รายการอ้างอิง

1. คู่มือบัญชียาหลักแห่งชาติ. 2529. กรุงเทพมหานคร : กระทรวงสาธารณสุข. 161-163.

2. Mclean, J. 1916. The thromboplastic action of cephalin. Amer. J. Physiol. 41:250-257.

3. Howel, W.H. and Holt, E. 1918. Two new factors in blood coagulation heparin and pro-antithrombin. Amer. J. Physiol. 47:328.

4. Charles, A.F. and Scott, D.A. 1933. Studies on heparin I and II. J. Biol. Chem. 102:425-435.

5. Linhardt, R.T. 1991. Heparin:An important drug enter its seventh dacade. Chem & Ind. Jan:45-47.

6. Jorpes, J.E., Holmgren, H.J. and Wilender. 1937. Uber das vork ommenvon heparin in den Gefasswanden und in den Augen. Z. mikrosk.-anal Forsch. 42:279-301.

7. Ogren, S. and Lindahi, U. 1975. Cleavage of macromolecular heparin by an enzyme from mouse mastocytoma. J. Biol. Chem. 250:2690-2697.

8. Jeanloz, R.W. 1970. Mucopolysaccharides of higher animals. In the carbohydrates chemistry and biochemistry. 2 nd ed., vol II B : 589-625. Edited by W.Pigman and D.Horton. Academic press, New york.

9. Martindale. 1977. The extra pharmacopoeia, 27 th edition. The Pharmaceutical press, London. 718.

10. The Merk Index. 1976. Merck & Co.,Inc, Rahway,N.J. 608.

11. Pattanaargson, S. 1922. Heparin derivatives:Preparation,Fractionation, and Characterization. Ph.D. dissertation, Miami University. 37-60.

12. Baugh ,R.F. and Hougie ,C. 1979. The Chemistry of blood coagulation. Clin. Haematol. 8(1):4.

13. Jaques ,L.B. 1980. Heparin-Anionic Polyelectrolyte Drugs. Pharmacological Reviews. 31(2):99-166.

14. Normine, G., Peassae, L. and Bartbelemy, P. 1961. Process of purifying heparin, and product produce therefrom. US.Patent NO. 2,989,438

15. Sumyk, G.B., Kyle, J.L. and Hawrylewicz, E.J. 1969. Method for the preparation of haparin. US.Patent No. 3,451,996.

16. Macilla, E., Peting, R.L. and Van Ness, L.W. 1974. Process for production of alkali metal salt of heparin. US.Patent No. 3,817,831.

17. Scott, J.E. 1960. Precipitation of heparin from aqueous solution. UK.Patent NO. 122,784. U.K.Patent Office, London.

18. Gardell, S. 1952. Method of Biochemical. Analysis. 212:325.

19. Jorpes, E. 1942. The chemistry of heparin. Adv. Exp. Med. Biol. 52(heparin):3-17.

20. Toccaceli, N. 1962. Purification of heparin. US. Patent No. 3,016,331.

21. Cremonesi, P. and Sportoletti, G. 1985. Process for the purification of glucosaminoglucans. US.Patent No. 4,507,205.

22. Schmidt, M. 1962. Fractionation of acid mucopolysaccharides on DEAE-Sephadex anion exchanger. Biochim. Biophys. Acta. 63:346-348.

23. Roden, L., Baker, J.R., Cifonelli, J.A. and Mathews, M.B. 1972. Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides. Method in Enzymology. 28:73-140.

24. Danielsson, A. and Bjork, I. 1978. The binding of low-affinity and high-affinity heparin to anti-thrombin. Competition for the same binding site on the protein. Eur. J. Biochem. 90:7-12.

25. Brimacombe, J.S. and Webber, J.M. 1964. Mucopolysaccharides. Elsevier,Amsterdam.

26. Bitter, T. and Muir, H.M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4:330-334.

27. Belcher, R., Nutten, A.J. and Sambrook, C.M. 1954. Analist. 79:201.

28. Montreuil, J. 1986. Chapter 5 Glycoproteins. Carbohydrate Analysis: A practical approch. Edited by MF Chaplin & JF Kenedy. Oxford Washington DC. IRL Press.

