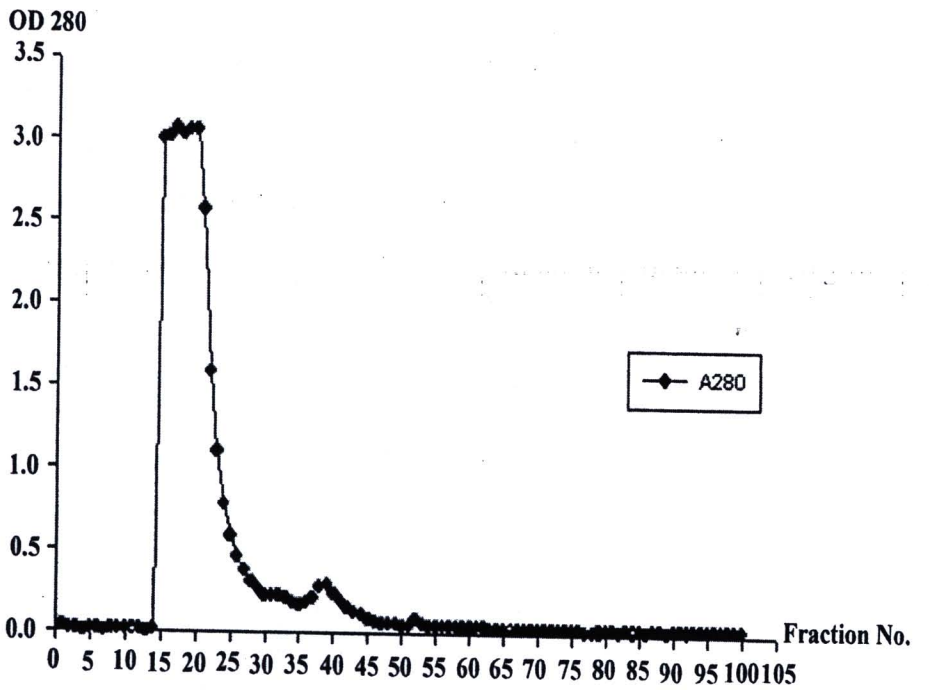
บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนฮีโมโกลบินด้วย column sephadex G-50

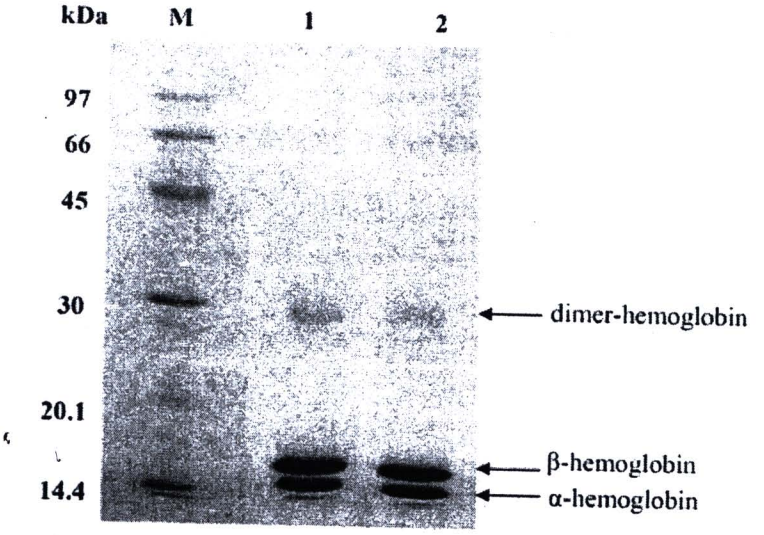
ทำการแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยโดยดัดแปลงวิธีการของ Deepthi และคณะ (2000) โดยนำเลือดจระเข้มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C จากนั้นแยกเอาส่วนใสและส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาวออก ทำการล้างเม็ดเลือดแดงด้วย Phosphate buffer saline pH 7.0 (PBS) ปริมาตร 4 เท่าของเลือดจระเข้ผสมให้เข้ากันและนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000xg เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสทิ้งทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นปริมาตร 5 เท่าของเม็ดเลือดแดงที่ล้างด้วย PBS แล้วผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที จะได้ฮีโมโกลบินซึ่งจะอยู่ในส่วนของเหลว ทำการเก็บสารละลายฮีโมโกลบินเพื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชั่นต่อไป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยด้วย column sephadex G-50

