

การผลิตฮอร์โมนฮิวแมนโคริโอติกโกนาโดโทรปิน อย่างประหยัดเพื่อการผสมเทียม

Cheap production of human chorionic gonadotropin for artificial fertilization

สุกัญญา วีรวัฒน์กะมุพะ* กำชัย ลาวัณยวุฒิ** มานพ ตั้งตรงไพโรจน์**
สุจินต์ หนูขวัญ** ขนิษฐ บุรณศิริ* ธาดา สืบหลินวงศ์*

Abstract : Sukanya Werawatgoompa, Khamchai Lawonyawut, Manob Tangtrongpairoj, Sujin Nukwan, Kanit Buranasiri, and Tada Sueblinvong. 1990. Cheap production of human chorionic gonadotropin for artificial fertilization. *J Hlth Resch* 4(1) : 59-63

Human chorionic gonadotropin (hCG) was extracted from pregnant women urine using kaolin-acetone method. The extract-hCG was tested induction ovulation by injection hCG into walking catfish (*Clarias macrocephalus*) at the dosage of 5000 IU per kilogramme of brooders and compared with the results obtained from brooders received luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogue 30 µg/Kg plus domperidone 5 mg/Kg. Eggs were stripped after 16 hr treatment and fertilized with male sperms of the same species. The hatching rate was found 80% in both groups of animals. While the survival rate after one week fertilization were 42% and 40% from fish treated with hCG and LHRH analogue plus domperidone respectively. It was indicated similar results obtained from hCG-extract and LHRH analogue plus domperidone and the cost of the hCG-extract was about 7 times cheaper than commercial hCG. It can be concluded hCG extracted from human pregnant urine utilization kaolin-acetone method is good for artificial fertilization in fish. Moreover, the method is convenience and economic in preparation. It is the make use of the human waste for use in developing countries where they have limited budget to purchase hormones. This technique is utilized in mass production for the National Inland Fisheries Institute for distribution to fish farmers in low cost. In addition, it is suitable for developing countries where they need fish as an inexpensive protein source. Moreover, it is hope to utilize this hormone in human if further purification of the extract is performed and this will reduce lots of capital expenditure.

Key words : Artificial ; Catfish (*Clarias macrocephalus*) ; Domperidone ; Fertilization ; Gonadotropin, Chorionic ; LHRH analogue ; Urine

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330

Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

** สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กทม. 10900

National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Co-operation, Bangkok 10900.

บทคัดย่อ : สุกัญญา วีวัฒน์กะกุมพะ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ, มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สุจินต์ หนูขวัญ, ขนิษฐ บุรณศิริ, และ ธาดา สืบหลินวงศ์. 2533. การผลิตฮอร์โมนฮิวแมนไทรโอไนกโกนาโดโทรปินอย่างประหยัดเพื่อการผสมเทียม. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 4(1) : 59-63

ได้สกัดฮอร์โมนฮิวแมนไทรโอไนกโกนาโดโทรปิน (hCG) จากปัสสาวะของสตรีตั้งครรภ์ปกติ ด้วยวิธี kaolin-acetone เพื่อการผสมเทียมโดยทดสอบกับปลาตุ๊กตูกอย (Clarias macrocephalus) ในปริมาณ 5000 IU/กก. แม่ปลา เปรียบเทียบกับ LHRH analogue ขนาด 30 µg/กก. ร่วมกับ domperidone 5 มก./กก. แม่ปลา ริดไข่หลังฉีดฮอร์โมน 16 ชั่วโมง ผสมไข่กับสเปิร์มของปลาตัวผู้ พบว่าฮอร์โมนทั้งสองชนิด ให้อัตราฟักลูก 80% เท่ากัน หลังจาก 1 สัปดาห์ อัตรารอดตายของลูกปลาที่ฉีดด้วยฮอร์โมน hCG 42% และฉีดด้วย LHRH analogue ร่วมกับ domperidone 40% แสดงว่าฮอร์โมนทั้งสองชนิดให้ผลเหมือนกัน และค่าใช้จ่ายในการสกัดฮอร์โมน hCG ถูกกว่าฮอร์โมน hCG ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศประมาณ 7 เท่า นอกจากนี้วิธีที่ใช้สกัดฮอร์โมนยังเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่าย เป็นการนำของเสียที่ร่างกายขับทิ้งแล้วกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์ คณะผู้วิจัยจึงได้ผลิตฮอร์โมน hCG เพื่อจำหน่ายให้เกษตรกรนำไปใช้ผสมเทียมปลาในราคาถูก ซึ่งเป็นการประหยัดเงินตราให้แก่ประเทศ โดยไม่ต้องสั่งซื้อฮอร์โมนจากต่างประเทศ จึงเหมาะกับประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีงบประมาณจำกัดและต้องการปลา ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูก

