บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ ทำการศึกษาโดยการสกัดเฮพารินจากปอดสุกร ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ผลิตเฮพารินในทางอุตสาหกรรม(14-16) และสามารถหาได้ง่ายในประเทศ เนื้อเยื่อปอดสุกรในประเทศไทยมีราคาถูกเพราะไม่เป็นที่นิยมในการบริโภค จึงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเฮพารินขึ้นใช้เองในประเทศ

3.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

จากการค้นคว้าข้อมูลกระบวนการสกัดเฮพารินในทางอุตสาหกรรมพบว่าการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเฮพารินทำได้โดยการทำออโตไลซิส(Autolysis) เนื้อเยื่อก่อน (4,14-17) และจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสจะปลดปล่อยเฮพารินออกมาสูงกว่าเนื้อเยื่อปอดที่ไม่ผ่านการออโตไลซิส(แสดงผลการทดลองในภาคผนวก ฌ) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการออโตไลซิสทำให้เซลแตกออกเฮพารินซึ่งอยู่ในรูปโปรติโอไกลแคนจึงถูกปลดปล่อยออกมาจากเซล ดังนั้นการสกัดเฮพารินในการวิจัยนี้จึงทำการออโตไลซิสเนื้อเยื่อก่อนกระทำขั้นตอนอื่นต่อไป

เนื่องจากในขั้นตอนการออโตไลซิสเนื้อเยื่อมีการเติมโทลูอีนลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ และขั้นตอนของการสกัดเฮพารินจำเป็นต้องมีการย่อยสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินออกด้วยการใช้โปรติเอส(14-16,20-21) จึงทำการศึกษาถึงผลกระทบของโทลูอีนที่อาจมีต่อการทำงานของโปรติเอส

ผลของการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรสเมื่อมีการเติมโทลูอีนในปริมาณต่าง ๆลงไปในปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนเคซีนแสดงดังตารางที่ 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	ความเข้มข้นของโทลูอีนในสารละลายเคซีน1%(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 จะเห็นว่ากลุ่มที่มีการเติมโทลูอีนความเข้มข้น 1%(v/v) มีค่าแอคติวิตีใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่มีการเติมโทลูอีน แสดงว่าโทลูอีนที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลยับยั้งการทำงานของทั้งเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส แต่ที่ความเข้มข้นของโทลูอีนเป็น 2 %(v/v) พบว่าแอคติวิตีการทำงานของทั้งเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรสจะลดลงประมาณ 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ทำงานในสภาวะที่ไม่มีการเติมโทลูอีน

เนื่องจากในกระบวนการผลิตเฮพารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกรนั้น ขั้นตอนการทำให้เซลแตกใช้เนื้อเยื่อ 1,250 กรัม ปริมาตรทั้งหมดของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ 1,600 มล. และเติมโทลูอีน 12.5 มล. โดยการออโตไลซิสใช้การเติมโทลูอีนจนมีความเข้มข้นเพียง 0.78 % ของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ ซึ่งปริมาณโทลูอีนที่เติมลงไปนี้ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์นั้นลดลง

3.2 ผลของนิวเทรสในการปลดปล่อยเฮพารินจากเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบการย่อยในรูปเนื้อเยื่อแขวนลอย ส่วนน้ำใสจากการออโตไลซิส และกากเนื้อเยื่อ

หลังจากผ่านการออโตไลซิสแล้วเฮพารินซึ่งอยู่ในรูปของโปรติโอไกลแคนควรจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลที่แตกออก ในที่นี้การแยกเฮพารินให้บริสุทธิ์จึงเริ่มต้นโดยการย่อยโปรตีนออกด้วยโปรติเอส การเปรียบเทียบปริมาณเฮพารินที่ได้จากการใช้สารแขวนลอยของเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โดยตรงเทียบกับการกรองเอาเฉพาะส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์นิวเทรสเช่นเดียวกัน พบว่าวิธีการเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อมีปริมาณเฮพารินปลดปล่อยออกมามากกว่าการเติมเอนไซม์ลงในส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.3

I2050729X

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ สารละลายใสจากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ และกากเนื้อเยื่อที่กรองเอาสารละลายใสออกไป

กลุ่มที่	สารที่นำมาทำการย่อย	ความเข้มข้นของเฮพาริน (มก./มล.)	%ของเฮพารินคิดเทียบกับปริมาณเฮพารินสูงสุดที่ปลดปล่อยจากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม
1	สารแขวนลอยเนื้อเยื่อ	1.143±.012	100.0
2	ส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ	0.622±.005	54.4
3	ส่วนกากเนื้อเยื่อที่กรองเอาสารละลายใสออกไป	0.439±.002	38.4

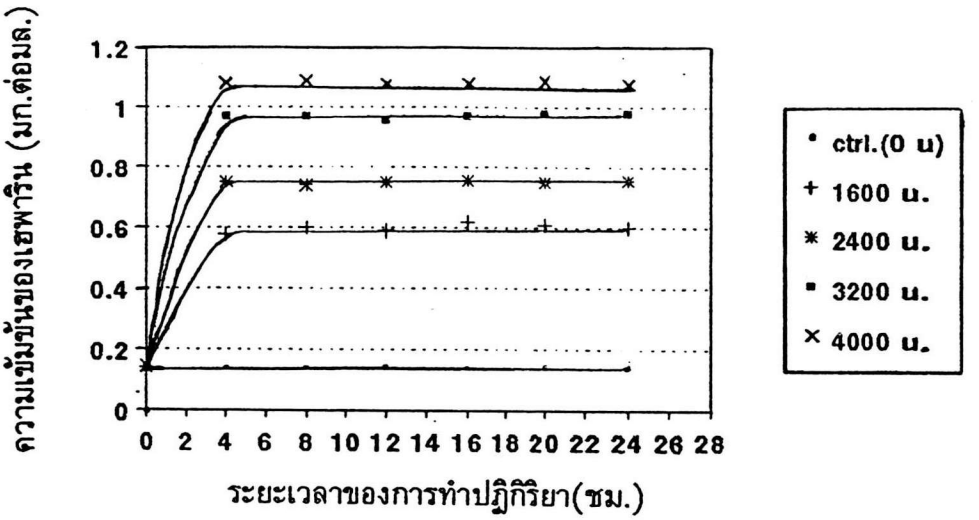
จากผลการทดลองในตารางที่ 3.3 จะเห็นได้ว่าการเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่ได้ปริมาณเฮพารินสูงสุดคือ 1.143 มก. จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อปริมาณ 0.5 กรัม โดยที่วิธีการเติมเอนไซม์ลงในเฉพาะส่วนสารละลายใสของสารแขวนลอยนั้นจะให้ปริมาณเฮพาริน 0.622 มก. เท่านั้น เนื่องจากเฮพารินยังคงอยู่ในรูปของโปรติโอไกลแคนในส่วนของกากเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเห็นได้จากเมื่อนำเฉพาะส่วนของกากเนื้อเยื่อมาย่อยด้วยเอนไซม์มีเฮพารินถูกปลดปล่อยออกมาปริมาณ 0.439 มก. แสดงว่าการออโตไลซิสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เฮพารินถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายได้ทั้งหมด การเติมเอนไซม์ลงในสารแขวนลอยเนื้อเยื่อโดยตรงจะทำให้ได้เฮพาริน (ที่ไม่มีส่วนของโปรตีนเกาะอยู่) ออกมาสู่สารละลายในปริมาณสูงสุด

3.3 การศึกษาหาความเข้มข้นของโปรติเอสที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการย่อยด้วยโปรติเอส

เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในขั้นตอนการย่อยโปรตีนที่เกาะกับเฮพาริน การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่จะใช้และระยะเวลาของปฏิกิริยาการย่อยจึงมีความสำคัญ ในที่นี้เอนไซม์ที่เลือกใช้ คือ เอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส เนื่องจากโปรติเอสทั้งสองชนิดนี้มีสภาวะการทำงานในช่วง pH ที่เป็นกลาง ซึ่งจะไม่มีผลต่อโครงสร้างของเฮพาริน นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสองชนิดยังหาซื้อได้ง่ายในประเทศ

3.3.1 การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แพนครีเอทิน

จากการแปรระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง 0 ถึง 24 ชั่งโมง กับแพนครีเอทินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 หน่วย ถึง 4,000 หน่วย พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง ให้การปลดปล่อยเฮพารินสูงสุดเท่ากับ 0.143 0.580 0.750 0.970 และ 1.08 มก. ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0 1,600 2,400 3,200 และ4,000 หน่วย ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 4 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1

