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 (Ultrafiltration)	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-Geratetechnick, Germany

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
11. เครื่องปั่น (Homogenizer)	AM-11	Kokusan Enshinki, Japan
12. ตู้อบแห้ง	ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
13. เครื่องเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมความเย็น	KR-20000T	Kubota, Japan
14. เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer)	-	Yamato, Tokyo, Japan
15. เครื่องโครมาโทกราฟีแบบใช้ความดันสูง (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	Elkay Products Inc., 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 กรมสรรพมิต
4. โซเดียมเตตระบอเรท ($Na_2B_4O_7H_2O$)	Analytical grade:Merck, Germany

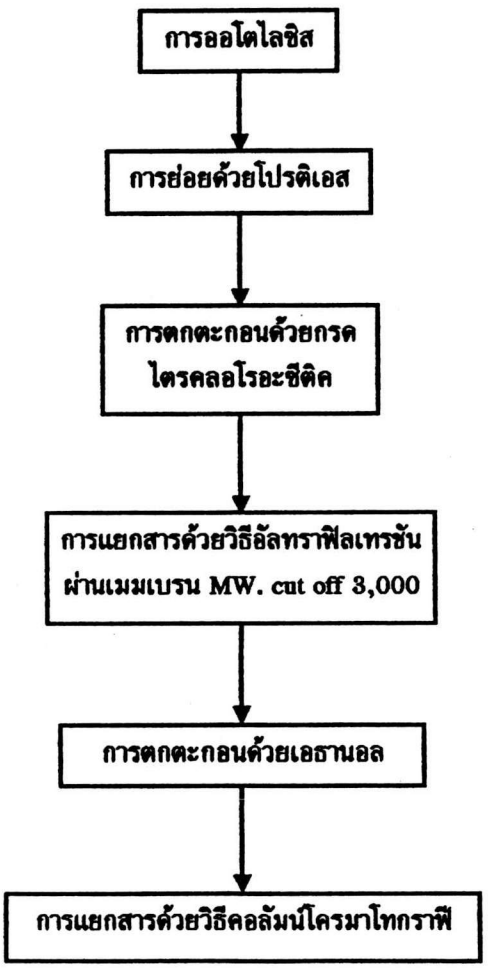
ชื่อเคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
5. กรดไตรคลอโรอะซีติค (Trichloroacetic acid)	Analytical grade:Merck, Germany
6. สารมาตรฐานเฮพาริน	Lab grade:Sigma chemical CO., USA
7. กรดอะซีติค (Acetic acid)	Commercial grade:The East Asiatic, Thailand
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Lab grade:Merck, Germany
9. โซเดียมคลอไรด์ (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. กรดไฮโดรคลอริค	Analytical grade:Merck, Germany
18. คาร์บาโซล(Carbazole)	Analytical grade:Fluka, Switzerland
19. เคซีน (casein 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

2.4 การสกัดเฮพารินจากปอดสุกร

<u>รูปที่ 2.1</u> แผนภาพแสดงขั้นตอนทั้งหมดในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกรของงานวิจัยนี้



2.4.1 การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด

2.4.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อปอดก่อนนำไปออโตไลซ์

นำปอดสุกรสดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ จากนั้นนำปอดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆกว้างยาวประมาณ 1x1 ซม.^{2} หนาประมาณ 2 ซม. และสุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อเก็บไว้ปริมาณหนึ่ง (150กรัม) 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 จากนั้นปิดจุกขวดให้สนิท นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที และสุ่มตัวอย่างสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสนี้(50 มล.) เพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อหลังออโตไลซิส แบ่งส่วนหนึ่ง (200 มล.)ไว้สำหรับศึกษาหาชนิดของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินด้วยโปรติเอส (หัวข้อ 2.4.2)และส่วนที่เหลือทั้งหมดใส่ในภาชนะที่ปิดสนิทเก็บรักษาไว้ที่ -4 องศาเซลเซียส

2.4.2 การย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินออกด้วยโปรติเอส

2.4.2.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสมีโทลูอีนผสมอยู่ 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) และนิวเทรส (Neutrase)