คาดว่าฮอร์โมนที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปใช้ขยายพันธุ์สัตว์ชนิดอื่นได้อีก และหากทำฮอร์โมนนี้ให้บริสุทธิ์เพียงพอ ก็จะสามารนำไปประยุกต์ใช้กับคนได้ ซึ่งจะช่วยให้ช่วยลดดุลการค้าของประเทศได้อีกด้วย

คำสำคัญ : ทำเทียม ; ปลาตุ๊กตูกอย (Clarias macrocephalus) ; คอมเปอริโดน ; การผสมพันธุ์ ; โกนาโดโทรปิน, ไทรโอไนก ; อนุพันธ์ LHRH ; น้ำปัสสาวะ

บทนำ

hCG เป็นฮอร์โมนที่สังเคราะห์จากรก มีคุณสมบัติกระตุ้นให้ไข่สุก เหมือนฮอร์โมน LH ที่สังเคราะห์จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า เนื่องจากฮอร์โมน LH เป็นฮอร์โมนที่ไม่เสถียร จึงมีการนำอนุพันธ์ (analogue) ของฮอร์โมน LH และ hCG มาใช้แทนฮอร์โมน LH กระตุ้นไข่สุกเพื่อใช้ในการผสมเทียมในคน และขยายพันธุ์สัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้กันมากในปลา (Lin et al., 1987; Ngamwongchon et al., 1988; Peter et al., 1989) ฮอร์โมนเหล่านี้ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ก็มีการใช้ต่อมใต้สมองปลาเพื่อการขยายพันธุ์ปลาด้วย โดยนำต่อมใต้สมองปลามาบด ละลายน้ำแล้วฉีดกระตุ้นให้ปลาวางไข่ จากการทดลองพบว่าต่อมใต้สมองที่มีขายในท้องตลาดมีคุณภาพไม่คงที่ และผู้ใช้ไม่สามารถควบคุมขนาดของฮอร์โมนในต่อมที่นำมาใช้แต่ละครั้งได้ จึงทำให้ผลที่ได้ไม่แน่นอน เพราะฮอร์โมนที่มีอยู่ในต่อมแต่ละครั้งไม่คงที่ (มานพ และ คณะ, 2531) ทางสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติเคยสกัดฮอร์โมน hCG จากปัสสาวะของสตรีมีครรภ์โดยใช้วิธีตกตะกอนด้วย acetone แต่ได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร จึงเป็นเหตุจูงใจให้พัฒนาหาวิธีสกัดฮอร์โมน hCG ที่ง่าย สะดวก ให้ผลผลิตสูง และใช้ต้นทุนต่ำ เพื่อผลิตขึ้นใช้เองภายในประเทศ และจำหน่ายให้เกษตรกรในราคาที่ต่ำกว่าที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

วัสดุ

ใช้ปัสสาวะที่รวบรวมจากสตรีที่ตั้งครรภ์ปกติในช่วงแรกของการตั้งครรภ์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมาฝากครรภ์ที่ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สารเคมีอื่น ๆ เช่น kaolin, ammonium hydroxide, diethyl ether และ glacial acetic acid เป็น AR grade ของบริษัท E. Merck ส่วน acetone เป็น laboratory grade และ LHRH analogue กับ domperidone (Motilium) ของบริษัท Hoechst และ Wellcome ตามลำดับ

วิธีการ

การสกัดฮอร์โมน ทำที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และการทดลองใช้ฮอร์โมน hCG ที่สกัดได้ ทำที่สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

การสกัดฮอร์โมน hCG

ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Butt and Lynch (1971) ใช้ปัสสาวะ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid เติม acid-washed kaolin 10 กรัม กวนให้เข้ากัน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เทของเหลวทิ้ง ปั่นแยกตะกอน ล้างตะกอนด้วย 0.5% acetic acid 50 มล. สกัด hCG ด้วย 10% ammonium hydroxide 50 มล. แยกของเหลวออกโดยการปั่นแยก นำส่วนของเหลวปรับ pH เป็น 5.5 ด้วย glacial acetic acid แล้วตกตะกอน hCG ด้วย acetone 2 ปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C 1-2 ชม. หรือข้ามคืน กรองตะกอน แล้วล้างด้วย acetone และตามด้วย diethyl ether ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ปั่นแยกเอาน้ำไปวิเคราะห์หาปริมาณ hCG โดยวิธี RIA จากนั้นปรับความเข้มข้น hCG ให้ได้ 5000 IU ในน้ำกลั่น 3.5 มล. เพื่อฉีดปลาอุกอุยเพศเมีย ขนาด 7 ตัว/1 กก. ฉีดตัวละ 0.5 มล.

