บทที่ ๑

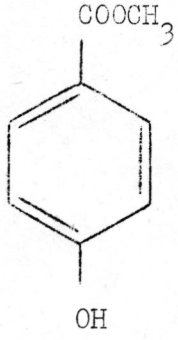
บทนำ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

๑.๑ ความเป็นมาของปัญหา

อาหาร เครื่องดื่ม และยารักษาโรค นับเป็นส่วนของปัจจัยสี่ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเราในปัจจุบัน แต่เนื่องจากประชากรของโลกมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมมากขึ้น มนุษย์มีการตั้งหลักแหล่งชุมชนขยายใหญ่ขึ้น ทำให้การส่งสินค้าประเภทอาหาร เครื่องดื่ม หรือยารักษาโรคต้องใช้เวลานานกว่าจะถึงมือผู้บริโภค บางครั้งสินค้าเหล่านี้ก็เสียหายก่อนถึงมือผู้บริโภค เช่นอาจบูดเน่าเสียหรือเปลี่ยนลักษณะของสินค้าไป การเน่าเสียหรือเปลี่ยนสภาพเหล่านี้ มักมีสาเหตุมาจากบัคเตรีหรือเชื้อรา ดังนั้นผู้ผลิตจึงมักแก้ไขโดยการใช้สารกันบูด (Preservative) ใส่ลงเป็นส่วนประกอบของสินค้าเหล่านั้น ซึ่งสารกันบูดนี้สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของบักเตรีและราได้เป็นอย่างดี ทำให้มีผู้นิยมใช้กันมากในวงการอุตสาหกรรม ทั้งอาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค ตลอดจนถึงในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ทำให้สามารถเก็บรักษาสินค้าต่างๆ เหล่านี้ได้นานนับเป็นปี สารกันบูดที่ใช้กันในปัจจุบันมีหลายชนิด ที่ใช้กันมากตัวหนึ่งในปัจจุบันก็คือ เมทธิลพาราเบน (Methylparaben)[๑,๓] ใช้ทั้งในวงการอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง แต่ต่อมาโดยเฉพาะในเครื่องสำอางจะพบว่าผู้ใช้เครื่องสำอางที่มีเมทธิลพาราเบน เป็นส่วนประกอบอยู่เกิดการแพ้ (Allergy) กันมาก ผู้วิจัยจึงอยากจะทราบว่า การแพ้ที่เกิดขึ้นกับผู้ใช้นั้น เกิดจากเมทธิลพาราเบน ที่มีปนอยู่ในยาหรือเครื่องสำอางนั้นหรือไม่

Methylparaben U.S.P. (Methyl P-Hydroxybenzoate, Solbrol, Methyl Parasept, Nipagin M) (รูปที่ ๑)



รูปที่ ๑ สูตรโครงสร้างของเมทธิลพาราเบน

เมทธิลพาราเบน เป็นผลึกหรือผงสีขาว ไม่มีกลิ่น เตรียมได้จากปฏิกริยาของ p Hydroxybenzoic acid กับ Methanol ๑ กรัม เมทธิลพาราเบนละลายใน ๔๐๐ ml น้ำ , 300 ml alcohol, 10 ml Ether, 50 ml ในน้ำอุณหภูมิ ๘๐ องศาเซลเซียส ใช้เป็นสารกันบูดในความเข้มข้น

๐.๐๕-๐.๒๕% ทั้งในยาและเครื่องสำอางที่มีไขมันทั้งที่ได้จากพืชและสัตว์เป็นส่วนประกอบ เมื่อต้องการใช้เมททิลพาราเบนเป็นสารฆ่าเชื้อต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่าเดิม ๓-๕ เท่า

สารพวกพาราเบน อาจทำให้เกิดการแพ้ที่ผิวหนัง[๑] แต่ปฏิกริยาเหล่านี้จะเกิดน้อย การแพ้เนื่องจากการรับประทานหรือฉีดยาที่มีเมททิลพาราเบนเป็นส่วนประกอบ ยังไม่มีรายงาน แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าอาการแพ้ต่าง ๆ ที่เกิดจากการให้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) หรือ Corticosteroid เป็นผลของการแพ้เมททิลพาราเบนในที่ต่าง ๆ ตามรายงานดังกล่าว น่าจะเกิดจากปฏิกริยาระหว่างเมททิลพาราเบนกับเยื่อเซลล์โดยตรง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะหาผลของเมททิลพาราเบนที่มีต่อเยื่อเซลล์ โดยการทำเยื่อเซลล์เทียมขึ้นให้มีลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบคล้ายเยื่อเซลล์จริง ๆ แล้วหาผลของเมททิลพาราเบนที่มีต่อเยื่อเซลล์เทียมนั้น วิธีการแปลผลใช้วิธีการของ Langmuir.