29. United State Pharmacopoeia. 1989. Heparin sodium. Appendix IX:1136.

30. British Pharmacopeia. 1993. Heparin sodium. Appendix IA:322.

31. Perlin, A.S. and Holme, K.R. 1989. NMR-Spectra of heparin in admixture with dermatan sulfate and other glycoaminoglycans. Annals of The New York Academy of sciences. 556:471-472.

32. Perlin, A.S., Casu, B. and Sanderson, G.R. 1970. 220 Mhz Spectra of heparin , chondroitin and other mucopolysaccharides. Can. J. chem. 48:2260-2268.

33. Neville, G.A., Mori, F., Holme, K.R. and Perlin, A.S. 1989. Monitoring the purity of pharmaceutical heparin preparation by high-field ^{1}H NMR resonance spectroscopy. J. Pharma. Sci. 78(2)101-104.

34. Jaque, L.B. 1980. Heparin-Anionic polyelectrolyte drugs. Pharmacological Review 31(2):99-166.

35. European Drug Index, Niels, F. Muller and Rodoff P. Dessing. 1992. 2 nd edition, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo. 546-548.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(0.2 โมลาร์)

ชั่ง KH_2PO_4 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และ ชั่ง K_2HPO_4 34.84 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

นำสารละลาย KH_2PO_4 ค่อยๆเติมลงในสารละลาย K_2HPO_4 จนกระทั่งได้สารละลายที่มี pH 7.0 ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A

1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5

นำสารละลาย KH_2PO_4 ค่อยๆเติมลงในสารละลาย K_2HPO_4 จนกระทั่งได้สารละลายที่มี pH 6.5 ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ B

2. สารละลายเมอร์แคพโทเอธานอล (0.02 โมลาร์)

สารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. ได้จากการผสมสารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 20 มล. และน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล.

3. สารละลายบัฟเฟอร์ A ได้จากการผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 99 มล. กับสารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มล. (อัตราส่วน 9: 1 (v/v))

4. สารละลายบัฟเฟอร์ B ได้จากการผสมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 99 มล. กับสารละลายเมอร์แคพโทเอธานอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มล. (อัตราส่วน 9: 1 (v/v))

<u>หมายเหตุ</u> การเก็บรักษาสารละลายที่เตรียมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การทดลองศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอทิน โดยแปรอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่ 30 - 70 องศาเซลเซียส

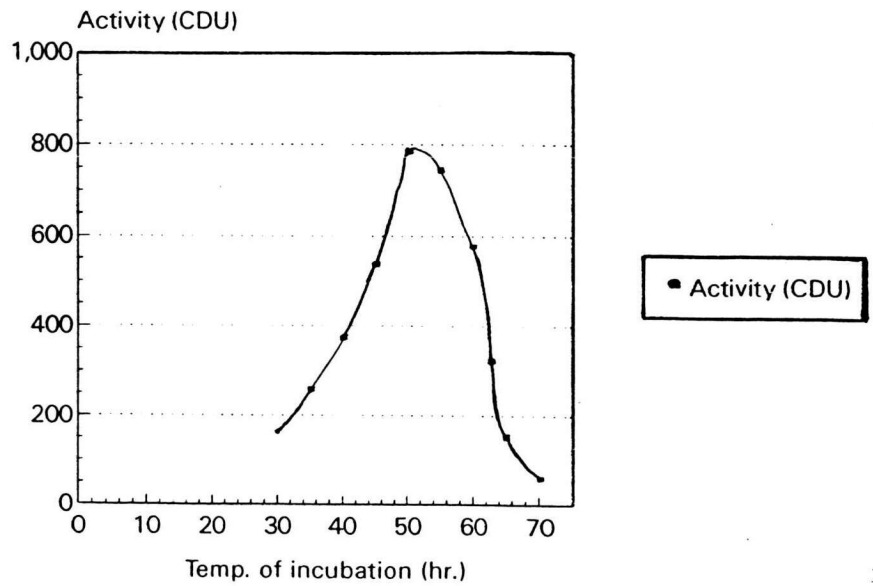
ก. วิธีการทดลอง

1. ชั่งเอนไซม์แพนครีเอทิน 10 มก. ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 20 มล. (ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.) เป็นสารละลายเอนไซม์แพนครีเอทินที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

2. ดำเนินการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรติเอสในภาคผนวก ค แต่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาทำที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

ผลการทดลองแสดงดังกราฟ

กราฟแสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

ก. วิธีการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นเหมาะสม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดนั้นๆเป็นตัวทำละลาย จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

1. เติมสารละลายเคซีนในน้ำ(1% w/v) ปริมาตร 1.0 มล. และสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 0.9 มล. ลงในหลอดทดลอง
2. ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้น เป็นเวลา 10 นาที
3. เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้น เป็นเวลา 10 นาที
4. สารละลาย TCA ในน้ำ (5% w/v) ปริมาตร 3.0 มล.
5. จากนั้นนำไปเซนตริฟิวเอาตะกอนออก ความเร็วรอบของการเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ Blank เพื่อประเมินค่าความเข้มข้นของไทโรซีน(tyrosine) ในสารละลาย [Blank คือ สารละลายบัฟเฟอร์ + เคซีน(1%w/v)+TCA (5%w/v) Control คือ เติม TCA (5%w/v) ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์]

ข. การคำนวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

หน่วยเป็น CDU (Casine Digestion Unit)

1 หน่วยของแอคติวิตีเอนไซม์ CDU คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนแล้วทำให้เกิดไทโรซีน 1 มิลลิโมลต่อนาที ในสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้น

คำนวณจากสูตร $$CDU/ml.enz. = \frac{(A - A_0) \times V_t \times D}{A_s \times V_E \times T}$$

โดยที่ A= ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่วัดจากสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารละลายเคซีน 1% ที่อุณหภูมิเหมาะสม

A_0= ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่วัดสารละลายปฏิกิริยาจากหลอด Control

A_s= ค่าคงที่ได้จากความชันของกราฟไทโรซีน ($\mu g.tyrosine/ml)^{-1}$

V_t= ปริมาตรสารละลายทั้งหมดในหลอดทดลอง(ปริมาตรของสารละลายเคซีน บัฟเฟอร์ เอนไซม์ และTCA 5%(w/v) รวมทั้งหมด 5 มล.

D= จำนวนของการเจือจางสารละะลาย

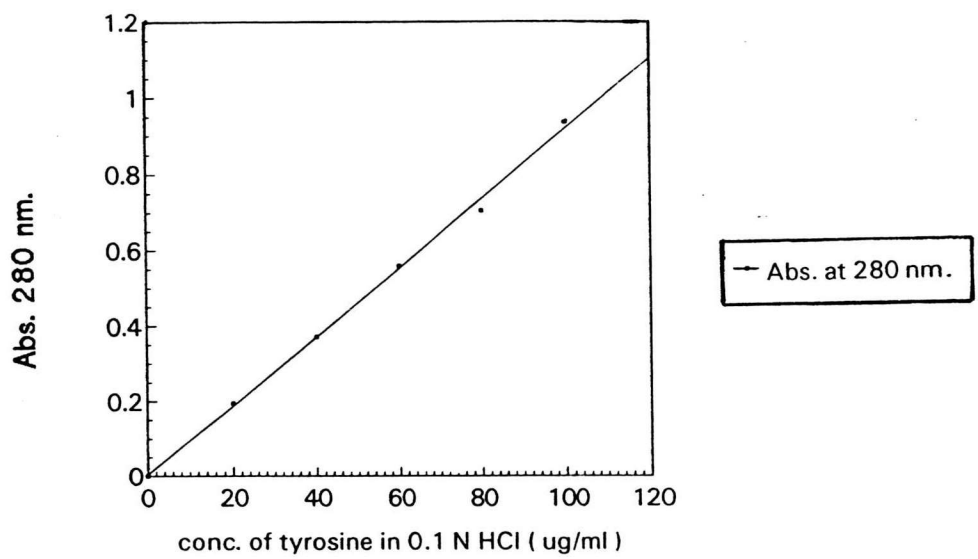
T= เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับเคซีน 1%(w/v)

ค. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

1. เตรียมสารละลายไทโรซีนใน 0.1 N HCl ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมล.

