บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์มาจากเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 โดย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540) โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นในช่วง 10 ถึง 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศในช่วง 1.0 ถึง 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนในช่วง 300 ถึง 500 รอบต่อนาที การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก และการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก เนื่องจากมีรายงานว่า ปัจจัยที่กล่าวมานี้มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นได้ (Johns และคณะ, 1994; Kim และคณะ, 1996 และArmstrong และ Johns, 1997)

จากรายงานของ Armstrong และ Johns ในปี 1997 เกี่ยวกับ ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร มีสภาวะในการหมัก คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร โดยอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.2 x 10^6 ดัลตัน ขณะที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 2.6 ถึง 2.7 x 10^6 ดัลตัน และได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 2.70 และ 1.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกนั้นผู้วิจัยรายงาน 2 วิธี คือ ใช้วิธี size exclusion chromatography สำหรับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 2.4 x 10^6 ดัลตัน และใช้วิธีการหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืด (viscometry) สำหรับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 2.4 x 10^6 ดัลตัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับ ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นในช่วง 10 ถึง 20 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีภาวะในการหมัก คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 15 และ 20 กรัมต่อลิตร จะไม่มี

ผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ โดยค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะมีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่าอยู่ในช่วง 0.72 ถึง 1.55 x 10^6 ดัลตัน, 0.78 ถึง 1.44 x 10^6 ดัลตัน และ 0.60 ถึง 1.55 x 10^6 ดัลตัน ตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Armstrong และ Johns (1997) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้แตกต่างกัน รวมถึงขนาดของถังหมัก สภาวะในการหมักและวิธีการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกก็แตกต่างกันอีกด้วย และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,200 2,225 และ 2,125 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นจาก 10 เป็น 15 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 1,200 เป็น 2,225 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 20 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ใกล้เคียงกันคือ 2,125 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการทดลองซ้ำที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ก็ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน จึงคิดว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ จึงไม่ได้ทำการทดลองในภาวะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 20 กรัมต่อลิตร และเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดสอบปัจจัยอื่นๆต่อไป

จากรายงานของ Armstrong และ Johns (1997) เกี่ยวกับ การเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในภาวะที่ไม่มีอากาศ และภาวะที่มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร มีภาวะในการหมัก คือ ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที พบว่า ภาวะที่มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่า โดยอยู่ในช่วง 2.6 ถึง 2.7 x 10^6 ดัลตัน และที่สภาวะที่ไม่มีอากาศ ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 2.2 x 10^6 ดัลตัน และได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 1.65 และ 1.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับ ผลของอัตราการให้อากาศในช่วง 1.0 ถึง 1.5 vvm ต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีภาวะในการหมักคือ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที พบว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.0 vvm เป็น 1.5 vvm จะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น คือ ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 0.78 ถึง 1.44 x 10^6 ดัลตัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ซึ่งได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,225 และ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.0 vvm เป็น 1.5 vvm จะมีผล

ทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Armstrong และ Johns (1997) ดังนั้น การเพิ่มอัตราการให้อากาศน่าจะมีผลทำให้ปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น

จากรายงานของ Kim และคณะ ในปี 1996 เกี่ยวกับ ผลของความเร็วรอบในการกวนต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus equi* KFCC 10830 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีภาวะในการหมักคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 400 รอบต่อนาที เป็น 1,200 รอบต่อนาที ที่ชั่วโมงที่ 5 จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก จะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลดลง แต่จะมีผลทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นจาก 3.2 x 10^6 ดัลตัน ที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที เป็น 5.0 x 10^6 ดัลตัน ที่ความเร็วรอบในการกวน 1,200 รอบต่อนาที โดยการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกใช้การทำ high performance liquid chromatography ที่ต่อกับ refractive index detector และ gel permeation chromatography program งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับ ผลของความเร็วรอบในการกวนในช่วง 300 ถึง 500 รอบต่อนาที ต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีภาวะในการหมักคือ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 300 รอบต่อนาที เป็น 400 และ 500 รอบต่อนาที จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6, 1.00 ถึง 2.34 x 10^6 และ 0.76 ถึง 1.82 x 10^6 ดัลตัน ตามลำดับ ซึ่งจากค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ ไม่สามารถบอกได้ว่า ความเร็วรอบในการกวนจะมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกหรือไม่ และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,700 2,600 และ 2,160 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Kim และคณะ (1996) คือ การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนที่สูงเกินไปจะมีผลทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลดลง ส่วนผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกนั้นยังไม่สามารถสรุปได้