จากรูปที่ 1 พบว่าการทำบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินจะพบโปรตีนแบนหลัก 1 peak ซึ่งจะถูกชะออกมาใน fraction ที่ 15-25 จากนั้นนำ fraction ที่แยกได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ศึกษาเปรียบเทียบผลการแยกบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟฟี กับไม่ใช้โครมาโตรกราฟฟีพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ผลการทดลอง

แสดงดังรูปที่ โดยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14 kDa, 15 kDa และ 30 kDa ซึ่งก็คือ แอลฟาฮีโมโกลบิน บีต้าฮีโมโกลบิน และ dimer ของฮีโมโกลบิน ตามลำดับ



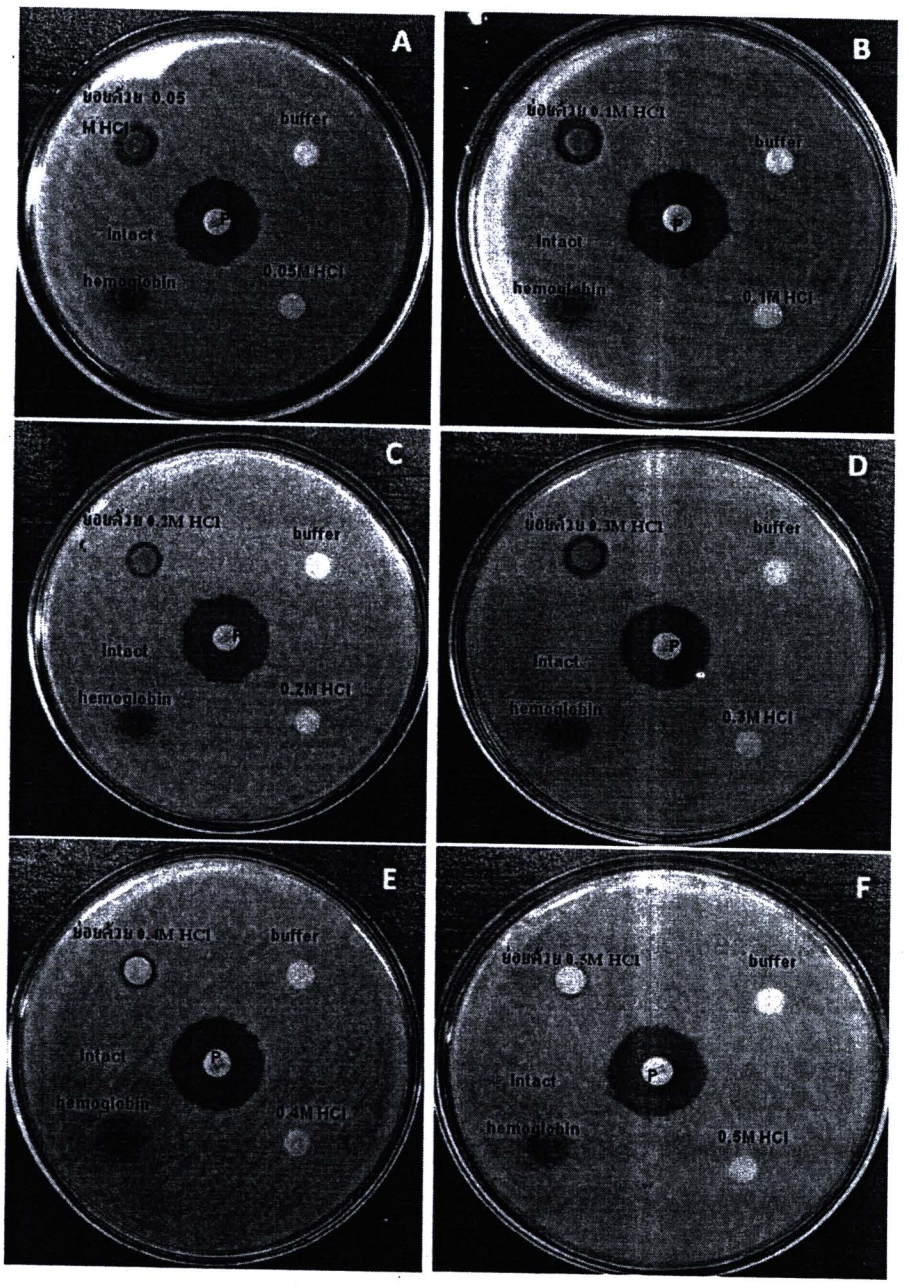
รูปที่ 8 ผลการแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (lane M: Maker, lane1:crude hemoglobin และ lane2:purified hemoglobin)