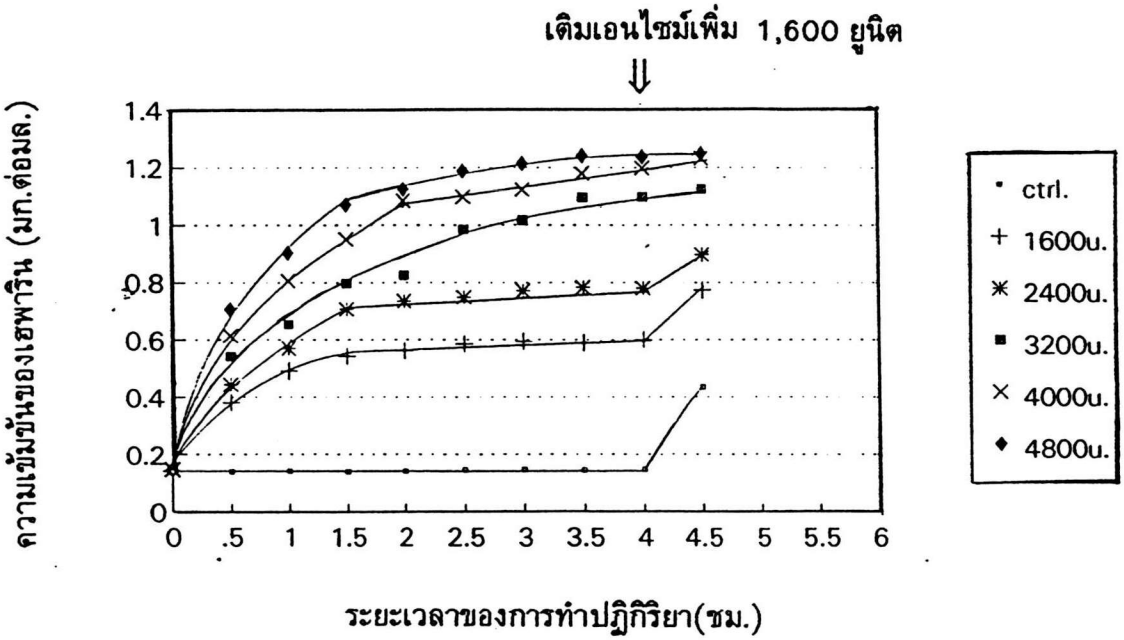


รูปที่ 3.1 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่าง ๆด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินต่าง ๆ

3.3.2 การหาความเข้มข้นของแพนครีเอทินที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์แพนครีเอทิน (Pancreatin)

การทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแพนครีเอทินในการย่อยสลายเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม โดยแปรเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆตั้งแต่ 0 หน่วย ถึง 4,800 หน่วย และบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 3.2 พบว่าเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4,000 หน่วย (2.5 มก.เอนไซม์) เพียงพอในการทำปฏิกิริยา จากรูปที่ 3.2 จะเห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสปริมาณ 0.5 กรัมที่ใช้เอนไซม์แพนครีเอทินที่ความเข้มข้น 4,000 หน่วย (2.5 มก.เอนไซม์)เพียงพอในการทำปฏิกิริยา (จะเห็นได้ว่าผลการทดลองไม่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 4,800 หน่วย มากนัก) และเนื่องจากความเข้มข้นของเฮพารินไม่เพิ่มขึ้นอีกมากนักหลังจากเติมเอนไซม์เพิ่มอีก 1,600 หน่วย แสดงว่าเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อเพื่อให้เฮพารินถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลายสมบูรณ์แล้ว

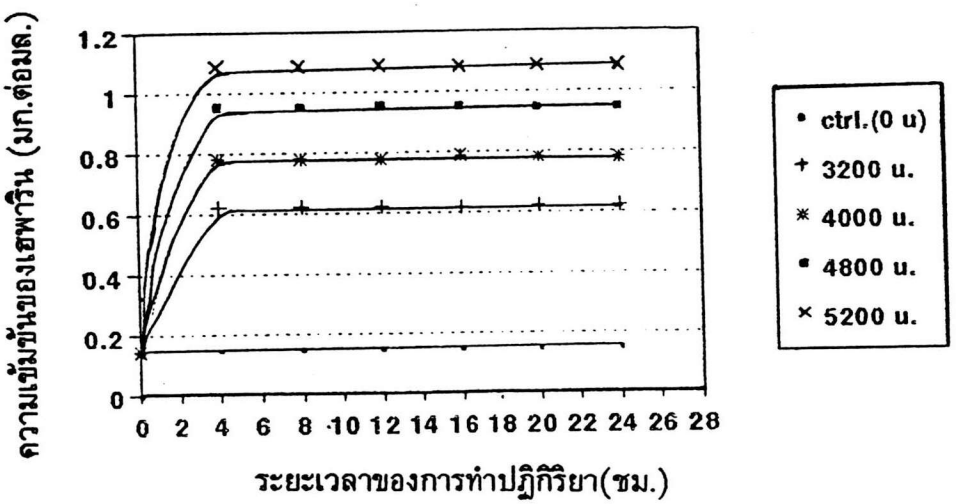
เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของเฮพารินจะคงที่(ไม่เพิ่มขึ้น)เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป 3 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลา 3 ชั่วโมงจึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด สำหรับขั้นตอนของปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสโดยเอนไซม์แพนครีเอทิน



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ(เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง) ด้วยความเข้มข้นต่างๆของเอนไซม์แพนครีเอตินและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่เวลา 4 ชั่วโมง เติมเอนไซม์ 1,600 หน่วย

3.3.3 การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรส

จากการแปรระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง 0 หน่วย ถึง 5,200 หน่วย พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง ให้การปลดปล่อยเฮพารินสูงสุดเท่ากับ 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 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 4 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 3.3

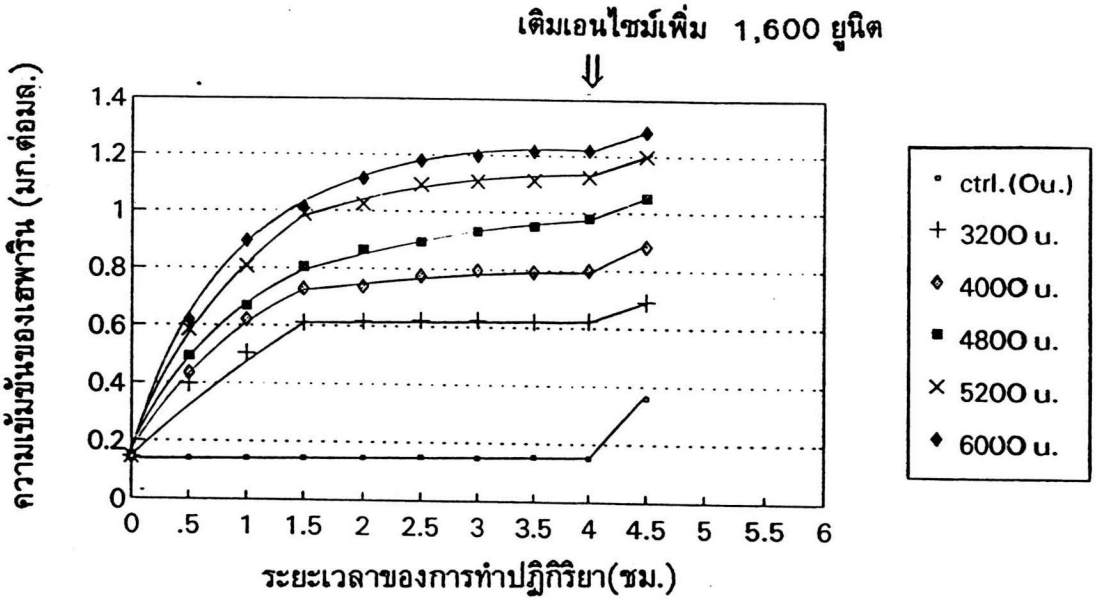


รูปที่ 3.3 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่าง ๆด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสต่าง ๆ

3.3.4 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อย

การทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์นิวเทรสในการย่อยสลายเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม โดยแปรเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0 หน่วย ถึง 6,000 หน่วยและบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 3.4 พบว่าที่ความเข้มข้น 5,200 หน่วย (6.5 มก.เอนไซม์)เพียงพอในการทำปฏิกิริยา จากรูปที่ 3.4 จะเห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสปริมาณ 0.5 กรัม ที่ใช้นิวเทรสที่ความเข้มข้น 5,200 หน่วย(6.5 มก.เอนไซม์) ก็เพียงพอในการทำปฏิกิริยา (จะเห็นได้ว่าผลการทดลองไม่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ 6,000 หน่วย มากนัก) และเนื่องจากความเข้มข้นของเฮพารินไม่เพิ่มขึ้นอีกมากนักหลังจากเติมเอนไซม์เพิ่มอีก 1,600 หน่วย แสดงว่าเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อเพื่อให้เฮพารินถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสายละลายสมบูรณ์แล้ว

เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของเฮพารินจะคงที่เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป 3 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลา 3 ชั่วโมงจึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับขั้นตอนของปฏิกิริยาการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสโดยเอนไซม์นิวเทรส