ลักษณะโครงสร้างของเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Model of Biological membrane) ได้มีผู้เสนอความคิดเกี่ยวกับเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยผลงานของนักวิทยาศาตร์เก่า ๆ เป็นหลักความคิดที่เกี่ยวข้องกับเยื่อเซลล์ เริ่มมาจากผลงานของ Mayer และ Overton[๔] ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับความสามารถในการซึมผ่านของสาร (Permeability) ซึ่งสรุปได้ว่า เยื่อเซลล์คงมีส่วนประกอบที่เป็นไขมัน ต่อมาในปี ค.ศ. ๑๙๒๕ Gorter และ Grendel[๕] ได้ทำการทดลองและเสนอว่า เยื่อเซลล์ประกอบด้วยไขมันเป็นจำนวนมาก และเรียงตัวเป็น ๒ ชั้น Danielli และ Davson[๖] เสนอความคิดเกี่ยวกับลักษณะและโครงร่างของเยื่อเซลล์ โดยเอาโปรตีนเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยเสนอว่า เยื่อเซลล์ประกอบด้วยส่วนไขมันที่เรียงตัวเป็น ๒ ชั้น (Bimolecular lipid leaflet) โดยโมเลกุลของไขมันทั้งสองข้างจะหันส่วนที่มีขั้ว (Polar part) ออกทางด้านนอกทั้งสองด้าน ส่วนที่ไม่มีขั้ว (Non-polar part) หันเข้าชนกัน โดยมีชั้นโมเลกุลของโปรตีน เรียงตัวคลุมอยู่รอบนอกทั้งสองด้าน

ความคิดเกี่ยวกับโครงร่างของเยื่อเซลล์ มีผู้เสนอต่อมาจนถึงในปัจจุบัน[๗-๑๕] แต่ก็ยังยอมรับในความคิดเดิมที่ว่า เยื่อเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันเรียงตัวเป็น ๒ ชั้น ไขมันที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของเยื่อเซลล์คือ Sterol กับ Phospholipid อาจมีเซลล์โลสเป็นส่วนประกอบในเยื่อเซลล์บางชนิด แต่ก็มีเป็นจำนวนน้อยมาก ส่วนโปรตีนที่ประกอบเป็นเยื่อเซลล์มีหลายชนิด ขึ้นกับชนิดของเยื่อเซลล์นั้น คลุมอยู่ทางด้านนอกของชั้นไขมันทั้งสองด้านโปรตีนที่คลุมอยู่อาจอยู่ในลักษณะกลม (Globular) หรือเป็นแผ่น (Lamella) ก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเยื่อเซลล์ที่มันคลุมอยู่ เราอาจแบ่งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในเยื่อเซลล์เป็น ๒ ชนิด คือ Intrinsic Protein และ Extrinsic Protein ซึ่งขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของมัน, การจับตัวของโปรตีนกับชั้นไขมัน และการฝังตัวของโปรตีนในไขมันนั้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเกิดปฏิกริยา (Interaction) ระหว่างไขมันทั้งสองชนิดที่ประกอบเป็นเยื่อเซลล์ด้วย ไขมันเหล่านี้สามารถเคลื่อนไหวได้ทางด้านข้าง ซึ่งมีผลทำให้เยื่อเซลล์มีคุณสมบัติเป็น Fluidity, Flexibility, High electrically resistance และ Relatively impermeability ต่อ High polar molecule

Langmuir 1917 [๑๖,๑๘,๑๙] เป็นผู้ที่นำ Experimental model of lipid มาใช้ประโยชน์ โดยอาศัยการสังเกตุและค้นพบของ Benjamin Franklin 1765 และ Lord Rayleight