2. **การตรวจสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ฮีโมโกลบินที่ทำเป็น fragmentated hemoglobin โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์เปปซิน จากนั้นนำไปทดสอบโดยเทคนิค disc diffusion assay**

1. ตัดฮีโมโกลบินด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

เพื่อให้เกิดความสะดวก และได้ปริมาณ active fragmented มากในเชิงอุตสาหกรรม ในการทดลองนี้จึงนำฮีโมโกลบินที่แยกบริสุทธิ์มาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ คือ 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M และ 0.5M ทำการย่อยที่อุณหภูมิห้อง เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่ 4 ^{0}C เวลา 20 นาที เก็บส่วนใสไปทำ speed vac เพื่อเอากรดไฮโดรคลอริกออก นำมาละลายกลับด้วย Tris-HCl pH 8.1 จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 9 ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ATCC 6633 โดยใช้ฮีโมโกลบินที่ทำเป็น fragmentated hemoglobin โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

ภาพ A คือ ฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้น 0.05 M HCl

ภาพ B คือ ฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้น 0.1 M HCl

ภาพ C คือ ฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้น 0.2 M HCl

ภาพ D คือ ฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้น 0.3 M HCl

ภาพ E คือ ฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้น 0.4 M HCl

ภาพ F คือ ฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้น 0.5 M HCl

หมายเหตุ Buffer ที่ใช้คือ Tris-HCl pH 8.1 (ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ)

Positive control ที่ใช้คือ streptomycin (ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก)

Intact hemoglobin ที่ใช้คือ ฮีโมโกลบินที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรด

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการย่อยฮีโมโกลบินด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจะทำให้ฮีโมโกลบินมีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีขึ้น เมื่อดูจาก Clear Zone ของ Intact hemoglobin เทียบกับฮีโมโกลบินที่ย่อยด้วยกรดที่เข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อฮีโมโกลบินถูกตัดให้มีขนาดเล็กลงก็จะทำให้มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น จากการทดลองนี้จะเลือกความเข้มข้นของกรดที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดไปทำการทดลองขั้นต่อไป เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในการอัดเม็ดโดยพบว่าความเข้มข้น 0.05 M HCl 24 ชั่วโมง จะให้ผลการทำลายเชื้อดีที่สุด

การตรวจสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ฮีโมโกลบินที่ทำเป็น fragmentated hemoglobin โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.05M ที่เวลา 20 นาที, 30 นาที, 50 นาที และ 60 นาที จากนั้นนำไปทดสอบโดยเทคนิค disc diffusion assay นำฮีโมโกลบินที่แยกบริสุทธิ์มาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.05M ที่เวลา 20 นาที, 30 นาที, 50 นาที และ 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่ 4 ^{0}C เวลา 20 นาที เก็บส่วนใส จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยเทคนิค speedVac นำมาละลายกลับด้วย Tris-HCl pH 8.1 นำไปทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10