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ(เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง)ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่เวลา 4 ชั่วโมงเติมเอนไซม์เพิ่ม 1,600 หน่วย

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2 และ3.3.4 เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเฮพารินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด คือ แพนครีเอทิน และนิวเทรส พบว่าเฮพารินที่ได้จากทั้ง 2 ปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยก็คล้ายคลึงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบในแง่ของต้นทุนการใช้เอนไซม์ย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อปอดที่ผ่านการออโตไลซิสปริมาณ 1 กิโลกรัม ต้องใช้เอนไซม์แพนครีเอทิน 5.0 กรัม คิดเป็นเงิน 18.75 บาท (ราคาเอนไซม์แพนครีเอทิน 3.75 บาทต่อเอนไซม์ 1 กรัม) และถ้าใช้เอนไซม์นิวเทรสต้องใช้ 13.0 กรัม คิดเป็นเงิน 8.45 บาท (ราคาเอนไซม์นิวเทรส 0.65 บาท ต่อเอนไซม์ 1 กรัม) พบว่าการเลือกใช้เอนไซม์นิวเทรสจะใช้ต้นทุนต่ำกว่าการใช้เอนไซม์แพนครีเอทิน ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์นิวเทรสในขั้นตอนการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินออกสำหรับการสกัดเฮพารินในงานวิจัยนี้ดังการทดลองในข้อ 2.4.2.4

3.4 การทำเฮพารินที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์โดยการกรองร่วมกับวิธีอัลทราฟิลเทรชัน

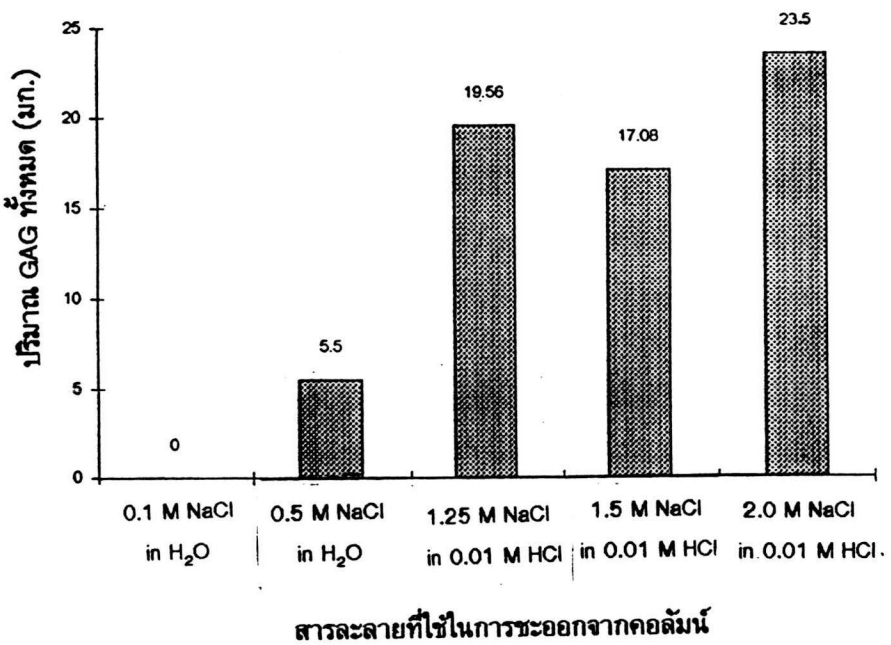
เนื่องจากในสารละลายหลังการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์นอกจากเฮพารินแล้วยังมีสารประกอบอื่นๆปนอยู่ด้วยจึงต้องมีการแยกเฮพารินให้บริสุทธิ์ โดยในขั้นแรกได้ทำการตกตะกอนแยกโปรตีนออกด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปแยกสารปนเปื้อนด้วยวิธีอัลทราฟิลเทรชันผ่านเมมเบรนที่มี MW.cut off 3,000 เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตัน ออก จากนั้นนำส่วนของสารละลายที่มีสารน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 3,000 ดาลตัน ไปตกตะกอนด้วยเอทธานอลเพื่อตกตะกอนแยกเฮพารินออกจากสารละลาย นำสารที่ได้ในส่วนต่างๆของแต่ละขั้นตอนการแยกเฮพารินไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮพารินและแอคติวิตีของเฮพารินโดยการทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor Xa assay) ผลแสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการทำเฮพารินให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วน และวิธีอัลทราฟิลเทรชัน

สาร	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอคติวิตีของเฮพาริน (ยูนิต/มล.)	ความเข้มข้นของเฮพาริน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก. เฮพาริน)	ปริมาณเฮพารินทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีที่สกัดได้ (%)
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% เอทธานอล (ก)	165	0.337	0.063	5.35	10.39	55.61	9.20
ตะกอนที่ 83 % เอทธานอล (ข)	78	0.521	0.138	3.78	10.76	40.64	6.74
ตะกอนที่ 90 % เอทธานอล (ค)	330	1.540	0.077	20.00	25.41	508.20	84.06

3.5 การแยกเฮพารินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบใช้ความดันสูง(HPLC) ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี

Schmidt (22) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำและในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.01 โมลาร์ สามารถแยกเฮพารินออกจากสารละลายที่มีสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนอื่นๆอยู่ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีของ Schmidt เป็นต้นแบบทำการแยกเฮพารินที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนเฮพารินด้วยสารละลายเอธานอลความเข้มข้นสุทธิ 90 %(v/v) โดยวิธี Anion Exchange Chromatography ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี โดยทำการทดลองดังแสดงรายละเอียดไว้ในหัวข้อ 2.4.4 เมื่อนำสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกันมาทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิค (ซึ่งบ่งปริมาณไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดต่างๆ เนื่องจากกรดยูโรนิคเป็นองค์ประกอบของสายโพลีเมอร์ในโครงสร้างของไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่างๆ) ปรากฏผลดังแสดงในรูปที่ 3.5



<u>รูปที่ 3.5</u> กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของ GAG (ไกลโคอะมิโนไกลแคน) ในสารละลายที่ชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ต่าง ๆตามลำดับขั้น คือ 0.1 M NaCl in H_2O 0.5 M NaCl in H_2O 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

จากการตรวจสอบพบว่ามีกรดยูโรนิคในส่วนของสารละลายที่ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาณ 5.5 กรัม สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริค(0.01โมลาร์) ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ ปริมาณ 19.56 กรัม สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริค(0.01โมลาร์) ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นปริมาณ 17.08 กรัม และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริค(0.01โมลาร์) ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นปริมาณ 23.5 กรัม จึงนำสารละลายในแต่ละส่วนที่พบว่ามีกรดยูโรนิคไปกำจัดเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส(Dialysis:ถุงไดอะไลซิสมีรูพรุนขนาด 2,000 ดาลตัน)

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

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณของไกลโคอะมิโนไกลแคนและแอนตีแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor Xa activity) ของสารส่วนต่างๆ

สารที่ได้จากการชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอนตีแฟกเตอร์เทนเอแอคติวิตี[1] (ยูนิต/มล.)	ความเข้มข้น[2] ของไกลโคอะมิโนไกลแคน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.)	ปริมาณเฮพารินทั้งหมด (มก.)	แอนตีแฟกเตอร์เทนเอแอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
สารที่ผ่านเข้าคอลัมน์	1.0	1.54	0.077	20.00	15.00	300.00
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	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 เป็นสารที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดซึ่งคือ สารเฮพารินที่สกัดได้ แต่เป็นค่าแอติวิตีที่ไม่สูงมากนัก เฮพารินมาตรฐานที่มีขายในท้องตลาดจะมีค่าในช่วง 140-200 ยูนิตต่อมก. ดังนั้นจึงได้นำสารส่วนดังกล่าวไปกำจัดเกลือออกอีกครั้งเนื่องจากเกลืออาจถูกกำจัดออกไม่หมดโดยการทำไดอะไลซิสซ้ำแล้วนำสารส่วนที่เหลือไปทำให้แห้งโดยการ lyophilize พบว่าสารส่วนสกัดที่เหลือหลังจากไดอะไลซิสครั้งนี้ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นจากเดิม 69.15 เป็น 143.21 ยูนิต/มก.เฮพาริน ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay และค่าแอคติวิตีของเฮพารินที่สกัดได้

สาร	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอคติวิตี[1] ของเฮพาริน (ยูนิต./มล.)	ความเข้มข้น[2] ของเฮพาริน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก. เฮพาริน)	ปริมาณเฮพารินทั้งหมด (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