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลาย 0.1 N HCl นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จากผลการทดลองได้กราฟมาตรฐานดังต่อไปนี้

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับ
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



ความเข้มข้นของไทโรซีนใน 0.1 N HCl (ไมโครกรัมต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร
20	0.195
40	0.372
60	0.559
80	0.706
100	0.937

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทิน

1. เตรียมสารละลายเอนไซม์แพนครีเอทิน

ชั่งเอนไซม์แพนครีเอทิน 1 มก. ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเจือจางโดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1 ปริมาตรต่อสารละลายบัฟเฟอร์ A 2 ปริมาตร

2. นำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีดังวิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีโปรติเอสในภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทิน

ส่วนสารละลายใสจาก	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโมตร	ค่าแอคติวิตีของ เอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
หลอด Control	0.004	-
หลอดที่มีเอนไซม์ ทำปฏิกิริยา	0.771	824.73

จากการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์แพนครีเอทินปริมาณ 0.5 มก. มีแอคติวิตีประมาณ 800 ยูนิต นำไปใช้ในการเตรียมเอนไซม์แพนครีเอทินที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ในการทดลองข้อ 2.4.2.3.1

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส

1. เตรียมสารละลายเอนไซม์นิวเทรส
   ชั่งเอนไซม์นิวเทรส 0.5 มก. ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ B ปริมาตร 1 มล.
2. นำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีดังวิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีโปรติเอส ใน ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แสดงดังตาราง ต่อไปนี้

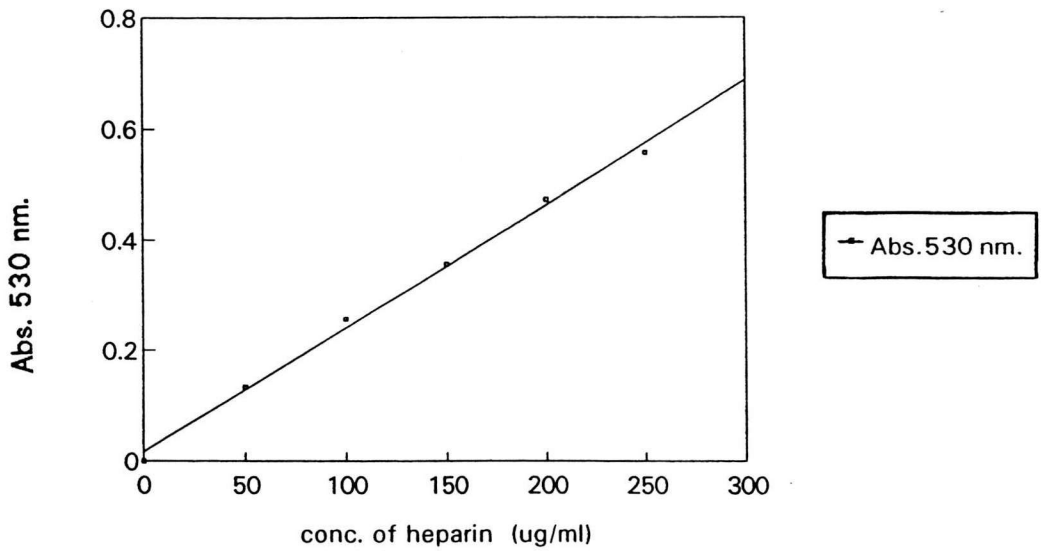
ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส

ส่วนสารละลายใสจาก	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต ต่อ มล.)
หลอด control	0.005	-
หลอดที่มีเอนไซม์ ทำปฏิกิริยา	0.782	417.48

จากการวิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์นิวเทรสปริมาณ 0.5 มก. มีแอคติวิตีประมาณ 400 ยูนิต นำไปใช้ในการเตรียมเอนไซม์นิวเทรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆกันในการทดลองข้อ 2.4.2.3.2

