สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2538-2539
เสนอ
ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง
การสกัดแยกเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์

จห
สห 15
011995

โดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

พฤษภาคม 2542

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2538-2539
เสนอ
ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง
การสกัดแยกเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์

โดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

พฤษภาคม 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 23800185 22 ก.ย. 2547

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ พบว่า เนื้อเยื่อสัตว์ที่เหมาะสมจะนำมาสกัดแยกเฮปาริน ได้แก่ เนื้อเยื่อปอดสุกร กระบวนการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกร ประกอบด้วย 1) การออโต-ไลซิสเนื้อเยื่อ 2) การย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์นิวเทรส 3) การตกตะกอนสารเจือปนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติค 4) การกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตัน ด้วยวิธีอัลทรา-ฟิวเทรชัน 5) การตกตะกอนลำดับส่วนไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่างๆ ที่เจือปน รวมทั้งเฮปารินด้วยสารละลายเอธานอลในน้ำ และ 6) การทำเฮปารินที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี พบว่า เฮปารินที่ได้มีค่าต่อต้านการแข็งตัวของเลือดแบบแอนตีแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor Xa) เท่ากับ 143.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ด้วยกระบวนการนี้สามารถสกัดเฮปารินได้ 18.20 มิลลิกรัม (2,606.42 ยูนิต) จากเนื้อเยื่อปอดสุกร 1 กิโลกรัม (น้ำหนักเปียก) นอกจากนั้นได้ทำการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของเฮปารินที่สกัดได้ โดยวิธีนิวเคลียร์แมคเนติค-เรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี และวิเคราะห์อัตราส่วนองค์ประกอบธาตุ พบว่า มีไนโตรเจน 4.63% คาร์บอน 48.86 % ไฮโดรเจน 9.31 % และซัลเฟอร์ 37.20 % และจากการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีไซส์เอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี พบว่า เฮปารินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 4,500 ดาลตัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จฬ
สก 15
เลขทะเบียน 011995
วัน,เดือน,ปี 17 ธค. 47

Abstract

Study show that the most suitable tissue tissue source for heparin extraction is porecine lung. The extraction and purification processes of heparin from porcine lung consist of 1) tissue autolysis 2) tissue disgestion by Neutrase enzyme 3) precipitation of impurities with trichloroacetic acid 4) removal of molecules weight of less than 3,000 daltons by ultrafiltration 5) fractional precipitation of contaminating glycosaminoglycans and heparin with aqueous ethanol solution and 6) further purification of the obtained heparin by anion exchange chromatography. It was found that the Anti Factor Xa blood anticoagulant activity of the pruified heparin was 143.21 unit/mg. By using these extraction and purification processes, one kilogram (wet weight) of the porcine lung tissue yeilds 18.20 milligrams of high purity heparin (2,606.42 units). Structural analyses of the obtained heparin were done by nuclear magnetic resonance spectroscopy and elemental analysis. It was found that the heparin preparation had 4.63% N 48.86%C 9.31%H and 37.20%S and molecular weight of 4,500 daltons estimated by size exclusion chromatography.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ..... i
สารบัญ..... ii
สารบัญตาราง..... iii
สารบัญรูป..... iiii
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 วิธีการทดลอง.....13
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....13
2.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....14
2.3 เนื้อเยื่อสัตว์.....15
2.4 การสกัดเฮปารินจากปอดสุกร.....16
2.4.1 การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด.....17
2.4.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อปอดก่อนนำไปออโตไลซ์.....17
2.4.1.2 การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด.....17
2.4.2 การย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปาริน ออกด้วยโปรติเอส.....17
2.4.2.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์....17
2.4.2.1.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงาน ของเอนไซม์แพนครีเอทิน.....17
2.4.2.1.2 การศึกษาผลของโทลูอีนต่อการทำงาน ของเอนไซม์นิวเทรส.....18
2.4.2.2 การศึกษากรรมวิธีการเติมโปรติเอส.....19
2.4.2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยเนื้อเยื่อ เพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินของเอนไซม์ แพนครีเอทินและนิวเทรส.....19
2.4.2.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ แพนครีเอทินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการ ทำปฏิกิริยา.....19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.2.3.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรส
และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....21
2.4.2.4 การย่อยเนื้อเยื่อปอดเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะ
กับสายเฮปารินด้วยเอนไซม์นิวเทรส.....22
2.4.3 การแยกเฮปารินหลังการย่อย.....22
2.4.4 การทำเฮปารินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง
(High Performance Liquid Chromatography : HPLC) ด้วยคอลัมน์
พีเอ-ดีอีเออี (PA-DEAE column).....24
2.4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮปารินโดยวิธีคาร์บาโซล
(Carbazole method).....25
2.4.6 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเฮปารินในการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ
ด้วยชุดทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ.....27
2.4.7 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปารินโดยการหาปริมาณ
เฮกโซซามีน โดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan).....28
2.4.8 การหาน้ำหนักแห้ง.....31
2.4.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮปารินที่สกัดได้
โดยวิธีนิวเคลียร์แมคเนติคเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี
(NMR Spectroscopy).....31
2.4.10 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเฮปารินที่สกัดได้
โดยวิธี HPLC.....31
2.4.11 การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H)
และซัลเฟอร์ (S) โดยวิธี Elemental Analyzer (NA 2000).....32
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....33
3.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส.....33
3.2 ผลของนิวเทรสในการปลดปล่อยเฮปารินจากเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบ
การย่อยในรูปเนื้อเยื่อแขวนลอย ส่วนน้ำใสจากการออโตไลซิส
และกากเนื้อเยื่อ.....35

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การศึกษาหาความเข้มข้นของโปรติเอสที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการย่อยด้วยโปรติเอส.....37
3.3.1 การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แพนครีเอทินเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....37
3.3.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์แพนครีเอทิน (Pancreatin).....37
3.3.3 การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....38
3.3.4 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์นิวเทรส (Neutrase).....38
3.4 การทำเฮปารินที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์ โดยการกรองร่วมกับวิธีอัลทราฟิลเทรชัน.....39
3.5 การแยกเฮปารินให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (HPLC) ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี.....41
3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮปารินที่สกัดได้ด้วยวิธี NMR Spectroscopy.....43
3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเฮปารินที่สกัดได้ด้วยคอลัมน์ Utrahydrogel 250.....51
3.8 การวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยวิธี Elemental Analyzer (NA 2000).....54
3.9 การหาปริมาณเฮกโซซามีนของเฮปารินที่สกัดได้ โดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan).....55
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....56
หนังสืออ้างอิง.....58
ภาคผนวก.....61

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงความสามารถการละลายได้ของเฮปารินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส.....5
ตารางที่ 1.2 แสดงชื่อผู้วิจัย ชนิดของเนื้อเยื่อ ขั้นตอนหลักในการสกัดเฮปาริน ปริมาณและแอคติวิตีจำเพาะ(Specific activity)ของเฮปารินที่สกัดได้.....8
ตารางที่ 2.1 แสดงเครื่องมือ รุ่น และบริษัทผู้ผลิตที่ใช้ในการทดลอง.....13
ตารางที่ 2.2 แสดงรายชื่อเคมีภัณฑ์และบริษัทผู้ผลิต.....14
ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาตรสารละลายที่เติมลงในหลอดทดลอง.....18
ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดลองในการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา.....20
ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณและปริมาตรสารต่างๆ ที่เติมลงในหลอดทดลองในการทดลองหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของเอนไซม์นิวเทรส.....21
ตารางที่ 2.6 แสดงขั้นตอนและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดสอบตามลำดับ.....27
ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาตรของสารต่างๆ ในการเตรียมสารละลายเฮปาริน.....28
ตารางที่ 2.8 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์และปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮกโซซามีนโดยวิธีเอลสัน-มอร์แกน.....29
ตารางที่ 2.9 แสดงปริมาตรสารต่างๆ ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ D-glucosamine-HCl.....30
ตารางที่ 3.1 ผลของโทลูอีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทิน.....34
ตารางที่ 3.2 ผลของโทลูอีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส.....34
ตารางที่ 3.3 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ สารละลายใสจากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อและกากเนื้อเยื่อที่กรองเอาสารละลายใสออกไป.....36

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการทำเฮปารินให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนและวิธีอัลทราฟิลเทรชัน.....42
ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณของไกลโคอะมิโนไกลแคนและแอนตีแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor Xa activity) ของสารส่วนต่างๆ.....44
ตารางที่ 3.6 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay และ ค่าแอคติวิตีของเฮปารินที่สกัดได้.....45
ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000).....55
ตารางที่ 3.8 แสดงค่าปริมาณเฮกโซซามีนที่มีอยู่ในเฮปารินมาตรฐานและเฮปารินที่สกัดได้.....56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างทั่วไปของเฮปาริน.....2
รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างสารประกอบในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคน.....4
รูปที่ 1.3 แสดงกระบวนการแข็งตัวของเลือด(Blood Coagulation).....6
รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนทั้งหมดในการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกร ของงานวิจัยนี้.....16
รูปที่ 2.2 แผนผังแสดงขั้นตอนการแยกสารเฮปารินจากสารละลายหลังการย่อย.....23
รูปที่ 3.1 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่างๆ ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินต่างๆ.....37
รูปที่ 3.2 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ (เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง) ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่เวลา 4 ชั่วโมง เติมเอนไซม์ 1,600 หน่วย.....38
รูปที่ 3.3 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่างๆ ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสต่างๆ.....39
รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ (เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง) ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่เวลา 4 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เพิ่ม 1,600 หน่วย.....40
รูปที่ 3.5 แสดง ^{1}H NMR สเปคตรัมของสารเฮปารินมาตรฐาน ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....46
รูปที่ 3.6 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิด ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....47
รูปที่ 3.7 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเดอร์มาแตนซัลเฟต ที่ 500 M Hz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....48

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.8 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารคอนดรอยตินซัลเฟต ที่ 500 Mhz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....49

รูปที่ 3.9 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 50 % ที่ 500 M Hz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....50

รูปที่ 3.10 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 83 % ที่ 500 M Hz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....50

รูปที่ 3.11 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.25 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 M Hz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 งศาเซลเซียส.....51

รูปที่ 3.12 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.50 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 M Hz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....51

รูปที่ 3.13 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 M Hz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....52

รูปที่ 3.14 แสดงการแยกของสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ PEG 4,000 (A) PEG 6,000 (B) Dextran 8,000 (C) และ Dextran 10,000 (D) ที่เวลาต่างๆ กัน.....53

รูปที่ 3.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสารกับค่า Retention Time.....53

รูปที่ 3.16 แสดงค่า Retention Time ของสารเฮปารินที่สกัดได้และสารมาตรฐาน 4 ชนิด...54

รูปที่ 3.17 แสดงการแยกสารเฮปารินมาตรฐานที่ผสมรวมกับสารมาตรฐาน 4 ชนิด.....54

บทที่ 1

บทนำ

เฮปาริน (HEPARIN) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือด (blood anticoagulant) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ เพื่อป้องกันและรักษาการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดดำ, รักษาผู้ป่วยที่มีการอุดตันของหลอดเลือด (embolism), วินิจฉัยและรักษาอาการเฉียบพลันหรือเรื้อรังของภาวะเลือดออกอันเนื่องมาจากร่างกายใช้ปัจจัยสำหรับการแข็งตัวของเลือดมากเกินไป (Consumptive Coagulopathesis), ป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือดแดง, ใช้ในการผ่าตัดและหลังผ่าตัด, ใช้ในการถ่ายเลือด, ใช้ในการให้น้ำเกลืออย่างต่อเนื่องและอื่นๆ (1)

เฮปารินที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ ส่วนใหญ่ผลิตจากเนื้อเยื่อลำไส้สุกร ปอดสุกร ลำไส้วัวและปอดวัว อย่างไรก็ตามสำหรับประเทศไทยนั้นเฮปารินที่ใช้ทั้งหมดล้วนนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น อิตาลี เป็นต้น เนื่องจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเฮปารินสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย จึงควรที่จะมีการค้นคว้าศึกษาหาวิธีการผลิตเฮปารินจากแหล่งวัตถุดิบในประเทศ

<u>ประวัติการค้นพบ</u>

ในปี ค.ศ. 1916 นักศึกษาแพทย์นาม Mc lean ผู้ซึ่งกำลังค้นคว้าหาตัวยาที่ช่วยทำให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้นได้ พบสารที่มีฤทธิ์ตรงกันข้ามกับสารที่ต้องการหา คือ พบสารที่มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด (2) และในปี ค.ศ. 1918 Howell ได้ให้ชื่อสารนี้ว่า เฮปาริน เนื่องจากสารนี้สกัดได้จากตับ (3) ต่อมาเมื่อ Charles และ Scott ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้เฮปารินในปริมาณที่สูงขึ้น (4) จึงได้เริ่มมีการผลิตเฮปารินในทางอุตสาหกรรมขึ้นเป็นครั้งแรกโดยสกัดจากสุนัข หลังจากนั้นมาได้มีการทดลองสกัดจากเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นๆ เช่น หัวใจ ปอด และลำไส้ เป็นต้น

ปี ค.ศ. 1935 ได้มีการนำเฮปารินมาใช้เป็นสารป้องกันและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเพื่อรักษาการอุดตันของหลอดเลือด, ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดภายหลังการผ่าตัด ซึ่งประสบผลสำเร็จและเป็นที่ยอมรับอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันยังคงมีการใช้เฮปารินกันอย่างแพร่หลายในโรงพยาบาลต่างๆทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยด้วย (5)

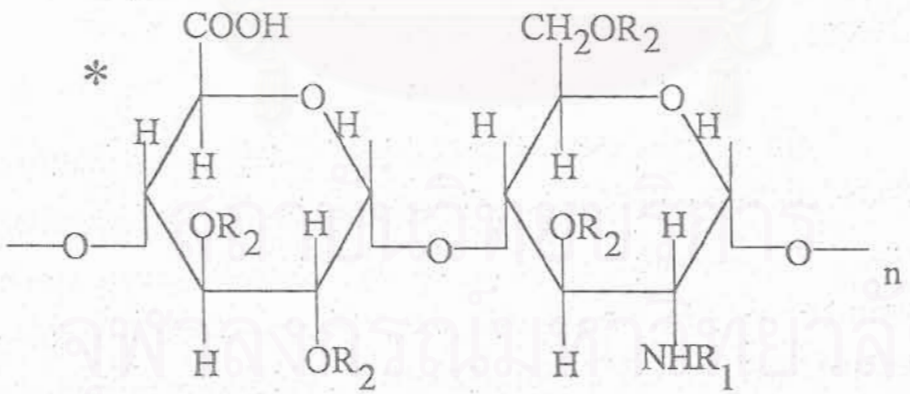
แหล่งที่พบเฮปาริน

เฮปารินพบทั่วไปในเบโซฟิลิกกรานูล (basophillic granules) ของแมสท์เซล (mast cell) ในเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (6) พบมากที่ตับ ปอด และผนังเส้นเลือดแดงใหญ่ เฮปารินถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของโปรติโอไกลแคน (สารประกอบของโปรตีน และพอลิแซคคาไรด์) สายเฮปารินเป็นพอลิแซคคาไรด์ประเภทไกลโคอะมิโนไกลแคน[1]ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ส่วนของสายเฮปารินที่เกาะกับโปรตีนในรูปของโปรติโอไกลแคนซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60,000 ถึง 100,000 ดาลตัน แต่เฮปารินดังกล่าวจะถูกเอนไซม์ไกลโคซิเดสย่อยให้สั้นลงจนมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 13,000 ดาลตัน (7)

โครงสร้างทางเคมี

เฮปารินเป็นไกลโคอะมิโนไกลแคน (8) ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย uronic acid residues และ 2-amino-deoxy-D-glucose residue (หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glucosamine) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (α) 1→4 เป็นสายโซ่ยาว ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของเฮปาริน



Repeating unit of heparin

* Uronic acid residues อาจเป็น α- L-iduronic acid หรือ β- D-glucuronic acid , R_1 อาจเป็น SO_3 หรือ $-C(O)CH_3$, R_2 อาจเป็น $-SO_3$ หรือ H

---

[1]ไกลโคอะมิโนไกลแคน หมายถึง สารประกอบระหว่างโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งมีสัดส่วนของพอลิแซคคาไรด์สูงกว่า

สารประกอบในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคน นอกจากเฮปารินแล้วยังมีสารประเภทอื่นๆ อีก ดังนี้

1) กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) พบได้ในสารวุ้นสายสะดือ (wharton's jelly from umbilical cord) และพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อยึดต่อของร่างกาย ในน้ำหล่อลื่นลูกตา (vitreous fluid) และในน้ำกระดูกไขสันหลัง (synovial fluid) กรดไฮยาลูโรนิกเป็นโพลีเมอร์ของหน่วยไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย D-glucuronic acid และ D-glucosamine ต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิค (ß) 1->3

2) คอนดรอยติน (Chondroitin) เป็นโพลีเมอร์ของหน่วยไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย D-glucuronic acid และ N-acetyl-D-galactosamine ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (ß) 1->3 ต่างกับกรดไฮยาลูโรนิคตรงที่มีกาแลคโตซามีนแทนที่จะเป็นกลูโคซามีน

3) เดอมาแตนซัลเฟต (Dermatan sulfate) พบในเนื้อเยื่อยึดต่อเช่นกันมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคอนดรอยตินยกเว้นมี L-iduronic acid แทนที่ D-glucuronic acid *

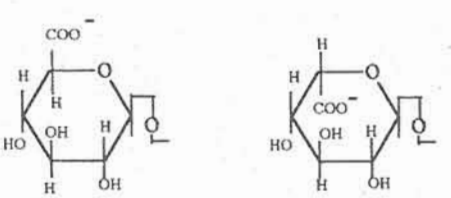
4) เคอราแตนซัลเฟต (Keratan sulfate) เป็นโพลีเมอร์ของหน่วยไดแซคคาไรด์ N-acetylglucosamine sulfate และ galactose โดยไม่มีกรดยูโรนิก (uronic acid) อยู่เหมือนกับไกลโคอะมิโนไกลแคนกลุ่มอื่นๆ

5) เฮพาแรนซัลเฟต (Heparan sulfate) มีโครงสร้างและองค์ประกอบคล้ายกับเฮปาริน แต่สามารถบอกความแตกต่างได้ที่ปริมาณ N- sulfate เฮปารินมีปริมาณ N- sulfate มากกว่าของเฮพาแรนซัลเฟต

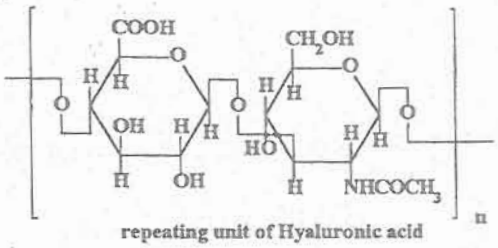
สารประกอบที่กล่าวมาทั้งหมดนี้พบได้ในเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย แต่จะพบมากในเนื้อเยื่อยึดเหนี่ยว เช่น กระดูกอ่อน เอ็น ผิวหนัง เป็นต้น โครงสร้างทางเคมีของไกลโคอะมิโนไกลแคนกลุ่มต่างๆ แสดงอยู่ในรูปที่ 1.2

---

* แสดงโครงสร้างทางเคมีของ D-glucuronic acid และ L-iduronic acid

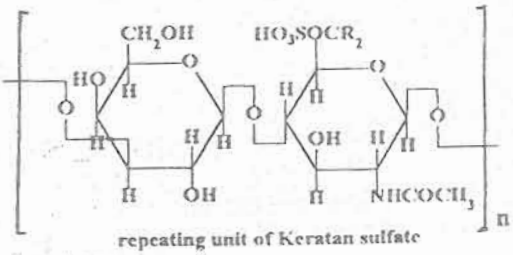


D-glucuronic acid L-iduronic acid



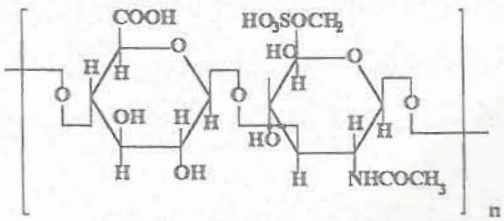
repeating unit of Hyaluronic acid

ก)



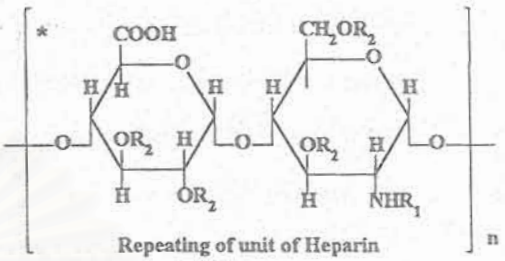
repeating unit of Keratan sulfate

ง)



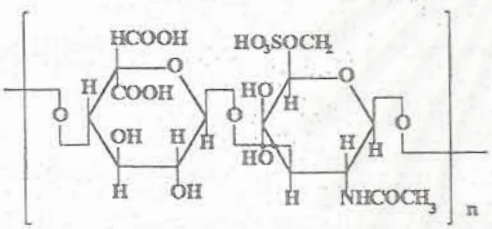
repeating unit of Chondroitin sulfate A

ข)