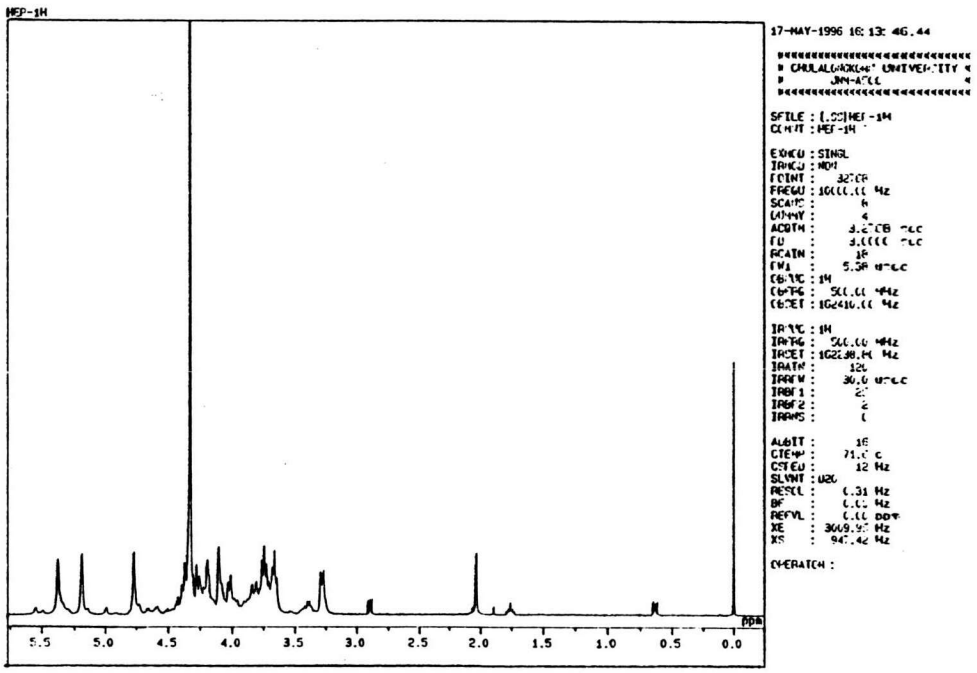
หมายเหตุ Z คือ สารลำดับส่วนที่ชะจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วย 2.0 M NaCl ใน 0.01 M HCl
Z* คือ สาร Z ส่วนที่เหลือหลังจากไดอะไลซิสซ้ำอีกครั้ง

จากตารางที่ 3.6 ปริมาณสารเฮพารินที่สกัดได้(สาร (Z*)) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 143.21 ยูนิตต่อมก.เฮพาริน ปริมาณเฮพารินที่สกัดได้ทั้งหมด 9.10 มก. จากการย่อยเนื้อเยื่อ 500 กรัม (น้ำหนักเปียก) คิดเป็นต่อ กก.เนื้อเยื่อ เมื่อทำการสกัดเฮพารินตามวิธีดังกล่างข้างต้น พบว่าสามารถสกัดเฮพารินได้ปริมาณ 18.20 มก.ต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก. มีแอคติวิตีเท่ากับ 143.21 ยูนิตต่อมก. ซึ่งเทียบเท่ากับแอคติวิตีทั้งหมด 2,606.42 ยูนิตต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก.

3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮพารินที่สกัดได้ด้วยวิธี NMR Spectroscopy

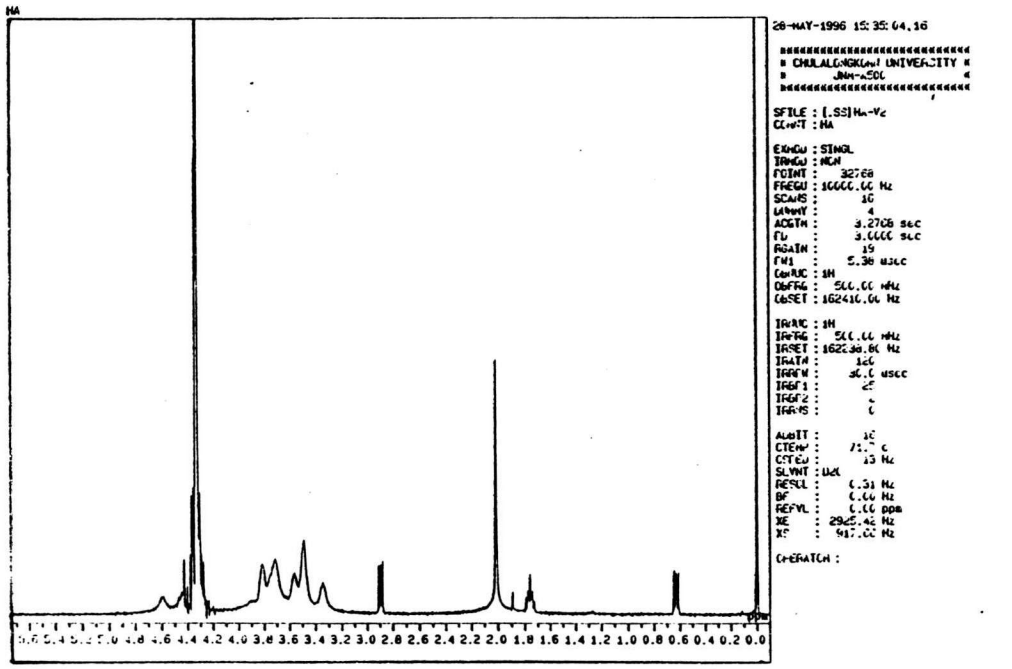
นำสารส่วนที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยสารละลายเอธานอลในน้ำที่ความเข้มข้นสุทธิเป็น 50 83 90 % และสารเฮพารินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีซึ่งใช้คอลัมน์ PA-DEAE ส่วนที่ชะคอลัมน์ด้วย 1.25 M NaCl in 0.01 M HCl 1.50 M NaCl in 0.01 M HCl และ 2.0 M NaCl in 0.01 M HCl มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮพารินด้วยวิธี NMR Spectroscopy ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากและสามารถตรวจสอบได้ว่ามีไกลโคอะมิโนไกลแคนตัวอื่นๆปนมาหรือไม่และมีปริมาณเท่าใด(33) โดยพิจารณาจากสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏในตำแหน่งต่างๆ กันของไกลโคอะมิโนไกลแคนแต่ละชนิดซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีต่างกัน

การวิจัยนี้ได้นำสารเฮพารินมาตรฐานและสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนต่างๆ คือ สารไฮยาลูโรนิคแอซิด สารเดอร์มาแตนซัลเฟต และสารคอนดรอยตินซัลเฟต ไปวิเคราะห์เพื่อให้ได้ NMR สเปกตรัมมาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบกับสารที่สกัดได้ ผลการวิเคราะห์สารเฮพารินมาตรฐาน(ของบริษัท Sigma) แสดงดังรูปที่ 3.6

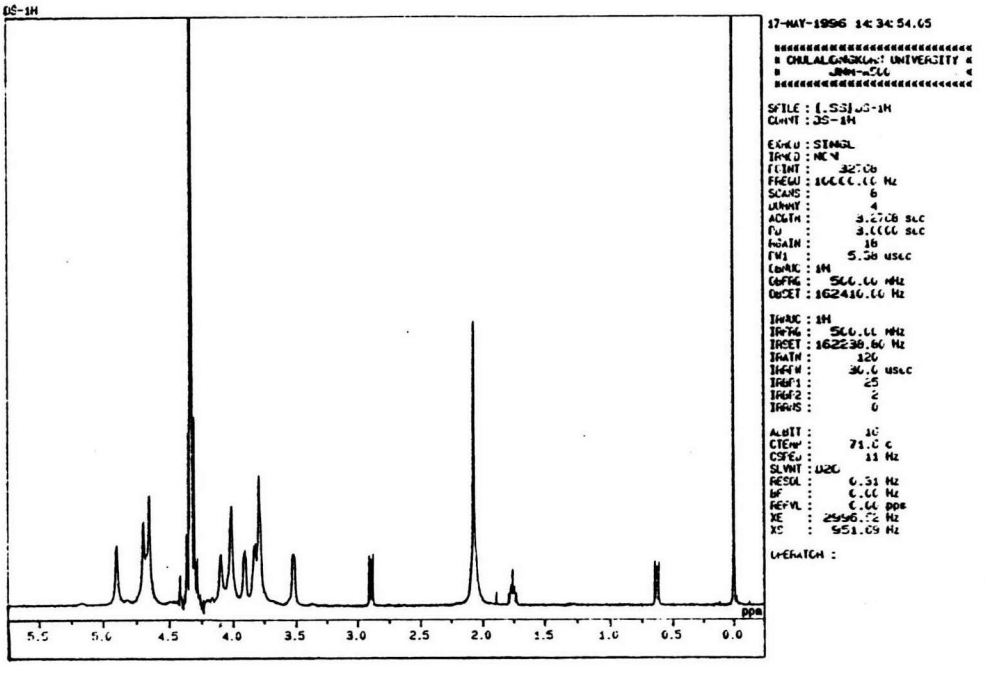


รูปที่ 3.6 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเฮพารินมาตรฐาน (ของบริษัท Sigma)ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 3.6 จะเห็นว่าสเปกตรัมของเฮพารินที่ได้จากการวิเคราะห์ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆดังนี้คือ หมู่ N-acetyl hexosamine ที่ตำแหน่ง 2.07 หมู่ L-iduronic acid ที่ตำแหน่ง 4.8 และ 5.2 และหมู่ N-sulfate glucosamine ที่ตำแหน่ง 5.4 ซึ่งตำแหน่งสัญญาณต่าง ๆดังกล่าวนี้สามารถใช้บ่งความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของสารไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่าง ๆได้และสามารถใช้ยืนยันว่าสารที่เตรียมได้มีโครงสร้างเป็นไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดใด



<u>รูปที่3.7</u> แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิด ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

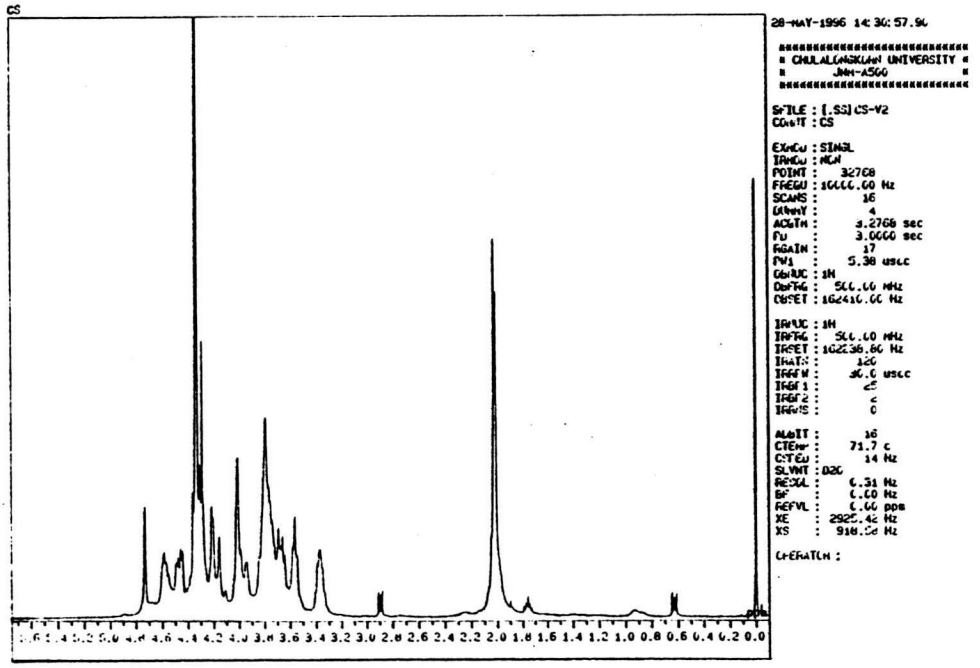


รูปที่ 3.8 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเดอร์มาแตนซัลเฟต ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

รูปที่ 3.7 แสดง NMR สเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิด เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิดกับของเฮพาริน(รูป3.6)จะเห็นได้ว่าไฮยาลูโรนิคไม่ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 4.8 5.2 และ 5.4 ซึ่งก็สอดคล้องกับการที่โครงสร้างของไฮยาลูโรนิคแอซิดไม่มีหมู่ L-iduronic acid และ N-acetyl glucosamine สำหรับ NMR สเปกตรัมของสารเดอร์มาแตนซัลเฟต(รูป3.8)นั้นจะเห็นว่าให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 4.8 (L-iduronic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างทางเคมีของเดอร์มาแตนซัลเฟตเช่นกัน) แต่ไม่ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 5.2 และ 5.4 (ไม่มีหมู่ N-acetyl glucosamine)

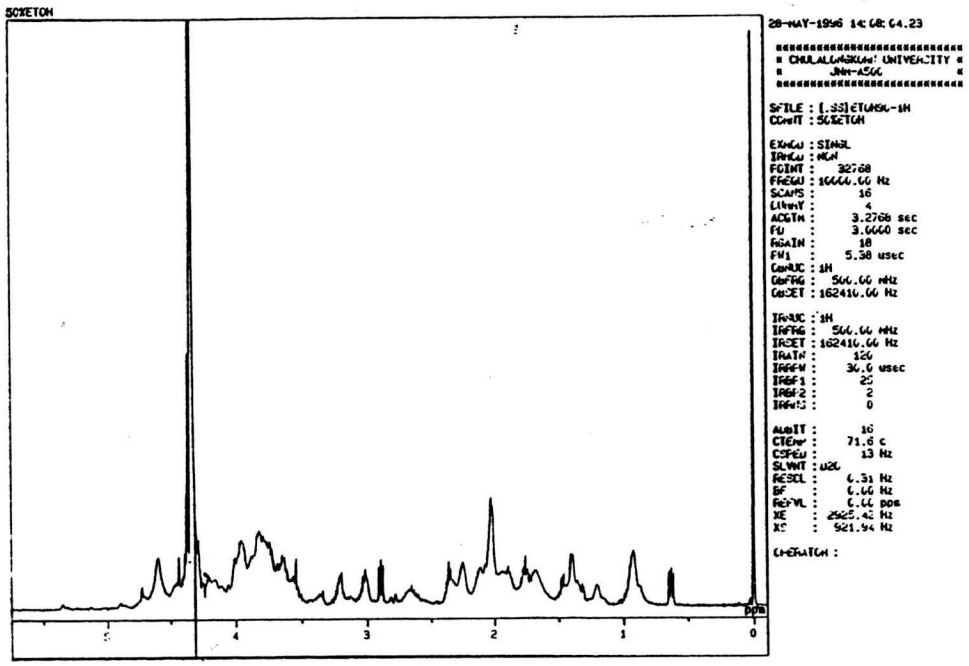
นอกจากนี้ตำแหน่งของสัญญาณเรโซแนนซ์ที่บอกความแตกต่างระหว่างเฮพารินและเดอร์มาแตนซัลเฟตได้ดีอีกตำแหน่งหนึ่ง คือ ที่ตำแหน่ง 2.10 (N-acetyl galactosamine ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างทางเคมีของเดอร์มาแตนซัลเฟตที่แตกต่างจากเฮพาริน)

รูปที่ 3.9 แสดง NMR สเปกตรัมของสารคอนดรอยตินซัลเฟตจะคล้ายคลึงกับสารเดอร์มาแตนซัลเฟต แตกต่างที่ไม่ให้สัญญาณที่ตำแหน่ง 4.8 (ไม่มีหมู่ L-iduronic acid)

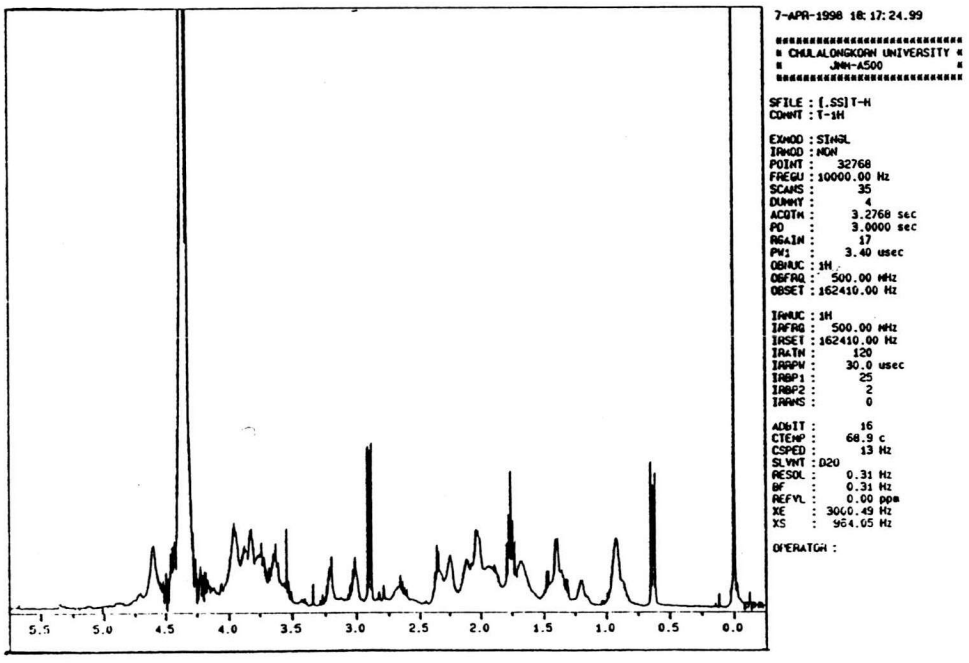


รูปที่ 3.9 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารคอนดรอยตินซัลเฟต ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

