บทที่ 1

บทนำ

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

เฮพารินที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ ส่วนใหญ่ผลิตจากเนื้อเยื่อลำไส้สุกร ปอดสุกร ลำไส้วัวและปอดวัว อย่างไรก็ตามสำหรับประเทศไทยนั้นเฮพารินที่ใช้ทั้งหมดล้วนนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และอิตาลี เป็นต้น เนื่องจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเฮพารินสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย จึงควรที่จะมีการค้นคว้าศึกษาหาวิธีการผลิตเฮพารินจากแหล่งวัตถุดิบในประเทศ

<u>ประวัติการค้นพบ</u>

ในปี ค.ศ. 1916 นักศึกษาแพทย์นาม Mc lean ผู้ซึ่งกำลังค้นคว้าหาตัวยาที่ช่วยทำให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้นได้ พบสารที่มีฤทธิ์ตรงกันข้ามกับสารที่ต้องการหา คือ พบสารที่มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด (2) และในปี ค.ศ. 1918 Howell ได้ให้ชื่อสารนี้ว่า เฮพาริน เนื่องจากสารนี้สกัดได้จากตับ (3) ต่อมาเมื่อ Charles และ Scott ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้เฮพารินในปริมาณที่สูงขึ้น (4) จึงได้เริ่มมีการผลิตเฮพารินในทางอุตสาหกรรมขึ้นเป็นครั้งแรกโดยสกัดจากตับสุนัข หลังจากนั้นมาได้มีการทดลองสกัดจากเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นๆ เช่น หัวใจ ปอด และ ลำไส้ เป็นต้น

ปี ค.ศ. 1935 ได้มีการนำเฮพารินมาใช้เป็นสารป้องกันและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเพื่อรักษาการอุดตันของหลอดเลือด ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดภายหลังการผ่าตัด ซึ่งประสบผลสำเร็จและเป็นที่ยอมรับอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันยังคงมีการใช้เฮพารินกันอย่างแพร่หลายในโรงพยาบาลต่างๆทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยด้วย (5)

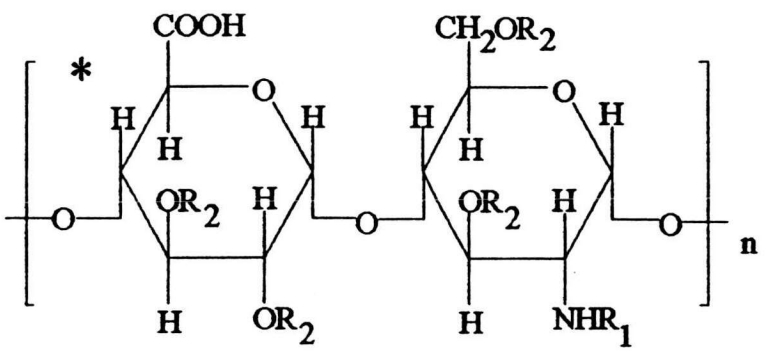
<u>แหล่งที่พบเฮพาริน</u>

เฮพารินพบทั่วไปในเบโซฟิลิกกรานูล (basophillic granules) ของแมสท์เซลล์ (mast cell) ในเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (6)พบมากที่ตับ ปอด และผนังเส้นเลือดแดงใหญ่ เฮพารินถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของโปรติโอไกลแคน (สารประกอบของโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์) สายเฮพารินเป็นพอลิแซคคาไรด์ประเภทไกลโคอะมิโนไกลแคน* ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ส่วนของสายเฮพารินที่เกาะกับโปรตีนในรูปของโปรติโอไกลแคนซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60,000 ถึง 100,000 ดาลตัน แต่เฮพารินดังกล่าวจะถูกเอนไซม์ไกลโคซิเดสย่อยให้สั้นลงจนมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 13,000 ดาลตัน (7)

<u>โครงสร้างทางเคมี</u>

เฮพารินเป็นไกลโคอะมิโนไกลแคน (8) ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย uronic acid residues และ 2-amino-deoxy-D-glucose residue (หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glucosamine) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (α) 1→4 เป็นสายโซ่ยาว ดังแสดงในรูปที่ 1.1

<u>รูปที่ 1.1</u> โครงสร้างทั่วไปของเฮพาริน



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

---

*ไกลโคอะมิโนไกลแคน หมายถึง สารประกอบระหว่างโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ซึ่งมีสัดส่วนของพอลิแซคคาไรด์สูงกว่า

สารประกอบในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคน นอกจากเฮพารินแล้วยังมีสารประเภทอื่นๆอีก ดังนี้

1) กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) พบได้ในสารวุ้นสายสะดือ (wharton's jelly from umbilical cord) และพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อยึดต่อของร่างกาย ในน้ำหล่อลื่นลูกตา (vitreous fluid) และในน้ำกระดูกไขสันหลัง (synovial fluid) กรดไฮยาลูโรนิกเป็นพอลิเมอร์ของหน่วยไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย D-glucuronic acid และ D-glucosamine ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (β) 1→3

2) คอนดรอยติน (Chondroitin) เป็นพอลิเมอร์ของหน่วยไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย D-glucuronic acid และ N-acetyl-D-galactosamine ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (β) 1→3 ต่างกับกรดไฮยาลูโรนิคตรงที่มีกาแลคโตซามีนแทนที่จะเป็นกลูโคซามีน

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

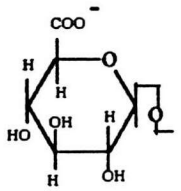
4) เคอราแตนซัลเฟต (Keratan sulfate) เป็นพอลิเมอร์ของหน่วยไดแซคคาไรด์ N-acetylglucosamine sulfate และ galactose โดยไม่มีกรดยูโรนิก (uronic acid)อยู่เหมือนกับไกลโคอะมิโนไกลแคนกลุ่มอื่นๆ

5) เฮพาแรนซัลเฟต (Heparan sulfate)มีโครงสร้างและองค์ประกอบคล้ายกับเฮพารินแต่สามารถบอกความแตกต่างได้ที่ปริมาณ N-sulfate เฮพารินมีปริมาณ N-sulfate มากกว่าของเฮพาแรนซัลเฟต

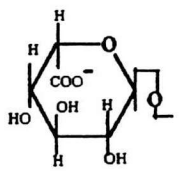
สารประกอบที่กล่าวมาทั้งหมดนี้พบได้ในเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกายแต่จะพบมากในเนื้อเยื่อยึดเหนี่ยว เช่น กระดูกอ่อน เอ็น ผิวหนัง เป็นต้น โครงสร้างทางเคมีของไกลโคอะมิโนไกลแคนกลุ่มต่างๆแสดงอยู่ในรูปที่ 1.2

---

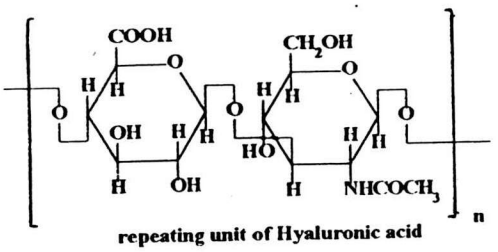
* แสดงโครงสร้างทางเคมีของ D-glucuronic acid และ L-iduronic acid



D-glucuronic acid

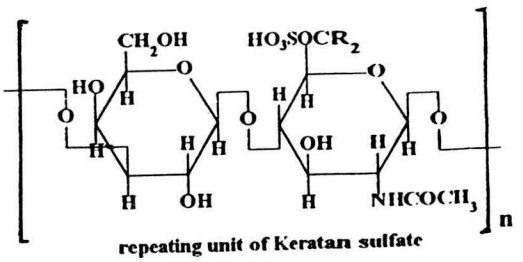


L-iduronic acid



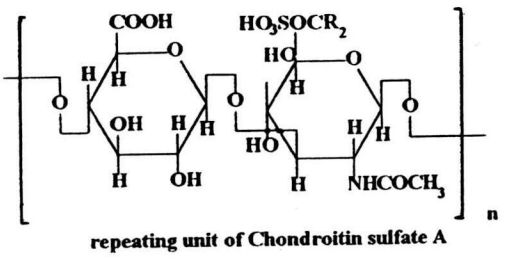
repeating unit of Hyaluronic acid

ก)



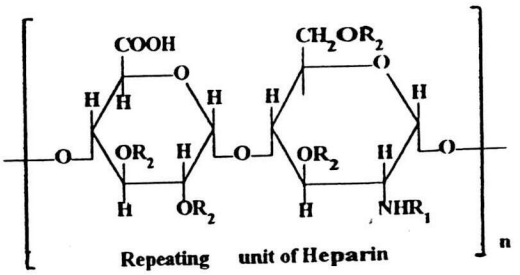
repeating unit of Keratan sulfate

ง)