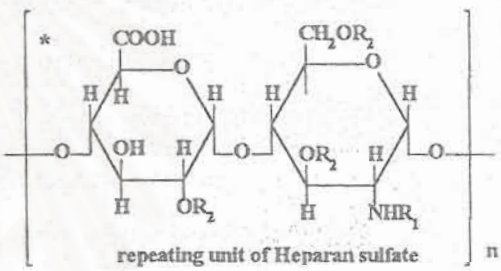
Repeating of unit of Heparin

จ)



repeating unit of Dermatan sulfate

ค)



repeating unit of Heparan sulfate

ฉ)

หมายเหตุ R_1 = $-SO_3$ หรือ $-C(O)CH_3$; R_2 = $-SO_3$ หรือ $-H$

รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างสารประกอบในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคน

ก) กรดไฮยาลูโรนิค ข) คอนดรอยตินซัลเฟต ค) เดอมาแตนซัลเฟต

ง) เคอราแตนซัลเฟต จ) เฮปาริน ฉ) เฮพาแรนซัลเฟต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมบัติของเฮปาริน

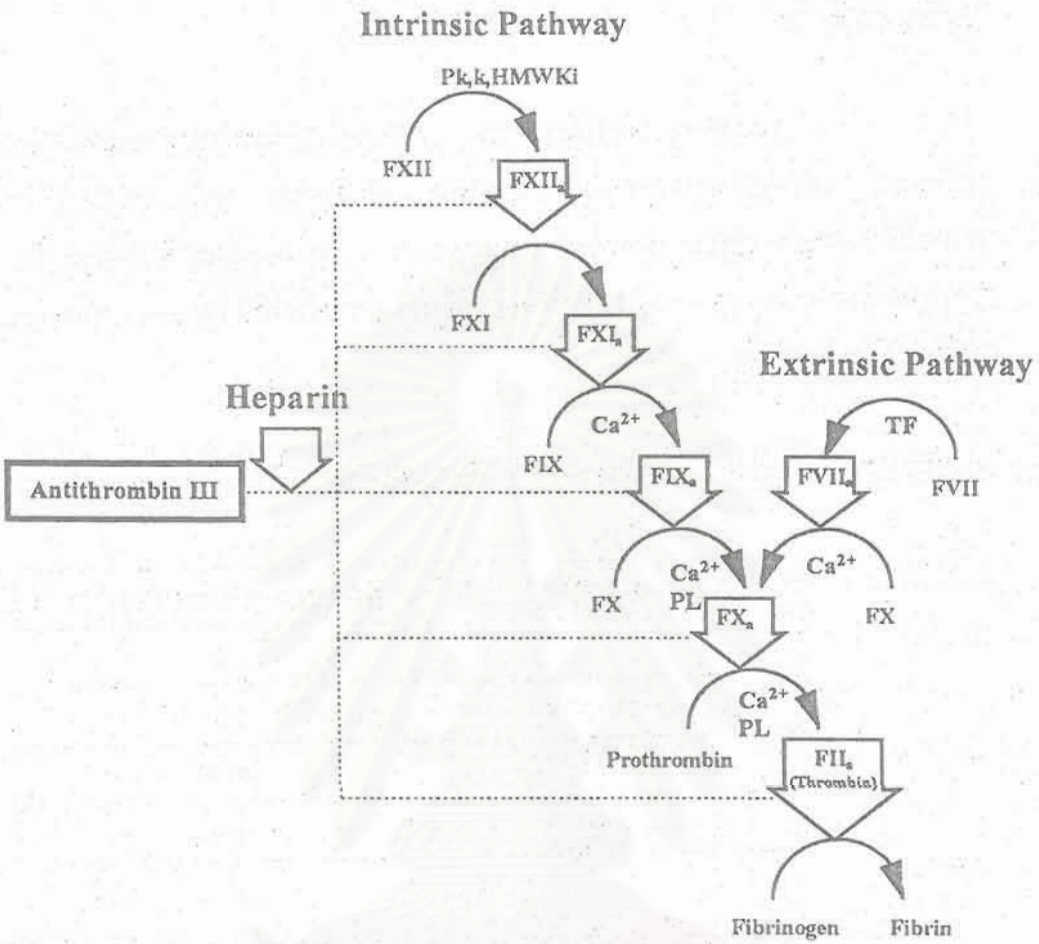
1) ความสามารถในการละลาย พอจะกล่าวได้ว่าตัวทำละลายที่ดีของเฮปารินแทบจะไม่มีเลย เฮปารินในรูปของเกลือโซเดียมละลายได้อย่างช้าๆ ในน้ำ และถือได้ว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดของเฮปาริน แสดงความสามารถการละลายได้ของเฮปารินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 1.1 เฮปารินไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหลาย แต่พบว่าละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม (9,10)

ตารางที่ 1.1 แสดงความสามารถการละลายได้ของเฮปารินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (9)

ตัวทำละลาย	ความสามารถของการละลาย (%)
น้ำ	60
เมธานอล	0.01
เอธานอล	<0.01
อะซีโตน	<0.01

2) ความสามารถในการต้านการแข็งตัวของเลือด เฮปารินมีสมบัติเป็นสารที่ต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) โดยเป็นตัวเร่ง (catalyst) ในปฏิกิริยาระหว่างแอนตีทรอมบินทรี (Antithrombin III) กับ Coagulation factors ต่างๆ ของกระบวนการแข็งตัวของเลือด (ดูแผนภาพในรูปที่ 1.3) เฮปารินสามารถทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดได้เร็วกว่าปกติ 1000 - 2000 เท่า ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเฮปาริน (11) นอกจากนี้เฮปารินยังมีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vasodilating effect) และมีฤทธิ์ลดไขมันในกระแสเลือด (Antipelmic) ด้วย ด้วยสมบัติดังกล่าวนี้ของเฮปาริน จึงมีการนำเฮปารินไปใช้เพื่อลดไขมันในหลอดเลือดในสภาวะเส้นเลือดตีบแข็ง และมีไขมันในเลือดสูง โดยจะให้เฮปารินแก่คนไข้ด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Intrasubcutaneous) หรือผสมกับน้ำเกลือให้ทางหลอดเลือดดำ (Intravascular) ถ้าให้โดยการรับประทานจะไม่ออกฤทธิ์เพราะถูกทำลายได้โดยกรดในกระเพาะอาหาร (12,13)

รูปที่ 1.3 แสดงกระบวนการแข็งตัวของเลือด (Blood Coagulation)



สัญลักษณ์ "a" แสดง factor ในสภาวะ

Pk = Prekallikrein, k = kallikrein, HMWKi = High molecular weight Kinigen, PL Phospholipid, TF = Tissue factor

FVII = Proconvertin, FIX = Plasma thromboplastin component

FX = stuart factor หรือ Thrombokinase

FXI = Plasma thromboplastin antecedent

FXII = Hageman factor

หมายถึง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ประวัติการสกัดเฮปาริน

โดยทั่วไปเฮปารินอยู่ในรูปโปรติโอไกลแคนในเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ ดังนั้นในกระบวนการสกัดแยกเฮปารินจำเป็นต้องผ่านการย่อย เพื่อให้เฮปารินที่เกาะกับโปรตีนในรูปของโปรติโอไกลแคนหลุดจากโปรตีนก่อน ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยสารละลายด่างหรือกรด (4) หรือด้วยโปรติเอส (Protease) ชนิดต่างๆ เช่น พาเพน (papain) โบรมีเลน (bromelain) หรือแพนครีเอทิน (pancreatin) เป็นต้น วิธีการใช้โปรติเอสในขั้นตอนการย่อยเป็นวิธีที่นิยมใช้ในกระบวนการสกัดเฮปารินในอุตสาหกรรม (14-16) เนื่องจากไม่ทำให้แอคติวิตีของเฮปารินเสียไป เพราะโดยทั่วไปโปรติเอสไม่มีผลต่อพอลิแซคคาไรด์ (17) และจากการศึกษาของ Gardell ในปี 1952 (18) พบว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนไม่ทำให้แอคติวิตีของเฮปารินสูญเสียไป ซึ่ง Jorpes ได้เคยรายงานไว้เช่นกันว่าการสกัดเฮปารินไม่ถูกทำให้เสียแอคติวิตีด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) (19)

โปรติเอสที่ใช้ในขั้นตอนการย่อย จะเลือกเอนไซม์ที่มีความจำเพาะค่อนข้างกว้างและมีประสิทธิภาพในการทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0-8.0 ในการวิจัยนี้สามารถหาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ 2 ชนิด คือ แพนครีเอทิน (Pancreatin) และนิวเทรส (Neutrase) เอนไซม์แพนทรีเอทินเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากตับอ่อนของสุกร สภาวะการทำงานที่เหมาะสมคือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นกลาง และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์นิวเทรสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อว่า Bacillus subtilis สภาวะการทำงานที่เหมาะสม คือ ที่ pH 6.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 45 องศาเซลเซียส

Charles และ Scott (4) พบว่า ขั้นตอนการย่อยโปรตีนจะมีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูงขึ้นหากทำการออโตไลซิสเนื้อเยื่อก่อน ดังนั้นในอุตสาหกรรมการสกัดเฮปารินจึงมีขั้นตอนการออโตไลซิสรวมอยู่ด้วยเสมอ (14,15,20) ขั้นตอนต่อจากการไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยโปรติเอส คือการใช้วิธีทางเคมีที่เหมาะสมแยกเฮปารินออกมาจากสารที่ได้จากการย่อย วิธีที่นิยมในทางการค้าได้แก่ การตกตะกอนด้วยเอธานอล การตกตะกอนด้วยสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (Quaternary Ammonium) และวิธีอัลทราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) (14-16,21) เฮปารินที่ได้ในขั้นตอนนี้จะยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ เช่น สารในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ เกลือและกรดนิวคลีอิค เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องนำเฮปารินที่ได้ในขั้นนี้ไปผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น วิธีที่นิยมคือ การแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) แบบต่างๆ เช่น การแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion-Exchange Chromatography) (15,22) และการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (Affinity Chromatography) (23, 24)

ในกระบวนการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์นั้นฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดและปริมาณของเฮปารินที่ได้ นอกจากจะขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้สกัดและการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดด้วย (4,25) ผู้วิจัยหลายท่านได้พยายามปรับปรุงเปลี่ยนแปลงขั้นตอนการสกัดโดยมีวิธีของ Charles และ Scott (4) เป็นพื้นฐานเพื่อให้ได้เฮปารินที่บริสุทธิ์ขึ้นและให้ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดสูง ดังตารางที่ 1.2 แสดงประวัติการปรับปรุงกรรมวิธีการทำเฮปารินให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 1.2 แสดงชื่อผู้วิจัย ชนิดของเนื้อเยื่อ ขั้นตอนหลักในการสกัดเฮปาริน ปริมาณและแอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ของเฮปารินที่สกัดได้

ชื่อผู้วิจัย	ชนิดของเนื้อเยื่อ	ขั้นตอนหลักที่ใช้สกัดเฮปาริน	ปริมาณเฮปาริน (มก./กก.ของเนื้อเยื่อปอดสด)	แอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity)
Charles และ Scott (4)	ปอดวัว	ออโตไลซิส ไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยสารละลายด่าง ตกตะกอนด้วยเอธานอล	270	100
Nomine Penasse และ Barthelemy (14)	ปอดวัว	ออโตไลซิส ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์พาเพน ตกตะกอนด้วยสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ	250	115
Toccaceli (20)	ปอดวัว	ออโตไลซิส ย่อยโปรตีนด้วย เอนไซม์ทริปซิน ตกตะกอนด้วย ซีรัมอัลบูมิน 5% ในน้ำ	950	23
Sumyk Kyle และ Hawrylewicz (15)	ปอดสุกร	ออโตไลซิส ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์พาเพน ตกตะกอนด้วยสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โครมาโตกราฟีโดยใช้เซฟาเดกซ์คอลัมน์	400	15

วิธีการแยกสารเฮปารินจากสารที่ได้หลังการย่อย สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. การตกตะกอนด้วยเอธานอล

หลักการของวิธีนี้คือ ความสามารถในการละลายน้ำของสารต่างชนิดกัน มีความแตกต่างกัน สารประเภทไกลโคอะมิโนไกลแคนต่างๆ ที่ปะปนอยู่กับเฮปารินมีความสามารถในการละลายในสารละลายเอธานอลในน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันไป ในการวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของเอธานอลในน้ำที่ 50 83 และ 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในการทำการตกตะกอนไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่างๆ ซึ่งจากการค้นคว้าพบว่า เฮปารินควรจะตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเอธานอลเป็น 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

2. การแยกสารโดยวิธี Size Exclusion Chromatography

เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด หรือน้ำหนักโมเลกุลของสาร ในการทำจะต้องเลือกชนิดของตัวค้ำจุน (Packing material) ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก โดยพิจารณาช่วงของการแยกสารของตัวค้ำจุนนั้นๆ ให้อยู่ในช่วงที่สามารถแยกสารที่เราต้องการได้ โดยประมาณจากน้ำหนักโมเลกุลของสารที่จะแยก เมื่อผ่านสารละลายที่มีสารที่ต้องการแยกเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งใช้บรรจุตัวค้ำจุนที่มีรูพรุนในขนาดที่เหมาะสม จากนั้นชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม สารแต่ละชนิดจะออกมาตามลำดับขนาดโมเลกุลของมัน

3. การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography)

เป็นวิธีแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของประจุในโมเลกุลของสาร ซึ่งส่งผลต่อการยึดกับตัวค้ำจุน ซึ่งเป็นเรซินที่มีประจุเรียกว่า "ไอออนเอกซ์เชนเรซิน" สารต่างชนิดกันจะถูกแยกจากกันดีหรือไม่ จึงขึ้นอยู่กับความแตกต่างของประจุบนโมเลกุลของสารเหล่านั้น โดยทั่วไปในการแยกจะประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 2 ขั้นตอนดังนี้

1) ให้สารที่จะแยกจับกับไอออนเอกซ์เชนเรซิน

2) ชะสารที่ต้องการแยกออกมาทีละส่วนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทำเฮปารินที่บริสุทธิ์อีกวิธีหนึ่ง จากการค้นคว้าพบว่า ตัวค้ำจุนที่นิยมใช้ในการแยกเฮปาริน ได้แก่ Dowex1-X2 Diethylaminoethyl (DEAE) cellulose ECTEOLA-cellulose เป็นต้น ในการวิจัยนี้ได้ใช้คอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี (Polyacrylate-Diethyla-minoethyl; PA-DEAE) ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีตัวค้ำจุนคือ ไดเอทธิลอะมิโนเอทธิล (DEAE) สำหรับขั้นตอนของการทำเฮปารินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยทำการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (HPLC)

4. การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (Affinity Chromatography)

เป็นวิธีที่นิยมใช้แยกโปรตีน นิวคลีอิคและพอลิแซคคาไรด์ หลักการคือ การใช้ลิแกนด์ที่สามารถยึดเกาะอย่างจำเพาะกับสารที่ต้องการแยกไปยึดไว้กับตัวดูดซับเฉื่อย เพื่อให้เป็นเฟสคงที่ (Stationary Phase) ซึ่งบรรจุไว้ในคอลัมน์ เมื่อผ่านสารที่ต้องการแยกลงไป สารตัวอื่นๆ จะผ่านออกมาหมด ยกเว้นสารที่มีการยึดเกาะกับลิแกนด์ที่ตรึงไว้ เมื่อต้องการชะสารที่ต้องการซึ่งถูกยึดไว้กับเฟสคงที่ออก สามารถทำโดยการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีการผสมสารที่มีแอฟฟินิตี (affinity) สูงกว่าจะล้างออกมา ซึ่งสารที่มีแอฟฟินิตีต่อลิแกนด์ตรึงสูงกว่านี้จะเข้าไปแทนที่สารตัวอย่างนั่นเอง

<u>การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮปารินโดยวิธีคาร์บาโซล</u> (Carbazole method)(26)

หลักการของวิธีนี้ คือ ใช้กรดซัลฟูริคไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของเฮปารินในภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้กรดยูโรนิค (uronic acid) กรดยูโรนิคจะทำปฏิกิริยากับสารคาร์บาโซล (Carbaazole) เกิดเป็นสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบสีที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณเฮกโซซามีนโดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan)</u> (27,28)

วิธีการวิเคราะห์เฮกโซซามีน (Hexosamine) และเอ็น-อะเซทธิลเฮกโซซามีน (N-acetylhexosamine) เป็นปฏิกิริยาการเกิดคอนเดนเซชันของเฮกโซซามีนกับอะเซทธิลอะซีโทนในสารละลายที่เป็นเบส ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ อนุพันธ์ของไพรอล (Pyrrole derivative) ในวิธีนี้ตรวจวัดอนุพันธ์ไพรอลที่เกิด โดยให้ทำปฏิกิริยาต่อกับพารา-ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimethylaminobenzaldehyde) หรือ Ehrlich's reagent ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์สีชมพูอย่างชัดเจน สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโคปี

การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และซัลเฟอร์ (S) โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000)

หลักการของการวิเคราะห์ธาตุ N C H และ S โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000) คือ สารตัวอย่างจะถูกออกซิไดซ์ที่อุณหภูมิสูง 1700-1800 องศาเซลเซียส (flash combustion) ซึ่งจะเปลี่ยนสารอินทรีย์และอนินทรีย์ให้เป็น combustion products ในรูปของ combustion gases ซึ่งจะถูกผ่านไปยัง reduction fernace ซึ่งจะดักจับสารต่างๆ ให้อยู่ในรูป reduced combustion gases จากนั้นกาซตัวพา (carrier gases) คือ ฮีเลียม (He) จะเป็นตัวพาไอของสารต่างๆ นี้ผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ (GC column) สารต่างๆ ที่ผ่านเข้าไปจะถูกแยกในคอลัมน์และตรวจวัดโดย Thermal Conductivity Detector (TCD)

การวัดแอคติวิตีของเฮปาริน

การวัดแอคติวิตีของเฮปาริน คือ การวัดฤทธิ์การต้านการแข็งตัวของเลือดของเฮปาริน ซึ่งสามารถทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) การทดสอบกระทำได้หลายวิธี วิธีมาตรฐานที่ใช้กันมากมี 3 กลุ่ม คือ

1. Whole blood assays เป็นการวัดความสามารถของเฮปารินในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด วิธีนี้จะวัดระยะเวลาของการแข็งตัวของเลือดซึ่งผสมเฮปาริน (Whole blood time) เปรียบเทียบกับระยะเวลาของการแข็งตัวของเลือดปกติที่ไม่มีเฮปารินผสม หลักการนี้ถูกใช้ในวิธีมาตรฐาน 2 วิธี คือ United State Pharmacopoeia (USP)(29) และ British Pharmacopoeia (BP)(30)

2. Blood coagulation specific assays เป็นการวัดผลของเฮปารินที่มีต่อปฏิกิริยาที่แอนตีทรอมบินไปยับยั้งการทำงานของ Coagulation Proteinases ทั้งหลาย

3. Amidolytic assays เป็นการวัดสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ Coagulation Factor แต่ละชนิดของเฮปาริน โดยทำการวัดผลของเฮปารินที่มีต่ออันตรกิริยาระหว่างสับสเตรทสังเคราะห์ที่ผลิตขึ้นเฉพาะสำหรับ Coagulation Factor แต่ละชนิดที่ทดสอบกับ Coagulation Factor นั้น โดยทั่วไปแล้วจะเป็นการวัดประสิทธิภาพในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเฮปารินในปฏิกิริยาที่แอนตีทรอมบินไปยับยั้งการไฮโดรไลซ์สับสเตรทสังเคราะห์ของ Coagulation Factor เฉพาะนั้นๆ ตัวอย่างเช่น การทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Factor Xa Assay) การทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์ทูเอ (Factor lla) เป็นต้น

ในการวิจัยนี้กระทำการวัดแอคติวิตีของเฮปารินด้วยวิธี Amidolytic assays โดยทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Factor Xa) ด้วยชุดทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอของบริษัท Sigma ซึ่งประกอบด้วยโบวีนแฟกเตอร์เทนเอ (Bovine Factor Xa) ฮิวแมนแอนตีทรอมบินทรี (Human Antithrombin) และสับสเตรทของแฟกเตอร์เทนเอ ซึ่งประกอบด้วยสายเปปไทด์ต่อกับสาร para-Nitroaniline (pNA) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบเป็นไปดังสมการ

1. Heparin + Antithrombin (AT) $\longrightarrow$ Heparin-AT
2. (1) Factor Xa + Heparin-AT $\longrightarrow$ Heparin-AT-Factor Xa
   (2) Factor Xa + Peptide-p-NA $\longrightarrow$ Peptide + pNA (yellow) + Factor Xa