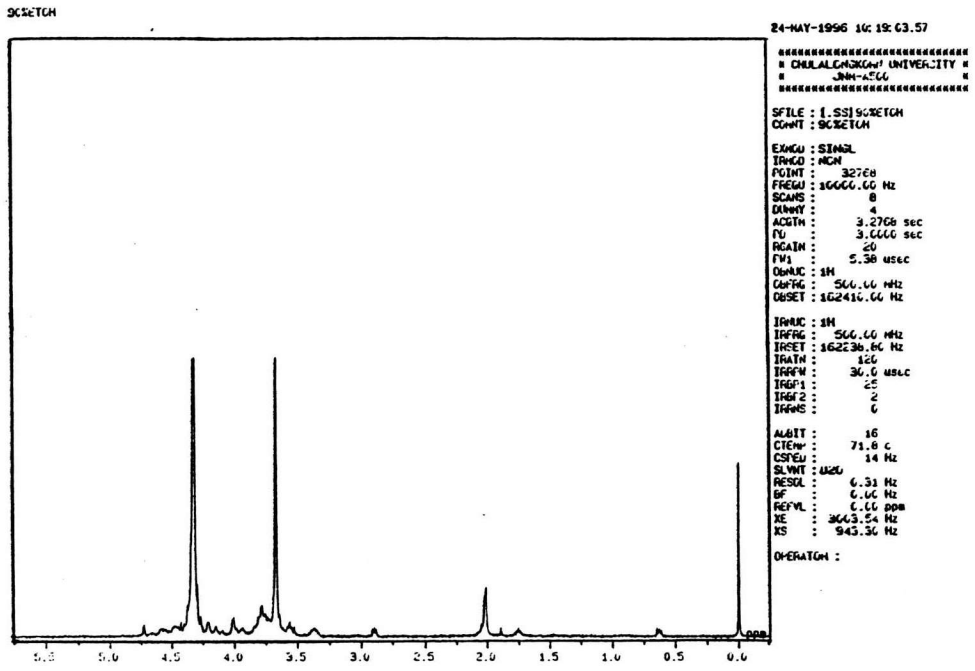
เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 3.6 ถึง 3.9 ข้างต้น จะเห็นว่า NMR สเปกตรัมของสารไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน และสามารถใช้ชี้เฉพาะว่าเป็นไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดใดได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำสารที่เตรียมได้ในขั้นตอนต่าง ๆไปวิเคราะห์หา NMR สเปกตรัมแล้วนำไปเปรียบเทียบกับ NMR สเปกตรัมของเฮพารินมาตรฐานและสารไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทอื่น ๆ NMR สเปกตรัมของสารที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอนแสดงไว้ในรูปที่ 3.10 ถึง 3.15



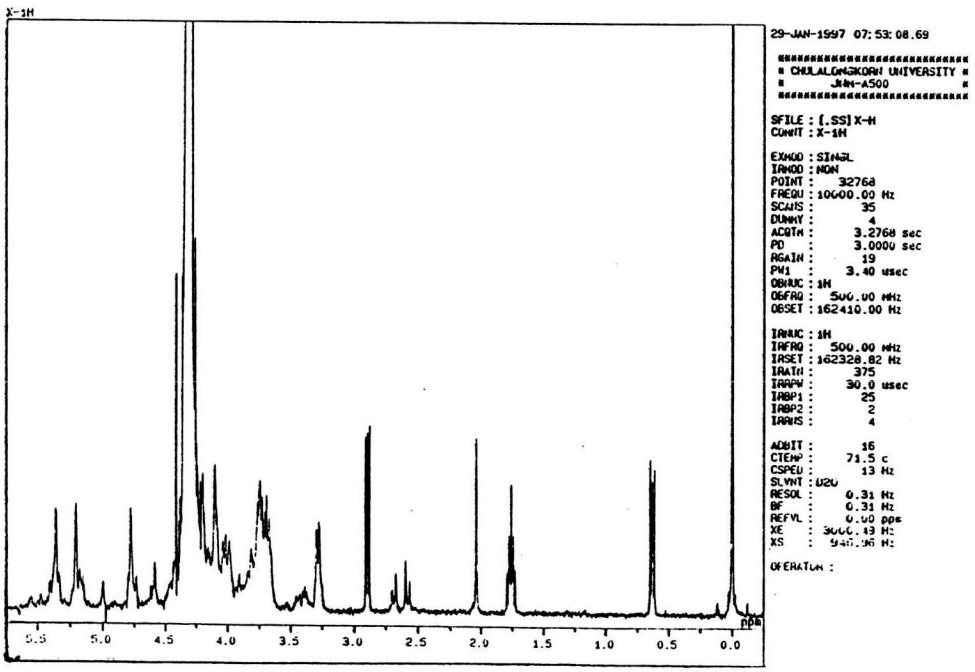
<u>รูปที่ 3.10</u> แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 50% ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



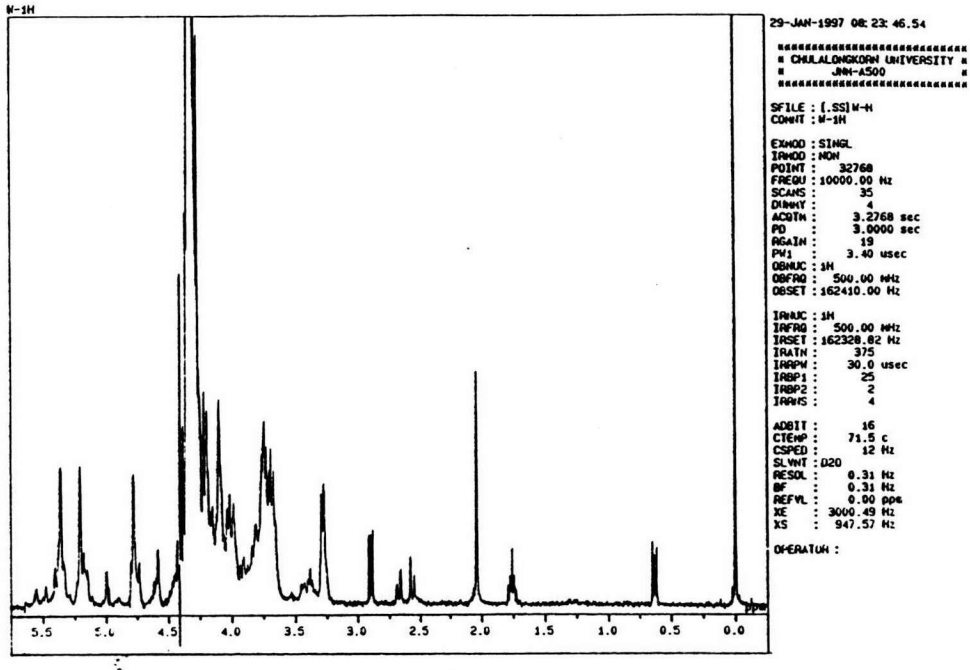
<u>รูปที่ 3.11</u> แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 83% ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



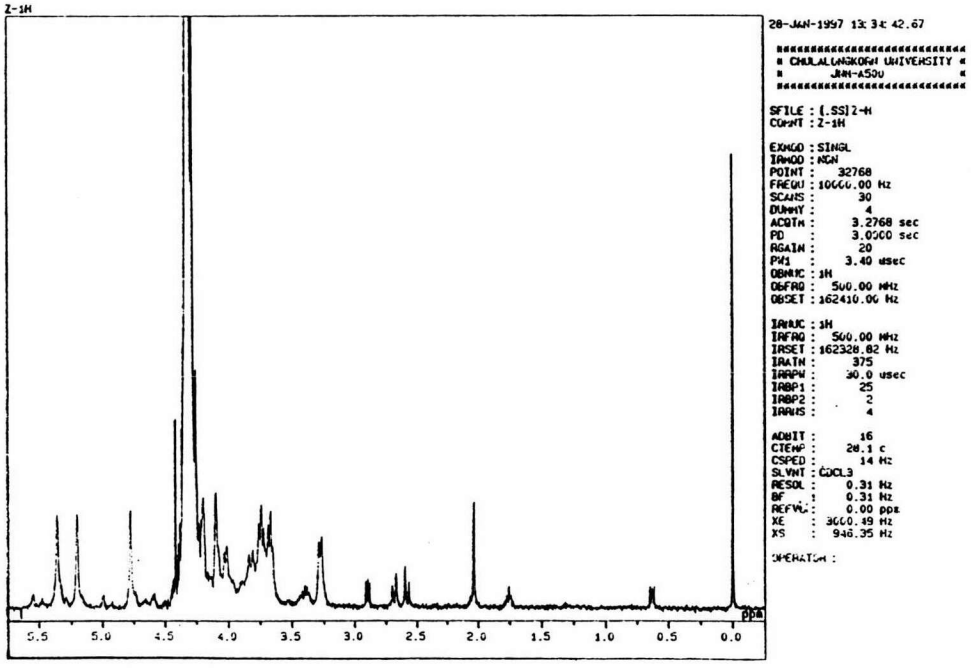
รูปที่ 3.12 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 90 % ที่ 500 MHz ใน D_2O อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.13 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 3.14 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