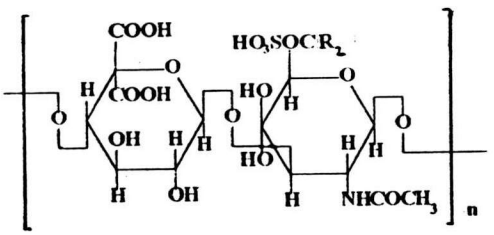
repeating unit of Chondroitin sulfate A

ข)



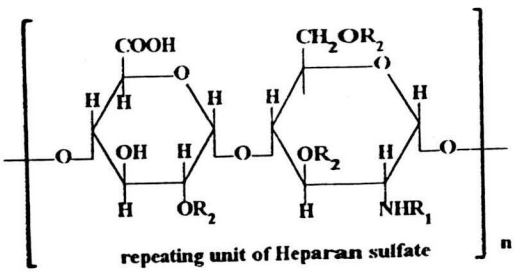
Repeating unit of Heparin

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) เฮพาริน ฉ) เฮพาแรนซัลเฟต

สมบัติของเฮพาริน

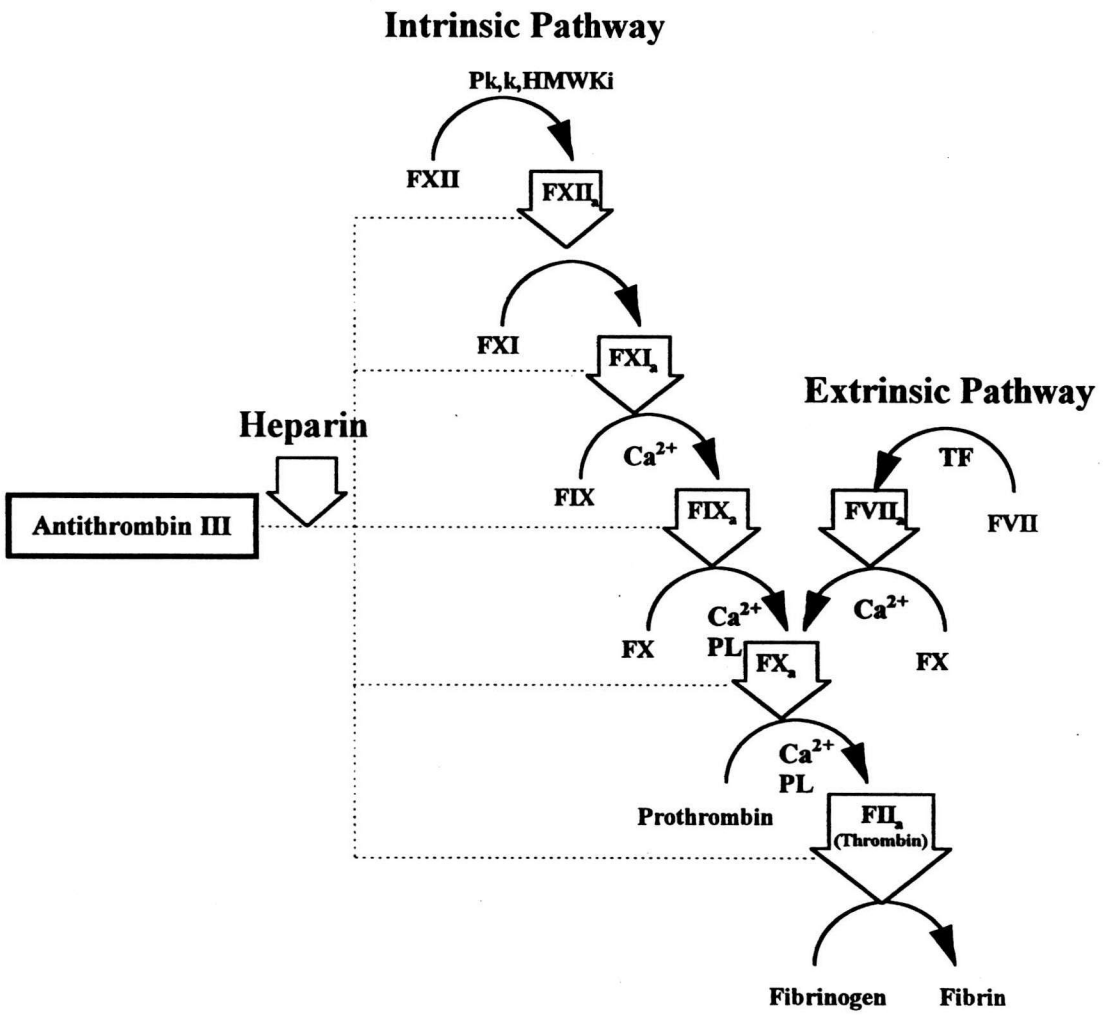
1) ความสามารถในการละลาย พอจะกล่าวได้ว่าตัวทำละลายที่ดีของเฮพาริน แทบจะไม่มีเลย เฮพารินในรูปของเกลือโซเดียมละลายได้อย่างช้าๆในน้ำ และถือได้ว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดของเฮพาริน แสดงความสามารถการละลายได้ของเฮพารินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 1.1 เฮพารินไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหลายแต่พบว่าละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม (9,10)