1890 ซึ่งสรุปได้ว่า เมื่อเอาน้ำมันหรือสารพวก Slightly soluble oil ใส่ลงในน้ำ มันจะกระจายตัวเป็นฝา (Film) อยู่ที่ผิวน้ำในลักษณะโมเลกุลชั้นเดียว (Monomolecular layer) ถ้าเราทราบพื้นที่ที่มันลอยตัวเป็นฝาอยู่, ปริมาตรของน้ำมันที่เราใส่ลงไป เราสามารถคำนวนความหนาของชั้นน้ำมันที่ลอยตัวอยู่บนผิวน้ำนั้นได้ว่าเท่ากับความยาวของโมเลกุลของน้ำมันที่เราใส่ลงไปเมื่ออยู่ในลักษณะตั้งตรง เมื่อฝาน้ำมันนั้นถูกบีบให้มีพื้นที่น้อยที่สุด เมื่อทราบน้ำหนักโมเลกุลและความหนาแน่น (Density) ของน้ำมันนั้น เราก็สามารถคำนวนหาพื้นที่หน้าตัดของโมเลกุลนั้นได้

คำว่า film และ Monomolecular film เราอาจให้คำจำกัดความได้ว่า filmเป็นชั้นของสารที่ไม่ละลายที่แผ่บนผิวหน้า ซึ่งบางมากจนผลจากแรงดึงดูดของโลกมีน้อยมาก Monomolecular film หรือ Monolayer เป็นชั้น film ที่มีความหนา ๑ โมเลกุล

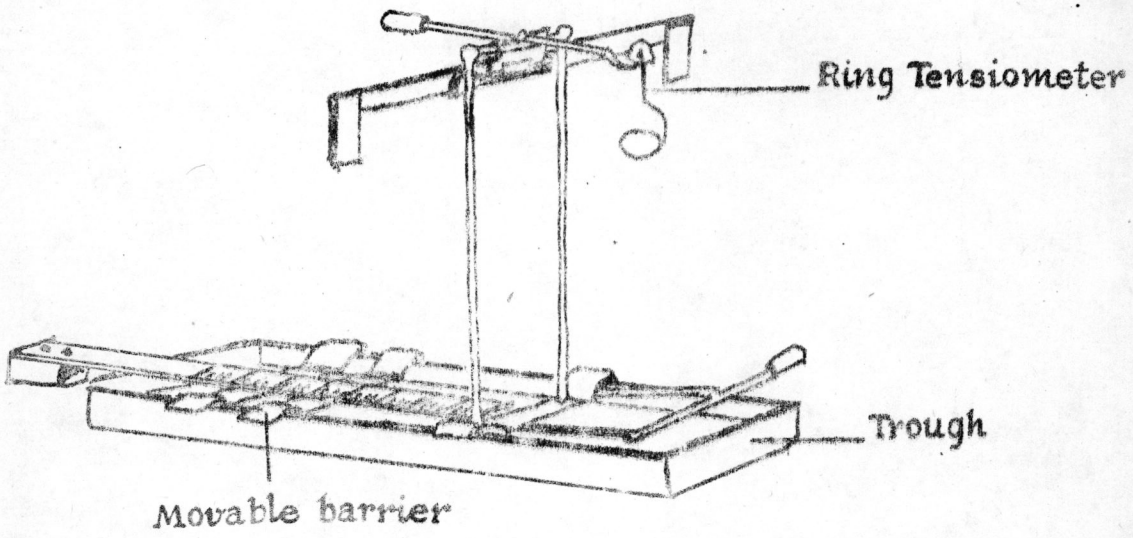
Pockels 1890 แสดงให้เห็นว่า ทำไม film จึงถูกจำกัดขอบเขตได้ โดยที่กั้น (Barrier) เขาพบการเปลี่ยนแปลงในความแรงตึงผิว (Surface tension)ของ film ของกรดไขมัน (Fatty acid) จน film นี้ถูกจำกัดที่พื้นที่ $20A^{o2}$ ต่อโมเลกุล (The Pockels point) Lord Rayleight 1899 ได้อธิบายผลของ Pockels Point ว่าที่พื้นที่นี้ โมเลกุลของสารที่ลอยตัวอยู่ที่ผิวจะสัมผัสกับโมเลกุลตัวอื่นได้พอดี film นี้จะมีลักษณะลอยตัวอยู่บนผิวซึ่งมี Interaction เล็กน้อยจนสัมผัสกับโมเลกุลอื่น การบีบ film ที่ Pockels Point จะทำให้เกิด Compressive energy ต่อ film ซึ่งสามารถลด Total free energy ในการเกิดผิวหน้าใหม่ นั่นคือจะมีการลดความแรงตึงผิวนั่นเอง