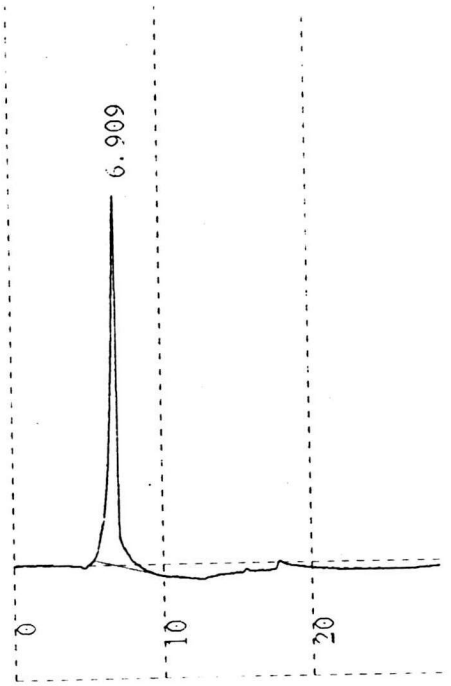


รูปที่ 3.15 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

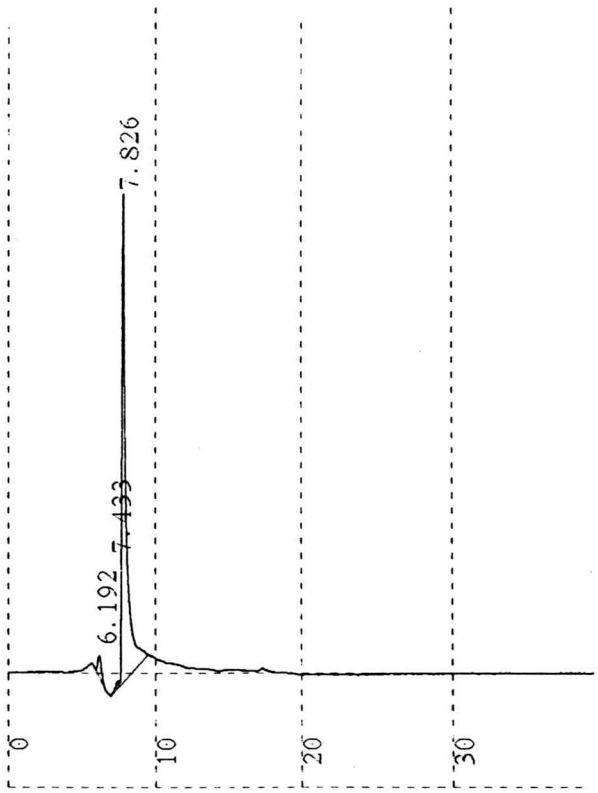
เมื่อพิจารณา NMR สเปกตรัมของสารที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นกับสเปกตรัมของเฮพารินมาตรฐาน ไฮยาลูโรนิคแอซิด เดอร์มาแตนซัลเฟต และ คอนดรอยตินซัลเฟต จะเห็นว่ารูปแบบของสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏของสารที่ได้จากการชะจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.25 M ใน HCl 0.01 M 1.50 M ใน HCl 0.01 M และ 2.0 M ใน HCl 0.01 M (รูปที่ 3.13-3.15) มีรูปแบบสเปกตรัมคล้ายคลึงกับของเฮพารินมาตรฐาน(รูปที่ 3.6)มากที่สุด ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงเป็นหลักฐานยืนยันได้ว่าสารที่ได้จากขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์ไอออนเอกซ์เชนจ์ PA-DEAE ทั้งสามส่วนมีโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับเฮพารินมาตรฐาน อย่างไรก็ตามคาดว่าจะมีความแตกต่างในด้านน้ำหนักโมเลกุลในสารทั้งสามส่วนนี้ ซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วพบว่าส่วนที่ให้ค่าต้านการแข็งตัวของเลือดมากที่สุดคือ ส่วนที่ชะด้วย 2.0 M NaCl ใน HCl 0.01 M

3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเฮพารินที่สกัดได้ด้วยคอลัมน์ Ultrahydrogel 250

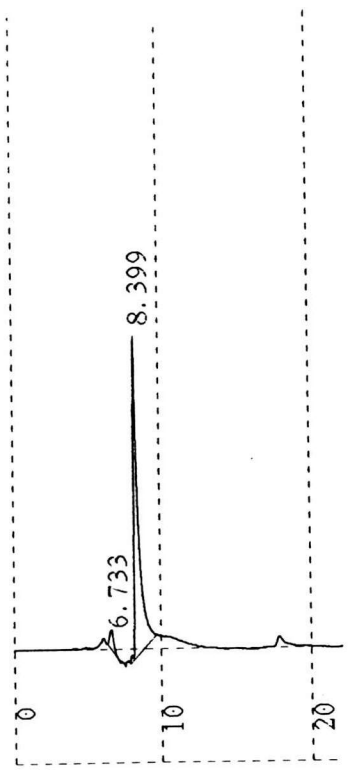
จากการนำสารมาตรฐานแต่ละชนิด คือ PEG 4,000 PEG 6,000 Dextran 8,000 และ Dextran 10,000 และจากการนำสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ผสมรวมกัน(อัตราส่วน 1:1:1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Ultrahydrogel 250(ของบริษัท Water Corporation,Massachusetts USA.) จากนั้นชะด้วยน้ำบริสุทธิ์ พบว่าสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลาต่างกันดังนี้ คือ สาร PEG 4,000 ถูกชะออกมาที่เวลา 6.35 นาที (รูปที่3.17) สาร PEG 6,000 ถูกชะออกมาที่เวลา 7.77 นาที (รูปที่ 3.18) สาร Dextran 8,000 ถูกชะออกมาที่เวลา 8.38 นาที (รูปที่ 3.19) สาร Dextran 10,000 ถูกชะออกมาที่ 10.01 นาที (รูปที่ 3.20) ส่วนโครมาโตรแกรมรูปที่ 3.21 แสดงผลของการวิเคราะห์สารผสมทั้งสี่ซึ่งจะเห็นว่าค่ารีเทนชันไทม์ (Retention Time) ของการวิเคราะห์สารทีละชนิดกับสารผสมมิได้ต่างกันมากนัก



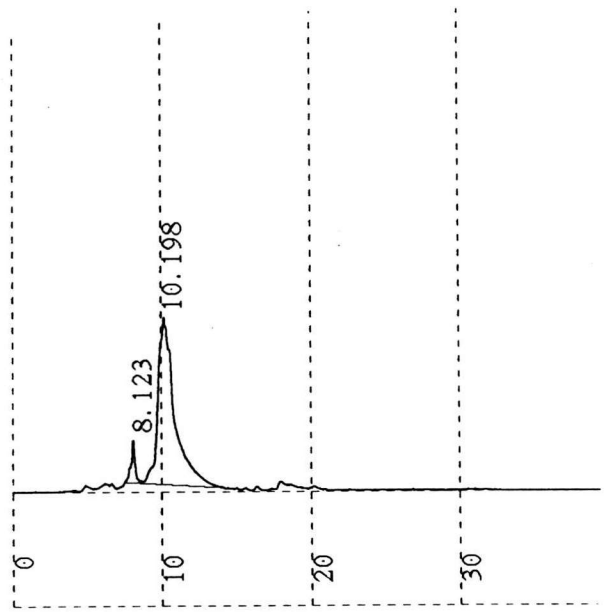
<u>รูปที่ 3.17</u> แสดงค่า Retention Time ของสาร PEG 4,000(MW. 4,000)



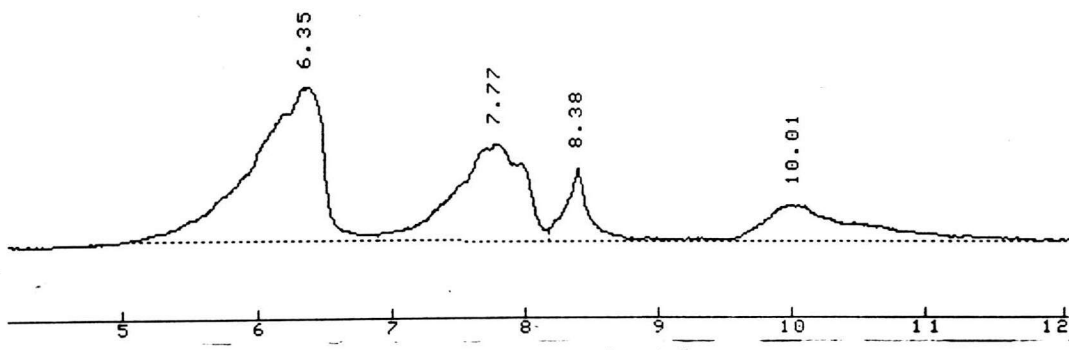
รูปที่ 3.18 แสดงค่า Retention time ของสาร PEG 6,000(MW. 6,000)