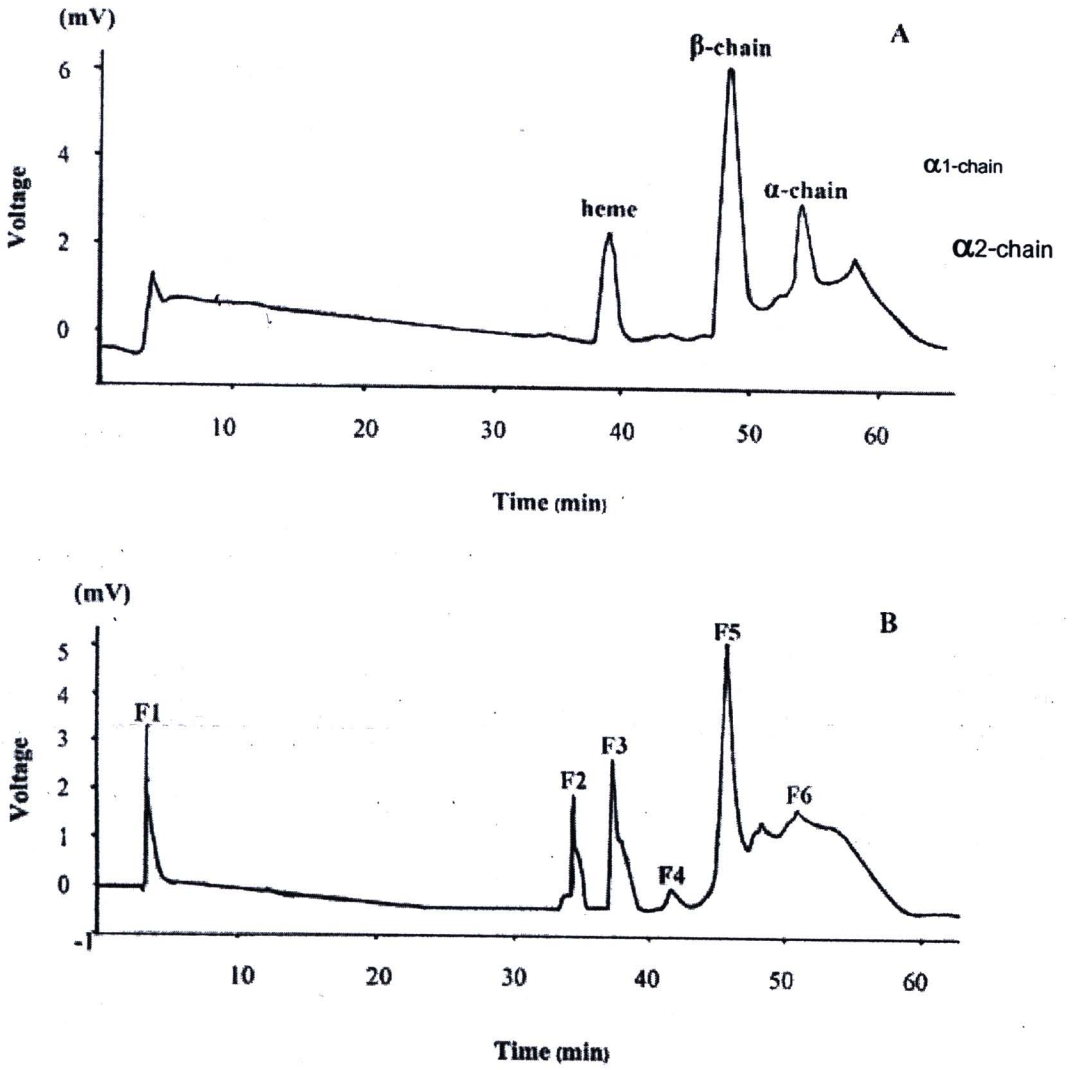
รูปที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อ *Bacillus pumilus* โดยใช้ฮีโมโกลบินที่ทำเป็น fragmentated hemoglobin โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.05 M HCl ที่เวลาต่างกัน

