บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

เฮพาริน (HEPARIN) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจำเป็นต่อการใช้ในวงการแพทย์แต่มีราคาแพง และส่วนใหญ่ต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการหากรรมวิธีในการสกัดเฮพารินเพื่อให้ได้ปริมาณมากและมีประสิทธิภาพสูงจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อผู้วิจัยในการค้นคว้าหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศ งานวิจัยนี้ได้ทำการค้นคว้าข้อมูลต่างๆ พบว่าเนื้อเยื่อที่เหมาะสมจะนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดแยกเฮพาริน คือ เนื้อเยื่อปอดสุกร

ขั้นตอนการสกัดแยกเฮพารินจากเนื้อเยื่อปอดสุกร ประกอบด้วย

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

จากการทดลองพบว่าการทำออโตไลซิสเนื้อเยื่อปอดจะช่วยให้มีการปลดปล่อยเฮพารินออกมาได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ในขั้นตอนที่สองคือการย่อยเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิสด้วยโปรติเอสนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาโปรติเอสที่พิจารณาแล้วว่าเหมาะสม 2 ชนิด คือ แพนครีเอทินและนิวเทรส และพบว่าเอนไซม์นิวเทรสเหมาะสมในแง่ของประสิทธิภาพการย่อยการไม่ทำลายโครงสร้างของเฮพารินและราคาถูก เพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดเกาะกับสายเฮพารินออก

ในขั้นตอนที่สาม คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค ซึ่งสามารถแยกเอาโปรตีนและเปปไทด์ต่างๆออกไปได้นั้น พบว่าความเข้มข้นของ TCA ควรจะอยู่ที่ 5 % (น้ำหนักของ TCA ปริมาตรรวมในสารละลายที่ทำการตกตะกอน ในขั้นตอนที่สี่ซึ่งเป็นการนำสารละลายที่ได้ไปแยกสารปนเปื้อนอื่นๆด้วยวิธีอัลทราฟิลเทรชันผ่านเมมเบรน MW. cut off 3,000 เพื่อกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตันนั้น พบว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ที่ถูกกำจัดออกไปโดยวิธีนี้นั้นมีค่าแอคติวิตีค่อนข้างต่ำ (23.34%) ในขั้นตอนที่ห้าเป็นการใช้วิธีการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้นสุทธิ 50 83 และ 90 % พบว่าแอคทีฟเฮพารินจะถูกแยกออกมาได้โดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้นสุทธิ 90 %(v/v) อย่างไรก็ตามเฮพารินที่ได้ในขั้นนี้ยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ เช่น สารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ เกลือ และกรดนิวคลีอิค เป็นต้น ดังนั้นจึงนำเฮพารินที่ได้ในขั้นตอนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยขั้นตอนที่หก คือ วิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี ด้วยคอลัมน์พีเอ-ดีอีเออี โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆในการชะคอลัมน์ ซึ่งพบว่าแอคทีฟเฮพารินสามารถถูกแยกออกมาโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.0 M ในกรดไฮโดรคลอริค 0.01 M เป็นตัวชะ(สาร Z)

เมื่อได้เฮพารินจากคอลัมน์จึงทำการทำให้บริสุทธิ์จากเกลือโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธีการไดอะไลซิสด้วยเมมเบรนที่มี MW. cut off ที่ 2,000 ซึ่งทำให้สามารถได้เฮพารินที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงถึง 143.21 ยูนิตต่อมก. ด้วยขั้นตอนการสกัดเฮพารินจากปอดสุกรดังกล่าวข้างต้นนี้ สามารถสกัดเฮพารินได้ 18.20 มก. เทียบเท่ากับ 2606.42 ยูนิตต่อเนื้อเยื่อปอด 1 กก.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคาแรคเตอร์ไรซ์เฮพารินที่เตรียมได้โดยวิธี NMR สเปกโตรสโคปี การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Size Exclusion Chromatography และการวิเคราะห์ธาตุ N/C/H/S ซึ่งผลการทดลองยืนยันว่าสารที่ได้เป็นโพลีเมอร์เฮพารินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,500 ดาลตัน และ มีค่าแอนตีแฟกเตอร์เทนเอแอคติวิตีเป็น 143.21 ยูนิตต่อมก. ซึ่งเป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก แต่นับว่าเป็นกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์วิธีหนึ่งและเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมาก นอกจากนี้ยังใช้ต้นทุนต่ำ จึงเป็นแนวทางที่ดีในการศึกษาหากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในการสกัดเฮพารินจากเนื้อเยื่อสัตว์และเป็นพื้นฐานในการศึกษาและดำเนินการผลิตเฮพารินขึ้นใช้ในประเทศรวมทั้งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษาและผลิตสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆด้วย