จากปฏิกิริยาข้างบนจะเห็นว่า ในกรณีที่มีเฮปารินที่สามารถช่วยการจับกันระหว่างแอนตีทรอมบินและแฟกเตอร์เทนเออยู่มากๆ จะทำให้เหลือแฟกเตอร์เทนเออิสระที่จะมาไฮโดรไลซ์เปปไทด์ออกจาก pNA เพื่อให้เกิด pNA ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ 385 นาโนเมตร ได้น้อยลง

จากที่กล่าวมาข้างต้นนี้ จะเห็นว่าเฮปารินช่วยทำให้เลือดแข็งตัวได้ช้าลง โดยผ่านกลไกที่ซับซ้อน การนำเฮปารินมาใช้มีอยู่ทั่วไป งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาวิธีสกัดแยกเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ โดยทำการศึกษาตั้งแต่การหาแหล่งเนื้อเยื่อที่เหมาะสม หาวิธีสกัดแยกทำให้บริสุทธิ์ ไปจนถึงหาน้ำหนักโมเลกุล และแอคติวิตีของเฮปารินที่สกัดได้

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 2.1 แสดงเครื่องมือ รุ่น และบริษัทผู้ผลิตที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ	TU-16D	Techne, Duxford Cambridge, England
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	WRT	Inform, Switzerland
3. เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporation)	RE-52	Yamato, Scientific, Tokyo, Japan
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	UV-3100	Shimadzu, Kyoto, Japan
5. เครื่องอัลทราฟิลเทรชันและเมมเบรน (Ultrafitration)	Amicon PM-3	W.R Grace Co., Beverly, USA
6. เครื่อง Ultrasonicator	D 200	D.S.C. group ประเทศไทย
7. เครื่องเขย่า	Vortex-Genie No. 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง	Z 230	Berthod Hermle, Framo-Geratetechnick, Germany
9. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	PHM 82	Radiometer Copenhagen, Denmark
10. Morat magnetic stirrer	M 22/1	Framo-Geratetecnick, Germany

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
11. เครื่องปั่น (Homogenizer)	AM-11	Kokusan Enshinki, Japan
12. ตู้อบแห้ง	ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
13. เครื่องเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมความเย็น	KR-20000T	Kubota, Japan
14. เครื่องระเหิดแห้ง (Lyphilizer)	-	Yamato, Tokyo, Japan
15. เครื่องโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (HPLC)	LC-6A	Shimadzu, Kyoto, Japan
16. คอลัมน์ PA-DEAE	-	Shimadzu, Kyoto, Japan
17. ปั๊ม (Peristatic pump)	P-1	Pharmacia, Sweden
18. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์	Elgastat UHQ II	Lane End High Wycombe Bucks, England
19. หลอดพลาสติก ขนาด 12x75 มม.	Natural Round bottom	Borton Turnpike shrewsbury, USA
20. เครื่องวิเคราะห์ธาตุ (Elemental Analyzer)	NA 2000	Fisons Instruments S.p.A., Italy

2.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 2.2 รายชื่อเคมีภัณฑ์และบริษัทผู้ผลิต

ชื่อเคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
1. ชุดทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Xa assay)	Sigma chemical Co., USA
2. โทลูอีน (Toluene)	Analytical grade : Merck, Germany
3. เอธานอล (Ethanol)	Commercial grade กองการสุรา กรมสรรพสามิต
4. โซเดียมเตตระบอเรท ($Na_2B_4O_7H_2O$)	Analytical grade : Merck, Germany
5. กรดไตรคลอโรอะซีติค (Trichloroacetic acid)	Analytical grade : Merck, Germany

ชื่อเคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
6. สารมาตรฐานเฮปาริน	Lab grade : Sigma chemical Co., USA
7. กรดอะซีติค (Acetic acid)	Commercial grade : The East Asiatic, Thailand
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Lab grade : Merck, Germany
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Analytical grade : Carlo Erba Reagent
10. ไดโปแตสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	Lab grade : Merck, Germany
11. โปแตสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Lab grade : Merck, Germany
12. เอนไซม์แพนครีเอทิน	Lab grade : Merck, Germany
13. เอนไซม์นิวเทรส	Commercial grade : The East Asiatic, Thailand
14. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	Lab grade : BDH, England
15. p-dimethylaminobenzaldehyde	Analytical grade : Sigma chemical Co., USA
16. อะเซทธิลอะซีโตน (2,4-Pentanedione)	Analytical grade : Sigma chemical Co., USA
17. กรดไฮโดรคลอริก	Analytical grade : Merck, Germany
18. คาร์บาโซล (Carbazole)	Analytical grade : Fluka, Switzerland
19. เคซีน (casine soluble)	Lab grade : BDH, England
20. N-acetyl-D-glucosamine ($C_8H_{15}NO_6$)	Nakarai chemicals Ltd., Japan
21. D-glucosamine-HCl	Nakarai chemicals Ltd., Japan

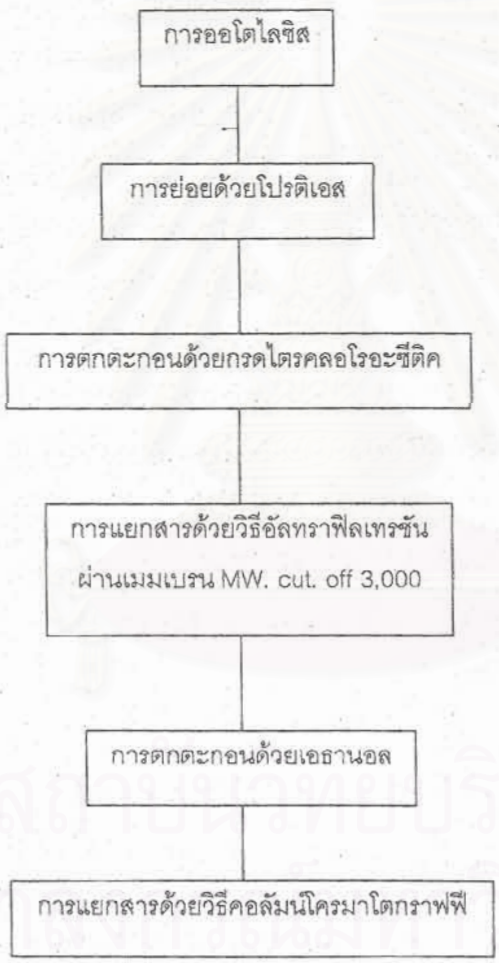
2.3 เนื้อเยื่อสัตว์

ปอดสุกรซื้อจากตลาดสามย่าน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 การสกัดเฮปารินจากปอดสุกร

<u>รูปที่ 2.1</u> แผนภาพแสดงขั้นตอนทั้งหมดในการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกรของงานวิจัยนี้



2.4.1 การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด

2.4.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อปอดก่อนนำไปออโตไลซ์

นำปอดสุกรสดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ จากนั้นนำปอดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ กว้างยาว ประมาณ 1x1 ซม.^{2} หนาประมาณ 2 ซม. และสุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อเก็บไว้ปริมาณหนึ่ง (150 กรัม) เพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอด ส่วนเนื้อเยื่อปอดที่เหลือทั้งหมดนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ความเร็วรอบของการปั่น 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.4.1.2 การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด

นำเนื้อเยื่อปอดที่ปั่นละเอียดจากข้อ 2.4.1.1 (1250 กรัม) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร แล้วเติมน้ำและโทลูอีน (อัตราส่วน น้ำ 500 มล. และโทลูอีน 10 มล. ต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก.) ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 1,600 มล. คนให้เข้ากัน จากนั้นปิดจุกขวดให้สนิทนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที และสุ่มตัวอย่างสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสนี้ (50 มล.) เพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อหลังออโตไลซิส แบ่งส่วนหนึ่ง (200 มล.) ไว้สำหรับศึกษาหาชนิดของเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินด้วยโปรติเอส (หัวข้อ 2.4.2) และส่วนที่เหลือทั้งหมดใส่ในภาชนะที่ปิดสนิทเก็บรักษาไว้ที่ -4 องศาเซลเซียส

2.4.2 การย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินออกด้วยโปรติเอส

2.4.2.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส มีโทลูอีนผสมอยู่ ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของโทลูอีนต่อการทำงานของโปรติเอส โดยได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการเติมโทลูอีน กลุ่มที่ 2 เติมโทลูอีน 10 ไมโครลิตรต่อสารละลายเคซีน 1%(w/v) ปริมาตร 1 มล. และกลุ่มที่ 3 เติมโทลูอีน 20 ไมโครลิตรต่อสารละลายเคซีน 1%(w/v) ปริมาตร 1 มล. (ดูตารางที่ 2.3) โดยได้ทำการทดสอบผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของโปรติเอส 2 ชนิด คือ แพนครีเอทิน (Pancreatin) และ นิวเทรส (Neutrase)

2.4.2.1.1 การศึกษาผลของโทลูอีนต่อการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอทิน

ก. เตรียมสารละลายเอนไซม์แพนครีเอทิน

ชั่งเอนไซม์แพนครีเอทิน 1 มก. ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 7.0) จากนั้นเจือจางสารละลายนี้

1 ปริมาตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 7.0) 2 ปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 800 ยูนิตต่อมล. สารละลายที่ได้เรียกว่า สารละลายแพนครีอีทิน ก. เก็บไว้เป็นสต็อก สำหรับทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อมีการเติมโทลูอีนที่ปริมาณต่างๆ กัน

ข. การเตรียมสารละลายเคซีน 1% (w/v) ชั่งเคซีน 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล.

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาตรสารละลายที่เติมลงในหลอดทดลอง

กลุ่มที่ 1	สารละลายเคซีน 1% W/V (มล.)	สารละลายบัฟเฟอร์ (ไมโครลิตร)	โทลูอีน (ไมโครลิตร)	สารละลายแพนครีเอทิน ก. (ไมโครลิตร)
1	1	900	-	100
2	1	890	10	100
3	1	880	20	100

การทดสอบทำกลุ่มละ 3 หลอด โดยเติมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดทดลองตามตารางที่ 2.3 นำหลอดทดลองทั้งหมดของทุกกลุ่มการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของแพนครีเอทิน (ภาคผนวก ข แสดงการทำการทดลองแปรอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรติเอส (ภาคผนวก ค)

2.4.2.1.2 การศึกษาผลของโทลูอีนต่อการทำงานของเอนไซม์นิวเทรสเตรียม สารละลายเอนไซม์นิวเทรสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) ให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 400 ยูนิตต่อมล. สารละลายเอนไซม์นี้เก็บไว้เป็นสต็อกสำหรับทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อมีการเติมโทลูอีนที่ปริมาณต่างๆ กัน และดำเนินการทดลองต่อไปเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.1.1 ยกเว้นอุณหภูมิของการบ่มเปลี่ยนจาก 50 องศาเซลเซียส มาเป็น 45 องศาเซลเซียส

2.4.2.2 การศึกษากรรมวิธีการเติมโปรติเอส

นำสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสแล้ว ใส่ในหลอดทดลอง 9 หลอดๆ ละ 0.5 กรัม จากนั้นแบ่งเป็นกลุ่มๆ ละ 3 หลอด กลุ่มที่ 1 ไม่มีการเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อ กลุ่มที่ 2 เติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อ กลุ่มที่ 3 เติมเอนไซม์ลงในส่วนสารละลายใสที่เซนตริฟิวส่วนเนื้อเยื่อออกไป กลุ่มที่ 4 เติมเอนไซม์ลงในกากเนื้อเยื่อที่ได้จากการเซนตริฟิวเนื้อเยื่อของส่วนสารละลายใสออกไป จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) เพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 มล. เท่ากันทุกหลอด นำแต่ละหลอดไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลาย TCA ในน้ำ (10% W/V) ปริมาตร 1 มล. เมื่อเขย่าให้ เข้ากัน แล้วจึงนำไปเซนตริฟิวเอาส่วนตะกอนออกที่อัตราความเร็วรอบของการเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายใสของแต่ละหลอดไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปาริน โดยการหาปริมาณกรดยูโรนิคด้วยวิธี Carbazole method (26) (หัวข้อ 2.4.5)

2.4.2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินของเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส

2.4.2.3.1 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทิน และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ในที่นี้สับสเตรท คือ สารแขวนลอยของเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสแล้ว สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์,0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 7.0) แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 20 หลอด ทำการเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณและปริมาตร ที่เติมลงในหลอดทดลองในการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทิน และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

กลุ่มที่ 1	ปริมาณสับสเตรท (เนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส) (กรัม)	ปริมาณบัฟเฟอร์ (มล.)	ปริมาณเอนไซม์ที่เติม* (ยูนิต)
1	0.5	1	0
2	0.5	1	1600
3	0.5	1	2400
4	0.5	1	3200
5	0.5	1	4000
6	0.5	1	4800

* สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์ คือ 1,600 ยูนิต/เอนไซม์แพนครีเอทิน 1.0 มก. (การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินแสดงไว้ในภาคผนวก ง) ทำการเตรียมเอนไซม์ให้ได้ปริมาณแอคติวิตี ตามที่แสดงในตารางที่ 2.4 โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 7.0) โดยให้สารละลายเอนไซม์สำหรับแต่ละหลอดมีปริมาตรสุทธิเป็น 1.0 มล. โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 7.0)

จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของแต่ละกลุ่มๆ ละ 2 หลอด (โดยทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีที่เก็บตัวอย่างด้วยการนำหลอดทดลองของตัวอย่างนั้นๆ ไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที) เมื่อบ่มไปเป็นเวลา 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 ชั่วโมง (ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง ได้จากการทดลองแปรระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (หัวข้อ 3.3.1) หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงแล้ว ได้ทำการเติมเอนไซม์เพิ่มลงไปอีก 1.0 มก. ในแต่ละหลอด แล้วบ่มต่อ 30 นาที จึงเก็บตัวอย่างแต่ละหลอดนั้นไว้อีกครั้งหนึ่ง

เติมสารละลาย TCA ในน้ำ (10% W/V) ปริมาตร 1 มล. ลงในทุกหลอดทดลองที่เก็บตัวอย่าง เขย่าแล้วนำไปเซนตริฟิวที่ความเร็วรอบของการเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนสารละลายใสของแต่ละหลอดไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปาริน โดย Carbazole method (หัวข้อ 2.4.5)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.2.3.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสที่เหมาะสม และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรส (Neutrase)

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.3.1 โดยเปลี่ยนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 7.0) เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) ปริมาณสารต่างๆ ที่เติมในแต่ละหลอดแสดงไว้ในตารางที่ 2.5 การทำปฏิกิริยาทำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบ ต่อนาที

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณและปริมาตรสารต่างๆ ที่เติมลงในหลอดทดลอง ในการทดลองหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรส

กลุ่มที่	ปริมาณสับเสตรท (เนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส) (กรัม)	ปริมาตรบัฟเฟอร์ (มล.)	ปริมาณเอนไซม์ที่เติม * (ยูนิต)
1	0.5	1	0
2	0.5	1	3200
3	0.5	1	4000
4	0.5	1	4800
5	0.5	1	5200
6	0.5	1	6000

* สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์คือ 400 ยูนิต/เอนไซม์นิวเทรส 0.5 มก. (การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรสในภาคผนวก จ) สารละลายเอนไซม์สำหรับแต่ละหลอดมี ปริมาตรสุทธิ 1 มล. เตรียมโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์,0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) เจือจางสารละลายเอนไซม์นิวเทรส

การเก็บตัวอย่างกระทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.3.1 และมีการเติมเอนไซม์เพิ่มหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในกรณี 2.4.2.3.1

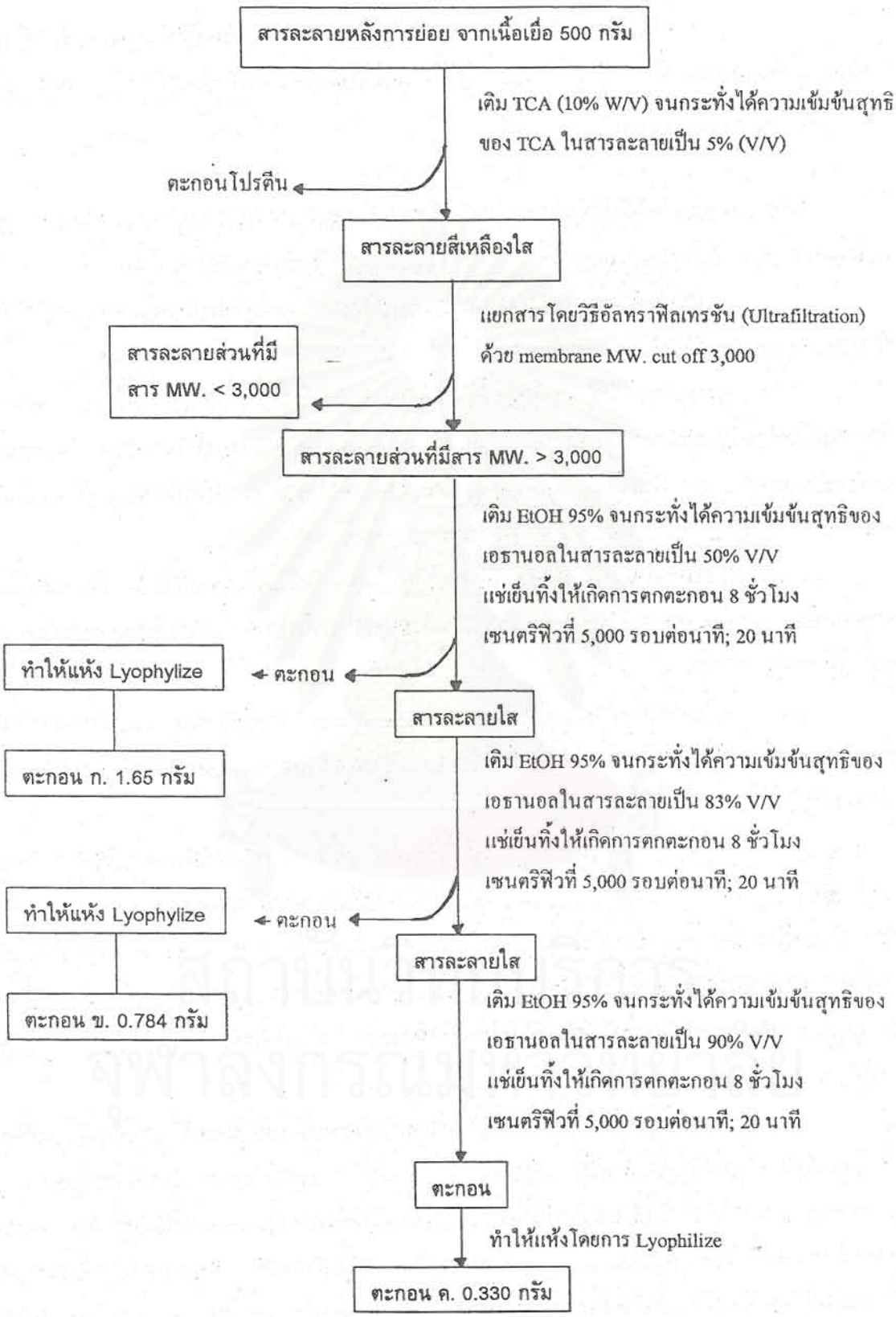
2.4.2.4 การย่อยเนื้อเยื่อปอดเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินด้วยเอนไซม์นิวเทรส

นำเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสแล้วจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาณ 500 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์นิวเทรสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) 5.2 มล. (5,200,000 ยูนิต) ลงในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อปอด คนให้เข้ากัน เติมสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, 0.02 โมลาร์ เมอร์แคพโทเอธานอล, pH 6.5) เพื่อปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.4.3 การแยกเฮปารินหลังการย่อย

นำสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส (จากหัวข้อ 2.4.2.4) มาเซนตริฟิวที่ความเร็วรอบของการเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารละลายใสมากรองด้วยกระดาษกรองวัตต์แมนเบอร์ 2 โดยกรองแบบสูญญากาศ นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาทำการแยกต่อไปดังขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 2.2

<u>รูปที่ 2.2</u> แผนผังแสดงขั้นตอนการแยกสารเฮพารินจากสารละลายหลังการย่อย



จากนั้นนำตะกอน ก ข และ ค ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปารินโดยวิธี Carbazole method (หัวข้อ 2.4.5) และหาแอคติวิตีของเฮปารินโดยทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Xa assay) (หัวข้อ 2.4.6)

2.4.4 การทำเฮปารินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography;HPLC) ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี (PA-DEAE column)

การเตรียมสารละลายที่เกี่ยวข้องและคอลัมน์ เพื่อใช้ในการสกัดแยกเฮปารินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นมีข้อปฏิบัติดังต่อไปนี้ คือ

คุณภาพน้ำ : ใช้น้ำบริสุทธิ์ที่ผ่านเครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ด้วยระบบ Milli q ซึ่งผ่านขั้นตอนการแยกสารอินทรีย์ออกโดยใช้ถ่านกัมมันต์ แล้วจึงผ่านขั้นตอนการขจัดอิออนและกรองผ่าน millipore membrane เพื่อขจัดสารแขวนลอยและเชื้อจุลินทรีย์ให้หมดเป็นขั้นตอนสุดท้าย (น้ำนี้มีความบริสุทธิ์สูงมาก มีค่าความต้านทานไฟฟ้า 18 megaohm-cm)