จากผลการทดลองดังกล่าวเมื่อนำฮีโมโกลบินที่บริสุทธิ์มาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.05M ที่เวลา 20 นาที, 30 นาที, 50 นาที และ 60 นาที พบว่าฮีโมโกลบินที่ถูกย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นของ 0.05M ที่เวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด และที่เวลา 20 นาที, 50 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งหรือถูกทำลายมีทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *B.pumilus* TISTR 905, *B. licheniformis* TISTR 1010, *B.subtilis* TISTR 008, *B.subtilis* ATCC 6633, *B.subtilis*, *B. megaterium*, *B.sphaericus* TISTR 678, *B.amyloliquefaciens* TISTR 1045 และ *B. cereus* ATCC 11778

3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมโกลบินโดยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้ column C4 เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของโครมาโตแกรมของฮีโมโกลบินก่อนย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกกับหลังย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ผลการทดลองพบว่าโครมาโตแกรมของฮีโมโกลบินก่อนย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 M (รูปที่ 11A) มีความแตกต่างกับโครมาโตแกรมของฮีโมโกลบินหลังย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 M (รูปที่ 11B) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรมจะพบว่าฮีโมโกลบินถูกตัดให้มีขนาดเล็กลง โดยจะ

ปรากฏ peak ของโปรตีนเพิ่มขึ้นแสดงดังรูปที่ 3 จากนั้นนำทุก peak ไปทดสอบความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย พบว่าฮีโมโกลบินที่ถูกย่อยด้วยกรด (fragmented hemoglobin) จะมีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้สูงขึ้น ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงนำส่วนของ fragmented hemoglobin ไปใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการอัดเม็ดต่อไป



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของ intact hemoglobin และ fragmented hemoglobin แยกด้วยเทคนิค RP-HPLC (C4 column) โดยใช้ 0.1% TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA อัตราเร็ว 1ml/min

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4. การทดสอบความเป็นพิษของ fragmentated hemoglobin ต่อเม็ดเลือดแดงของคน

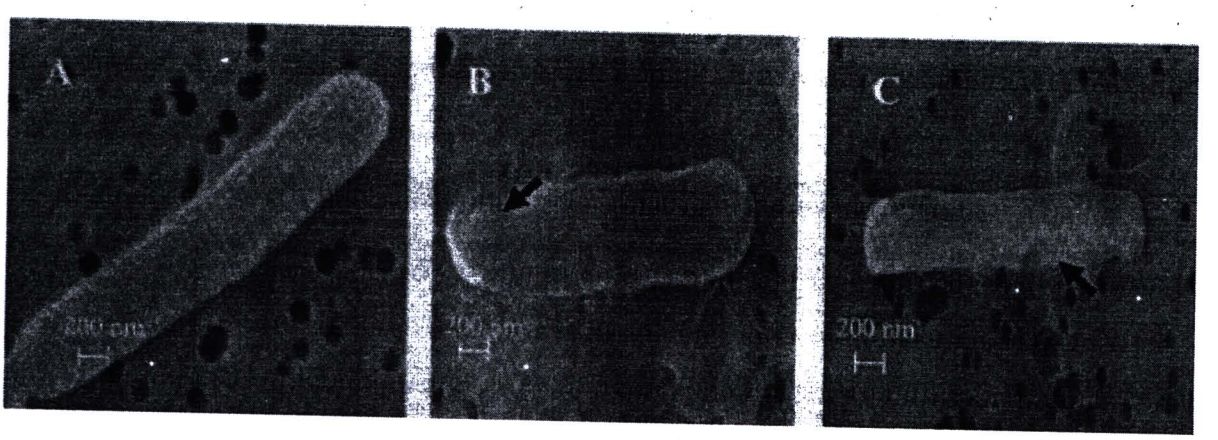
จากการทดสอบความเป็นพิษของฮีโมโกลบินจระเข้กับเลือดแดงของคนพบว่า ฮีโมโกลบินของจระเข้ไม่มีความเป็นพิษกับเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ เราจึงสามารถนำฮีโมโกลบินจระเข้มาทำการขึ้นรูปอัดเม็ดเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในอนาคตได้

