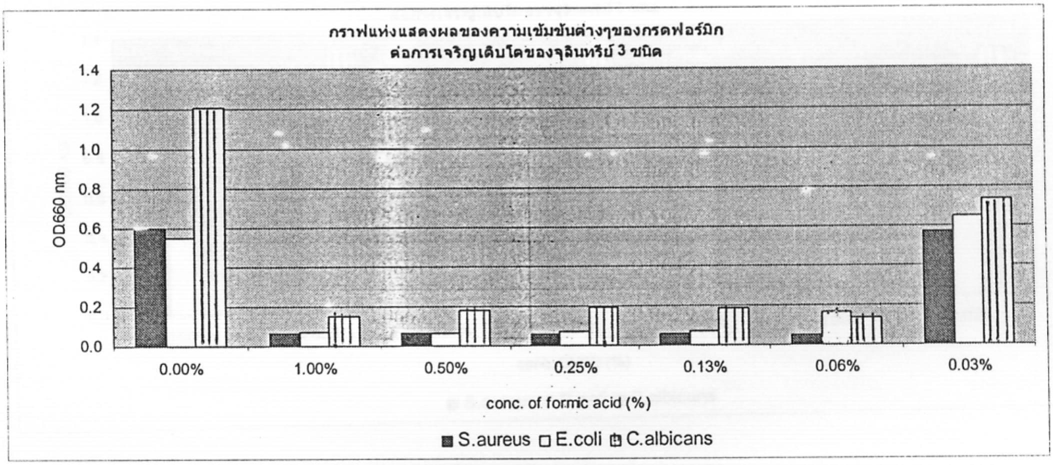
Conc. Of Lactic acid	OD. 660 nm		
	E.coli	*S.aureus*	*C.albicans*
0%	0.5773	0.5944	1.0550
1%	0.0646	0.0608	0.2061
0.50%	0.0624	0.0613	0.4570
0.25%	0.1348	0.0689	0.8106
0.13%	0.6495	0.6462	0.9209
0.06%	0.7286	0.0625	1.0495
0.03%	0.6598	0.6013	1.1337



ภาพภาคผนวกที่ 2 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดแลกติกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลของกรดฟอร์มิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*

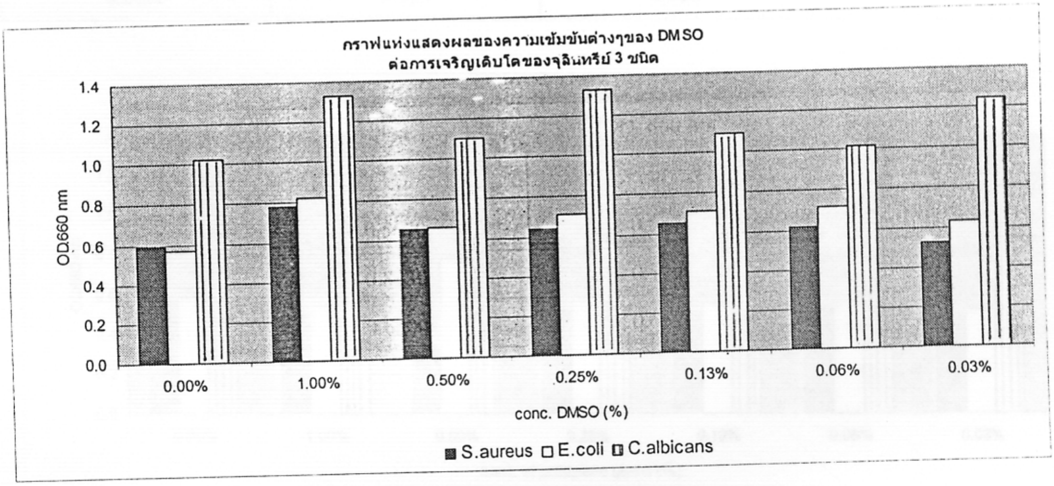
Conc. Of Formic acid	OD. 660 nm		
	E.coli	*S.aureus*	*C.albicans*
0%	0.5466	0.5966	1.2050
1%	0.0691	0.0640	0.1492
0.50%	0.0663	0.0629	0.1756
0.25%	0.0721	0.0601	0.1908
0.13%	0.0703	0.0592	0.1851
0.06%	0.1618	0.0497	0.1388
0.03%	0.6502	0.5705	0.7337



ภาพภาคผนวกที่ 3 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดฟอร์มิกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลของ DMSOที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*

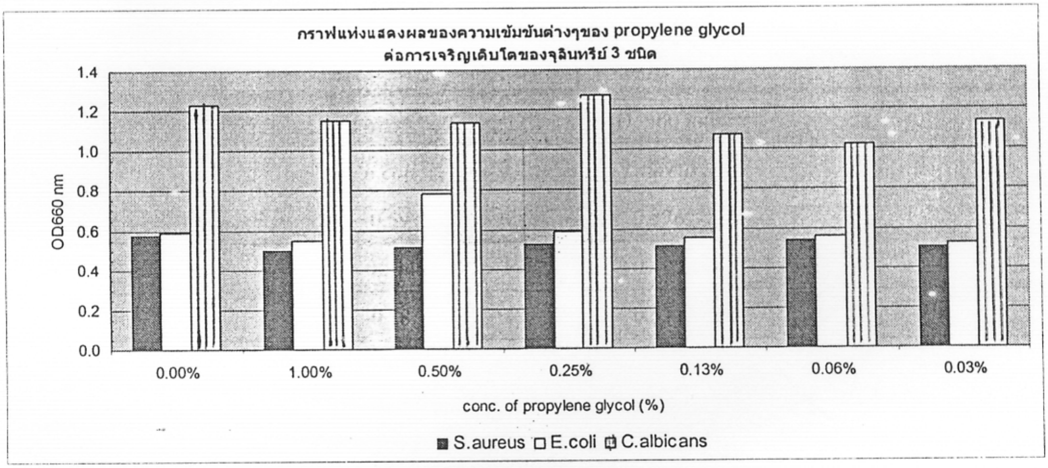
Conc. Of DMSO	OD. 660 nm		
	E.coli	*S.aureus*	*C.albicans*
0%	0.5670	0.5870	1.0250
1%	0.8230	0.7790	1.3310
0.50%	0.6600	0.6520	1.0990
0.25%	0.7080	0.6430	1.3280
0.13%	0.7110	0.6520	1.0960
0.06%	0.7210	0.6210	1.0180
0.03%	0.6300	0.5250	1.2440



ภาพภาคผนวกที่ 4 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ DMSO ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *E.coli, S.aureus* และ *C.albicans*

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลของโพรพิลีนไกลคอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*, *S.aureus* และ *C.albicans*

Conc. Of Propylene glycol	OD. 660 nm		
	E.coli	*S.aureus*	*C.albicans*
0%	0.59	0.576	1.227
1%	0.544	0.499	1.149
0.50%	0.78	0.511	1.14
0.25%	0.591	0.526	1.275
0.13%	0.553	0.515	1.073
0.06%	0.561	0.537	1.022
0.03%	0.525	0.508	1.139



ภาพภาคผนวกที่ 5 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ propylene glycol ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *E.coli*, *S.aureus* และ *C.albicans*