เตรียมสารละลายที่ใช้ชะ (mobile phase) : ใช้โซเดียมคลอไรด์ และกรดไฮโดรคลอริกชนิด lab grade ซึ่งได้กำจัดเศษผงและตะกอนขนาดเล็กโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนใช้

กำจัดฟองอากาศที่อยู่ในน้ำและ mobile phase : โดยใช้เครื่อง ultrasonicator หรือ vacuum pump การกำจัดฟองอากาศเพื่อไม่ให้ระบบการแยกและระบบ detector ซึ่งจะทำให้เกิดพีค (Peak) ผิดปกติ

การเตรียมคอลัมน์ : ล้างคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออีด้วยน้ำบริสุทธิ์ด้วยความเร็ว 1 มล.ต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดสารที่ยังตกค้างอยู่ในคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำบริสุทธิ์อีกครั้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงเริ่มปรับสภาพคอลัมน์ให้สมดุลย์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

สารตัวอย่าง : สารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้นสุทธิของเอธานอลในน้ำ 90 %(v/v)(ตะกอน ค) ปริมาณ 15 มก. ละลายลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มล. และนำสารตัวอย่างมาผ่านการกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกำจัดตะกอนขนาดเล็กและเชื้อจุลินทรีย์ นำสารตัวอย่างนี้มาผ่านลงในคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี แล้วจึงทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยชะสารเป็นขั้นๆ ตามลำดับ ดังจะกล่าวต่อไป

ขั้นตอนการชะสารออกจากคอลัมน์ : กระทำโดยการชะเป็นขั้นๆ ตามลำดับ ดังนี้

ขั้นที่ 1 ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
ขั้นที่ 2 ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์
ขั้นที่ 3 ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์
ขั้นที่ 4 ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ ความเข้มข้น 1.50 โมลาร์
ขั้นที่ 5 ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์

ในการชะสารแต่ละขั้นนั้น ชะด้วยอัตราเร็ว 1 มล.ต่อนาที เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วนๆ ละ 1 มล. นำไปตรวจหาเฮปารินโดยวิธีคาร์บาโซล ในแต่ละขั้นจะเก็บสารละลายที่ถูกชะจนกระทั่งตรวจหาสารเฮปารินไม่พบ จึงเปลี่ยนการชะเป็นขั้นตอนต่อไปจนถึงขั้นที่ 5 จากนั้นรวบรวมสารเฮปารินที่ชะได้ในแต่ละขั้นที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (evaporation) และนำไปกำจัดเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส ซึ่งถุงไดอะไลซิสมีรูพรุนขนาด 2,000 ดาลตัน นำส่วนที่ได้หลังจากกำจัดเกลือออกแล้วไปทำให้แห้งโดยการระเหิดแห้ง (Lyophylize) และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปาริน ด้วยวิธีคาร์บาโซลและหาแอคติวิตีของเฮปารินโดยทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ

2.4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮปารินโดยวิธีคาร์บาโซล (Carbazole Method) (26)

ก. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1) สารละลายโบเรท-ซัลฟูริค (Borate-Sulfuric acid solution) 10% (w/v) (สารละลาย ก) ชั่งไดโซเดียมเตตระโบเรท ($Na_2B_4O_7 \cdot H_2O$) 3.82 กรัม ละลายในน้ำร้อน 10 มล. ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง ปริมาตร 390 มล.

2) สารละลายคาร์บาโซล (Carbazole solution) 0.2 % (w/v) (สารละลาย ข) ชั่งคาร์บาโซล 100 มก. ละลายลงในเอธานอล 50 มล. สารละลายนี้เก็บในขวดสีชา ป้องกันแสงและเก็บไว้ในตู้เย็น (อายุการใช้งาน 6 เดือน)

ข. วิธีทดสอบ

นำหลอดทดสอบไปทำให้ร้อนโดยแช่ในอ่างน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เติมสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย ก 1.25 มล. เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็ง เมื่อสารละลายเย็นแล้วเติมสารละลาย ข ลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ Blank (Blank หมายถึงใช้น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทนสารตัวอย่างแล้วดำเนินขั้นตอนต่างๆ เหมือนกับการทดสอบสารตัวอย่าง)

การคำนวณหาความเข้มข้นของเฮปารินในตัวอย่างที่สกัดได้ ณ ขั้นตอนต่างๆ หรือด้วยวิธีต่างๆ ทำโดยใช้กราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของเฮปารินมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบซึ่งใช้ที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ฉ)

2.4.6 การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเฮปารินในการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอด้วยชุดทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ มีขั้นตอนและการเติมสารต่างๆ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงขั้นตอนและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดสอบ* ตามลำดับ

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Human Antithrombin III	200
เฮปารินหรือสารตัวอย่าง	25
ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ; 2 นาที	
Bovine factor Xa	200
ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ; 1 นาที	
Factor Xa substrate	200
ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ; 5 นาที	
สารละลายกรดอะซีติคในน้ำ(20% w/v)	200
น้ำกลั่น	200
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 385 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับBlank**	

* หลอดทดสอบที่ใช้เป็นหลอดพลาสติก 12 x 75 มม.

** Blank เตรียมโดยเติมกรดอะซีติคลงในหลอดทดสอบก่อนการเติมสารละลายอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

หมายเหตุ 1. การเตรียมสารละลาย Antithrombin III โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. ลงในขวดสาร Antithrombin III การเตรียมสารละลาย Bovine factor Xa และ Factor Xa substrate กระทำเช่นเดียวกัน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2. สารละลายเฮปารินที่ใช้ในการทดสอบนี้เป็นเฮปารินมาตรฐานของบริษัท Leo ที่มีค่าแอคติวิตี 5,000 ยูนิตต่อมล.

การหาค่าแอคติวิตีของสารตัวอย่าง ทำโดยใช้กราฟมาตรฐาน วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน กระทำโดยการเตรียมสารละลายเฮปารินซึ่งทราบค่าแอคติวิตีแน่นอน ให้มีแอคติวิตีของเฮปารินเป็น 8 ยูนิตต่อมล. (ในที่นี้ใช้เฮปารินของบริษัท Leo ที่มีค่าแอคติวิตี 5,000 ยูนิตต่อมล.) จากนั้นนำมาเตรียมสารละลายเฮปารินให้มีแอคติวิตีเป็น 0.8 0.4 0.2 และ 0.0 ยูนิตต่อมล. ตามลำดับ ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาตรของสารต่างๆ ในการเตรียมสารละลายเฮปาริน

สารละลายเฮปารินที่ได้ (ยูนิตต่อมล.)	ความเข้มข้นของสารละลายเฮปารินและปริมาตรที่ใช้เตรียม(ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0.8	8.0 ยูนิต/มล. 100	900
0.4	0.8 ยูนิต/มล. 500	500
0.2	0.4 ยูนิต/มล. 500	500
0.0	-	1000

นำสารละลายเฮปารินที่มีค่าแอคติวิตี 0.8 0.4 0.2 และ 0.0 ยูนิต ดังกล่าวไปวิเคราะห์ ตามวิธีที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 บันทึกค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 385 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของเฮปารินที่ใช้ในการทดสอบ (ภาคผนวก ช)

2.4.7 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปาริน โดยการหาปริมาณเฮกโซซามีน (Hexosamine) โดยวิธีเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan)(27,28)

I. วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

ก. สารละลายอะเซทธิลอะซีโตน (Acetylacetone reagent) เติมอะเซทธิลอะซีโตน 2 มล. ลงในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในน้ำ ความเข้มข้น 0.625 โมลต่อลิตร 48 มล. (สารละลายนี้เมื่อเตรียมแล้วใช้ภายใน 1 ชั่วโมง)

ข. สารละลายเออร์ลิช (Ehrlich's reagent) ชั่งพารา-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ 1.6 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 มล.

2. วิธีวิเคราะห์กระทำการเติมสารต่างๆ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์และปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮกโซซามีนโดยวิธีเอลสัน-มอร์แกน

สารละลาย	ปริมาตร (มล.)
ไกลแคนหรือสารละลายมาตรฐานของ D-glucosamine	0.25
อะเซทธิลอะซีโตน	0.25
น้ำกลั่น	0.25
ผสมและนำไป heat ในน้ำต้มเดือด เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง	
เอธานอล 95 %	1.25
ผสมและนำไป heat ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	
Ehrlich's reagent	0.25
ผสมและนำไป heat ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง	
เอธานอล 95 %	1.25
ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร	

* สารละลายไกลแคนต้องผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงปรับ pH ให้เป็น 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ และน้ำกลั่น

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณเฮกโซซามีน

ก. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ D-glucosamine HCl 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมล. โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นจากสารละลายตั้งต้น D-glucosamine HCl ที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมล. ดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 แสดงปริมาตรสารต่างๆในการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ D-glucosamine HCl

ความเข้มข้นของ D-glucosamine Hcl (ไมโครกรัม/มล.)	ปริมาตรสารละลาย D-glucosamine HCl (1,000 ไมโครกรัม/มล.) (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0.0	5.0
20	0.1	4.9
40	0.2	4.8
60	0.3	4.7
80	0.4	4.6
100	0.5	4.5

ข. นำไปวิเคราะห์ตามขั้นตอน ดังตารางที่ 2.8 จากนั้นเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ D-glucosamine HCl กับค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร (ภาคผนวก ซ)

2.4.8 การหาน้ำหนักแห้ง

2.4.8.1 การหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอด

ทำโดยนำเนื้อเยื่อปอดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนัก บันทึกค่าไว้และนำไป อบซ้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และชั่งหาน้ำหนักซ้ำ ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักที่ได้หักลบน้ำหนักกระดาษกรองจะได้น้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอด

2.4.8.2 การหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอดหลังออโตไลซิส

ทำเช่นเดียวกับวิธีในหัวข้อ 2.4.8.1 แต่เปลี่ยนจากเนื้อเยื่อปอดเป็นเนื้อเยื่อปอดหลังออโตไลซิส

2.4.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮปารินที่สกัดได้ โดยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปคโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR Spectroscopy)(31-33)

การเตรียมสารเฮปารินก่อนนำไปวิเคราะห์ ทำโดยนำสารเฮปารินปริมาณ 8-10 มก. ละลายในดิวทีเรียมออกไซด์ (D_2O) ปริมาตร 0.5 มล. แล้วนำไป lyophilize ให้แห้ง จึงนำไปเติม D_2O ปริมาตร 0.6 มล. อีกครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเครื่อง FT-NMR Spectrometer High-field ^1H NMR รุ่น JNM-A-500 ขนาด 500 MHz ของบริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น อุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 70 องศาเซลเซียส

2.4.10 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเฮปารินที่สกัดได้โดยวิธี HPLC แบบ Size Exclusion Column ด้วยคอลัมน์อัลทราไฮโดรเจล-250 (Ultrahydrogel-250)

คอลัมน์อัลทราไฮโดรเจล-250 ขนาด 0.78 x 30 ซม. ของบริษัท Water Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา

การเตรียมคอลัมน์ ทำโดยล้างคอลัมน์ Ultrahydrogel ด้วยน้ำบริสุทธิ์ด้วยอัตราเร็ว 1 มล.ต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับสภาพอัตราเร็วเป็น 0.8 มล. ต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราเร็วที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารละลายที่ใช้ชะ : น้ำบริสุทธิ์กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45ไมครอน และกำจัดฟองก๊าซในน้ำด้วยเครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 30 นาที

สารตัวอย่าง : เฮปารินที่สกัดได้ปริมาณ 1 มก. (จากขั้นตอนการ ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ใน HCl 0.01 M) ละลายในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 1 มล. แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานมี 4 ชนิด ได้แก่ Polyethyleneglycol (PEG) 4,000 (MW.4,000) PEG 6,000 (MW.6,000) Dextran 8,000 (MW.8,000) และ Dextran 10,000 (MW.10,000)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ทั้ง 4 ชนิด : เตรียมสารละลาย มาตรฐานแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1 มก.ต่อมล. และนำสารละลายที่เตรียมนี้ไปผ่านคอลัมน์เพื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานแต่ละชนิด จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดที่เตรียมไว้นั้น นำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1 โดยปริมาตร แล้วนำสารละลายผสมที่เตรียมนี้ไป วิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด

ปริมาณสารที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง คือ 10 ไมโครกรัม ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที ความไวของการตรวจวัด (sensitivity) 0.08 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดคือ 206 นาโนเมตร

2.4.1 การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และซัลเฟอร์ (S) โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000)

นำสารที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ซึ่งได้ทำให้แห้งโดยการ Lyophilyze แล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ N C H และ S โดยเครื่อง NA 2000 ของบริษัท Fisons Instruments S.p.A. ประเทศอิตาลี ปริมาณสารที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งประมาณ 2-3 มิลลิกรัม

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ จากการศึกษาข้อมูลต่างๆ พบว่า เนื้อเยื่อที่ให้ปริมาณเฮปารินสูงคือ เนื้อเยื่อปอดสุกร โดยในเมืองไทยเนื้อเยื่อนี้มีราคาถูก และไม่ได้รับความนิยมบริโภค โดยทั่วไปใช้ทำอาหารสัตว์ จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาสกัดแยกเฮปาริน ในที่นี้จึงได้ทำการศึกษาโดยการสกัดเฮปารินจากปอดสุกร ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ผลิตเฮปารินในทางอุตสาหกรรมในต่างประเทศด้วย (14-16)

3.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

จากการค้นคว้าข้อมูลกระบวนการสกัดเฮปารินในทางอุตสาหกรรม พบว่าการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเฮปารินทำได้โดยการทำออโตไลซิส (Autolysis) เนื้อเยื่อก่อน (4,14-17) และจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า เนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสจะปลดปล่อยเฮปารินออกมาสูงกว่าเนื้อเยื่อปอดที่ไม่ผ่านการออโตไลซิส (แสดงผลการทดลองในภาคผนวก ฌ) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการออโตไลซิสทำให้เซลล์แตกออก เฮปารินซึ่งอยู่ในรูปโปรติโอไกลแคนจึงถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ ดังนั้นการสกัดเฮปารินในการวิจัยนี้จึงทำการออโตไลซิสเนื้อเยื่อก่อนกระทำขั้นตอนอื่นต่อไป

เนื่องจากในขั้นตอนการออโตไลซิสเนื้อเยื่อมีการเติมโทลูอีนลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อและขั้นตอนของการสกัดเฮปารินจำเป็นต้องมีการย่อยสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินออกด้วยการใช้โปรติเอส (14-16,20-21) จึงทำการศึกษาถึงผลกระทบของโทลูอีนที่อาจมีต่อการทำงานของโปรติเอส

ผลของการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส เมื่อมีการเติมโทลูอีนในปริมาณต่างๆ ลงไปในปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนแคซีน แสดงดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ผลของโทลูอีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทิน

กลุ่มที่	ความเข้มข้นของโทลูอีนในสารละลายเคซีน1%(w/v) (%v/v)	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ Casein Digestion Unit (CDU)
1	-	825.81
2	1	821.51
3	2	411.83

ตารางที่ 3.2 ผลของโทลูอีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส

กลุ่มที่	ความเข้มข้นของโทลูอีนในสารละลายเคซีน 1%(w/v) (%v/v)	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ Casein Digestion Unit (CDU)
1	-	415.59
2	1	414.52
3	2	237.10

จากตารางที่ 3.1 และ 3.2 จะเห็นว่า กลุ่มที่มีการเติมโทลูอีนความเข้มข้น 1%(v/v) มีค่าแอคติวิตีใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่มีการเติมโทลูอีน แสดงว่าโทลูอีนที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลยับยั้งการทำงานของทั้งเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส แต่ที่ความเข้มข้นของโทลูอีนเป็น 2% (v/v) พบว่า แอคติวิตีการทำงานของทั้งเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรสจะลดลงประมาณ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ทำงานในสภาวะที่ไม่มีการเติมโทลูอีน

เนื่องจากในกระบวนการผลิตเฮปารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกรนั้น ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกใช้เนื้อเยื่อ 1,250 กรัม ปริมาตรทั้งหมดของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ 1,600 มล. และเติมโทลูอีน 12.5 มล. โดยการออโตไลซิสใช้การเติมโทลูอีนจนมีความเข้มข้นเพียง 0.78% ของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ ซึ่งปริมาณโทลูอีนที่เติมไปนี้ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์นั้นลดลง

3.2 ผลของนิวเทรสในการปลดปล่อยเฮปารินจากเนื้อเยื่อ เมื่อเปรียบเทียบการย่อยในรูปเนื้อเยื่อแขวนลอย ส่วนน้ำใสจากการออโตไลซิส และกากเนื้อเยื่อ

หลังจากผ่านการออโตไลซิสแล้ว เฮปารินซึ่งอยู่ในรูปของโปรติโอไกลแคนควรจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ที่แตกออก ในที่นี้การแยกเฮปารินให้บริสุทธิ์จึงเริ่มต้นโดยการย่อยโปรตีนออกด้วยโปรติเอส การเปรียบเทียบปริมาณเฮปารินที่ได้จากการใช้สารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสมา ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โดยตรงเทียบกับการกรองเอาเฉพาะส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์นิวเทรสเช่นเดียวกัน พบว่าวิธีการเติมเอนไซม์ ลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อมีปริมาณเฮปารินปลดปล่อยออกมามากกว่าการเติมเอนไซม์ลงในส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21200185

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ สารละลายใสจากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ และกากเนื้อเยื่อที่กรองเอาสารละลายใสออกไป

กลุ่มที่	สารที่นำมาทำ การย่อย	ความเข้มข้นของเฮปาริน (มก./มล.)	%ของเฮปารินคิดเทียบกับปริมาณเฮปารินสูงสุดที่ปลดปล่อยจากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม
1	สารแขวนลอยเนื้อเยื่อ	1.143±.012	100.0
2	ส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ	0.622±.005	54.4
3	ส่วนกากเนื้อเยื่อที่กรองเอาสารละลายใสออกไป	0.439±.002	38.4

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.3 จะเห็นได้ว่า การเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่ได้ปริมาณเฮปารินสูงสุดคือ 1.143 มก./มล. จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อปริมาณ 0.5 กรัม โดยที่วิธีการเติมเอนไซม์ลงในเฉพาะส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยนั้น จะให้ปริมาณเฮปาริน 0.622 มก. เท่านั้น เนื่องจากเฮปารินยังคงอยู่ในรูปของโปรติโอไกลแคนในส่วนของกากเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเห็นได้จากเมื่อนำเฉพาะส่วนของกากเนื้อเยื่อมาย่อยด้วยเอนไซม์มีเฮปารินถูกปลดปล่อยออกมาปริมาณ 0.439 มก. แสดงว่าการออโตไลซิสเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถทำให้เฮปารินถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายได้ทั้งหมด การเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อโดยตรง จะทำให้ได้เฮปาริน (ที่ไม่มีส่วนของโปรตีนเกาะอยู่) ออกมาสู่สารละลายในปริมาณสูงสุด

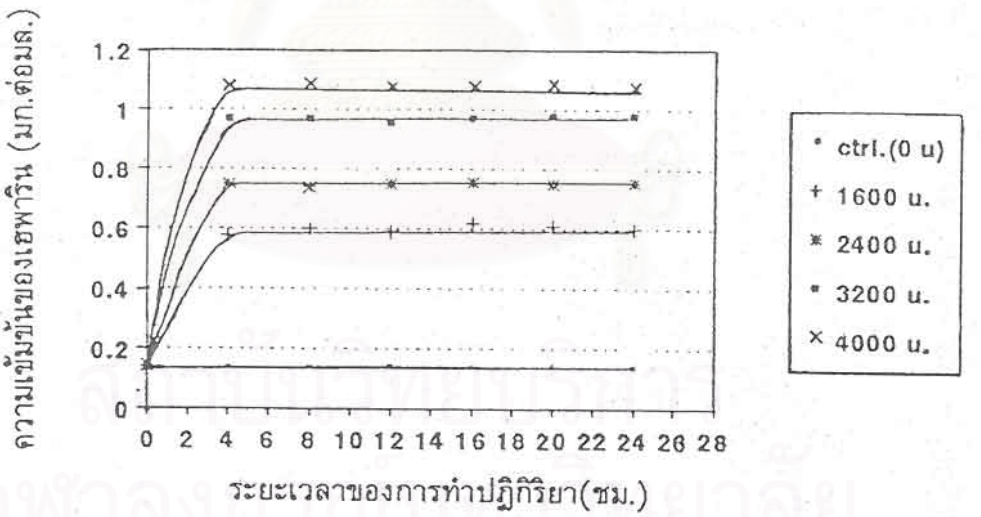
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การศึกษาหาความเข้มข้นของโปรติเอสที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการย่อยด้วยโปรติเอส

เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในขั้นตอนการย่อยโปรตีนที่เกาะกับเฮปาริน การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่จะใช้และระยะเวลาของปฏิกิริยาการย่อยจึงมีความสำคัญ ในที่นี้เอนไซม์ที่เลือกใช้ คือ เอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส เนื่องจากโปรติเอสทั้งสองชนิดนี้มีสภาวะการทำงานในช่วง pH ที่เป็นกลาง ซึ่งจะไม่มีผลต่อโครงสร้างของเฮปาริน นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสองชนิดยังหาซื้อได้ง่ายในประเทศ

3.3.1 การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แพนครีเอทิน

จากการแปรระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง 0 ถึง 24 ชั่วโมง กับแพนครีเอทินปริมาณตั้งแต่ 0 หน่วย ถึง 4,000 หน่วย พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง ให้การปลดปล่อยเฮปารินสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 4 ชั่วโมง

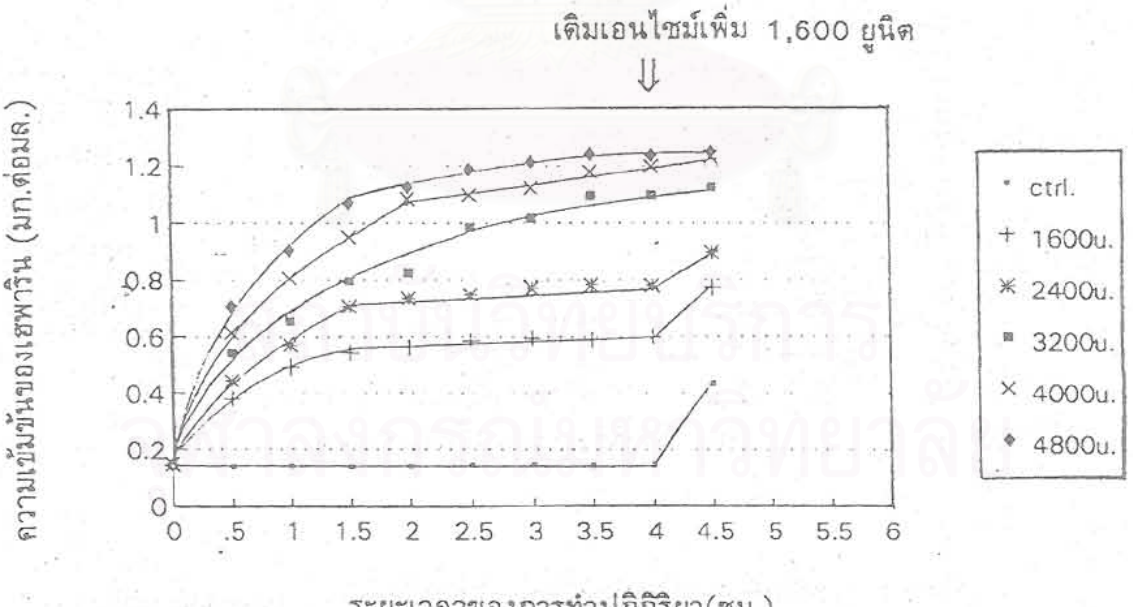


รูปที่ 3.1 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่างๆ ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินต่างๆ

3.3.2 การหาความเข้มข้นของแพนครีเอทินที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์แพนครีเอทิน (Pancreatin)

การทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแพนครีเอทินในการย่อยสลายเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม โดยแปรเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 หน่วย ถึง 4,800 หน่วย และบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ที่ปริมาณ 4,000 หน่วย (2.5 มก.เอนไซม์) ต่อเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม เพียงพอในการทำปฏิกิริยา จากรูปที่ 3.2 จะเห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสปริมาณ 0.5 กรัม ที่ใช้เอนไซม์แพนครีเอทินที่ความเข้มข้น 4,000 หน่วย (2.5 มก.เอนไซม์) เพียงพอในการทำปฏิกิริยา (จะเห็นได้ว่าผลการทดลองไม่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 4,800 หน่วย มากนัก) และเนื่องจากความเข้มข้นของเฮปารินไม่เพิ่มขึ้นอีกมากนักหลังจากเติมเอนไซม์เพิ่มอีก 1,600 หน่วย แสดงว่าเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อเพื่อให้เฮปารินถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลายสมบูรณ์แล้ว

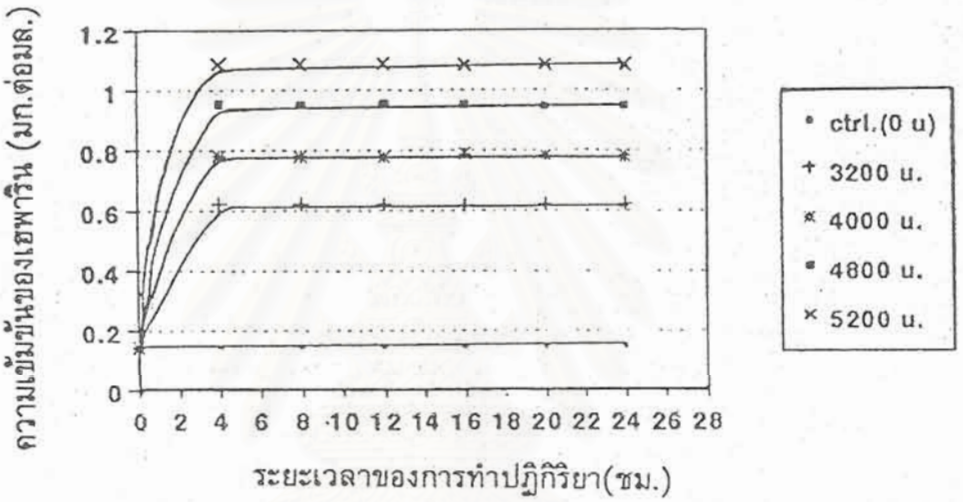
เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา พบว่า ความเข้มข้นของเฮปาริน จะคงที่ (ไม่เพิ่มขึ้น) เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป 3 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลา 3 ชั่วโมงจึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด สำหรับขั้นตอนของปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโต-ไลซิส โดยเอนไซม์แพนครีเอทิน



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ (เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง) ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่เวลา 4 ชั่วโมง เติมเอนไซม์ 1,600 หน่วย

3.3.3 การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรส

จากการแปรระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง 0 หน่วย ถึง 5,200 หน่วย ต่อเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง ให้การปลดปล่อยเฮปารินสูงสุดเท่ากับ 0.147 0.625 0.782 0.956 และ 1.09 มก. ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0 3,200 4,000 4,800 และ 5,200 หน่วย ต่อเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม ดังนั้นในการ ทดลองต่อไปจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 4 ชั่วโมง

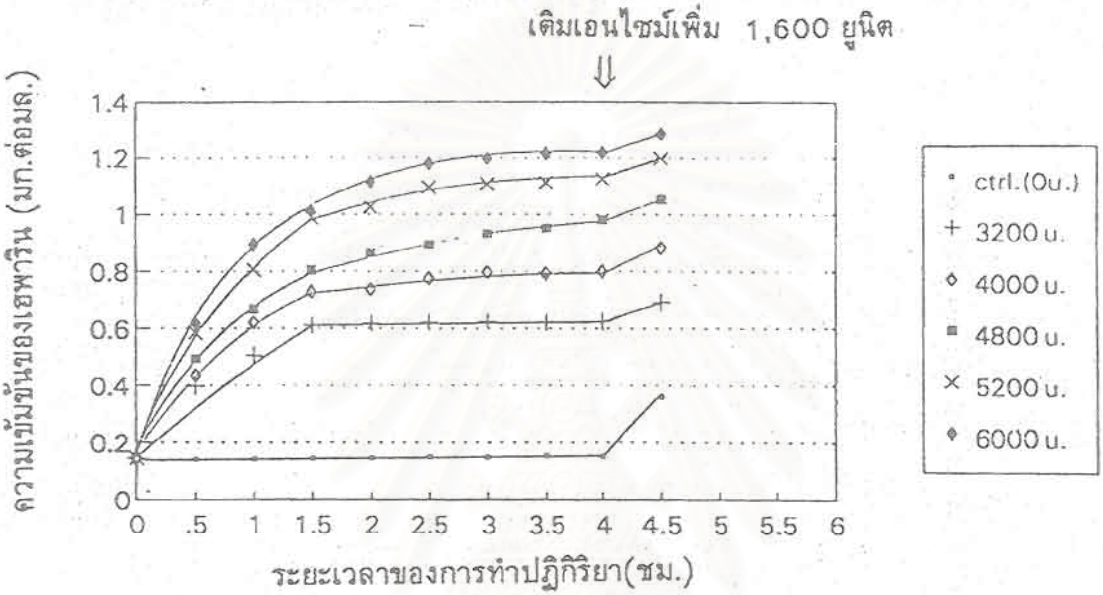


รูปที่ 3.3 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่างๆ ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสต่างๆ

3.3.4 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อย

การทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์นิวเทรส ในการย่อยสลายเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม โดยแปรเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 หน่วย ถึง 6,000 หน่วย ต่อเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม และบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้น 5,200 หน่วย ต่อเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม เพียงพอในการทำปฏิกิริยา จากรูปที่ 3.4 จะเห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสปริมาณ 0.5 กรัม ที่ใช้นิวเทรสที่ความเข้มข้น 5,200 หน่วย

ต่อเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม ก็เพียงพอในการ ทำปฏิกิริยา (จะเห็นได้ว่าผลการทดลองไม่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 6,000 หน่วย มากนัก) และเนื่องจากความเข้มข้นของเฮปารินไม่เพิ่มขึ้นอีกมากนักหลังจากเติมเอนไซม์เพิ่มอีก 1,600 หน่วย แสดงว่าเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อเพื่อให้เฮปารินถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสายละลายสมบูรณ์แล้ว



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปาริน โดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ (เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง) ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่เวลา 4 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เพิ่ม 1,600 หน่วย

เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา พบว่า ความเข้มข้นของเฮปารินจะคงที่เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป 3 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับขั้นตอนของปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสโดยเอนไซม์นิวเทรส

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2 และ 3.3.4 เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเฮปารินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด คือ แพนครีเอทินและนิวเทรส พบว่าเฮปารินที่ได้จากทั้ง 2 ปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยก็คล้ายคลึงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบในแง่ของต้นทุนการใช้เอนไซม์ย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ

ปอดที่ผ่านการออโตไลซิสปริมาณ 1 กิโลกรัม ต้องใช้เอนไซม์แพนครีเอทิน 5.0 กรัม คิดเป็นเงิน 18.75 บาท (ราคาเอนไซม์แพนครีเอทิน 3.75 บาทต่อเอนไซม์ 1 กรัม) และถ้าใช้เอนไซม์นิวเทรส ต้องใช้ 13.0 กรัม คิดเป็นเงิน 8.45 บาท (ราคาเอนไซม์นิวเทรส 0.65 บาทต่อเอนไซม์ 1 กรัม) พบว่า การเลือกใช้เอนไซม์นิวเทรสจะใช้ต้นทุนต่ำกว่าการใช้เอนไซม์แพนครีเอทิน ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์นิวเทรสในขั้นตอนการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินออกสำหรับการสกัดเฮปารินในงานวิจัยนี้

3.4 การแยกเฮปารินที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์ โดยการกรองร่วมกับวิธีอัลทราฟิลเทรชัน

เนื่องจากในสารละลายหลังการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ นอกจากเฮปารินแล้ว ยังมีสารประกอบอื่นๆ ปนอยู่ด้วยจึงต้องมีการแยกเฮปารินให้บริสุทธิ์ โดยในขั้นแรกได้ทำการตกตะกอนแยกโปรตีนออกด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปแยกสารปนเปื้อนด้วยวิธีอัลทราฟิลเทรชั่นผ่านเมมเบรนที่มี MW.cut off 3,000 เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตัน ออก จากนั้นนำส่วนของสารละลายที่มีสารน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 3,000 ดาลตัน ไปตกตะกอนด้วยเอธานอลเพื่อตกตะกอนแยกเฮปารินออกจากสารละลาย นำสารที่ได้ในส่วนต่างๆ ของแต่ละขั้นตอนการแยกเฮปารินไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮปารินและแอคติวิตีของเฮปาริน โดยการทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor Xa assay) ผลแสดงดังตารางที่ 3.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการทำเฮปารินให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนและวิธีอัลทราฟิลเทรชัน

สาร	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอคติวิตีของเฮปาริน (ยูนิต/มล.)	ความเข้มข้นของเฮปาริน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก. เฮปาริน)	ปริมาณเฮปารินทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
สารละลายหลังย่อยที่กำจัดโปรตีนด้วย TCA	200	0.037	3.32	0.011	664	7.40
สารส่วนที่มี MW. < 3,000	158	0.010	1.102	0.009	174.12	1.58
สารส่วนที่มี MW. > 3,000	39	0.133	7.936	0.017	309.51	5.19
ตะกอนที่ 50% เอธานอล (ก)	165	0.337	0.063	5.35	10.39	55.61
ตะกอนที่ 83% เอธานอล (ข)	78	0.521	0.138	3.78	10.76	40.64
ตะกอนที่ 90% เอธานอล (ค)	330	1.540	0.077	20.00	25.41	508.20

จากตารางข้างบนนี้จะเห็นว่า ตะกอน ค. มีแอคติวิตีสูงสุด อย่างไรก็ตามแอคติวิตีรวมของตะกอน ก ข และ ค มากกว่าแอคติวิตีของส่วนที่มี MW > 3,000 สมมติฐานที่เป็นไปได้คือในส่วนที่มี MW > 3,000 นั้น มีสารปนเปื้อนอื่นๆ อีก ซึ่งอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของกระบวนการทดลองแอคติวิตีได้ และสารละลายส่วนที่มี MW > 3,000 ที่นำมาทดสอบแอคติวิตีนั้น ก็มีฤทธิ์เป็นกรด (เติม TCA เพื่อกำจัดโปรตีน) ด้วย

3.5 การแยกเฮปารินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (HPLC) ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี

Schmidt (22) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำและในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.01 โมลาร์ สามารถแยกเฮปารินออกจากสารละลายที่มีสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนอื่นๆ อยู่ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีของ Schmidt เป็นต้นแบบทำการแยกเฮปารินที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนเฮปารินด้วยสารละลายเอธานอลความเข้มข้นสุทธิ 90 %(v/v) โดยวิธี Anion Exchange Chromatography ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี โดยทำการทดลองดังแสดงรายละเอียดไว้ในหัวข้อ 2.4.4

จากการตรวจสอบพบว่า มีกรดยูโรนิคในส่วนของสารละลายที่ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาณ 5.5 กรัม สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก (0.01โมลาร์) ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ ปริมาณ 19.56 กรัม สารละลายโซเดียม-คลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก (0.01โมลาร์) ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นปริมาณ 17.08 กรัม และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก (0.01โมลาร์) ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นปริมาณ 23.5 กรัม จึงนำสารละลายในแต่ละส่วนที่พบว่ามีกรดยูโรนิคไปกำจัดเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (Dialysis : ถุงไดอะไลซิสมีรูพรุนขนาด 2,000 ดาลตัน)

เมื่อนำสารละลายในแต่ละส่วนหลังจากกำจัดเกลือออกแล้วไปทำให้แห้งโดยการ lyophilize และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดยูโรนิค ด้วยวิธีคาร์บาโซล (Carbazole method) และหาแอคติวิตีของไกลโคอะมิโนไกลแคนที่ได้ในแต่ละแฟรกชันโดยทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor X_a assay) ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณของเฮปารินและแอคติวิตีของสารส่วนต่างๆ

สารที่ได้จากการชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอคติวิตีของเฮปาริน[1] (ยูนิต/มล.)	ความเข้มข้น[2] ของไกลโคอะมิโนไกลแคน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.)	ปริมาณไกลโคอะมิโนไกลแคนทั้งหมด(มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
สารที่ผ่านเข้าคอลัมน์	1.0	1.54	0.077	20.00	0.077	1.54
0.5 M NaCl in H_2O	10	0	0.550	0	5.50	0
1.25 M NaCl in 0.01 HCl	20	2.48	0.978	2.536	19.56	49.60
1.50 M NaCl in 0.01 HCl	20	3.85	0.854	4.508	17.08	77.00
2.0 M NaCl in 0.01 HCl (Z)	100	16.25	0.235	69.150	23.50	1625.03

1. วิเคราะห์โดยวิธีทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ(Anti Factor Xa assay)

2. วิเคราะห์โดยวิธี uronic assay

หมายเหตุ จากการหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อ (หัวข้อ 2.4.8.1) ปริมาณ 5 กรัม คิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.70 กรัม และจากการหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอดหลังออโตไลซิส (หัวข้อ 2.4.8.2) ปริมาณ 5 กรัม คิดเป็นน้ำหนักเท่ากับ 1.723 กรัม

จากตารางที่ 3.5 สารส่วนที่ชะจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 2.0 M NaCl in 0.01 HCl เป็นสารที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด อย่างไรก็ตามเฮปารินมาตรฐานที่มีขายในท้องตลาดจะมีค่าในช่วง 140-200 ยูนิตต่อ มก. จากการทดสอบหาค่าแอคติวิตีด้วยชุดทดสอบที่ใช้พบว่า หากมีเกลือแม้เพียงเล็กน้อย ก็จะทำให้แอคติวิตีลดลงมาก ซึ่งคาดว่าอาจเนื่องมาจากเกลือไปส่งผลต่อการจับเฮปารินกับโปรตีนในชุดทดสอบ ดังนั้นจึงได้นำสารส่วนดังกล่าวไปกำจัดเกลือออกอีกครั้ง โดยการทำไดอะไลซิสซ้ำ แล้วนำสารส่วนที่เหลือไปทำให้แห้ง โดยการ lyophilize พบว่าสารส่วนสกัดที่เหลือหลังจากไดอะไลซิสครั้งนี้ ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นจากเดิม 69.15 เป็น 143.21 ยูนิต/มก. เฮปาริน ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay และค่าแอคติวิตีของเฮปาริน ที่สกัดได้

สาร	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอคติวิตี[1] ของเฮปาริน (ยูนิต./มล.)	ความเข้มข้น[2] ของเฮปาริน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก. เฮปาริน)	ปริมาณเฮปารินทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
Z	100	16.25	0.235	69.150	23.50	1625.03
Z*	30	78.48	0.548	143.210	9.10	1303.21

1. วิเคราะห์โดยวิธีทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ(Anti Factor Xa assay)

2. วิเคราะห์โดยวิธี uronic assay

หมายเหตุ Z คือ สารลำดับส่วนที่ชะจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วย1.5-2.0 M NaCl in 0.01 HCl

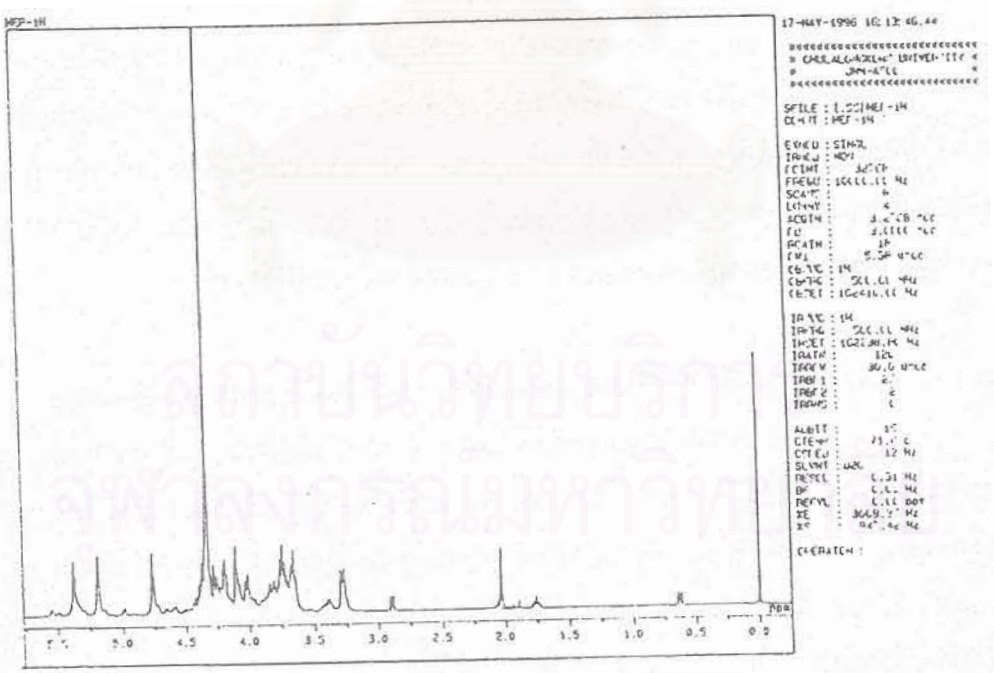
Z* คือ สาร Z ส่วนที่เหลือหลังจากไคอะไลซิสซ้ำอีกครั้ง

จากตารางที่ 3.6 ปริมาณสารเฮปารินที่สกัดได้ (สาร (Z*)) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 143.21 ยูนิตต่อมก.เฮปาริน ปริมาณเฮปารินที่สกัดได้ทั้งหมด 9.10 มก. จากการย่อยเนื้อเยื่อ 500 กรัม (น้ำหนักเปียก) คิดเป็นต่อ กก.เนื้อเยื่อ เมื่อทำการสกัดเฮปารินตามวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่าสามารถสกัดเฮปารินได้ปริมาณ 18.20 มก.ต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก. มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 143.21 ยูนิตต่อ มก. ซึ่งเทียบเท่ากับแอคติวิตีทั้งหมด 2,606.42 ยูนิตต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก.