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์หรือโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย RP-HPLC

จากผลของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของ fragmented hemoglobin มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นจึงนำสารละลายดังกล่าวไปทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC พบว่าสารละลายดังกล่าวสามารถแยกบริสุทธิ์ออกได้ไม่น้อยกว่า 6 peak ดังนั้นจึงทำการเก็บทุก peak ไปทดสอบหาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 2 สายพันธุ์ พบว่า peak ที่ 3 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ดี

6. การศึกษาผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (SEM)

เมื่อนำ Active fractions (peak no.3) ไปบ่มกับเซลล์ของแบคทีเรียตามเวลาที่กำหนด โดยใช้ *B. subtilis* ATCC 6633 หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ดูลักษณะของการเปลี่ยนแปลงเซลล์แบคทีเรียโดยใช้กล้อง SEM ซึ่งผลที่ได้คือเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะขรุขระหรือเกิดการแตกเสียหายเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการบ่มกับเปปไทด์ ซึ่งจากผลการทดลองในเบื้องต้นนี้คาดว่าเปปไทด์ที่แยกได้จาก fragment hemoglobin น่าจะมีตำแหน่งในการเข้าทำลายที่บริเวณเมมเบรนของแบคทีเรียดังเช่นที่เคยมีผู้รายงานแล้วใน antimicrobial peptide ชนิดอื่นๆ



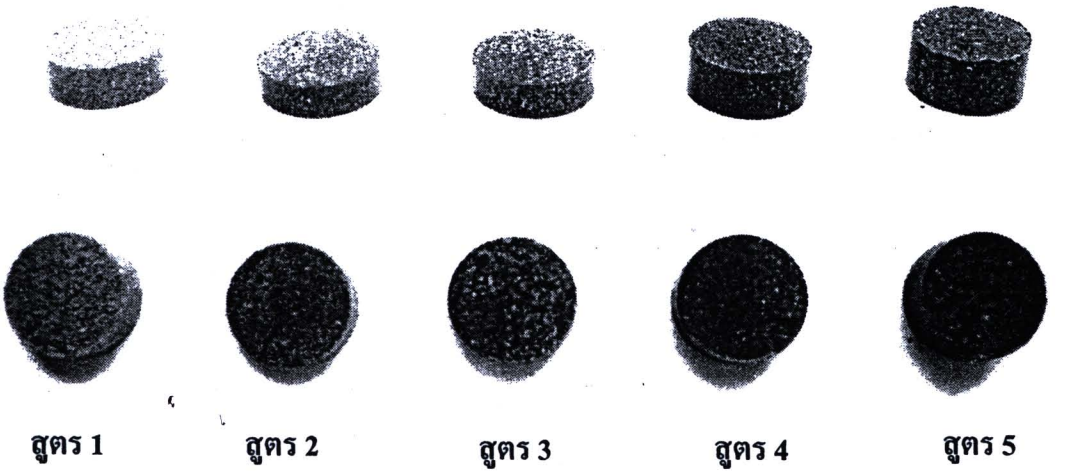
รูปที่ 12 ลักษณะผิวเซลล์ *B. subtilis* ATCC 6633 เมื่อบ่มกับเปปไทด์ (peak no. 3)