Langmuir พบว่า เมื่อเรากระจายโมเลกุลของไขมันลงบนผิวน้ำ โมเลกุลของไขมันจะเรียงตัวหลวม ๆ ชั้นเดียว เมื่อเราบีบให้พื้นที่ผิวหน้าของโมเลกุลของไขมันที่กระจายอยู่ให้น้อยลง โมเลกุลเหล่านี้จะเรียงตัวเป็นระเบียบยิ่งขึ้น ถ้าเราบีบให้พื้นที่ของผิวหน้าลดลงไปอีก โมเลกุลของไขมันจะเรียงตัวแน่นมากเข้า จนในที่สุด film นี้จะแตกออก นั่นคือ โมเลกุลของไขมันบางส่วนจะไม่เรียงตัวอยู่บนผิวน้ำอีกต่อไป แต่จะหลุดเข้าไปใต้ผิวน้ำทำให้แรงตึงผิวเพิ่มขึ้น

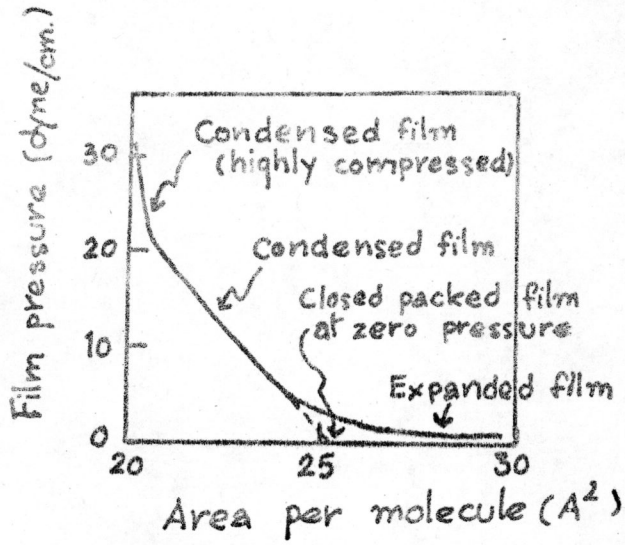
เครื่องมือที่ Langmuir ใช้เรียกว่า Film Balance (รูปที่ ๒) ซึ่งประกอบด้วย Ring Tensiometer และถาดที่ทราบพื้นที่ โดยมีที่กั้นที่ เคลื่อนที่ได้ (Movable Barrier) ติดอยู่ที่ถาดเพื่อเปลี่ยนพื้นที่ของบริเวณที่เรากระจายไขมันไว้บนผิวหน้าของน้ำ วัดความแรงตึงผิวที่พื้นที่ต่าง ๆ ด้วย Torsion wire ของ Ring Tensiometer Compressive force ต่อหน่วยพื้นที่ของ film เรียกว่า Surface pressure (π) ซึ่งเป็น ความแตกต่างระหว่าง ความแรงตึงผิวของน้ำเมื่อไม่มีไขมันอยู่ที่ผิวหน้า (γ_o) กับความแรงตึงผิวของ System ที่มีไขมันเรียงตัวอยู่ที่ผิวหน้า (γ)

$$\pi = \gamma_o - \gamma$$

ถาดที่ใช้เคลือบด้วย Paraffin หรือ Teflon ไขมันที่ใช้เอามาละลายในตัวทำละลาย (Solvent) ที่ระเหยได้ง่าย เมื่อให้ไขมันเรียงตัวบนผิวหน้าของน้ำแล้วทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายที่มีอยู่ระเหยไป หาค่า Surface pressure ที่พื้นที่ต่าง ๆ มา Plot ระหว่าง Surface Pressure π กับพื้นที่ผิวของ System ผลที่ได้พบว่าเมื่อพื้นที่กว้างโมเลกุลของไขมันจะเรียงตัวหลวมๆ