ตารางที่ 1.1 แสดงความสามารถการละลายได้ของเฮพารินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (9)

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

2) ความสามารถในการต้านการแข็งตัวของเลือด เฮพารินมีสมบัติเป็นสารที่ต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) โดยเป็นตัวเร่ง (catalyst) ในปฏิกิริยาระหว่างแอนตีทรอมบินทรี (Antithrombin III) กับ Coagulation factors ต่างๆของกระบวนการแข็งตัวของเลือด (ดูแผนภาพในรูปที่1.3) เฮพารินสามารถทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดได้เร็วกว่าปกติ 1000 - 2000 เท่า ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเฮพาริน (11) นอกจากนี้เฮพารินยังมีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vasodilating effect) และมีฤทธิ์ลดไขมันในกระแสเลือด(Antipelmic) ด้วยสมบัติดังกล่าวนี้ของเฮพารินจึงมีการนำเฮพารินไปใช้เพื่อลดไขมันในหลอดเลือดในสภาวะเส้นเลือดตีบแข็ง และมีไขมันในเลือดสูง โดยจะให้เฮพารินแก่คนไข้ด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Intrasubcutaneous) หรือผสมกับน้ำเกลือให้ทางหลอดเลือดดำ (Intravascular) ถ้าให้โดยการรับประทานจะไม่ออกฤทธิ์เพราะถูกทำลายได้โดยกรดในกระเพาะอาหาร (12,13)

แสดงกระบวนการแข็งตัวของเลือด (Blood Coagulation)



สัญลักษณ์ "a" แสดง factor ในรูป Active

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

ประวัติการสกัดเฮพาริน

โดยทั่วไปเฮพารินอยู่ในรูปโปรติโอไกลแคนในเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ ดังนั้นในกระบวนการสกัดแยกเฮพารินจำเป็นต้องผ่านการย่อย เพื่อให้เฮพารินที่เกาะกับโปรตีนในรูปของโปรติโอไกลแคนหลุดจากโปรตีนก่อน ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยสารละลายด่างหรือกรด (4) หรือด้วยโปรติเอส (Protease) ชนิดต่างๆ เช่น พาเพน (papain) โบรมีเลน (bromelain) หรือแพนครีเอทิน (pancreatin) เป็นต้น วิธีการใช้โปรติเอสในขั้นตอนการย่อยเป็นวิธีที่นิยมใช้ในกระบวนการสกัดเฮพารินในอุตสาหกรรม (14-16) เนื่องจากไม่ทำให้แอคติวิตีของเฮพารินเสียไปเพราะโดยทั่วไปโปรติเอสไม่มีผลต่อพอลิแซคคาไรด์ (17)และจากการศึกษาของ Gardell ในปี 1952 (18) พบว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนไม่ทำให้แอคติวิตีของเฮพารินสูญเสียไป ซึ่ง Jorpes ได้เคยรายงานไว้เช่นกันว่าการสกัดเฮพารินไม่ถูกทำให้เสียแอคติวิตีด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin)(19)

