การสกัดเฮพารินจากปอดสุกร

นางสาวทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-408-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20607297X

EXTRACTION OF HEPARIN FROM PORCINE LUNG

Miss Tiphawan Wongwiwithakul

Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-635-408-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดเฮพารินจากปอดสุกร
โดย	นางสาว ทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ศุภศร พัฒนอักษร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

.....

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. ศุภศร พัฒนอักษร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล:การสกัดเฮพารินจากปอดสุกร(EXTRACTION OF HEPARIN FROM PORCINE LUNG)อ.ที่ปรึกษา อ.ดร.ศุภศร พัฒนอักษร,อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร.อมร เพชรสม 83 หน้า. ISBN 974-635-408-6

กระบวนการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกรประกอบด้วย 1)การออโตไลซิสเนื้อเยื่อ 2)การย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์นิวเทรส 3)การตกตะกอนสารเจือปนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค 4)การกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตันด้วยวิธีอัลทราฟิลเทรชัน 5)การตกตะกอนลำดับส่วนไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่างๆที่เจือปนรวมทั้งเฮพารินด้วยสารละลายเอธานอลในน้ำ และ 6)การทำเฮพารินที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี พบว่าเฮพารินที่ได้มีค่าต่อต้านการแข็งตัวของเลือดแบบแอนตีแฟกเตอร์เทนเอ(Anti Factor Xa)เท่ากับ 143.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ด้วยกระบวนการนี้สามารถสกัดเฮพารินได้ 18.20 มิลลิกรัม (2,606.42ยูนิต) จากเนื้อเยื่อปอดสุกร 1 กิโลกรัม (น้ำหนักเปียก) นอกจากนั้นได้ทำการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของเฮพารินที่สกัดได้โดยวิธีนิวเคลียร์แมคเนติคเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีและวิเคราะห์อัตราส่วนองค์ประกอบธาตุ พบว่ามีไนโตรเจน 4.63 % คาร์บอน 48.86 % ไฮโดรเจน 9.31% และซัลเฟอร์ 37.20% และจากการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีไซส์เอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟีพบว่าเฮพารินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 4,500 ดาลตัน

ภาควิชา – ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626964 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: GLYCOSAMINOGLYCANS/HEPARIN PREPARATION/HEPARIN PURIFICATION

TIPHAWAN WONGWIWITHAKUL: EXTRACTION OF HEPARIN FROM PORCINE LUNG. THESIS ADVISOR: SUPASON PATTANAARGSON, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D. 83 pp. ISBN 974-635-408-6

The extraction and purification processes of heparin from porcine lung consist of 1) tissue autolysis 2) tissue digestion by Neutrase enzyme 3) precipitation of impurities with trichloroacetic acid 4) removal of molecules with molecular 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 purified 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.

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. ศุภศร พัฒนอักษร ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อแนะนำและช่วยเหลืออย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและแนวคิดอันมีค่ายิ่งต่อการทำวิจัยตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณาให้คำแนะนำและจัดหาเอนไซม์สำหรับใช้ในการวิจัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมี ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวลัยลักษณ์ เหล่าสินชัย คุณศรินทิพย์ อานามนาถ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง คุณเลอศักดิ์ พร้อมสงฆ์ และนักวิจัยของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายช่างเทคนิค และเจ้าหน้าที่ธุรการประจำสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้ความรักและความเข้าใจผู้วิจัยเสมอ ซึ่งเป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่งต่อผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อนๆและน้องๆ Biotech ชาวสถาบันทุกคนที่เป็นกำลังใจให้เสมอ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ พี่สาว น้องสาว เพื่อนกลุ่มเกษตร KU. 47 ทุกคน และคุณอาภรณ์ ธีรมงคลรัศมี ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฎ
สารบัญรูป.....ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ณ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วิธีการทดลอง.....13
2.1อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....13
2.2เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....14
2.3เนื้อเยื่อสัตว์.....15
2.4การสกัดเฮพารินจากปอดสุกร.....16
2.4.1การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด.....17
2.4.1.1การเตรียมเนื้อเยื่อปอดก่อนนำไป
ออโตไลซ์.....17
2.4.1.2การออโตไลซ์เนื้อเยื่อปอด.....17
2.4.2การย่อยเนื้อเยื่อเพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสาย
เฮพารินออกด้วยโปรติเอส.....17
2.4.2.1การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงาน
ของเอนไซม์.....17
2.4.2.1.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อ
การทำงานของเอนไซม์แพนครีเอทิน.....18
2.4.2.1.2 การศึกษาผลของโทลูอีนต่อ
การทำงานของเอนไซมนิวเทรส.....18