รูปที่ ๒ Langmiur's film balance



รูปที่ ๓ ผลการทดลองของ Langmiur

ในลักษณะที่เรียกว่า Expanded หรือ Gaseous film เมื่อลดพื้นที่ลงค่า Suface Pressure จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว film จะมีลักษณะเป็น LiquidหรือSolid หรือ Condensed film จนในที่สุด เมื่อลดพื้นที่ลงจนถึงขีดหนึ่ง film จะแตกและมีการเปลี่ยนแปลง Surface Pressure ให้เห็นโดย Surface Pressure จะเริ่มลดลงตรงพื้นที่ที่ film แตก

มีผู้ใช้ Monomolecular film กันอย่างกว้างขวางในการศึกษาปฏิกริยาที่เกิดระหว่างสารต่าง ๆ ของเยื่อเซลล์ เช่นกลไกการเกิดปฏิกริยาของ Polyene Anitibiotic, Air Pollutant [๒๐] และอาจเป็นสารอื่นซึ่งไม่ใช่ส่วนประกอบของเยื่อเซลล์เช่นศึกษาปฏิกริยาที่เกิดระหว่าง Copolymer ที่ประกอบด้วย Polyvinylpyrrolidone และ Vinyl acetate กับ Benzoic acid และ Parahydroxy benzoic acid [๒๑] กลไกของการเกิดปฏิกริยาต่าง ๆ เหล่านี้ได้มีการอธิบายกันอย่างแจ่มแจ้งบางครั้งถึงในระดับ cell ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ Monomolecular film ในการศึกษาถึงการซึมผ่านและปฏิกริยาของเมททิลพาราเบนในความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็น - เบื้องต้น ก่อนที่จะศึกษาขั้นต่อไปในสัตว์ทดลอง

๑.๒ วัตถุประสงค์

๑.๒.๑ เพื่อศึกษาการซึมผ่านและปฏิกริยาของเมททิลพาราเบนในความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในขนาดที่สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของบักเตรีและ Microorganism อื่น ๆ ต่อส่วนประกอบต่าง ๆ ของเยื่อเซลล์เทียมที่สร้างขึ้นโดยวิธีของ Wilhelmy (Wilhelmy Plate Method) [๑๗]

๑.๒.๒ เพื่อหาความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดของเมททิลพาราเบนในการป้องกันการเจริญเติบโตของบักเตรี และ Microorganism โดยมีปฏิกริยาต่อเยื่อเซลล์น้อยที่สุด

๑.๒.๓ เพื่อศึกษาการซึมผ่าน และปฏิกริยาของเมททิลพาราเบน ที่มีต่อเยื่อเซลล์เทียมที่ pH ต่าง ๆ ที่ใกล้เคียงกับ pH ของกะเพาะอาหาร [๒๒], ลำไส้ [๒๓] และผิวหนัง [๒]

๑.๓ ขอบเขตของการวิจัย

เนื่องจากยังไม่ปรากฏชัดว่า เมททิลพาราเบนที่ใช้เป็นสารกันบูดทั้งในยา, อาหาร และเครื่องสำอาง มีผลอย่างไรต่อเยื่อเซลล์เทียมชนิดต่าง ๆ อีกทั้งในแต่ละบริเวณของเยื่อเซลล์ที่แท้จริงก็มีส่วนประกอบแตกต่างกันไปทั้งชนิด และปริมาณ [๒๔] ผู้วิจัยจึงใช้สารเคมีเป็นตัวแทนของส่วนประกอบในเยื่อเซลล์เทียมดังนี้

๑.๓.๑ ใช้ Egg Lecithin (Phosphatidylcholine) [๒๕] เป็นตัวแทนของ Phospholipid

๑.๓.๒ ใช้ Cholesterol [๒๖] เป็นตัวแทนของ Sterol

๑.๓.๓ ใช้ Bovine Serum albumin [๒๗,๒๘,๒๙,๓๐] เป็นตัวแทนของ Protein

ผู้วิจัยต้องการจะศึกษาผลของเมททิลพาราเบนในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้เป็นสารกันบูด ใน pH ที่ใกล้เคียงกับ pH ของกะเพาะอาหาร, ลำไส้ และผิวหนัง ต่อเยื่อเซลล์เทียมที่เตรียมขึ้นจากสารเคมีทั้ง ๓ ตัว โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารเคมีทั้ง ๓ ตัวนั้น