โปรติเอสที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยจะเลือกเอนไซม์ที่มีความจำเพาะค่อนข้างกว้างและมีประสิทธิภาพในการทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0-8.0 ในการวิจัยนี้สามารถหาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ 2 ชนิด คือ แพนครีเอทิน (Pancreatin)และนิวเทรส (Neutrase) เอนไซม์แพนครีเอทินเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากตับอ่อนของสุกร สภาวะการทำงานที่เหมาะสมคือที่ค่าความเป็นกรดด่าง(pH)เป็นกลาง และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์นิวเทรสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อว่า Bacillus subtilis สภาวะการทำงานที่เหมาะสม คือ ที่ pH 6.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 45 องศาเซลเซียส

Charles และ Scott (4) พบว่าขั้นตอนการย่อยโปรตีนจะมีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูงขึ้นหากทำการออโตไลซิสเนื้อเยื่อก่อน ดังนั้นในอุตสาหกรรมการสกัดเฮพารินจึงมีขั้นตอนการออโตไลซิสรวมอยู่ด้วยเสมอ (14,15,20) ขั้นตอนต่อจากการไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยโปรติเอสคือการใช้วิธีทางเคมีที่เหมาะสมแยกเฮพารินออกมาจากสารที่ได้จากการย่อย วิธีที่นิยมในทางการค้า ได้แก่ การตกตะกอนด้วยเอธานอล การตกตะกอนด้วยสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียม(Quaternary Ammonium)และวิธีอัลทราฟิลเทรชัน(Ultrafiltration)(14-16,21) เฮพารินที่ได้ในขั้นตอนนี้จะยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ เช่น สารในกลุ่มของไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ เกลือ และกรดนิวคลีอิค เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องนำเฮพารินที่ได้ในขั้นนี้ไปผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น วิธีที่นิยมคือ การแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) แบบต่างๆ เช่น การแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ(Anion-Exchange Chromatography)(15,22)และการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ(Affinity Chromatography)(23,24)

ในกระบวนการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์นั้นฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดและปริมาณของเฮพารินที่ได้นอกจากจะขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้สกัดและการทำให้บริสุทธิ์แล้วยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดด้วย(4,25) ผู้วิจัยหลายท่านได้พยายามปรับปรุงเปลี่ยนแปลงขั้นตอนการสกัดโดยมีวิธีของ Charles และ Scott (4) เป็นพื้นฐานเพื่อให้ได้เฮพารินที่บริสุทธิ์ขึ้นและให้ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดสูง ดังตารางที่ 1.2 แสดงประวัติการปรับปรุงกรรมวิธีการทำเฮพารินให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 1.2 แสดงชื่อผู้วิจัย ชนิดของเนื้อเยื่อ ขั้นตอนหลักในการสกัดเฮพาริน ปริมาณและแอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ของเฮพารินที่สกัดได้

ชื่อผู้วิจัย	ชนิดของเนื้อเยื่อ	ขั้นตอนหลักที่ใช้สกัดเฮพาริน	ปริมาณเฮพาริน (มก./กก. ของ เนื้อเยื่อปอดสด)	แอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity)
Charles และ Scott (4)	ปอดวัว	ออโตไลซิส ไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยสารละลายด่าง ตกตะกอนด้วยเอธานอล	270	100
Nomine Penasse และ Barthelemy (14)	ปอดวัว	ออโตไลซิส ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์พาเพน ตกตะกอนด้วยสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ	250	115
Toccaceli(20)	ปอดวัว	ออโตไลซิส ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน ตกตะกอนด้วยซีรัลอัลบูมิน 5%ในน้ำ	950	23
Sumyk Kyle และHawrylewicz (15)	ปอดสุกร	ออโตไลซิส ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์พาเพน ตกตะกอนด้วยสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โครมาโทกราฟีโดยใช้เซฟาเดกซ์คอลัมน์	400	15

วิธีการแยกสารเฮพารินจากสารที่ได้หลังการย่อยสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. การตกตะกอนด้วยเอธานอล

หลักการของวิธีนี้ คือ ความสามารถในการละลายน้ำของสารต่างชนิดกันมีความแตกต่างกัน สารประเภทไกลโคอะมิโนไกลแคนต่าง ๆที่ปะปนอยู่กับเฮพารินมีความสามารถในการละลายในสารละลายเอธานอลในน้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆแตกต่างกันไป ในการวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของเอธานอลในน้ำที่ 50 83 และ 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในการทำการตกตะกอนไกลโคอะมิโนไกลแคนประเภทต่าง ๆ ซึ่งจากการค้นคว้าพบว่าเฮพารินควรจะตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเอธานอลเป็น 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

