

๐๐๐.๐

๘๖๖๐

๖.๖

การแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้อนตา
ของกุ้งก้ามกราม

ปริญญานิพนธ์

ของ

สมปอง ใจดีเนย

18 S.A. 2539

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2539

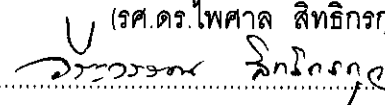
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๘. ๕๖๖๓

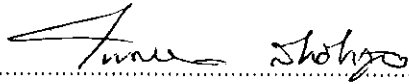
คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปฏิญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

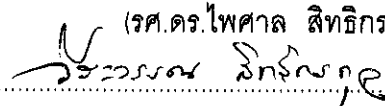
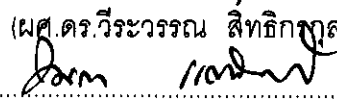
คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน

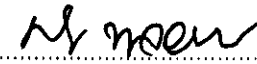
(รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)
.....กรรมการ
(ผศ.ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

(รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)
.....กรรมการ
(ผศ.ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)
.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร.จินดา แท้มบรรจง)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปฏิญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ดร.ศิริยุภา พูลสุวรรณ)

วันที่ 16 เดือน พฤษภาคม พ.ศ.2539

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล และ ผศ.ดร.วิระวรรณ สิทธิกรกุล รวมทั้ง ดร.จินดา แต้มบรรจง ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รศ.เกษร พะลัง ที่ให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณศิวาพร ลงยันต์ คุณวันเพ็ญ สาหร่ายทองคำ คุณพาณี จักรแสงชัยโชติ ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด จนทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้คำแนะนำความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

สมปอง ใจดีเฉย

สารบัญ

บทที่	หน้า
1	บทนำ 1
	ภูมิหลัง 1
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
	ชีววิทยาของกิ้งก่ามรกต 13
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า 18
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า 18
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า 18
2	วิธีการวิจัย 25
	สัตว์ทดลอง 25
	อุปกรณ์การทดลอง 25
	สารเคมี 26
	วิธีดำเนินการทดลอง 27
	การเตรียมสัตว์ทดลอง 27
	การเก็บรวบรวมตากุ้ง 27
	การเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตา 27
	การทำให้ CHH บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) 28
	การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH 29
	การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกิ้งก่ามรกต 29
	การคำนวณร้อยละของการคงสภาพ 30
	วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล 30

บทที่	หน้า
3 ผลการวิจัย	34
4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	63
ภาคผนวก ข	77
ภาคผนวก ค	79
ประวัติย่อของผู้วิจัย	81

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1 การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะ ของCHH ในสัตว์คริสตาเขียนชนิดต่าง ๆ	19
2 การเปรียบเทียบชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ คริสตาเขียนบางชนิด	22
3 ระดับความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้างก่อนฉีด และหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาที่สกัดด้วย methanol-acetic acid เจือจางที่ระดับต่าง ๆ	34
4 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1	37
5 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2	39
6 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 และ 4	45
7 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5-8	52
8 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1.1	64
9 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1.2	65
10 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1.3	66

11	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.1	67
12	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.2	68
13	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.3	69
14	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3	70
15	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4	71
16	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5	72
17	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6	73
18	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7	74
19	การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8	75
20	ระดับความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดทั้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง ก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัดจาก้านตาด้วยน้ำเกลือ ที่เจือจางระดับต่าง ๆ	76

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่ว ๆ ไปของกึ่งก้ามกราม	23
2 เปรียบเทียบลักษณะของกึ่งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย	24
3 เปรียบเทียบขาเดินคู่ที่ 2 ระหว่างกึ่งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย.....	24
4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตาของ กึ่งก้ามกราม	31
5 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่ม ระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH	32
6 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกึ่งก้ามกราม	33
7 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 1	36
8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 2.1	40
9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 2.2	41
10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 2.3	42
11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 3	44
12 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 4	47

13	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของ กึ่งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ขั้นตอนที่ 5-8	51
14	ตัวอย่าง microtiter plate ที่ใช้ในการตรวจหาน้ำตาล ในตัวอย่างเลือดของกึ่งก้ามกราม	78

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เป็นสินค้าออกที่ทำเงินตราให้กับประเทศปีละมาก ๆ เนื่องจากเนื้อกุ้งมีรสชาติดีสามารถประกอบอาหารได้หลายชนิด ในอดีตเคยมีอยู่อย่างมากมายในแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่ปัจจุบันปริมาณของ กุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติมีจำนวนลดลง เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การทำการ ประมงมากเกินไปจนควรรหรือผิดวิธี ปัญหาจากมลภาวะต่าง ๆ และการเพิ่มขึ้นของประชากร ฯลฯ จึงทำ ให้มีผู้สนใจเฉพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแทนการจับจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ซึ่งนักวิชาการและ เกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่างก็พยายามศึกษาและพัฒนาวิธีการต่าง ๆ เพื่อช่วยให้การเลี้ยงกุ้ง- ก้ามกรามได้ผลดียิ่งขึ้น