ภาคผนวก ฉ

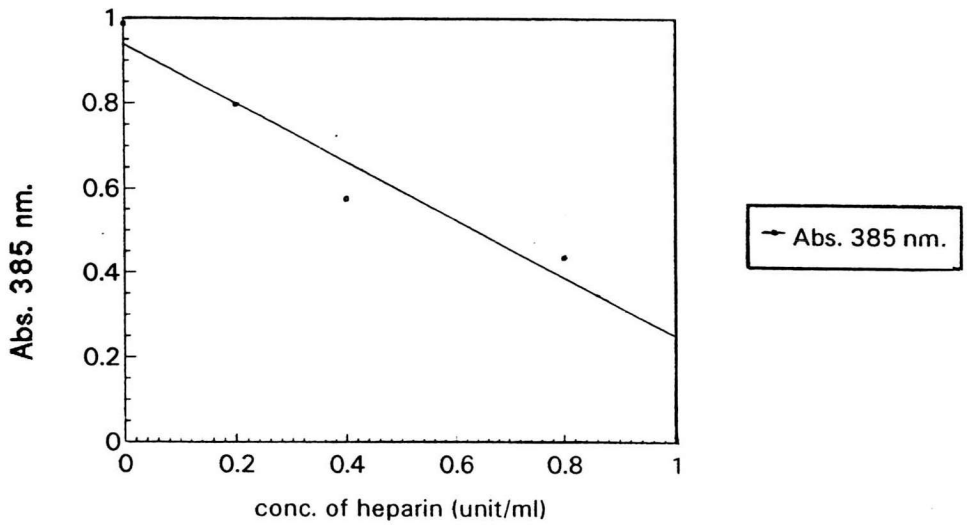
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ไกลโคอะมิโนไกลแคนกับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 530 นาโนเมตร (ผลการทดลองจาก Carbazole method ในหัวข้อ 2.4.5 หน้า 25)



ค่าความเข้มข้นของเฮพาริน (ไมโครกรัมต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร
50	0.133
100	0.256
150	0.356
200	0.474
250	0.558

ภาคผนวก ช

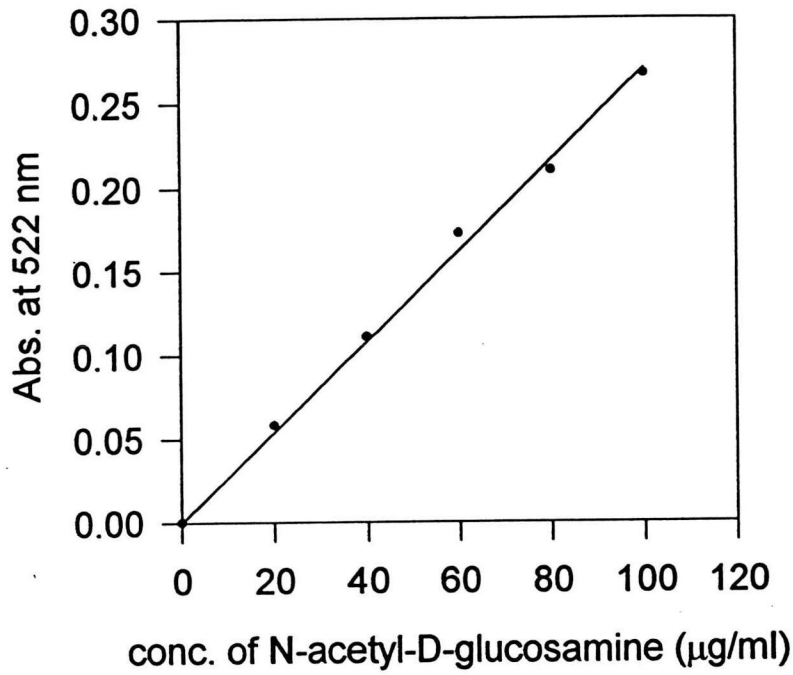
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไกลโคอะมิโนไกลแคนกับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 385 นาโนเมตร (ผลการทดลองจาก Anti factor Xa assay ในหัวข้อ 2.4.6 หน้า 27)



ค่าความเข้มข้นของเฮพาริน (ยูนิตต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 385 นาโนเมตร
0.0	0.989
0.2	0.797
0.4	0.598
0.8	0.435