2. การแยกสารโดยวิธี Size Exclusion Chromatography

เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสาร ในการทำจะต้องเลือกชนิดของตัวค้ำจุน(Packing material) ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก โดยพิจารณาช่วงของการแยกสารของตัวค้ำจุนนั้น ๆให้อยู่ในช่วงที่สามารถแยกสารที่เราต้องการได้โดยประมาณจากน้ำหนักโมเลกุลของสารที่จะแยก เมื่อผ่านสารละลายที่มีสารที่ต้องการแยกเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งใช้บรรจุตัวค้ำจุนที่มีรูพรุนในขนาดที่เหมาะสม จากนั้นชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม สารแต่ละชนิดจะออกมาตามลำดับขนาดโมเลกุลของมัน

3. การแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography)

เป็นวิธีแยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุในโมเลกุลของสารซึ่งส่งผลต่อการยึดกับตัวค้ำจุนซึ่งเป็นเรซินที่มีประจุเรียกว่า "ไอออนเอกซ์เชนเรซิน" สารต่างชนิดกันจะถูกแยกออกจากกันดีหรือไม่จึงขึ้นอยู่กับความแตกต่างของประจุบนโมเลกุลของสารเหล่านั้น โดยทั่วไปในการแยกจะประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 2 ขั้นตอนดังนี้

1)ให้สารที่จะแยกจับกับไอออนเอกซ์เชนเรซิน

2)ชะสารที่ต้องการแยกออกมาทีละส่วนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทำเฮพารินที่บริสุทธิ์อีกวิธีหนึ่ง จากการค้นคว้าพบว่าตัวค้ำจุนที่นิยมใช้ในการแยกเฮพารินได้แก่ Dowex1-X2 Diethylaminoethyl(DEAE)cellulose ECTEOLA-cellulose เป็นต้น ในการวิจัยนี้ได้ใช้คอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี(Polyacrylate-Diethylaminoethyl;PA-DEAE)ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีตัวค้ำจุนคือไดเอทธิลอะมิโนเอทธิล(DEAE) สำหรับขั้นตอนของการทำเฮพารินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบใช้ความดันสูง(HPLC)

4. การแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (Affinity Chromatography)

เป็นวิธีที่นิยมใช้แยกโปรตีน นิวคลีอิคและพอลิแซคคาไรด์ หลักการคือ การใช้ลิแกนด์ที่สามารถยึดเกาะอย่างจำเพาะกับสารที่ต้องการแยกไปยึดไว้กับตัวดูดซับเฉื่อยเพื่อให้เป็นเฟสคงที่ (Stationary Phase)ซึ่งบรรจุไว้ในคอลัมน์ เมื่อผ่านสารที่ต้องการแยกลงไปสารตัวอื่นๆจะผ่านออกมาหมดยกเว้นสารที่มีการยึดเกาะกับกับลิแกนด์ที่ตรึงไว้ เมื่อต้องการชะสารที่ต้องการซึ่งถูกยึดไว้กับเฟสคงที่ออกสามารถทำโดยการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีการผสมสารที่มีแอฟฟินิตี(affinity)สูงกว่าชะล้างออกมา ซึ่งสารที่มีแอฟฟินิตีต่อลิแกนด์ตรึงสูงกว่านี้จะเข้าไปแทนที่สารตัวอย่างนั่นเอง

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

หลักการของวิธีนี้ คือ ใช้กรดซัลฟูริคไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของเฮพารินในภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้กรดยูโรนิค (uronic acid) กรดยูโรนิคจะทำปฏิกิริยากับสารคาร์บาโซล (Carbazole)เกิดเป็นสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบสีที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

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

วิธีการวิเคราะห์เฮกโซซามีน(Hexosamine) และเอ็น-อะเซทธิลเฮกโซซามีน(N-acetyl hexosamine) เป็นปฏิกิริยาการเกิดคอนเดนเซชันของเฮกโซซามีนกับอะเซทธิลอะซีโทนในสารละลายที่เป็นเบส ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ อนุพันธ์ของไพรอล (Pyrrole derivative) ในวิธีนี้ตรวจวัดอนุพันธ์ไพรอลที่เกิดโดยให้ทำปฏิกิริยาต่อกับพารา-ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimethylaminobenzaldehyde) หรือ Ehrlich's reagent ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์สีชมพูอย่างชัดเจนสามารถตรวจวัดได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโคปี

การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และ ซัลเฟอร์ (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 ซึ่งจะดักจับสารต่างๆให้อยู่ในรูป reduced combustion gases จากนั้นกาซตัวพา (carrier gases) คือฮีเลียม(He) จะเป็นตัวพาไอของสารต่างๆนี้ผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ (GC column) สารต่างๆที่ผ่านเข้าไปจะถูกแยกในคอลัมน์และตรวจวัดโดย Thermal Conductivity Detector (TCD)

การวัดแอคติวิตีของเฮพาริน

การวัดแอคติวิตีของเฮพาริน คือ การวัดฤทธิ์การต้านการแข็งตัวของเลือดของเฮพาริน ซึ่งสามารถทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) การทดสอบกระทำได้หลายวิธี วิธีมาตรฐานที่ใช้กันมากมี 3 กลุ่ม คือ

1. Whole blood assays เป็นการวัดความสามารถของเฮพารินในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด วิธีนี้จะวัดระยะเวลาของการแข็งตัวของเลือดซึ่งผสมเฮพาริน (Whole blood time) เปรียบเทียบกับระยะเวลาของการแข็งตัวของเลือดปกติที่ไม่มีเฮพารินผสม หลักการนี้ถูกใช้ในวิธีมาตรฐาน 2 วิธี คือ United State Pharmacopoeia (USP)(29) และ British Pharmacopoeia (BP)(30)

2. Blood coagulation specific assays เป็นการวัดผลของเฮพารินที่มีต่อปฏิกิริยายาที่แอนตีทรอมบินไปยับยั้งการทำงานของ Coagulation Proteinase ทั้งหลาย

3. Amidolytic assays เป็นการวัดสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ Coagulation Factor แต่ละชนิดของเฮพาริน โดยทำการวัดผลของเฮพารินที่มีต่ออันตรกิริยาระหว่างสับสเตรทสังเคราะห์ที่ผลิตขึ้นเฉพาะสำหรับ Coagulation Factor แต่ละชนิดที่ทดสอบกับ Coagulation Factor นั้น โดยทั่วไปแล้วจะเป็นการวัดประสิทธิภาพในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเฮพารินในปฏิกิริยาที่แอนตีทรอมบินไปยับยั้งการไฮโดรไลซ์สับสเตรทสังเคราะห์ของ Coagulation Factor เฉพาะนั้นๆ ตัวอย่างเช่น การทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์เทนเอ (Factor Xa assay) การทดสอบการยับยั้งแฟกเตอร์ทูเอ (Factor IIa) เป็นต้น

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

1. Heparin + Antithrombin(AT) $\rightarrow$ Heparin-AT
2. (1) Factor Xa + Heparin-AT $\rightarrow$ Heparin-AT-Factor Xa

   (2) Factor Xa + Peptide-p-NA $\rightarrow$ Peptide + pNA (yellow)+ Factor Xa

จากปฏิกิริยาข้างบนจะเห็นว่า ในกรณีที่มีเฮพารินที่สามารถช่วยการจับกันระหว่างแอนตีทรอมบินและแฟกเตอร์เทนเออยู่มากๆจะทำให้เหลือแฟกเตอร์เทนเออิสระที่จะมาไฮโดรไลซ์เปปไทด์ออกจาก pNA เพื่อให้เกิด pNA ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ 385 นาโนเมตร ได้น้อยลง

<u>วัตถุประสงค์ของงานวิจัย</u>

เพื่อหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่หาได้ง่ายในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางศึกษาหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์

<u>ขอบเขตของงานวิจัย</u>

1. สกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกรและหาวิธีการทำให้บริสุทธิ์
2. ตรวจสอบเฮพารินที่สกัดได้ในแง่ของฤทธิ์การต้านการแข็งตัวของเลือดและโครงสร้างทางเคมี

<u>ประโยชน์ซึ่งคาดว่าจะได้รับ</u>

เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาและดำเนินการผลิตเฮพารินขึ้นใช้ในประเทศและเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษาและผลิตสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่น