การเตรียม LHRH analogue

นำ LHRH analogue 30 µg ผสม domperidone 5 µg เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 3 มล. ฉีดปลาอุกอุยเพศเมีย ขนาด 6 ตัว/1 กก. ฉีดตัวละ 0.5 มล.

วิธีทดลอง

ฉีดฮอร์โมนตามปริมาณและกลุ่มของปลาที่เตรียมไว้ เข็มกลั้มใกล้ศรีษะหลัง สังเกตพฤติกรรมแม่ปลา หลังฉีด 16 ชั่วโมง ริดไข่ ดูลักษณะไข่ ผสมไข่กับน้ำเชื้อตัวผู้ แล้วนับจำนวนลูกปลาที่ได้และมีชีวิตรอดหลังจากเป็นตัว 1 สัปดาห์

ผล

จากการนำ hCG ที่สกัดด้วยวิธี kaolin-acetone ฉีดปลาอุกอุย เพื่อทดลองผสมเทียมโดยกระตุ้นให้ปลาวางไข่ เปรียบเทียบกับการใช้ LHRH analogue ร่วมกับ domperidone การที่ใช้ hCG เปรียบเทียบกับ LHRH analogue เพราะจากประสบการณ์พบว่า LHRH analogue เป็นฮอร์โมนที่ให้ผลดีกับปลาทุกชนิด เมื่อใช้แล้วพบว่าแม่ปลาสงบ และให้ไข่ที่มีลักษณะดีเหมือนกัน คือ 80% หลังจากพักเป็นตัว 1 สัปดาห์ จำนวนลูกปลาที่มีชีวิตรอดจากแม่ปลาที่ได้รับ hCG มีอยู่ 42% และ 40% จากแม่ปลาที่ได้รับ LHRH analogue ซึ่งผลการทดลองจากการใช้สารสองชนิดไม่ต่างกัน แสดงว่า hCG ให้ผลเหมือนกับ LHRH analogue (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายแล้ว (ตารางที่ 2) พบว่า hCG ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ ราคา 150 บาท แต่ hCG ที่ผลิตได้ราคาเพียง 24 บาท ซึ่งเท่ากับราคาต่อมได้สมองปลา แสดงว่า hCG ที่ผลิตได้มีราคาต่ำกว่า hCG ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศประมาณ 7 เท่า ส่วน LHRH analogue ราคา 1,100 บาท/10 มิลลิกรัม ใช้กับปลาได้ 333 กิโลกรัม ถ้าเกษตรกรใช้ครั้งละ 30 µg จะได้ลูกปลาครั้งละประมาณ 15,000 ตัว ซึ่งพอเพียงต่อความต้องการของเกษตรกรที่ใช้แต่ละครั้ง แต่ถ้าเกษตรกรใช้หมด 10 มิลลิกรัม ก็จะไม่มีส่วนที่พอที่จะเลี้ยงลูกปลา และหากเกษตรกรใช้ LHRH analogue ไม่หมดและเก็บไว้ก็จะเสื่อมคุณภาพ ถ้าเกษตรกรต้องการใช้ LHRH analogue เพื่อขยายพันธุ์ปลาเพียงครั้งละ 1 กิโลกรัม จะต้องเสียค่าใช้จ่ายถึง 1,100 บาท ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้น LHRH analogue จึงไม่เหมาะสมแก่เกษตรกรที่จะนำไปใช้

Table 1 : Comparison induce ovulation of *Clarias macrocephalus* using in-house preparation hCG and LHRH analogue plus domperidone.

Treatment regimen	No. brooder	No. male	No. brooder		No. fry	% survival at 1 wk. old
			ovulate	good egg		
hCG	7	5	7	5	14,400	42
LHRH	6	5	6	6	15,500	40

Table 2 : Cost comparison between hCG, pituitary gland and LHRH analogue for use in induce ovulation in *Clarias macrocephalus*.