จากรายงานของ Kim และคณะ (1996) เกี่ยวกับ ผลของการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus equi* KFCC 10830 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีภาวะในการหมักคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ครั้ง ที่เวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1.0 และ 3.0 โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตาม

ลำดับ จะมีผลทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นจาก 2.9 x 10^6 ดัลตัน (ไม่มีการเติมไลโซไซม์) เป็น 3.8 x 10^6 ดัลตัน และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นจาก 3.65 กรัมต่อลิตร (ไม่มีการเติมไลโซไซม์) เป็น 4.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดย Kim และคณะ ได้เสนอแนะว่า การเติมไลโซไซม์จะทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลาย ทำให้มีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มมากขึ้นเพื่อป้องกันอันตราย และสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะนี้ งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับ ผลของการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีภาวะในการหมักคือ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาการหมัก (20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร กับ 200,000 และ 600 ,000 ยูนิตต่อลิตร) จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ใกล้เคียงกัน คือ มีค่าอยู่ในช่วง 0.83 ถึง 2.04 x 10^6 ดัลตัน และ 0.83 ถึง 2.24 x 10^6 ดัลตัน ตามลำดับ และค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ มีค่าสูงกว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมัก โดยไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักเล็กน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน ผลการทดลองที่ได้ ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Kim และคณะ (1996) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากชนิดของแบคทีเรียที่ใช้แตกต่างกัน หรือความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่ใช้ยังไม่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของเชื้อนี้ จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกหรือไม่ และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ลดลง คือ จาก 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก เป็น 2,110 และ 2,360 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาการหมัก (20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร กับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร) ตามลำดับ

จากการศึกษาเกี่ยวกับ ผลของการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมัก เมื่อมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.83 ถึง 1.58 x 10^6 ดัลตัน โดยมีค่าต่ำกว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในสภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จะมีค่าใกล้เคียงกับการหมักในภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ดังนั้น การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ไม่น่ามีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

จากการศึกษาเกี่ยวกับ ผลของการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จะอยู่ในช่วง 1.20 ถึง 2.00 x 10^6 ดัลตัน จะเห็นว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับ ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก การหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีค่าเท่ากับ 2,610 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าใกล้เคียงกับการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก น่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นได้ ส่วนการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก น่าจะไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

จากรายงานของ Shozo และคณะ ในปี 1997 เกี่ยวกับ การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis พบว่า สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจากแหล่งต่างๆ 3 ชนิด คือ กรดไฮยาลูโรนิกจากหนังหมู (4.0 ถึง 6.0 x 10^6 ดัลตัน) กรดไฮยาลูโรนิกจากสายสะดือมนุษย์ (0.8 ถึง 1.2 x 10^6 ดัลตัน) และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Opelead (1.5 ถึง 2.1 x 10^6 ดัลตัน) เป็นสารตัวอย่าง โดยการทำ high-performance capillary electrophoresis โดยใช้ uncoated fused-silica capillary ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็น running buffer และมี naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (NTS) เป็น internal standard และติดตามกรดไฮยาลูโรนิกจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 185 นาโนเมตร งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับ การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีนี้ โดยได้ดัดแปลงจากวิธีของ Shozo และคณะ คือ ใช้กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน 2 ชนิด ของบริษัท Sigma ได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* (0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน) และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ (3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน) ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 4.0) 25 มิลลิโมลาร์ เป็น running buffer และติดตามกรดไฮยาลูโรนิกจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร พบว่า ไม่สามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานได้ เนื่องจากค่า relative mobility ของกรดไฮยาลูโรนิกทั้ง 2 ชนิด ที่ได้ ไม่สัมพันธ์กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกลับมีค่า relative mobility ต่ำกว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Shozo และคณะ ซึ่งรายงานว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีค่า migration time น้อยกว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงคาดว่า ภาวะที่ใช้ในการทดลองยังไม่เหมาะสม โดยอาจจะต้องปรับเปลี่ยนภาวะต่างๆในการทดลอง เช่น ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานที่ใช้ ความเข้มข้นของ pullulan ที่จะ

ใช้ ระยะเวลาในการฉีดสารตัวอย่าง อุณหภูมิของ capillary ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ซึ่งมีผลต่อค่า migration time ทั้งสิ้น และอาจจะต้องเพิ่มชนิดของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานให้มากขึ้น สำหรับการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานที่ถูกต้องสำหรับใช้หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นสารตัวอย่างด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis

รายการอ้างอิง