๑.๔ ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยนี้

๑.๔.๑ ทำให้ทราบความเข้มข้นของเมทธิลพาราเบนที่พอเหมาะในการป้องกันการเจริญเติบโตของบักเตรี และ Microorganism อื่น ๆ และให้โทษต่อเยื่อเซลล์น้อยที่สุด

๑.๔.๒ ทำให้ทราบถึงปฏิกริยาของเมทธิลพาราเบนที่อาจมีต่อส่วนประกอบต่าง ๆ ของเยื่อเซลล์ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการวิจัยขั้นต่อไป

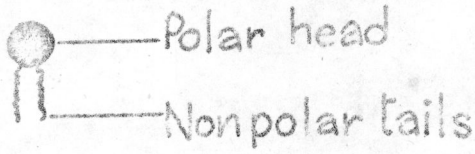
๑.๔.๓ ทำให้ทราบว่า เมทธิลพาราเบนควรจะมีการดูดซึมได้ดีที่สุด หรือมีปฏิกริยาต่อส่วนประกอบของเยื่อเซลล์มากที่สุดที่บริเวณไหนของร่างกาย

๑.๔.๔ ทำให้สามารถแนะนำได้ว่า อาหาร ตำหรับยาประเภทใด หรือเครื่องสำอางใดควรจะใช้เมทธิลพาราเบนเป็นส่วนประกอบหรือไม่ เพราะเหตุใด

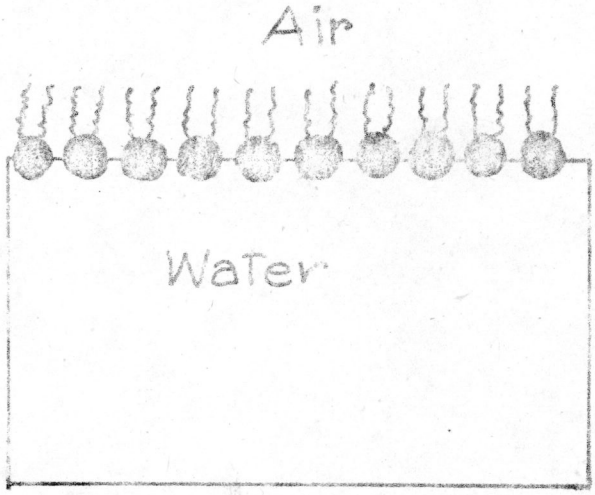
๑.๕ วิธีจะดำเนินงานค้นคว้าและวิจัย

ผู้วิจัยอาศัยลักษณะโครงสร้างของเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Model of Biological Membrane เป็นหลักในการทำเยื่อเซลล์เทียม โดยใช้ลักษณะโครงสร้างของเยื่อเซลล์ที่เสนอโดย Danielli และ Davson [๖] เป็นหลัก แต่ผู้วิจัยทำเป็น Monomolecular Lipid film เพราะเมื่อเราให้ไขมันลงในน้ำ ไขมันจะเรียงตัวที่ผิวน้ำโดยเอาส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (Non Polar part) ชี้ไปในอากาศ ส่วนที่ละลายน้ำ (Polar part) หันลงไปในน้ำ (รูปที่ ๔,๕) และเมื่อมีโปรตีนไปเคลือบอีกที จะได้ที่มีลักษณะคล้ายข้างหนึ่งของเยื่อเซลล์ ซึ่งผู้วิจัยใช้เยื่อเซลล์ที่เตรียมขึ้นในลักษณะนี้ในการวิจัยแทนเยื่อเซลล์ที่แท้จริง โดยใช้ Egg Lecithin, Cholesterol และ Bovine Serum albumin เป็นส่วนประกอบในเยื่อเซลล์เทียมที่ทำขึ้น

ส่วนวิธีการวัดและแปลผล ผู้วิจัยใช้วิธีการของ Langmuir เป็นหลัก โดยเครื่องมือ Tensiometer วัดความแรงตึงผิว โดยวิธี Wilhelmy Plate Method แทน Ring Method ของ Langmuir



รูปที่ ๔ ลักษณะโมเลกุลของไขมัน



รูปที่ ๕ การเรียงตัวของไขมันที่ผิวหน้าของน้ำ