2.4.2.1.1 การศึกษาผลของโทลูอีนต่อการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอทิน

ก. เตรียมสารละลายเอนไซม์แพนครีเอทิน

ชั่งเอนไซม์แพนครีเอทิน 1 มก.ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ A[1] จากนั้นเจือจางสารละลายนี้ 1 ปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A 2 ปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 800 ยูนิตต่อมล. สารละลายที่ได้เรียกว่า สารละลายแพนครีเอทิน ก. เก็บไว้เป็นสต็อค สำหรับทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อมีการเติมโทลูอีนที่ปริมาณต่าง ๆ 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 แสดงการทำการทดลองแปรอุณหภูมิหาอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรติเอส (ภาคผนวก ค)

2.4.2.1.2 การศึกษาผลของโทลูอีนต่อการทำงานของเอนไซม์นิวเทรส

เตรียมสารละลายเอนไซม์นิวเทรสในสารละลายบัฟเฟอร์ B[2]

---

[1] รายละเอียดการเตรียมบัฟเฟอร์ A แสดงไว้ในภาคผนวก ก

[2] รายละเอียดการเตรียมบัฟเฟอร์ B แสดงไว้ในภาคผนวก ก

ให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 400 ยูนิตต่อมล. สารละลายเอนไซม์นี้เก็บไว้เป็นสต็อคสำหรับทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อมีการเติมโทลูอีนที่ปริมาณต่างๆกัน และดำเนินการทดลองต่อไปเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.1.1 ยกเว้นอุณหภูมิของการบ่มเปลี่ยนจาก 50 องศาเซลเซียส มาเป็น 45 องศาเซลเซียส

2.4.2.2 การศึกษากรรมวิธีการเติมโปรติเอส

นำสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสแล้วใส่ในหลอดทดลอง 9 หลอดๆละ 0.5 กรัม จากนั้นแบ่งเป็นกลุ่มๆละ 3 หลอด กลุ่มที่ 1 ไม่มีการเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อ กลุ่มที่ 2 เติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อ กลุ่มที่ 3 เติมเอนไซม์ลงในส่วนสารละลายใสที่เซนตริฟิวส่วนเนื้อเยื่อออกไป กลุ่มที่ 4 เติมเอนไซม์ลงในกากเนื้อเยื่อที่ได้จากการเซนตริฟิวเนื้อเยื่อของส่วนสารละลายใสออกไป จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ B เพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 มล. เท่ากันทุกหลอด นำแต่ละหลอดไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลาย TCA ในน้ำ (10% W/V) ปริมาตร 1 มล. เมื่อเขย่าให้เข้ากันแล้วจึงนำไปเซนตริฟิวเอาส่วนตะกอนออกที่อัตราความเร็วรอบของการเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายใสของแต่ละหลอดไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮพารินโดยการหาปริมาณกรดยูโรนิคด้วยวิธี Carbazole method (26) (หัวข้อ 2.4.5)

2.4.2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินของเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส

2.4.2.3.1 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ในที่นี้สับสเตรท คือ สารแขวนลอยของเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสแล้ว สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ A แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 20 หลอด ทำการเติมสารต่างๆดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดลองในการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

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) ทำการเตรียมเอนไซม์ให้ได้ปริมาณแอคติวิตีตามที่แสดงในตารางที่ 2.4 โดยตัวทำละลายที่ใช้คือสารละลายบัฟเฟอร์ A โดยให้สารละลายเอนไซม์สำหรับแต่ละหลอดมีปริมาตรสุทธิเป็น 1.0 มล. โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ A

จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างของแต่ละกลุ่มๆละ 2 หลอด (โดยทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีที่เก็บตัวอย่างด้วยการนำหลอดทดลองของตัวอย่างนั้นๆไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 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 ได้จากการทดลองแปรระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เป็นระยะเวลา 24 ชั่งโมง (หัวข้อ 3.3.1) หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชม. แล้วได้ทำการเติมเอนไซม์เพิ่มลงไปอีก 1.0 มก. (ความเข้มข้น 1600 ยูนิต) ในแต่ละหลอด แล้วบ่มต่อ 30 นาที จึงเก็บตัวอย่างแต่ละหลอดนั้นไว้อีกครั้งหนึ่ง