3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮปารินที่สกัดได้ด้วยวิธี NMR Spectroscopy

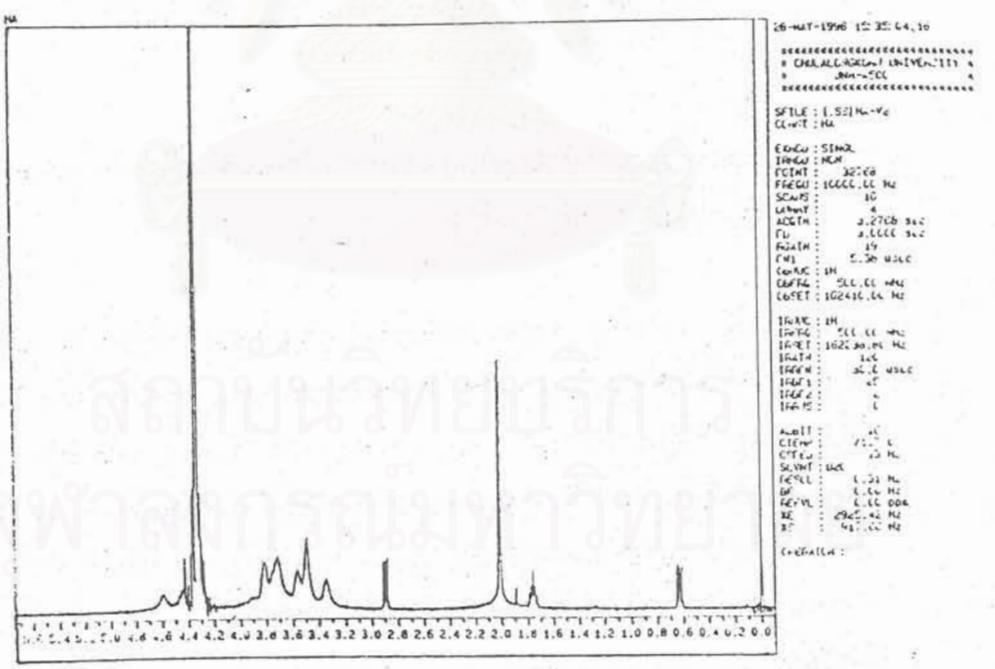
นำสารส่วนที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนลำดับส่วน ด้วยสารละลายเอธานอลในที่ความเข้มข้นสุทธิเป็น 50 83 90 % และสารเฮปารินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งใช้คอลัมน์ PA-DEAE ส่วนที่ชะคอลัมน์ด้วย 1.25 M NaCl in 0.01 M HCl 1.50 M NaCl in 0.01 M HCl และ 2.0 M NaCl in 0.01 M HCl มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮปารินด้วยวิธี NMR Spectroscopy ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก และสามารถตรวจสอบได้ว่ามีไกลโคอะมิโนไกลแคนตัวอื่นๆ ปนมาหรือไม่ และมีปริมาณเท่าใด (33) โดยพิจารณาจากสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏในตำแหน่งต่างๆ กันของไกลโคอะมิโนไกลแคนแต่ละชนิด ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีต่างกัน

การวิจัยนี้ได้นำสารเฮปารินมาตรฐานและสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนต่างๆ คือ ไฮยาลูโรนิคแอซิด เดอร์มาแตนซัลเฟต และคอนดรอยตินซัลเฟต ไปวิเคราะห์เพื่อให้ได้ NMR สเปกตรัมมาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบกับสารที่สกัดได้ ผลการวิเคราะห์สารเฮปารินมาตรฐาน (ของบริษัท Sigma) แสดงดังรูปที่ 3.5

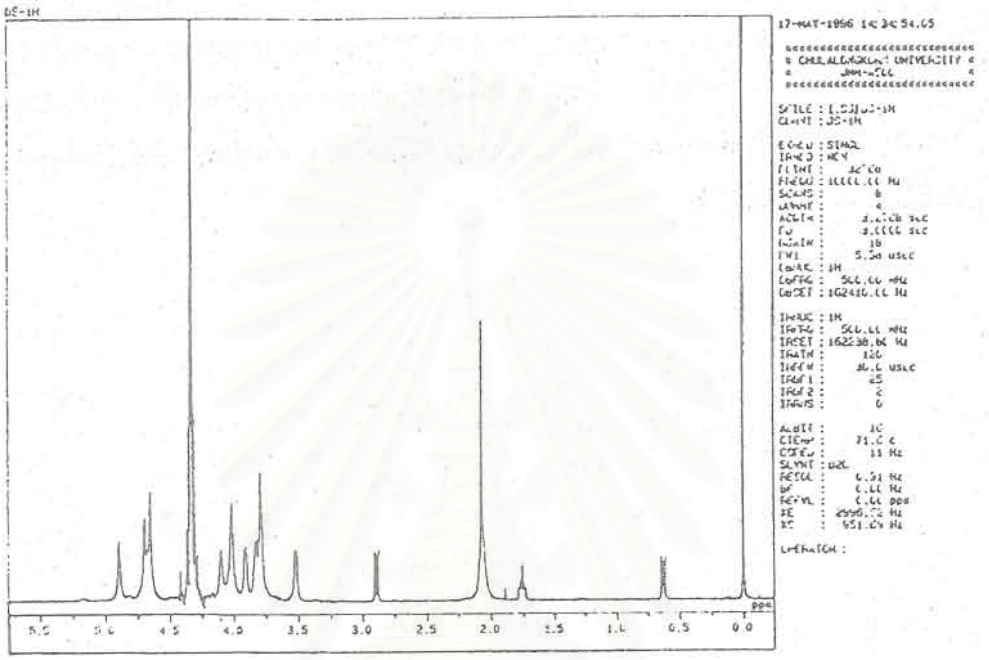


<u>รูปที่ 3.5</u> แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเฮปารินมาตรฐาน (ของบริษัท Sigma) ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 3.5 จะเห็นว่า สเปกตรัมของเฮปารินที่ได้จากการวิเคราะห์ ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ดังนี้คือ หมู่ N-acetyl hexosamine ที่ตำแหน่ง 2.07 หมู่ L-iduronic acid ที่ตำแหน่ง 4.8 และ 5.2 และหมู่ N-sulfate glucosamine ที่ตำแหน่ง 5.4 ซึ่งตำแหน่งสัญญาณต่างๆ ดังกล่าวนี้ สามารถใช้บ่งความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของสารไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่างๆ ได้และสามารถใช้ยืนยันว่า สารที่เตรียมได้มีโครงสร้างเป็นไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดใด



<u>รูปที่3.6</u> แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิด ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

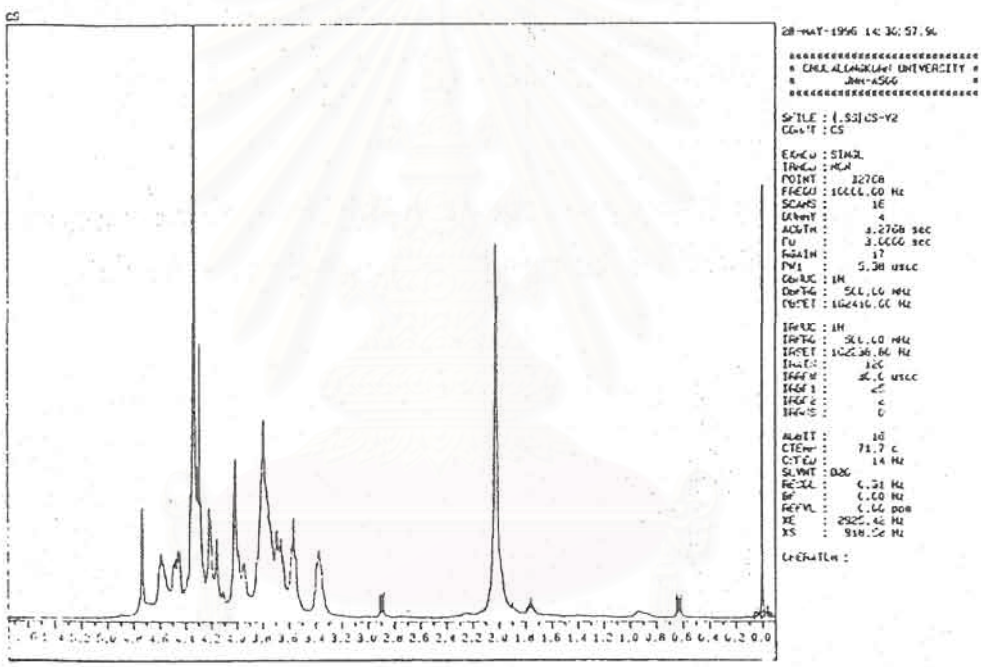


รูปที่ 3.7 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเดอร์มาแตนซัลเฟต ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

รูปที่ 3.6 แสดง NMR สเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิด เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิดกับของเฮปาริน (รูป 3.5) จะเห็นได้ว่าไฮยาลูโรนิคไม่ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 4.8 5.2 และ 5.4 ซึ่งก็สอดคล้องกับการที่โครงสร้างของไฮยาลูโรนิคแอซิดไม่มีหมู่ L-iduronic acid และ N-acetyl glucosamine สำหรับ NMR สเปกตรัมของสารเดอร์มาแตนซัลเฟต (รูป 3.7) นั้นจะเห็นว่าให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 4.8 (L-iduronic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างทางเคมีของเดอร์มาแตนซัลเฟตเช่นกัน) แต่ไม่ให้สัญญาณเรโซ-แนนซ์ที่ตำแหน่ง 5.2 และ 5.4 (ไม่มีหมู่ N-acetyl glucosamine)

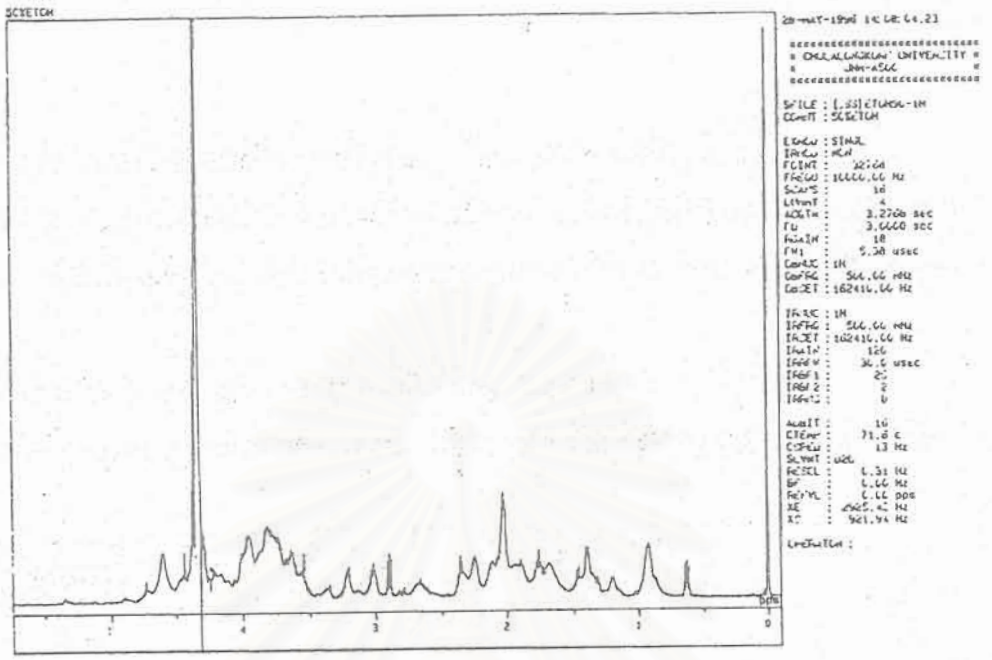
นอกจากนี้ตำแหน่งของสัญญาณเรโซแนนซ์ที่บอกความแตกต่างระหว่างเฮปารินและเดอร์มาแตนซัลเฟตได้ดีอีกตำแหน่งหนึ่ง คือ ที่ตำแหน่ง 2.10 (N-acetyl galactosamine ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างทางเคมีของเดอร์มาแตนซัลเฟตที่แตกต่างจากเฮปาริน)

รูปที่ 3.8 แสดง NMR สเปกตรัมของสารคอนดรอยตินซัลเฟตจะคล้ายคลึงกับสารเดอร์มาแตนซัลเฟต แตกต่างที่ไม่ให้สัญญาณที่ตำแหน่ง 4.8 (ไม่มีหมู่ L-iduronic acid)

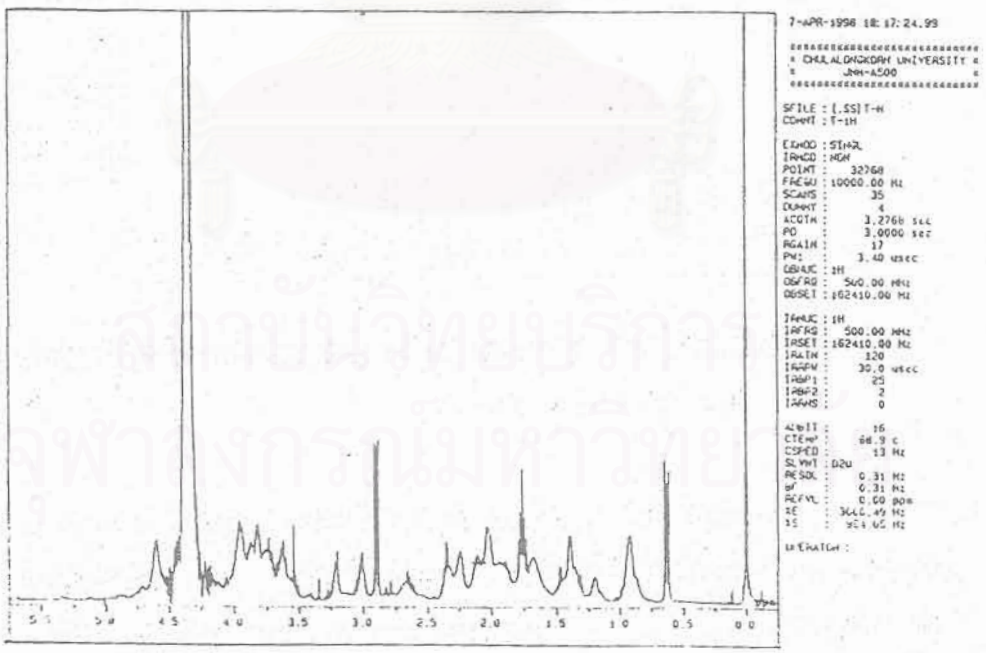


<u>รูปที่ 3.8</u> แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารคอนดรอยตินซัลเฟต ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

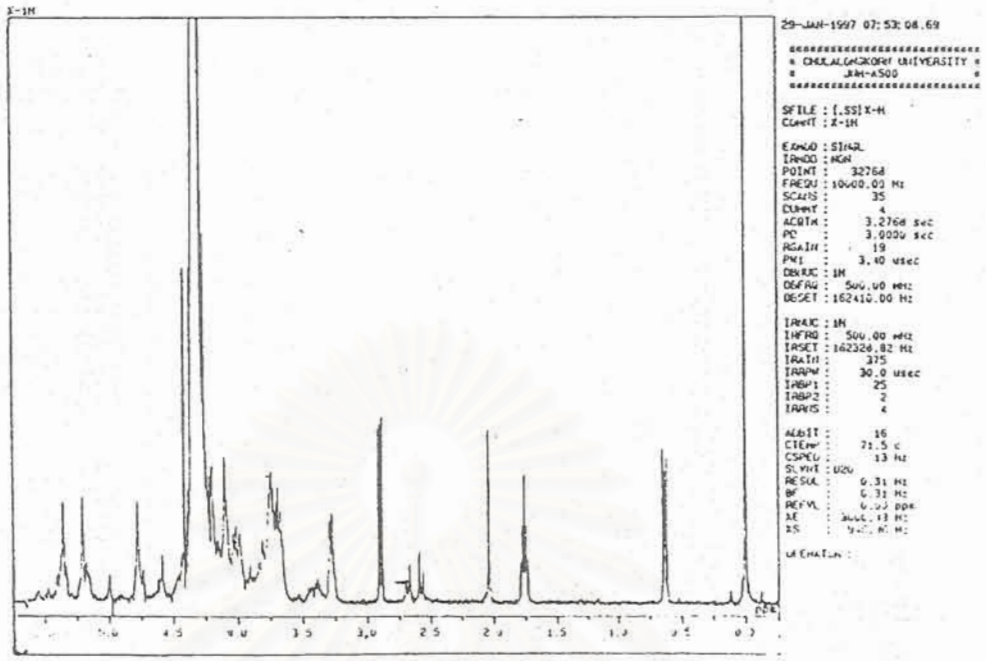
เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 3.5 ถึง 3.8 ข้างต้น จะเห็นว่า NMR สเปกตรัมของสารไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่างๆ มีความแตกต่างกัน และสามารถใช้ชี้เฉพาะว่าเป็นไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดใดได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำสารที่เตรียมได้ในขั้นตอนต่างๆ ไปวิเคราะห์หา NMR สเปกตรัม แล้วนำไปเปรียบเทียบกับ NMR สเปกตรัมของเฮปารินมาตรฐานและสารไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทอื่นๆ NMR สเปกตรัมของสารที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอนแสดงไว้ในรูปที่ 3.9 ถึง 3.14



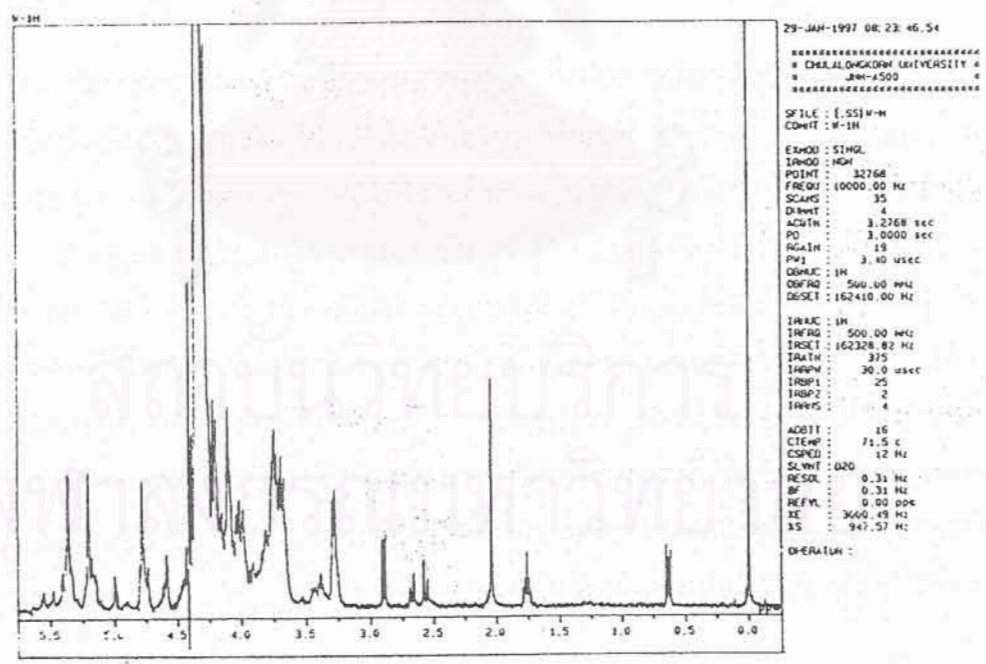
รูปที่ 3.9 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอล เข้มข้น 50% ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