<u>รูปที่ 3.19</u> แสดงค่า Retention Time ของสาร Dextran 8,000(MW.8,000)

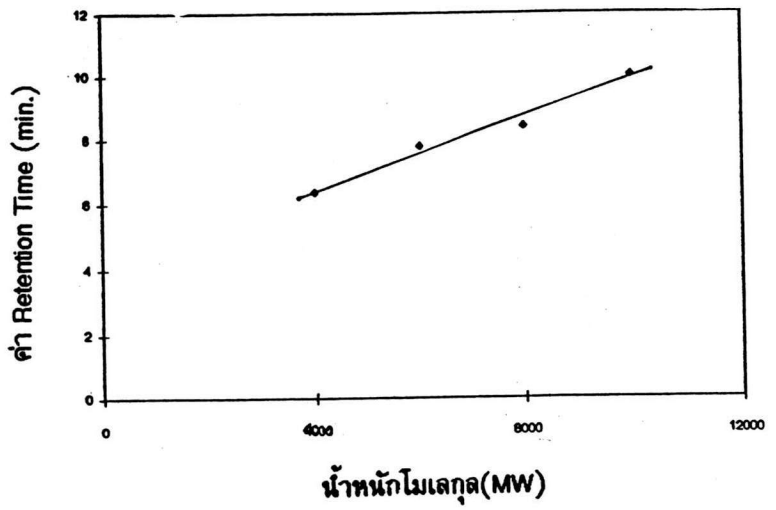


<u>รูปที่ 3.20</u> แสดงค่า Retention Time ของสาร Dextran 10,000(MW. 10,000)



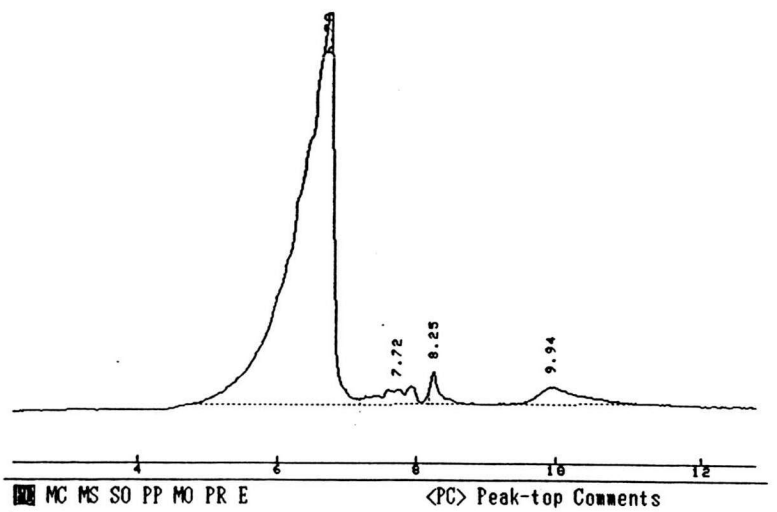
<u>รูปที่ 3.21</u> แสดงการแยกของสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ PEG 4,000 (A) PEG 6,000 (B) Dextran 8,000 (C) และ Dextran 10,000 (D) ที่เวลาต่างๆกัน

เมื่อนำค่า Retention Time ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดที่ผสมทั้งสี่สาร (จากรูปที่ 3.21)มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสารกับค่า Retention Time จะได้กราฟดังรูปที่ 3.22



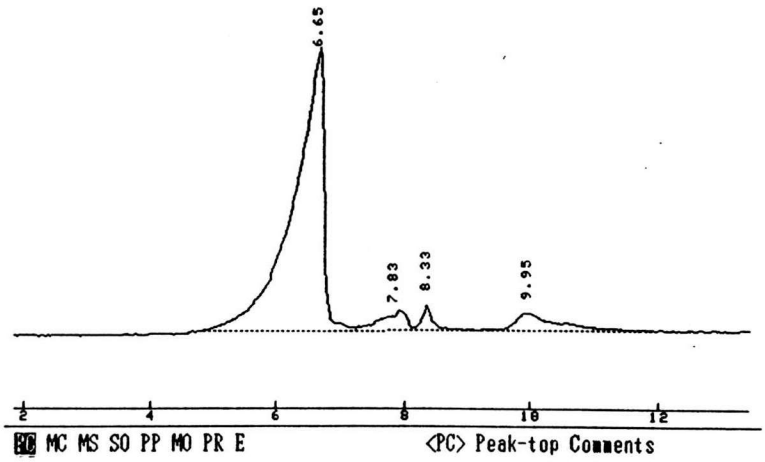
รูปที่3.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสาร กับค่า Retention Time

ผลการนำเฮพารินที่เตรียมได้(สารส่วนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ PA-DEAE ในขั้นตอนการที่ชะสารด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริค(0.01 โมลาร์)เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ซึ่งเป็นส่วนสกัดที่ให้แอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด) ผสมรวมกับสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด และนำไปผ่านคอลัมน์อัลทราไฮโดรเจล 250 ได้ผลโครมาโตรแกรม ดังแสดงในรูปที่ 3.23



รูปที่ 3.23 แสดงค่า Retention Time ของสารเฮพารินที่สกัดได้ และสารมาตรฐาน 4 ชนิด

จากรูปที่ 3.23 จะเห็นว่าเฮพารินที่สกัดได้ถูกชะออกมาที่เวลา 6.70 นาที เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ 3.22 พบว่าเฮพารินที่สกัดได้นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,500 ดาลตัน เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยใช้เฮพารินมาตรฐานของบริษัท Sigma ได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 3.24 ซึ่งจะเห็นว่าค่า Retention Time ของเฮพารินมาตรฐานอยู่ที่ 6.65 นาที ซึ่งใกล้เคียงมากกับเฮพารินที่สกัดได้จากการวิจัยนี้ อนึ่งการที่ผสมสารมาตรฐานทั้งสี่ลงไปในการวิเคราะห์เฮพารินด้วยก็เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการคลาดเคลื่อนของค่า Retention Time ของสารทั้งสี่



รูปที่ 3.24 แสดงการแยกสารเฮพารินมาตรฐานที่ผสมรวมกับสารมาตรฐาน 4 ชนิด

3.8 การวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000)

การวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยยืนยันว่าสารที่สกัดได้นั้นเป็นเฮพารินโดยอาศัยการเปรียบเทียบอัตราส่วน N/C/H/S ระหว่างสารที่สกัดได้กับเฮพารินมาตรฐาน

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) = สารเฮพารินมาตรฐานของบริษัท Sigma

HEP(Leo) = สารเฮพารินมาตรฐานของบริษัท 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) จะเห็นว่าเฮพารินมาตรฐานของบริษัท Sigma และ Leo มีปริมาณ S 27.9 % และ 36.5 % ตามลำดับ ส่วนสารเฮพารินที่เตรียมได้ (Z) มีปริมาณ S 37.2 % ซึ่งใกล้เคียงกับเฮพารินมาตรฐานและหากพิจารณาอัตราส่วนของ N/C/H/S ระหว่างสาร Z และเฮพารินมาตรฐานจากทั้ง 2 บริษัทแล้วก็จะพบว่ามีอัตราส่วนใกล้เคียงกันด้วย ผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Jaques ในปี ค.ศ. 1980 (34) โดยได้ทำการวิเคราะห์เฮพารินที่ผลิตขายทั่วไปในท้องตลาดที่มีวิธีการเตรียมเหมือนกันและแตกต่างกันในช่วงปี ค.ศ. 1940-1972 ซึ่งพบว่าเฮพารินจะมีปริมาณ S เป็นองค์ประกอบ 19.0%-38.7% โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ธาตุนี้ยังสอดคล้องกับค่าปริมาณ S ที่แสดงไว้ใน British Phamacopoeia ปี 1933 (30) และ European Drug Index ปี 1922 (35) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าเฮพารินจะมีปริมาณ S ไม่ต่ำกว่า 10 % โดยน้ำหนัก(วิเคราะห์หาปริมาณธาตุ S ด้วยวิธี Oxygen-flash combustion)

3.9 การหาปริมาณเฮกโซซามีนของเฮพารินที่สกัดได้โดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan)

นำเฮพารินที่สกัดได้วิเคราะห์หาปริมาณเฮกโซซามีนโดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกนตามวิธีการในข้อ 2.4.7 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเฮกโซซามีนที่เป็นองค์ประกอบของเฮพารินที่เตรียมได้กับเฮพารินมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.8 พบว่าเฮพารินที่เตรียมได้มีปริมาณเฮกโซซามีนใกล้เคียงกับเฮพารินมาตรฐาน

ตารางที่ 3.8 แสดงค่าปริมาณเฮกโซซามีนที่มีอยู่ในเฮพารินมาตรฐานและเฮพารินที่สกัดได้

สาร	ปริมาณเฮกโซซามีน (% โดยน้ำหนัก)
เฮพารินมาตรฐาน	23.8±.06
เฮพารินที่สกัดได้	22.3±.09