Hormone	Weight of brooder	Cost (Baht)
in-house hCG	1 Kg	24
commercial hCG	1 Kg	150
pituitary gland	1 Kg	24
LHRH analogue 10 mg	333 Kg	1,100

วิจารณ์

ตามที่ Peter *et al.* (1989) ได้เคยรายงานไว้ว่า LHRH analogue ใช้ร่วมกับ dopamine antagonist สามารถกระตุ้นปลาวางไข่ได้ดี และจากการทดลองนี้พบว่า hCG ให้ผลเหมือนกับ LHRH analogue แสดงว่า hCG ที่สกัดด้วยวิธี kaolin-acetone มีคุณสมบัติกระตุ้นปลาดุกอูยให้ไข่สุกและวางไข่ได้ดี ในระยะแรกภาควิชาชีวเคมีได้ทำการผลิต hCG ให้กับสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ เพื่อนำไปจ่ายให้แก่เกษตรกร ซึ่งอยู่ในเครือข่ายของกรมประมงไปใช้ในการขยายพันธุ์ปลาให้เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งเป็นการช่วยประหยัดเงินตราให้กับประเทศโดยไม่ต้องสั่งซื้อฮอร์โมนจากต่างประเทศ เมื่อสถาบันประมงมีความพร้อมก็จะนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาไปใช้ผลิตฮอร์โมน hCG ต่อไป

จะเห็นได้ว่าวิธี kaolin-acetone ที่นำมาใช้ผลิตฮอร์โมน hCG เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกแก่การผลิต เสียค่าใช้จ่ายน้อย เป็นวิธีที่นำเอาของที่ร่างกายขับทิ้งแล้วกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์อีก และสามารถนำผลผลิตที่ได้ไปใช้กระตุ้นปลา วางไข่และผสมเทียมได้ดี วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกับประเทศที่กำลังพัฒนาที่ต้องการผลิตปลา ซึ่งเป็นอาหารหลัก และเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูกชนิดหนึ่งให้แก่ประชากรของประเทศได้เป็นอย่างดี

คาดว่าฮอร์โมน hCG ที่ผลิตได้นี้จะสามารถนำไปใช้ขยายพันธุ์สัตว์ชนิดอื่นได้อีก และหากทำฮอร์โมนนี้ให้บริสุทธิ์เพียงพอก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในคนได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยลดดุลการค้าของประเทศอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี จากพระมหากรุณาธิคุณของสมเด็จพระเจ้าลูกเธอเจ้าฟ้าหญิงจุฬาภรณ์-วลัยลักษณ์ ที่ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้มูลนิธิจุฬาภรณ์ ประทานเงินทุน และจากศาสตราจารย์ นายแพทย์ นิกร ดุสิตสิน หัวหน้าภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนแพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่ห้องฝากครรภ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้ให้ความร่วมมือและความสะดวกในการเก็บปัสสาวะเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, กำชัย ลาวัญญู, และสุจินต์ หนูขวัญ. 2531. การผลิต Crude hCG จากปัสสาวะหญิง-มีครรภ์เพื่อใช้ในการผสมเทียมพันธุ์ปลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 83 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ 15 หน้า.
- Butt WR, and Lynch SS. 1971. Estimate of urinary gonadotropins by bioassay and radioimmunoassay. J End 51:393-399.
- Lin H, Zhou X, van der Kraak G, and Peter RE. 1987. Comparison of (D-Arg⁽⁶⁾, Trp, Leu⁽⁸⁾, Pro⁽⁹⁾ Net)-luteinizing hormone releasing hormone (sGnRH-A) and (D-Ala⁽⁶⁾, Pro⁽⁹⁾ Net)-luteinizing hormone releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide (PIM) or domperidone (DOM) in stimulating gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). Reproductive physiology of fish 1987. St. Johns, Newfoundland, Canada, August, p 33.
- Ngamwongchon S, Pawaputanon O, Leelapatra W, and Johnson WE. 1988. Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and catfish in Northeast Thailand. Aquaculture. 74: 35-40.
- Peter RE, Lin HR, van der Kraak G, and Little M. 1989. Use of GnRH analogues and dopamine antagonists for induction of ovulation and spawning of culture freshwater fish. Satellite symposium on applications of comparative endocrinology to fish culture. May 22-23, 1989, Spain pp 59-65.