7. การทดสอบหาสารที่เหมาะสมกับฮีโมโกลบินในการอัดเม็ดยา

ยาเม็ดประกอบไปด้วยตัวยาสำคัญและสารช่วยต่างๆ เพื่อช่วยในกระบวนการผลิตยาส่วนประกอบที่สำคัญต่างๆนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและประเภทของการผลิตยานั้นด้วย รวมทั้งปริมาณที่ใช้ที่แตกต่างกันอาจหมายถึง หน้าที่ที่แตกต่างกันของสารช่วยนั้นๆ ดั้งนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการ Vary ส่วนประกอบที่สำคัญของยาเม็ดได้แก่ สารเพิ่มปริมาณ (filler, dilutes), สารยึดเกาะ (binder), สารช่วยแตกตัว (disintegrant), สารหล่อลื่น (lubricant), สารช่วยไหล (glidant) เป็นต้น เพื่อให้ได้อัตราส่วนที่เหมาะสม ที่ทำให้ส่วน Intact hemoglobin และ fragmented hemoglobin สามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดได้ และยังคง activity มากที่สุด ดังตารางที่ 6 (หน้าที่ 30) การทดลองหาส่วนประกอบที่เหมาะสมในการอัดเม็ด พบว่า จากการทดลองทำการอัดเม็ดทั้งหมด 5 สูตร ซึ่งมีอัตราส่วนประกอบที่แตกต่างกัน หลังจากอัดเม็ดแล้วได้นำยาเม็ดทุกสูตรมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของยาเม็ด เช่น การละลาย ความแข็ง ความหนาของเม็ด เป็นต้น และจากนั้นนำเม็ดยาแต่ละสูตรมาละลายกลับด้วยน้ำแล้วนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ATCC 6633 และ *B.subtilis* TISTR 008 จากผลการทดลองพบว่าสูตรที่ 4 มีความเหมาะสมกับฮีโมโกลบินมากที่สุด เพราะฮีโมโกลบินยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีเหมือนเดิมเมื่อเทียบกับ Intact hemoglobin กับ fragmented hemoglobin ที่ยังไม่ได้อัดเม็ด

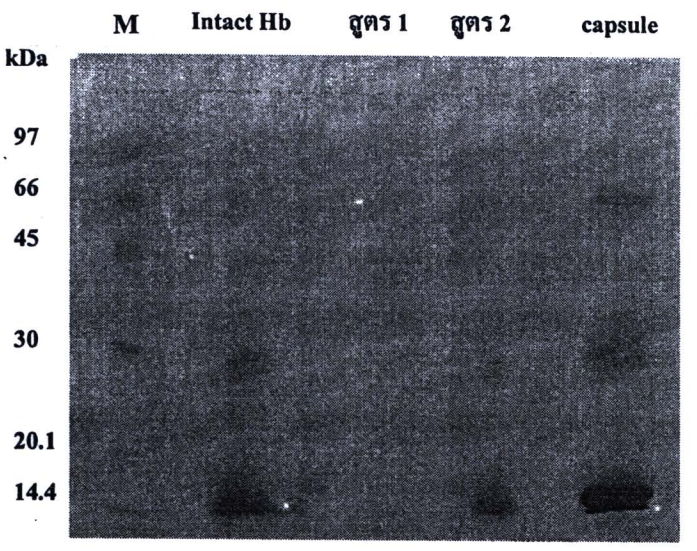
ลักษณะของเม็ดยาที่ทำการอัดเม็ด

จากการทดลองพบว่าลักษณะของเม็ดยาที่มีอัตราส่วนของส่วนผสมของเม็ดยาที่แตกต่างกันทำให้มีสี และลักษณะของเม็ดยามีความละเอียดแตกต่างกัน และหลังจากการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเม็ดยาพบว่ามีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น ความแข็ง การละลาย เป็นต้นและเมื่อดูลักษณะเบื้องต้นของเม็ดยาจะต้องมีการเคลือบเม็ดยาเพื่อให้มีลักษณะสวยงามซึ่งขั้นตอนการเคลือบเม็ดยาจะต้องมีการทดลองต่อไปในอนาคตเพื่อให้ฮีโมโกลบินจระเข้อัดเม็ดสามารถนำไปใช้เป็นอาหราเสริมทางเลือกใหม่ และสามารถหวังผลเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคตได้



รูปที่ 13 ลักษณะของเม็ดยาแต่ละสูตรที่ทำการอัดเม็ด

การทดสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมโกลบินหลังอัดเม็ดยา



รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมโกลบินหลังอัดเม็ดยาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (lane M: Maker)