ภาคผนวก ช

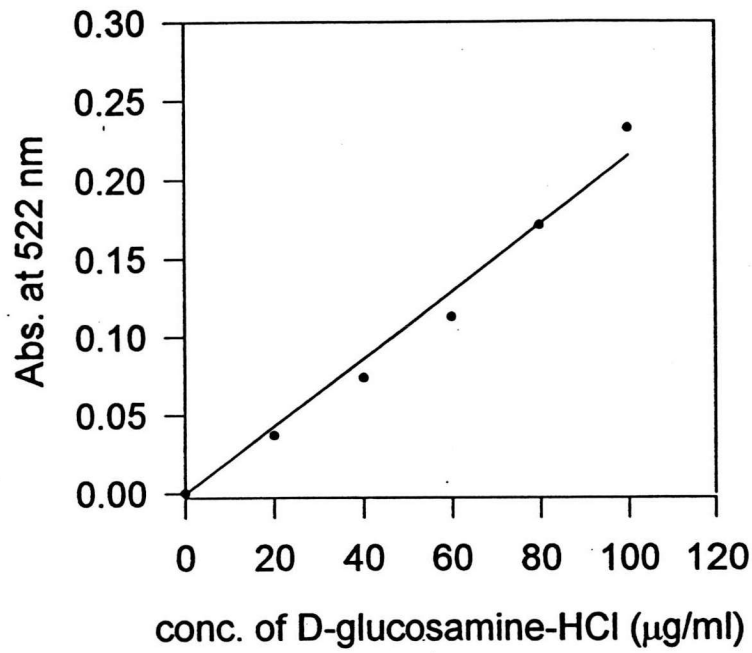
1. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร(ผลการทดลองจากวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan) ในหัวข้อ 2.4.7 หน้า 28)



ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine (ไมโครกรัมต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร
0.0	0.000
20.0	0.058
40.0	0.111
60.0	0.173
80.0	0.210
100.0	0.267

ภาคผนวก ช

2. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ D-glucosamine HCl กับค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 522 นาโนเมตร (ผลการทดลองจากวิธีของเอลสัน-มอร์แกน (Elson-Morgan) ในหัวข้อ 2.4.7 หน้า 28)



ค่าความเข้มข้นของ D-glucosamine HCl (ไมโครกรัมต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร
0.0	0.000
20.0	0.037
40.0	0.074
60.0	0.113
80.0	0.171
100.0	0.232

ภาคผนวก ฌ

การทดลองศึกษาผลที่กระบวนการออโตไลซิสมีต่อการสกัดแยกเฮพาริน

ก. วิธีการทดลอง

1. ชั่งเนื้อเยื่อปอดที่ปั่นละเอียดบรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มม. จำนวน 8 หลอดให้ได้เนื้อเยื่อหลอดละ 0.5 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส

2. การเก็บตัวอย่างทำโดยเก็บเมื่อเริ่มต้นบ่ม(เป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการออโตไลซิส) และเมื่อครบ 24 ชั่วโมง(เป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส) โดยขนาดของตัวอย่างที่เก็บคือ 0.5 กรัม ตัวอย่างที่เก็บมานำมาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติค 1 มล. ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. นำไปเซนตริฟิวเอาตะกอนออกและนำส่วนสารละลายใสไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay

การทดลองนี้แต่ละจุดทำ 4 ชุด

ข. ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay ตามวิธีดังวิธีในข้อ 2.4.5

ตารางแสดงค่าความเข้มข้นของเฮพารินโดย uronic assay

สารจากส่วนสารละลายใสที่ได้จากชัสเพนชั่นเนื้อเยื่อ	ความเข้มข้นของเฮพาริน(เฉลี่ย) (มก./ มล.)
เนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการออโตไลซิส	0.003±.005
เนื้อเยื่อที่ผ่านการออโตไลซิส	0.141±.014

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล เกิดวันที่ 13 เมษายน 2512 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับสอง สาขาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในปีการศึกษา2534 และเข้าทำงานในบริษัทยูไนเต็ดฟีดดิ้งจำกัด ในปี 2536 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาจากโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์(U.D.C.) ในปี 2537