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.2.2 การศึกษากรรมวิธีการเติมโปรติเอส.....19
2.4.2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยเนื้อเยื่อเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินของเอนไซม์แพนครีเอทินและนิวเทรส.....19
2.4.2.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....19
2.4.2.3.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....21
2.4.2.4การย่อยเนื้อเยื่อปอดเพื่อสลายโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินด้วยเอนไซม์นิวเทรส.....22
2.4.3การแยกเฮพารินหลังการย่อย.....22
2.4.4การทำเฮพารินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบใช้ความดันสูง(High Performance Liquid Chromatography:HPLC)ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี (PA-DEAE column).....24
2.4.5การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮพารินโดยวิธีคาร์บาโซล (Carbazole method).....25
2.4.6การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเฮพารินในการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอด้วยชุดทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ.....27
2.4.7การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮพารินโดยการหาปริมาณเฮกโซซามีนโดยวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan).....28
2.4.8 การหาน้ำหนักแห้ง.....31

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮพารินที่สกัดได้โดยวิธีนิวเคลียร์แมคเนติคเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR Spectroscopy).....31
2.4.10 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเฮพารินที่สกัดได้โดยวิธี HPLC.....31
2.4.11 การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน(N) คาร์บอน(C) ไฮโดรเจน(H) และ ซัลเฟอร์(S)โดยวิธี Elemental Analyzer (NA 2000).....32

3.ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....33
3.1 การศึกษาผลของโทลูอีนที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส.....33
3.2 ผลของนิวเทรสในการปลดปล่อยเฮพารินจากเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบการย่อยในรูปเนื้อเยื่อแขวนลอย ส่วนน้ำใสจากการออโตไลซิส และกากเนื้อเยื่อ.....35
3.3 การศึกษาหาความเข้มข้นของโปรติเอสที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการย่อยด้วยโปรติเอส.....37
3.3.1การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แพนครีเอทินเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....37
3.3.2การหาความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์แพนครีเอทิน(Pancreatin).....38
3.3.3การทดลองแปรระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวเทรสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....40
3.3.4การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์นิวเทรส (Neutrase).....41
3.4 การทำเฮพารินที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์โดยการกรองร่วมกับวิธีอัลทราฟิลเทรชัน.....44

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.5 การแยกเฮพารินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี
แบบใช้ความดันสูง(HPLC) ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี...45
3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเฮพารินที่สกัดได้ด้วย
วิธี NMR Spectroscopy.....49
3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเฮพารินที่สกัดได้ด้วยคอลัมน์
Ultrahydrogel 250.....57
3.8 การวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยวิธี Elemental
Analyzer (NA 2000).....64
3.9 การหาปริมาณเฮกโซซามีนของเฮพารินที่สกัดได้โดยวิธี
ของเอลสัน-มอร์แกน(Elson-Morgan).....65

4.สรุปผลการทดลอง.....66
รายการอ้างอิง.....68
ภาคผนวก.....71
ประวัติผู้เขียน.....83

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1.1 แสดงความสามารถการละลายได้ของเฮพารินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส.....5
1.2 แสดงชื่อผู้วิจัย ชนิดของเนื้อเยื่อ ขั้นตอนหลักในการสกัดเฮพาริน ปริมาณและแอคติวิตีจำเพาะ(Specific activity)ของเฮพาริน ที่สกัดได้.....8
2.1 แสดงเครื่องมือ รุ่น และบริษัทผู้ผลิตที่ใช้ในการทดลอง.....13
2.2 แสดงรายชื่อเคมีภัณฑ์และบริษัทผู้ผลิต.....14
2.3 แสดงปริมาตรสารละลายที่เติมลงในหลอดทดลอง.....18
2.4 แสดงปริมาณและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดลองในการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา.....20
2.5 แสดงปริมาณและปริมาตรสารต่าง ๆ ที่เติมลงในหลอดทดลองในการทดลองหาความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของเอนไซม์นิวเทรส.....21
2.6 แสดงปริมาณและปริมาตรสารที่เติมลงในหลอดทดสอบตามลำดับ.....27
2.7 แสดงปริมาตรของสารต่าง ๆ ในการเตรียมสารละลายเฮพาริน.....28
2.8 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์และปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮกโซซามีนโดยวิธีเอลสัน-มอร์แกน.....29
2.9 แสดงปริมาตรต่าง ๆ ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ D-glucosamine-HCl.....30
3.1 แสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินเมื่อมีการเติมโทลูอีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....34
3.2 แสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรสเมื่อมีการเติมโทลูอีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....34
3.3 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay จากการย่อยเนื้อเยื่อสารแขวนลอย สารละลายใสจากสารแขวนลอยเนื้อเยื่อและกากเนื้อเยื่อที่กรองเอาสารละลายใสออกไป.....36