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

2.4.2.3.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรส (Neutrase)

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.3.1 โดยเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ A เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ B ปริมาณสารต่างๆที่เติมในแต่ละหลอดแสดงไว้ในตารางที่ 2.5 การทำปฏิกิริยาทำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณและปริมาตรสารต่างๆที่เติมลงในหลอดทดลอง 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

* สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์ คือ 400 ยูนิต/เอนไซม์นิวเทรส 0.5 มก. (การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรสในภาคผนวก จ) สารละลายเอนไซม์สำหรับแต่ละหลอดมีปริมาตรสุทธิ 1 มล. เตรียมโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ B เจือจางสารละลายเอนไซม์นิวเทรส

การเก็บตัวอย่างกระทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.3.1 และมีการเติมเอนไซม์เพิ่มหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในกรณี 2.4.2.3.1

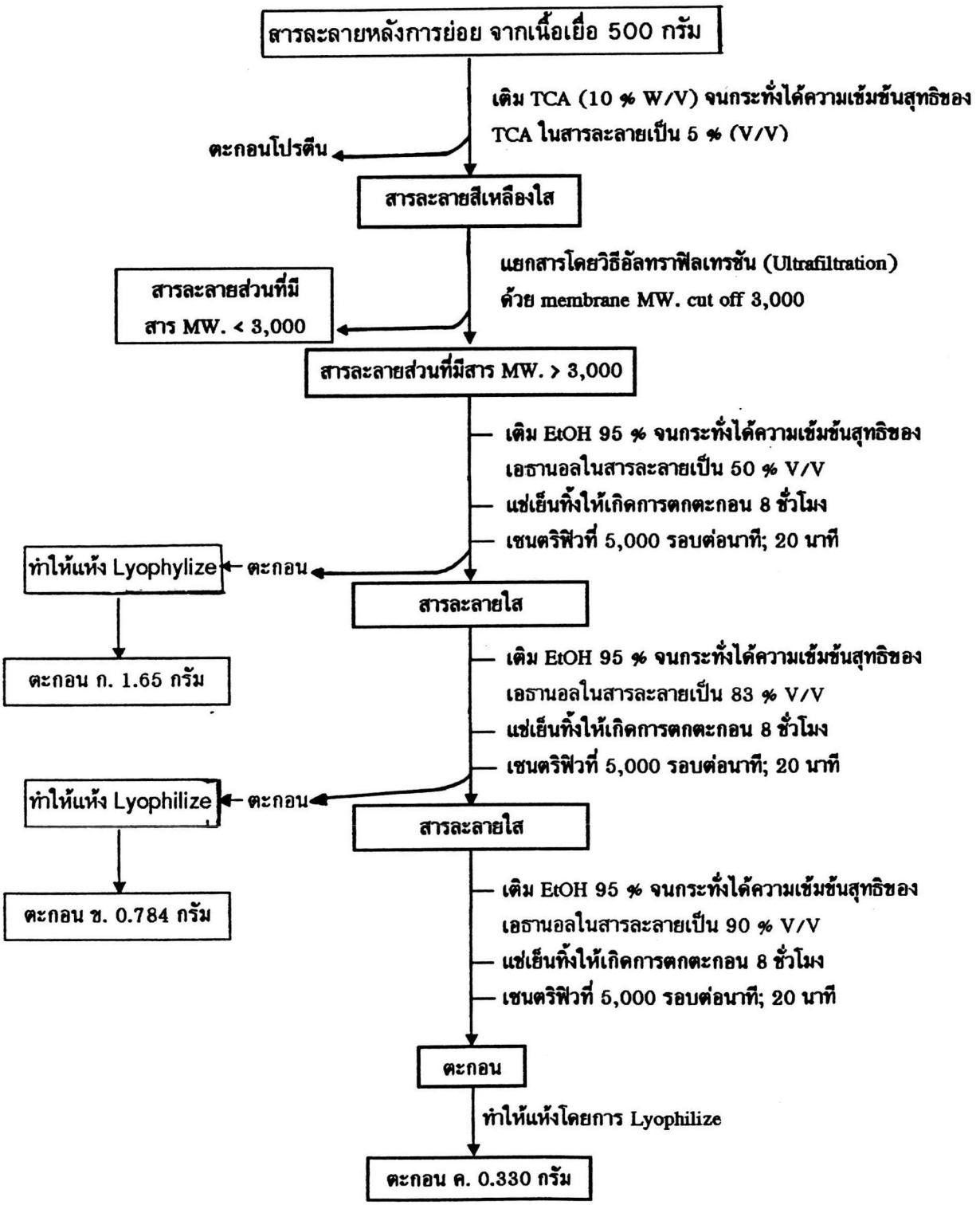
2.4.2.4 การย่อยเนื้อเยื่อปอดเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินด้วยเอนไซม์นิวเทรส

นำเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสแล้วจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาณ 500 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ B จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์นิวเทรสในสารละลายบัฟเฟอร์ B 5.2 มล. (5,200,000 ยูนิต)ลงในสารแขวนลอยของเนื้อเยื่อปอด คนให้เข้ากัน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ B เพื่อปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.4.3 การแยกเฮพารินหลังการย่อย

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 ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮพารินโดยวิธี Carbazole method (หัวข้อ 2.4.5) และหาแอคติวิตีของเฮพารินโดยทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Xa assay) (หัวข้อ 2.4.6)

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

การเตรียมสารละลายที่เกี่ยวข้องและคอลัมน์ เพื่อใช้ในการสกัดแยกเฮพารินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นมีข้อปฏิบัติดังต่อไปนี้ คือ

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

เตรียมสารละลายที่ใช้ชะ (mobile phase) : ใช้โซเดียมคลอไรด์ และกรดไฮโดรคลอริคชนิด 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 จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 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 แล้วจึงทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยชะสารเป็นขั้นๆตามลำดับดังจะกล่าวต่อไป

ขั้นตอนการชะสารออกจากคอลัมน์ : กระทำโดยการชะเป็นขั้นๆ ตามลำดับ ดังนี้

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

ในการชะสารแต่ละขั้นนั้น ชะด้วยอัตราเร็ว 1 มล.ต่อนาที เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วนๆละ 1 มล. นำไปตรวจหาเฮพารินโดยวิธีคาร์บาโซล ในแต่ละขั้นจะเก็บสารละลายที่ถูกชะจนกระทั่งตรวจหาสารเฮพารินไม่พบ จึงเปลี่ยนการชะเป็นขั้นตอนต่อไปจนถึงขั้นที่ 5 จากนั้นรวบรวมสารเฮพารินที่ชะได้ในแต่ละขั้นที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (evaporation) และนำไปกำจัดเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส ซึ่งถุงไดอะไลซิสมีรูพรุนขนาด 2,000 ดาลตัน นำส่วนที่ได้หลังจากกำจัดเกลือออกแล้วไปทำให้แห้งโดยการระเหิดแห้ง(Lyophylize) และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮพารินด้วยวิธีคาร์บาโซลและหาแอคติวิตีของเฮพารินโดยทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ

2.4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮพารินโดยวิธีคาร์บาโซล (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 นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นที่แช่ไว้ในน้ำแข็งปริมาตร 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 แทนสารตัวอย่างแล้วดำเนินขั้นตอนต่าง ๆ เหมือนกับการทดสอบสารตัวอย่าง)

การคำนวนหาความเข้มข้นของเฮพารินในตัวอย่างที่สกัดได้ ณ ขั้นตอนต่าง ๆ หรือด้วยวิธีต่าง ๆ ทำโดยใช้กราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของเฮพารินมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบซึ่งใช้ที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ฉ)

2.4.6 การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเฮพารินในการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอด้วยชุดทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ มีขั้นตอนและการเติมสารต่าง ๆตามลำดับดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงขั้นตอนและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดสอบ* ตามลำดับ

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Human Antithrombin III	200
เฮพารินหรือสารตัวอย่าง	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**	

* หลอดทดสอบที่ใช้เป็นหลอดพลาสติค 12 x 75 มม.