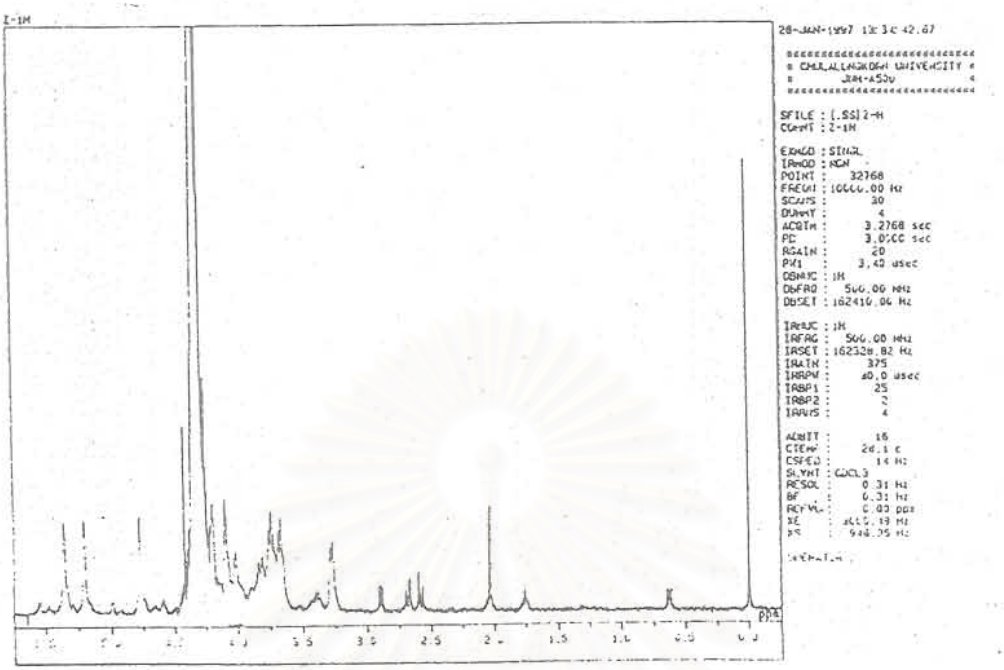
รูปที่ 3.10 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอล เข้มข้น 83% ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.11 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.25 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.12 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.50 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 MHz ใน D_2O อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

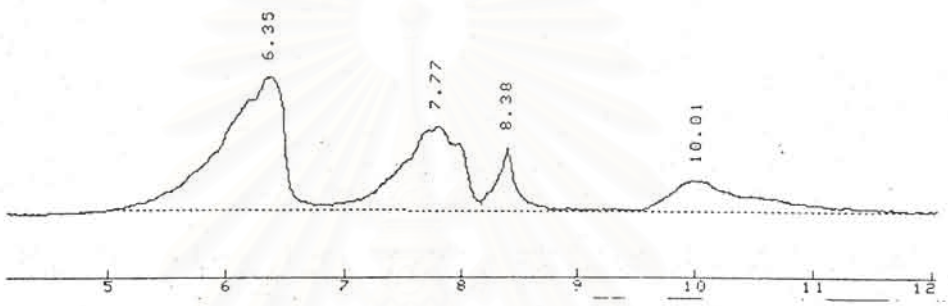


รูปที่ 3.13 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณา NMR สเปกตรัมของสารที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นกับสเปกตรัมของเฮปารินมาตรฐาน ไฮยาลูกโรนิคแอซิด เดอร์มาแตนซัลเฟต และคอนดรอยตินซัลเฟต จะเห็นว่ารูปแบบของสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏของสารที่ได้จากการชะจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.25 M ใน HCl 0.01 M 1.50 M ใน HCl 0.01 M และ 2.0 M ใน HCl 0.01 M (รูปที่ 3.11-3.13) มีรูปแบบสเปกตรัมคล้ายคลึงกับของเฮปารินมาตรฐาน (รูปที่ 3.5) มากที่สุด ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงเป็นหลักฐานยืนยันได้ว่า สารที่ได้จากขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์ไอออนเอกซ์เชนจ์ PA-DEAE ทั้งสามส่วนมีโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับเฮปารินมาตรฐาน อย่างไรก็ตามคาดว่าจะมีความแตกต่างในด้านน้ำหนักโมเลกุลในสารทั้งสามส่วนนี้ ซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วพบว่า ส่วนที่ให้ค่าต้านการแข็งตัวของเลือดมากที่สุดคือ ส่วนที่ชะด้วย 2.0 M NaCl ใน HCl 0.01 M

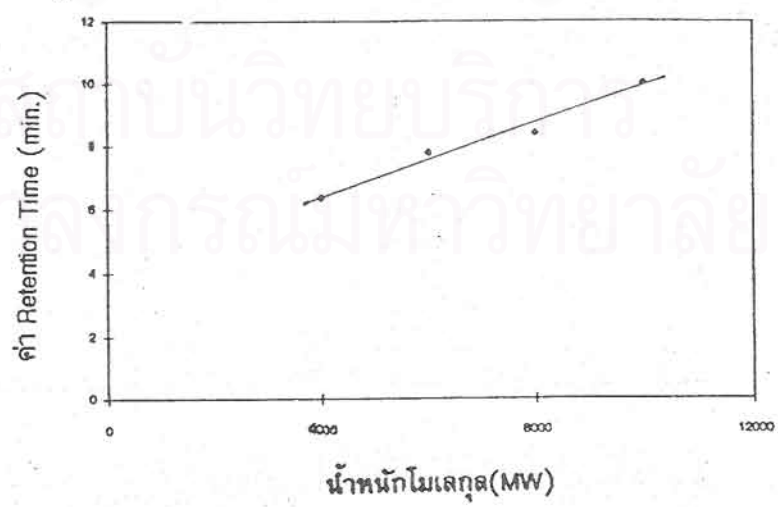
3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเฮปารินที่สกัดได้ด้วยคอลัมน์ Ultrahydrogel 250

จากการนำสารมาตรฐานแต่ละชนิด คือ PEG 4,000 PEG 6,000 Dextran 8,000 และ Dextran 10,000 และจากการนำสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ผสมรวมกัน (อัตราส่วน 1:1:1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Ultrahydrogel 250 (ของบริษัท Water Corporation, Massachusetts USA.) จากนั้นชะด้วยน้ำบริสุทธิ์ ผลการทดลองได้โครมาโตรแกรมดังรูปที่ 3.14 ซึ่งจะเห็นค่ารีเทนชันไทม์ (Retention Time) สารแต่ละชนิดที่ออกมาที่เวลาต่างกัน



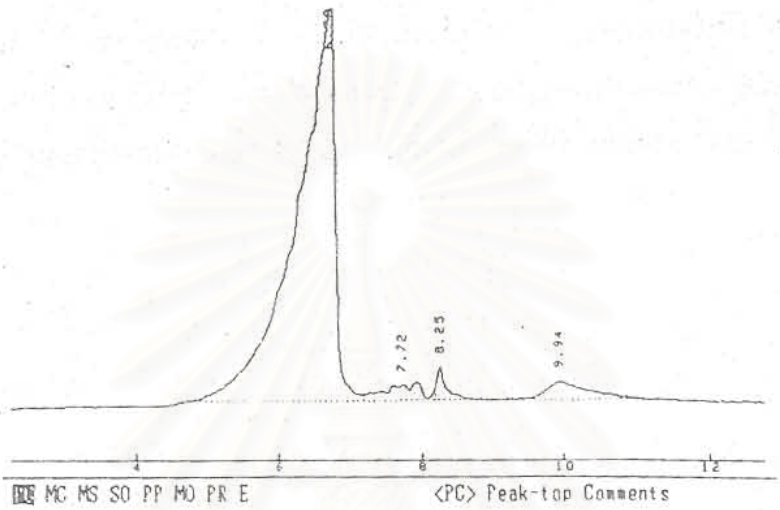
รูปที่ 3.14 แสดงการแยกของสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ PEG 4,000 (A) PEG 6,000 (B) Dextran 8,000 (C) และ Dextran 10,000 (D) ที่เวลาต่างๆ กัน

เมื่อนำค่า Retention Time ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดที่ผสมทั้งสี่สาร (จากรูป 3.14) มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสารกับค่า Retention Time จะได้กราฟดังรูปที่ 3.15



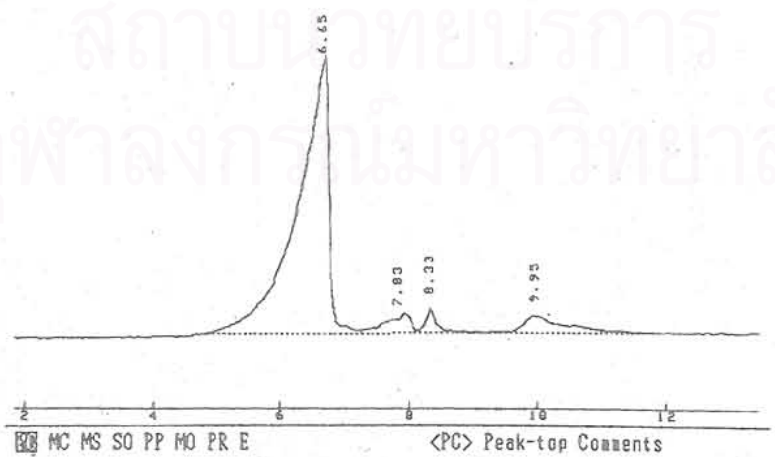
รูปที่3.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสารกับค่า Retention Time

ผลการนำเฮปารินที่เตรียมได้ (สารส่วนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ PA-DEAE ในขั้นตอนการที่ชะสารด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก (0.01 โมลาร์) เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ซึ่งเป็นส่วนสกัดที่ให้แอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด) ผสมรวมกับสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด และนำไปผ่านคอลัมน์อัลทราไฮโดรเจล 250 ได้ผลโครมาโตรแกรม ดังแสดงในรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 แสดงค่า Retention Time ของสารเฮปารินที่สกัดได้และสารมาตรฐาน 4 ชนิด

จากรูปที่ 3.16 จะเห็นว่าเฮปารินที่สกัดได้ถูกชะออกมาที่เวลา 6.70 นาที เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ 3.15 พบว่าเฮปารินที่สกัดได้นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,500 ดาลตัน เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยใช้เฮปารินมาตรฐานของบริษัท Sigma ได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 3.17 ซึ่งจะเห็นว่าค่า Retention Time ของเฮปารินมาตรฐานอยู่ที่ 6.65 นาที ซึ่งใกล้เคียงมากกับเฮปารินที่สกัดได้จากการวิจัยนี้ อนึ่งการที่ผสมสารมาตรฐานทั้งสี่ลงไปในการวิเคราะห์เฮปารินด้วย ก็เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการคลาดเคลื่อนของค่า Retention Time ของสารทั้งสี่



รูปที่ 3.17 แสดงการแยกสารเฮปารินมาตรฐานที่ผสมรวมกับสารมาตรฐาน 4 ชนิด

3.8 วิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยเครื่อง Elemental analyzer (NA 2000)

การวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยยืนยันว่า สารที่สกัดได้นั้นเป็นเฮปาริน โดยอาศัยการเปรียบเทียบอัตราส่วน N/C/H/S ระหว่างสารที่สกัดได้กับเฮปารินมาตรฐาน

ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยเครื่อง Elemental analyzer (NA 2000)

สาร	%N	%C	%H	%S
HEP (Sigma)	5.35	55.72	11.04	27.90
HEP (Leo)	5.00	48.52	9.98	36.50
HA	6.96	78.71	14.33	0
T(F. 50 EtOH)	21.45	67.83	10.72	0
U(F. 83 EtOH)	21.34	67.68	10.98	0
S(F. 90 EtOH)	11.70	63.00	10.73	14.57
X(F. 1.25 M)	4.66	50.12	8.76	36.46
W(F. 1.5 M)	4.86	50.50	7.77	36.87
Z(F. 2.0 M)	4.63	48.86	9.31	37.20

หมายเหตุ HEP(Sigma) = สารเฮปารินมาตรฐานของบริษัท Sigma

HEP(Leo) = สารเฮปารินมาตรฐานของบริษัท Leo

HA = ไฮยาลูโรนิคแอซิดมาตรฐานของบริษัท Sigma

T = สารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 50%

U = สารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 83%

S = สารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 90%

X = สารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ที่ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.25 M ใน HCl 0.01 M

W = สารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ที่ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.50 M ใน HCl 0.01 M

Z = สารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ที่ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ใน HCl 0.01 M

จากผลการวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000) จะเห็นว่าเฮปารินมาตรฐานของบริษัท Sigma และ Leo มีปริมาณ S 27.9% และ 36.5% ตามลำดับ ส่วนสารเฮปารินที่เตรียมได้ (Z) มีปริมาณ S 37.2% ซึ่งใกล้เคียงกับเฮปารินมาตรฐานและหากพิจารณาอัตราส่วนของ N/C/H/S ระหว่างสาร Z และเฮปารินมาตรฐานจากทั้ง 2 บริษัทแล้ว จะพบว่ามีอัตราส่วนใกล้เคียงกันด้วย ผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Jaques ในปี ค.ศ. 1980 (34) โดยได้ทำการวิเคราะห์เฮปารินที่ผลิตขายทั่วไปในท้องตลาดที่มีวิธีการเตรียมเหมือนกัน และแตกต่างกันในช่วงปี ค.ศ. 1940-1972 ซึ่งพบว่า เฮปารินจะมีปริมาณ S เป็นองค์ประกอบ 19.0%-38.7% โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ธาตุนี้ยังสอดคล้องกับค่าปริมาณ S ที่แสดงไว้ใน British Phamacopoeia ปี 1933 (30) และ European Drug Index ปี 1922 (35) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าเฮปารินจะมีปริมาณ S ไม่ต่ำกว่า 10% โดยน้ำหนัก (วิเคราะห์ปริมาณธาตุ S ด้วยวิธี Oxygen-flash combustion)

3.9 การหาปริมาณเฮกโซซามีนของเฮปารินที่สกัดได้โดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan)

นำเฮปารินที่สกัดได้วิเคราะห์หาปริมาณเฮกโซซามีน โดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน ตามวิธีการในข้อ 2.4.7 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเฮกโซซามีนที่เป็นองค์ประกอบของเฮปารินที่เตรียมได้กับเฮปารินมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.8 พบว่าเฮปารินที่เตรียมได้มีปริมาณเฮกโซซามีนใกล้เคียงกับเฮปารินมาตรฐาน

ตารางที่ 3.8 แสดงค่าปริมาณเฮกโซซามีนที่มีอยู่ในเฮปารินมาตรฐานและเฮปารินที่สกัดได้

สาร	ปริมาณเฮกโซซามีน (% โดยน้ำหนัก)
เฮปารินมาตรฐาน	23.8±.06
เฮปารินที่สกัดได้	22.3±.09

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

เฮปาริน (HEPARIN) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจำเป็นต่อการใช้ในวงการแพทย์แต่มีราคาแพง และส่วนใหญ่ต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้น การหากรรมวิธีในการสกัดเฮปารินเพื่อให้ได้ปริมาณมากและมีประสิทธิภาพสูง จึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อผู้วิจัยในการค้นคว้าหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศ งานวิจัยนี้ได้ทำการค้นคว้าข้อมูลต่างๆ พบว่า เนื้อเยื่อที่เหมาะสมจะนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดแยกเฮปาริน คือ เนื้อเยื่อปอดสุกร

ขั้นตอนการสกัดแยกเฮปารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกร ประกอบด้วย

1. การออโตไลซิสเนื้อเยื่อ
2. การย่อยเนื้อเยื่อด้วยโปรติเอส
3. การตกตะกอนสารเจือปนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค
4. การแยกสารด้วยวิธีอัลทราฟิลเทรชัน ผ่านเมมเบรน MW. Cut off 3,000
5. การตกตะกอนลำดับส่วนด้วยสารละลายเอธานอลในน้ำ
6. การแยกสารด้วยวิธีแอนไอออนแอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี

จากการทดลองพบว่าการทำออโตไลซิสเนื้อเยื่อปอด จะช่วยให้มีการปลดปล่อยเฮปารินออกมาได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ในขั้นตอนที่สองคือ การย่อยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสด้วยโปรติเอสนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาโปรติเอสที่พิจารณาแล้วว่าเหมาะสม 2 ชนิด คือ แพนครีเอทินและนิวเทรส และพบว่าเอนไซม์นิวเทรสเหมาะสมในแง่ของประสิทธิภาพการย่อย การไม่ทำลายโครงสร้างของเฮปารินและราคาถูก เพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮปารินออก

ในขั้นตอนที่สาม คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค ซึ่งสามารถแยกเอาโปรตีนและเปปไทด์ต่างๆ ออกไปได้นั้น พบว่า ความเข้มข้นของ TCA ควรจะอยู่ที่ 5% (น้ำหนักของ TCA ปริมาตรรวมในสารละลายที่ทำการตกตะกอน ในขั้นตอนที่สี่ซึ่งเป็นการนำสารละลายที่ได้ไปแยกสารปนเปื้อนอื่นๆ ด้วยวิธีอัลทราฟิลเทรชันผ่านเมมเบรน MW. cut off 3,000 เพื่อกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตันนั้น พบว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ที่ถูกกำจัดออกไปโดยวิธีนี้นั้น มีค่าแอคติวิตีค่อนข้างต่ำ (23.34%) ในขั้นตอนที่ห้าเป็นการใช้วิธีการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้นสุทธิ 50 83 และ 90% พบว่าแอคทีฟเฮปารินจะถูก

แยกออกมาได้โดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้นสุทธิ 90% (v/v) อย่างไรก็ตามเฮปาริน ที่ได้ในขั้นนี้ยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ เช่น สารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนนิดอื่นๆ เกลือ และกรดนิวคลีอิค เป็นต้น ดังนั้นจึงนำเฮปารินที่ได้ในขั้นตอนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย ขั้นตอนที่หก คือ วิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ในการชะคอลัมน์ ซึ่งพบว่าแอคทีฟเฮปารินสามารถถูกแยกออกมาโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ในกรดไฮโดรคลอริก 0.01 M เป็นตัวชะ (สาร Z)

เมื่อได้เฮปารินจากคอลัมน์ จึงทำการทำให้บริสุทธิ์จากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ด้วยวิธีการไดอะไลซิสด้วยเมมเบรนที่มี MW. cut off ที่ 2,000 ซึ่งทำให้สามารถได้เฮปารินที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงถึง 143.21 ยูนิตต่อมก. ด้วยขั้นตอนการสกัดเฮปารินจากปอดสุกรดังกล่าวข้างต้น สามารถสกัดเฮปารินได้ 18.20 มก. เทียบเท่ากับ 2606.42 ยูนิตต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคาแรคเตอร์ไรซ์เฮปารินที่เตรียมได้ โดยวิธี NMR สเปกโตรสโคปี การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Size Exclusion Chromatography และการวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S ซึ่งผลการทดลองยืนยันว่า สารที่ได้เป็นโพลีเมอร์เฮปารินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,500 ดาลตัน และมีค่าแอนตีแฟกเตอร์เทนเอแอคติวิตีเป็น 143.21 ยูนิตต่อมก. ซึ่งเป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก แต่นับว่าเป็นกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์วิธีหนึ่ง และเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมาก นอกจากนี้ยังใช้ต้นทุนต่ำ จึงเป็นแนวทางที่ดีในการศึกษาหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในการสกัดเฮปารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ และเป็นพื้นฐานในการศึกษาและดำเนินการผลิตเฮปารินขึ้นใช้ในประเทศ รวมทั้งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษา และผลิตสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนังสืออ้างอิง

1. คู่มือบัญชียาหลักแห่งชาติ. 2529. กรุงเทพมหานคร : กระทรวงสาธารณสุข. 161-163.
2. Mclean, J. 1916. The thromboplastic action of cephalin. Amer. J. Physiol. 41 : 250-257.
3. Howel, W.H. and Holt, E. 1918. Two new factors in blood coagulation heparin and pro-antithrombin. Amer. J. Physiol. 47 : 328.
4. Charles, A.F. and Scott, D.A. 1993. Studies on heparin I and II. J. Biol. Chem. 102 : 425-435.
5. Linhardt, R.T. 1991. Heparin:An improtant drug enter its seventh dacade. Chem & Ind. Jan:45-47.
6. Jorpes, J.E., Holmgren, H.J. and Wilender. 1937. Uber das vork ommenvon heparin in den Gefasswanden und in den Augen. Z. mikrosk.-anal Foorsch. 42:279-301.
7. Ogren, s. and Lindahi, U. 1975. Cleavage of macromolecular heparin by and enzyme from mouse mastocytoma. J. Biol. Chem. 250:2690-2697.
8. Jeanloz, R.W. 1970. Mucopolysaccharides of higher animals. In the carbohydrates chemistry And biochemistry. 2nd ed., vol II B : 589-625. Edited by W. Pigman and D. Horton. Academic press, New York.
9. Martindale. 1977. The extra pharmacopoeia, 27th edition. The Pharmaceutical press, London. 718.
10. The Merck Index. 1976. Merck & Co., Inc, Rahway, N.J. 608.
11. Pattanaargson, S. 1922. Heparin derivatives:Preparation, Fractionation, and Characterization. Ph.D. dissertation, Miami University. 37-60.
12. Baugh, R.F. and Hougie, C. 1979. The Chemistry of blood coagulation. Clin, Haematol. 8(1):4.
13. Jaques, L.B. 1980. Heparin-Anionic Polyelectrolyte Drugs. Pharmacological Reviews. 31(2):99-166.
14. Normine, G., Peassae, L. and Bartbelemy, P. 1961. Process of purifying heparin, and product produce therefrom. US. Patent No. 2,989,438
15. Sumyk, G.B., Kyle, J.L. and Hawrylewicz, E.J. 1969. Method for the preparation of Heparin. US. Patent No. 3,451,996.

16. Macilla, E., Peting, R.L. and Van Ness, L.W. 1974. Process for production of alkali metal salt of heparin. US. Patent No. 3,817,831.