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่

3.4 แสดงขั้นตอนการทำเฮพารินให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนและวิธีอัลทราฟิลเทรชัน....44
3.5 แสดงปริมาณของไกลโคอะมิโนไกลแคนและแอนตีแฟกเตอร์เทนเอ (Anti Factor Xa activity) ของสารส่วนต่างๆ....47
3.6 แสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay และ ค่าแอคติวิตีของเฮพารินที่สกัดได้....48
3.7 แสดงผลการวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S โดยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000)....64
3.8 แสดงค่าปริมาณเฮกโซซามีนที่มีอยู่ในเฮพารินมาตรฐานและเฮพารินที่สกัดได้....65

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1.1 แสดงโครงสร้างทั่วไปของเฮพาริน....2
1.2 แสดงโครงสร้างสารประกอบในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคน....4
1.3 แสดงกระบวนการแข็งตัวของเลือด(Blood Coagulation)....6
2.1 แสดงขั้นตอนทั้งหมดในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกร ของงานวิจัยนี้....16
2.2 แสดงขั้นตอนการแยกสารเฮพารินจากสารละลายหลังการย่อย....23
3.1 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่าง ๆด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินต่าง ๆ....38
3.2 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ(เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง)ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์แพนครีเอทินและระยะเวลาของการทำปฏิกริยาต่าง ๆ....39
3.3 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่าง ๆด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์นิวเทรส....40
3.4 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ของสารละลายที่ได้จากการย่อยสารแขวนลอยเนื้อเยื่อ(เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง)ด้วยความเข้มข้นต่าง ๆของเอนไซม์นิวเทรสและระยะเวลาของการทำปฏิกริยาต่าง ๆ....42
3.5 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....46
3.6 แสดง ^1H NMR สเปคตรัมของสารเฮพารินมาตรฐาน ที่ 500 MHz อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส....49

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่

3.7 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารไฮยาลูโรนิคแอซิด ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....50
3.8 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเดอร์มาแตนซัลเฟต ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....51
3.9 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารคอนดรอยตินซัลเฟต ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....52
3.10 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 50 % ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....53
3.11 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 83 % ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....53
3.12 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารส่วนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 90 % ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....54
3.13 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.25 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....54
3.14 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารส่วนที่ได้จากการชะสารจากคอลัมน์ PA-DEAE ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.50 M ใน HCl 0.01 M ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....55
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.....55

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่

3.16 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเฮพารินมาตรฐาน (รูปที่ 3.6) เปรียบเทียบกับสารที่เตรียมได้(รูปที่ 3.15) ที่ 500 MHz ใน D_2O ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส.....56

3.17 แสดงค่า Retention Time ของสาร PEG 4,000 (MW. 4,000).....57

3.18 แสดงค่า Retention Time ของสาร PEG 6,000 (MW. 6,000).....58

3.19 แสดงค่า Retention Time ของสาร Dextran 8,000 (MW. 8,000).....59

3.20 แสดงค่า Retention Time ของสาร Dextran 10,000 (MW. 10,000).....60

3.21 แสดงการแยกของสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ PEG 4,000 (A) PEG 6,000 (B) Dextran 8,000 (C) และ Dextran 10,000 (D) ที่เวลาต่างๆกัน.....61

3.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสารกับค่าRetention Time.....62

3.23 แสดงค่า Retention Time ของสารเฮพารินที่สกัดได้และสารมาตรฐาน 4 ชนิด.....62

3.24 แสดงการแยกสารเฮพารินมาตรฐานที่ผสมรวมกับสารมาตรฐาน 4 ชนิด.....63

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
HPLC	=	ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
กก.	=	กิโลกรัม
PA-DEAE	=	Polyacrylate-Diethylaminoethyl