** Blank เตรียมโดยเติมกรดอะซีติคลงในหลอดทดสอบก่อนการเติมสารละลายอื่นๆที่ใช้ในการทดสอบ

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. สารละลายเฮพารินที่ใช้ในการทดสอบนี้เป็นเฮพารินมาตรฐานของบริษัท Leo ที่มีค่าแอคติวิตี 5,000 ยูนิตต่อมล.

การหาค่าแอคติวิตีของสารตัวอย่างทำโดยใช้กราฟมาตรฐาน วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานกระทำโดยการเตรียมสารละลายเฮพารินซึ่งทราบค่าแอคติวิตีแน่นอนให้มีแอคติวิตีของเฮพารินเป็น 8 ยูนิตต่อมล. (ในที่นี้ใช้เฮพารินของบริษัท Leo ที่มีค่าแอคติวิตี 5,000 ยูนิตต่อมล.) จากนั้นนำมาเตรียมสารละลายเฮพารินให้มีแอคติวิตีเป็น 0.8 0.4 0.2 และ 0.0 ยูนิตต่อมล. ตามลำดับ ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาตรของสารต่าง ๆในการเตรียมสารละลายเฮพาริน

สารละลายเฮพารินที่ได้ (ยูนิตต่อมล.)	ความเข้มข้นของสารละลายเฮพารินและปริมาตรที่ใช้เตรียม(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	-	500

นำสารละลายเฮพารินที่มีค่าแอคติวิตี 0.8 0.4 0.2 และ0.0 ยูนิต ดังกล่าวไปวิเคราะห์ตามวิธีที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 บันทึกค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 385 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของเฮพารินที่ใช้ในการทดสอบ (ภาคผนวก ช)

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

1. 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 ละลายในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 30 มล.

2. วิธีวิเคราะห์กระทำการเติมสารต่าง ๆตามลำดับ 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	

* สารละลายไกลแคนต้องผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 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 ช)

2.4.8 การหาน้ำหนักแห้ง

2.4.8.1 การหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอด

ทำโดยนำเนื้อเยื่อปอดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนัก บันทึกค่าไว้และนำไปอบซ้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และชั่งหาน้ำหนักซ้ำ ทำเช่นนี้เรื่อยๆจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักที่ได้หักลบน้ำหนักกระดาษกรองจะได้น้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอด

2.4.8.2 การหาน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อปอดหลังออโตไลซิส

ทำเช่นเดียวกับวิธีในหัวข้อ2.4.8.1 แต่เปลี่ยนจากเนื้อเยื่อปอดเป็นเนื้อเยื่อปอดหลังออโตไลซิส

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

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

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

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

การเตรียมคอลัมน์ทำโดยล้างคอลัมน์ Ultrahydrogelด้วยน้ำบริสุทธิ์ด้วยอัตราเร็ว 1 มล.ต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นปรับสภาพอัตราเร็วเป็น 0.8 มล.ต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราเร็วที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารละลายที่ใช้ชะ: น้ำบริสุทธิ์ซึ่งผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และกำจัดฟองกาซในน้ำด้วยเครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 30 นาที

สารตัวอย่าง: เฮพารินที่สกัดได้ปริมาณ 1 มก. (จากขั้นตอนการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ใน HCl 0.01 M) ละลายในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 1 มล. แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานมี 4 ชนิดได้แก่ Polyethyleneglycol (PEG) 4,000 (MW.4,000) PEG 6,000(MW.6,000) Dextran 8,000(MW.8,000) และDextran 10,000(MW.10,000)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด : เตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1 มก.ต่อมล. และนำสารละลายที่เตรียมนี้ไปผ่านคอลัมน์เพื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานแต่ละชนิด จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดที่เตรียมไว้นั้นนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1 โดยปริมาตร แล้วนำสารละลายผสมที่เตรียมนี้ไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด

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

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

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