17. Scott, J.E. 1960. Precipitation of heparin from aqueous solution. UK. Patent No. 122,784. UK. Patent Office, London.

18. Gardell, s. 1952. Method of Biochemical. Analysis. 212:325.

19. Jorpes, E. 1942. The chemistry of heparin. Adv. Exp. Med. Biol. 52(heparin):3-17.

20. Toccaceli, N. 1962. Purification of heparin. US. Patent No. 3,016,331.

21. Cremonesi, P. and Sportoletti, G. 1985. Process for the purification of glucosaminoglucans. US. Patent No. 4,507,205.

22. Schmidt, M. 1962. Fractionation of acid mucopolysaccharides on DEAE-Sephadex anion Exchanger. Biochim. Biophys. Acta. 63:346-348.

23. Roden, L., Baker, J.R. Cifonelli, J.A. and Mathews, M.B. 1972. Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides. Method in Enzymology. 28:73-140.

24. Danielsson, a. and Bjork, I. 1978. The binding of low-affinity and high-affinity heparin to anti-thrombin. Competition for the same binding site on the protein. Eur. J. Biochem. 90:7-12.

25. Brimacombe, J.S. and Webber, J.M. 1964. Mucopolysaccharides. Elsevier, Amsterdam.

26. Bitter, T. and Muir, H.M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4:330-334.

27. Belcher, R., Nutten, A.J. and Sambrook, C.M. 1954. Analist. 79:201.

28. Montreuil, J. 1986. Chapter 5 Glycoproteins. Carbohydrate Analysis: A practical approch. Edited by MF Chaplin & JF Kenedy. Oxford Washington DC. IRL Press.

29. United State Pharmacopoeia. 1989. Heparin sodium. Appendix IX:1136.

30. British Pharmacopeia. 1993. Heparin sodium. Appendix IA:322.

31. Perlin, A.S. and Holme, K.R. 1989. NMR-Spectra of heparin in admixture with dermatan sulfate and other glycoaminoglycans. Annals of The New York Academy of sciences. 556:471-472.

32. Perlin, A.S., Casu, B. and Sanderson, G.R. 1970. 220 Mhz Spectra of heparin, chondroitin and other mucopolysaccharides. Can. J. chem. 48:2260-2268.

33. Neville, G.A., Mori, F., Holme, K.R. and Perlin, A.S. 1989. Monitoring the purity of pharmaceutical heparin preparation by high-field ^{1}H NMR resonance spectroscopy. J. Pharma. Sci. 78(2)101-104.

34. Jaque, L.B. 1980. Heparin-Anionic polyelectrolyte drugs. Pharmacological Review 31(2):99-166.

35. European Drug Index, Niels, F. Muller and Rodoff P. Dessing. 1992. 2nd edition, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo. 546-548.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์)

ชั่ง KH_2PO_4 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และชั่ง K_2HPO_4 34.84 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

นำสารละลาย KH_2PO_4 ค่อยๆ เติมลงในสารละลาย K_2HPO_4 จนกระทั่งได้สารละลายที่มี pH 7.0 ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A

1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5

นำสารละลาย KH_2PO_4 ค่อยๆ เติมลงในสารละลาย K_2HPO_4 จนกระทั่งได้สารละลายที่มี pH 6.5 ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ B

2. สารละลายเมอร์แคพโทเอธานอล (0.02 โมลาร์)

สารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. ได้จากการผสมสารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 20 มล. และน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มล.

3. สารละลายบัฟเฟอร์ A ได้จากการผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 99 มล. กับสารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มล. (อัตราส่วน 9 : 1 (v/v))

4. สารละลายบัฟเฟอร์ B ได้จากการผสมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 99 มล. กับสารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มล. (อัตราส่วน 9 : 1 (v/v))

<u>หมายเหตุ</u> การเก็บรักษาสารละลายที่เตรียม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การทดลองศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอทิน โดยแปรอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่ 30 - 70 องศาเซลเซียส

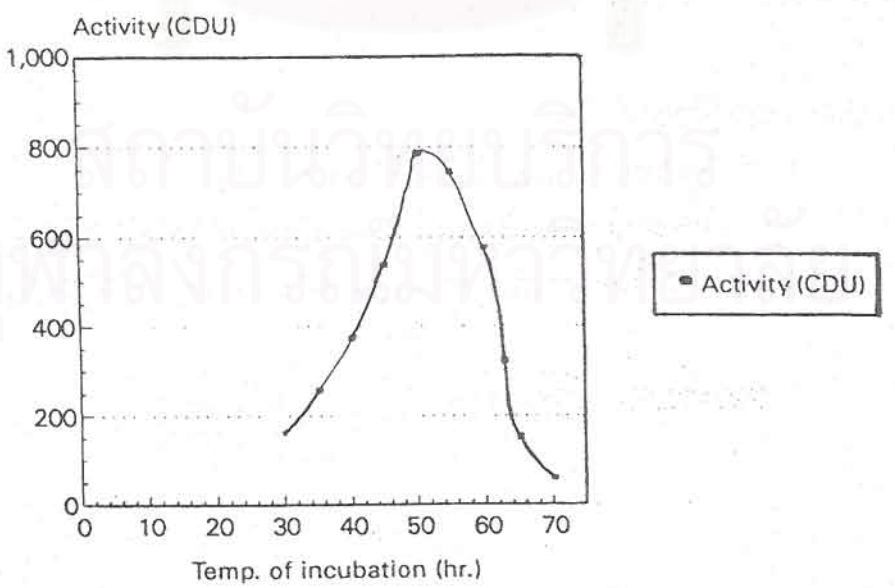
ก. วิธีการทดลอง

1. ชั่งเอนไซม์แพนครีเอทิน 10 มก. ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 20 มล. (ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.) เป็นสารละลายเอนไซม์แพนครีเอทินที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

2. ดำเนินการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรติเอสในภาคผนวก ค แต่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาทำที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

ผลการทดลองแสดงดังกราฟ

กราฟแสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ กัน



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

ก. วิธีการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นเหมาะสม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดนั้นๆ เป็นตัวทำละลาย จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

1. เติมสารละลายเคซีนในน้ำ (1% w/v) ปริมาตร 1.0 มล. และสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 0.9 มล. ลงในหลอดทดลอง

2. ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้น เป็นเวลา 10 นาที

3. เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้น เป็นเวลา 10 นาที

4. สารละลาย TCA ในน้ำ (5% w/v) ปริมาตร 3.0 มล.

5. จากนั้นนำไปเซนตริฟิวเอาตะกอนออก ความเร็วรอบของการเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ Blank เพื่อประเมินค่าความเข้มข้นของไทโรซีน (tyrosine) ในสารละลาย [Blank คือ สารละลายบัฟเฟอร์ + เคซีน (1% w/v) + TCA (5% w/v) Control คือ เติม TCA (5% w/v) ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์]

ข. การคำนวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

หน่วยเป็น CDU (Casine Digestion Unit)

1 หน่วยของแอคติวิตีเอนไซม์ CDU คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนแล้ว ทำให้เกิดไทโรซีน 1 มิลลิโมลต่อนาที ในสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้น

คำนวณจากสูตร $$\text{CDU/ml.enz.} = \frac{(A - A_0) \times V_t \times D}{A_s \times V_E \times T}$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ที่วัดจากสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารละลายเคซีน 1% ที่อุณหภูมิเหมาะสม

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ที่วัดสารละลายปฏิกิริยาจากหลอด Control

A_s = ค่าคงที่ได้จากความชันของกราฟไทโรซีน $(Abs280/\mu g.tyrosine/ml)^{-1}$

V_t = ปริมาตรสารละลายทั้งหมดในหลอดทดลอง (ปริมาตรของสารละลายเคซีน บัฟเฟอร์ เอนไซม์ และTCA 5%(w/v) รวมทั้งหมด 5 มล.

D = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลาย

T = เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับเคซีน 1%(w/v)

V_E = ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้

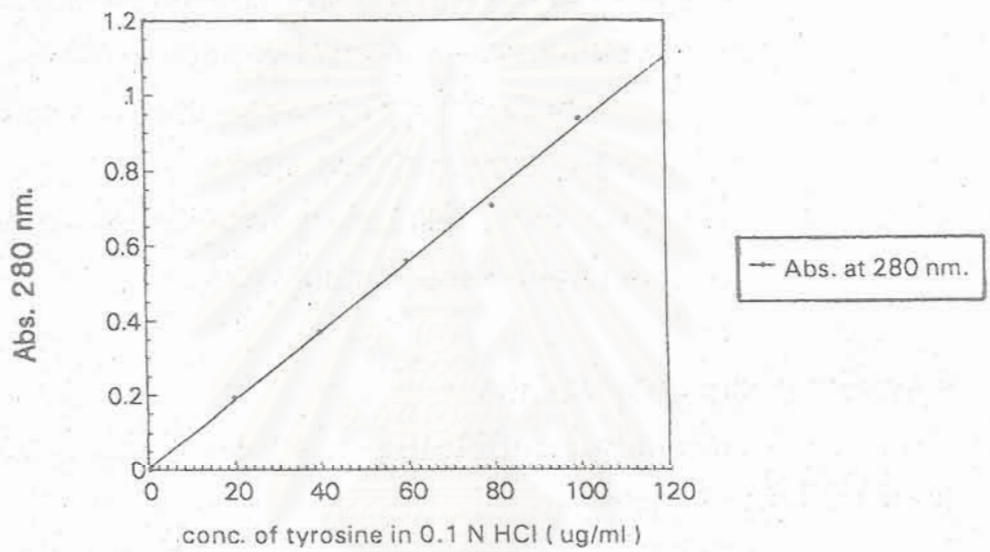
ค. <u>การเตรียมกราฟมาตรฐานของไทโรซีน</u>

1. เตรียมสารละลายไทโรซีนใน 0.1 N HCl ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลาย 0.1 N HCl นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จากผลการทดลองได้กราฟมาตรฐานดังต่อไปนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับ
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



ความเข้มข้นของไทโรซีนใน 0.1 N HCl (ไมโครกรัมต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร
20	0.195
40	0.372
60	0.559
80	0.706
100	0.937

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทิน

1. เตรียมสารละลายเอนไซม์แพนครีเอทิน

ชั่งเอนไซม์แพนครีเอทิน 1 มก. ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเจือจางโดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1 ปริมาตรต่อสารละลายบัฟเฟอร์ A 2 ปริมาตร

2. นำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตี ดังวิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีโปรติเอสในภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทิน

ส่วนสารละลายใสจาก	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
หลอด Control	0.004	-
หลอดที่มีเอนไซม์ทำปฏิกิริยา	0.771	824.73

จากการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินปริมาณ 0.5 มก. มีแอคติวิตีประมาณ 800 ยูนิต นำไปใช้ในการเตรียมเอนไซม์แพนครีเอทินที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ในการทดลองข้อ 2.4.2.3.1

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส

1. เตรียมสารละลายเอนไซม์นิวเทรส

ชั่งเอนไซม์นิวเทรส 0.5 มก. ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ B ปริมาตร 1 มล.

2. นำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตี ดังวิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีโปรติเอสในภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส

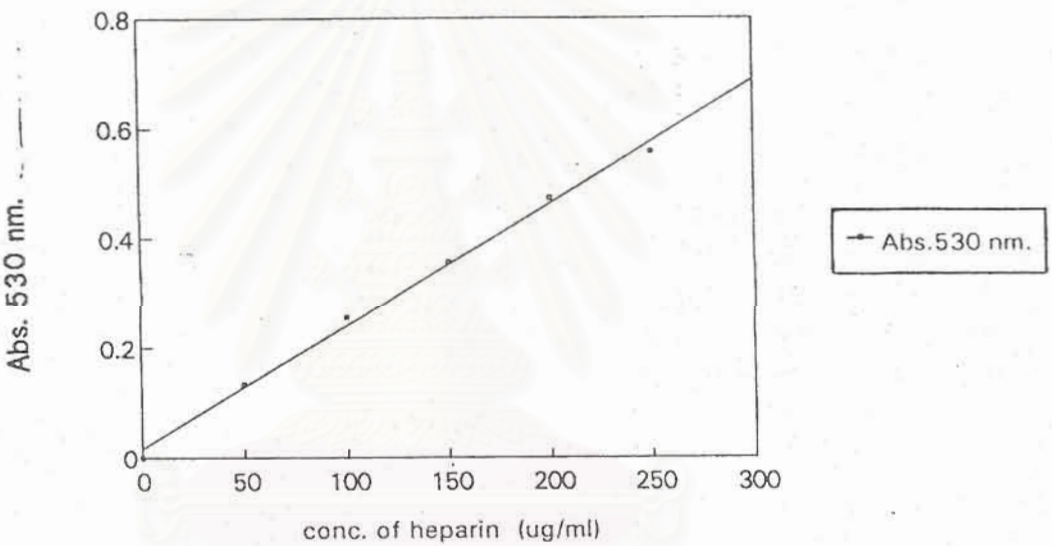
ส่วนสารละลายใสจาก	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
หลอด Control	0.005	-
หลอดที่มีเอนไซม์ทำปฏิกิริยา	0.782	417.48

จากการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส ปริมาณ 0.5 มก. มีแอคติวิตีประมาณ 400 ยูนิต นำไปใช้ในการเตรียมเอนไซม์นิวเทรสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ในการทดลองข้อ 2.4.2.3.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

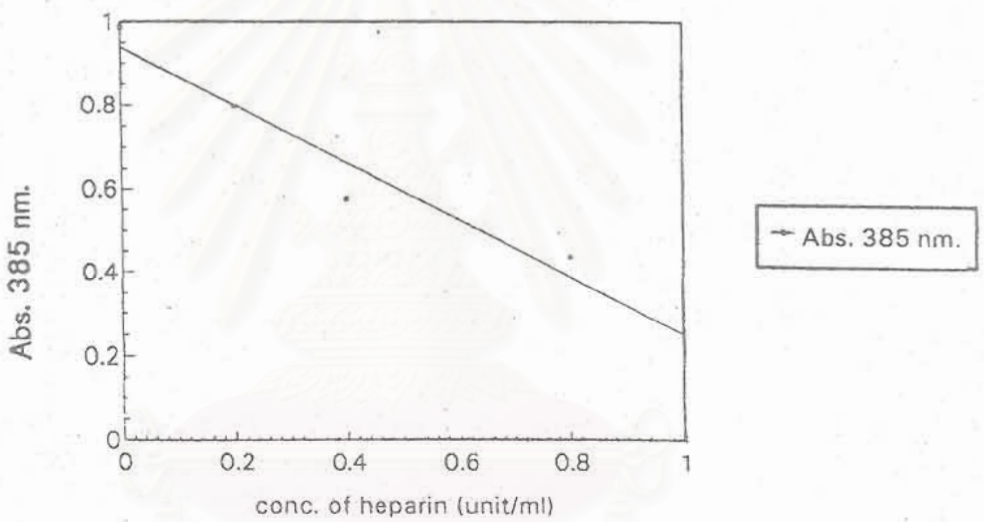
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ
ไกลโคอะมิโนไกลแคนกับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 530 นาโนเมตร
(ผลการทดลองจาก Carbazole method ในหัวข้อ 2.4.5 หน้า 25)



ค่าความเข้มข้นของเฮปาริน (ไมโครกรัมต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร
50	0.133
100	0.256
150	0.356
200	0.474
250	0.558

ภาคผนวก ช

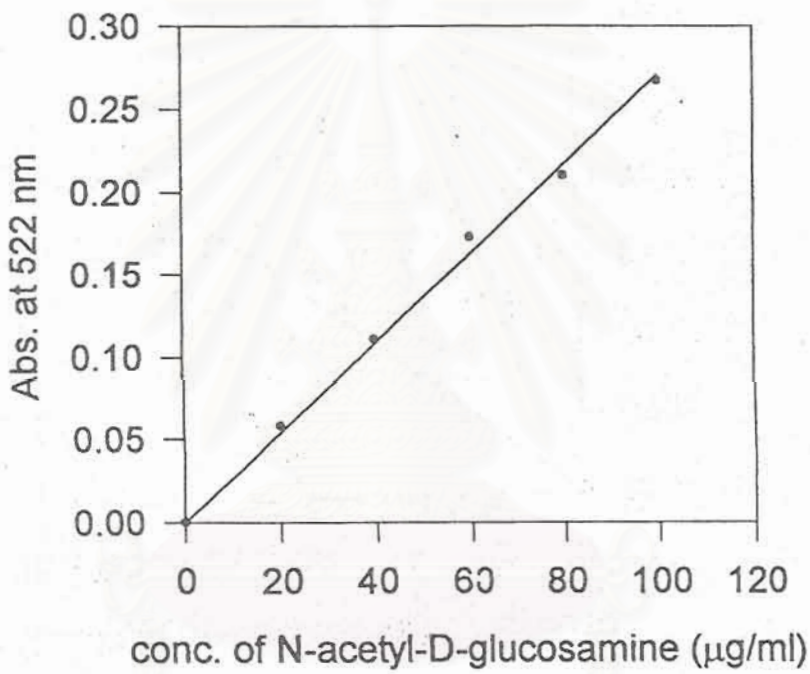
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ
ไกลโคอะมิโนไกลแคนกับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 385 นาโนเมตร
(ผลการทดลองจาก Anti factor Xa assay ในหัวข้อ 2.4.6 หน้า 27)



ค่าความเข้มข้นของเฮปาริน (ยูนิตต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 385 นาโนเมตร
0.0	0.989
0.2	0.797
0.4	0.598
0.8	0.435

ภาคผนวก ซ

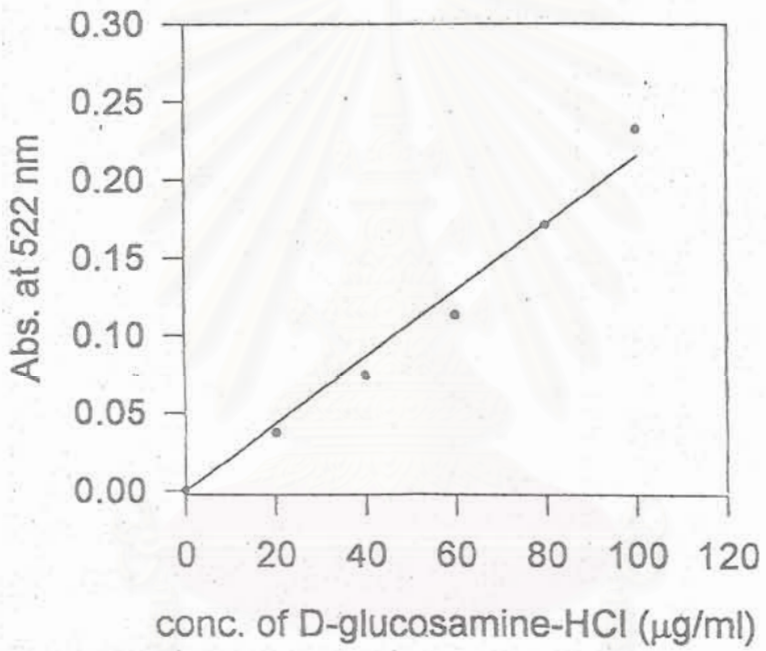
I. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 522 นาโนเมตร (ผลการทดลองจากวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan) ในหัวข้อ 2.4.7 หน้า 28)



ค่าความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine (ไมโครกรัมต่อ มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร
0.0	0.000
20.0	0.058
40.0	0.111
60.0	0.173
80.0	0.210
100.0	0.267

ภาคผนวก ซ

2. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ D-glucosamine HCI กับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 522 นาโนเมตร (ผลการทดลองจากวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan) ในหัวข้อ 2.4.7 หน้า)



ค่าความเข้มข้นของ ~~N-acetyl~~-D-glucosamine – HCl (ไมโครกรัมต่อ มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร
0.0	0.000
20.0	0.037
40.0	0.074
60.0	0.113
80.0	0.171
101.0	0.232

ภาคผนวก ฌ

การทดลองศึกษาผลที่กระบวนการออโตไลซิสที่มีต่อการสกัดแยกเฮปาริน

ก. วิธีการทดลอง

1. ชั่งเนื้อเยื่อปอดที่ปั่นละเอียดบรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มม. จำนวน 8 หลอด ให้ได้เนื้อเยื่อหลอดละ 0.5 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส

2. การเก็บตัวอย่างทำโดยเก็บเมื่อเริ่มต้นบ่ม (เป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการออโตไลซิส) และเมื่อครบ 24 ชั่วโมง (เป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส) โดยขนาดของตัวอย่างที่เก็บคือ 0.5 กรัม ตัวอย่างที่เก็บมานำมาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติค 1 มล. ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. นำไปเซนตริฟิวเอาตะกอนออกและนำส่วนสารละลายใสไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay

การทดลองนี้แต่ละจุดทำ 4 ชุด

ข. ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay ตามวิธีดังวิธีในข้อ 2.4.5

ตารางแสดงค่าความเข้มข้นของเฮปารินโดย uronic assay

สารจากส่วนสารละลายใสที่ได้จากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ	ความเข้มข้นของเฮปาริน (เฉลี่ย) (มก./ มล.)
เนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการออโตไลซิส	0.003±.005
เนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส	0.141±.014