เป็นที่ทราบกันดีว่าสัตว์พวกครัสเตเชีย (crustacean) โดยเฉพาะพวก decapod เช่น กุ้ง ปู และ crayfish กระบวนการทางสรีรวิทยาหลายกระบวนการถูกควบคุมโดยนิวโรฮอโมน (neuro-hormone) ซึ่งอยู่ในก้านตา กระบวนการเหล่านี้ได้แก่ การเคลื่อนที่ของรงควัตถุที่ผิวหนังหรือที่ตา การ ลอกคราบ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ สมดุลของน้ำและแร่ธาตุ อัตราการเต้นของหัวใจ การปรับ อุณหภูมิ เมตาบอลิซึมของแคลเซียม ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งการควบคุมระดับ น้ำตาลในเลือด (Keller and Sedlmeier, 1988) ในปัจจุบันสามารถแยก ทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาจน ทราบถึงโครงสร้างทางเคมีรวมทั้งแหล่งที่ผลิตของฮอโมนบางชนิดได้บ้างแล้ว เช่น ฮอโมนที่ยับยั้ง พัฒนาการของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH or Gonad Inhibiting Hormone-GIH) (Soyez and others, 1987; Aguilar and others, 1992) ฮอโมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุ ในโครมาโตฟอร์ (Pigment Dispersing Hormone-PDH) (Kleinholz and others, 1986; Rao and Riehm, 1988) ฮอโมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุภายในตาเพื่อปรับตัวให้เข้ากับแสงในที่มืด (Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH) (Fernelund, 1974) ฮอโมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhi-biting Hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb, 1987) และฮอโมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ของสัตว์พวกครัสเตเชีย (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Martin and others, 1984; Huberman and Aguilar, 1986; Kegel and others, 1989; Soyez and others, 1990; Tensen and others, 1991; Huberman, Aguilar and Brew, 1993)

ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียหรือ CHH เป็นสารประเภท โพลีเปปไทด์ เป็นโมเลกุลที่ไวต่อความร้อน ถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์โปรตีเอส (Beltz. 1988) ได้มีการแยกฮอร์โมนนี้จากสัตว์ครัสตาเซียต่าง ๆ หลายสปีชีส์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ และมีการศึกษา ลักษณะต่างๆ ทางด้านชีววิทยาและชีวเคมีของฮอร์โมนนี้บ้างแล้วในบางสปีชีส์ พบว่า CHH ในสัตว์ พวกครัสตาเซียแต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างกันบ้างในด้านส่วนประกอบและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Kegel and others. 1991; Huberman and others. 1993) ในสัตว์สปีชีส์เดียวกันอาจ มี CHH ได้หลายรูปแบบ (polymorphism) เช่น ใน Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* พบ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C (Huberman and Aguilar. 1988) และในกุ้ง American lobster, *Homarus americanus* พบ CHH 2 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH กลุ่มละ 2 รูปแบบ (Soyez and others. 1990) การที่ CHH มีหลายรูปแบบอาจเป็นไปได้ว่า CHH ผลิตมาจาก gene เดียว แต่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากถอดรหัสเป็นโปรตีน (postranslational modification) ให้ CHH หลายรูปแบบ หรือ CHH อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการเพิ่มจำนวน gene ก็ได้ (Huberman and Aguilar. 1988)

จากการศึกษาด้วยปฏิกิริยาเคมีและปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (immunocytochemical studies) ในกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* โดยใช้แอนติซีรัม (antiserum) ต่อ CHH ที่ผลิตได้ พบว่ากลุ่มของตัวเซลล์ประสาท (perikarya) ที่สร้าง CHH จะอยู่บริเวณที่เรียกว่า Medulla Terminalis Ganglionic X-organ (MTGXO) ในก้านตาและมีส่วนปลายประสาทแยกออกไปสิ้นสุดที่บริเวณต่อมไชนัส (sinus gland-SG) ซึ่งเป็น neurohemal organ ในก้านตาเช่นกัน ต่อมไชนัสจึงเป็นแหล่งสะสมและปล่อย CHH ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue) โดยลำเลียงมาจาก neurosecretory cells ซึ่งอยู่ที่ X-organ (Kallen and Van Herp. 1981) ส่วนของ MTGXO-SG system มีขนาดและจำนวนเซลล์ที่สร้าง CHH แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ครัสตาเซียนั้น ๆ เช่น ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* มีเซลล์ขนาด 40 ไมโครเมตร จำนวน 40 perikarya ที่ MTGXO ในกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* มีเซลล์ขนาด 50 ไมโครเมตร จำนวน 32 perikarya และในกุ้งมังกร *Palinurus* sp. มีเซลล์จำนวนมากถึง 150 perikarya เป็นต้น (Keller and Sedlmeier. 1988) นอกจากนี้ยังพบว่าบางส่วนของฮอร์โมนนี้อาจสร้างมาจากสมองส่วนโปรโตซีรีบรัม (protocerebrum) ของแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* ระบบประสาทส่วนกลาง และ pericardial organ ของปู *Carcinus maenas* (Keller and Sedlmeier. 1988) และปมประสาทส่วนอกของปูน้ำจืด *Barythelphusa guerini* (Gangotri, Venkatachari and Vasantha. 1987) อย่างไรก็ตามแหล่งสร้าง CHH ในก้านตาจะเป็นตัวหลักในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเพราะมี

ปริมาณมาก ส่วนแหล่งอื่น ๆ มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นในการแยกสกัด CHH และทำให้บริสุทธิ์ในสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลา เช่น ในแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (Martin and others. 1984) ในกุ้ง crayfish, *Procambarus bouvieri* (Huberman and Aguilar. 1988) ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* (Kegel and others. 1989) ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez and others. 1990) ในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* (Kegel and others. 1991) จึงใช้ก้านตาเป็นแหล่งสกัดฮอร์โมนทั้งสิ้น

เมื่อประมาณ 50 ปีที่แล้วมา ได้มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ของ CHH พบว่าฮอร์โมนนี้เป็นปัจจัยที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (diabetogenic factor) ของปู *Callinectes sapidus* (Abramowitz. 1944) และได้มีรายงานว่า เมื่อตัดก้านตาของกุ้ง ปู และ crayfish (order decapoda) หลายชนิด ในกั้งตั๊กแตน *Squilla mantis* (order stomatopoda) และในแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (order isopoda) จะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง และเมื่อให้สารสกัดจากก้านตากลั้วเข้าไปในสัตว์เหล่านั้นจะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น (Keller and Sedlmeier. 1988) นั่นคือ CHH มีหน้าที่ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้ปกติเพื่อรักษาสมดุลของร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่า CHH มีศักยภาพในการกระตุ้นให้มีการหลั่งเอนไซม์อะไมเลส (potent secretagogue action) จาก midgut gland ของกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* (Sedlmeier. 1988)

จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ CHH ในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* พบว่าจะผ่านทางตัวส่งสัญญาณที่สอง (second messenger) คือ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และผ่านทางระบบการสร้าง cAMP (cyclic AMP หรือ adenosine 3', 5' monophosphate) และ cGMP (cyclic GMP หรือ guanosine 3', 5' monophosphate) โดยก่อให้เกิดการสลายไกลโคเจนและยับยั้งการสังเคราะห์ไกลโคเจน เป็นผลให้มีการปล่อยกลูโคสสู่กระแสเลือด ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น (Sedlmeier and Keller. 1981; Sedlmeier. 1988)

ได้มีรายงานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ข้ามกัน (cross-reactivity) ระหว่างสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดต่าง ๆ พบว่าการออกฤทธิ์ข้ามกันค่อนข้างจำกัด เช่น CHH ของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* สามารถทำให้ระดับกลูโคสในเลือดเพิ่มได้ในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* แต่ CHH จากกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* ไม่สามารถทำให้ระดับกลูโคสเพิ่มในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ปู *Carcinus maenas* และแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* ได้ แต่จากการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกันด้วยกระบวนการทาง RIA (radioimmunoassay) พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกันระหว่าง CHH ของ *C.maenas* กับแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (Martin and others. 1984) และปู *C.maenas* กับกุ้ง crayfish,

Orconectes limosus (Keller and Sedlmeier, 1988) ซึ่งแสดงว่า CHH ในครัสเตเชียแต่ละชนิดมีโครงสร้างบางส่วนของโมเลกุลคล้ายคลึงกันจึงออกฤทธิ์ข้ามกันได้ แต่ก็มีบางส่วนของโมเลกุลที่ออกฤทธิ์แตกต่างกันไปเป็นผลให้ปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างสปีชีส์ค่อนข้างจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากรีเซพเตอร์ในเนื้อเยื่อเป้าหมายจะมีความจำเพาะต่อฮอร์โมนเพียงชนิดเดียวหรือฮอร์โมนที่มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้าย ๆ กันเท่านั้น ซึ่งส่วนของโมเลกุลที่แตกต่างกันไปนี้อาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่มีวิวัฒนาการ (Keller and Sedlmeier, 1988) จากเหตุผลดังกล่าวนี้เองทำให้สามารถอธิบายได้ว่าการที่ MIH จากกุ้งอเมริกันลอกบสเตอร์ *Homarus americanus* แสดงคุณสมบัติของ CHH ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เพราะ ฮอร์โมนทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากในด้านน้ำหนักโมเลกุลและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Kegel and others, 1991)

ดังนั้นการศึกษาฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic hormone) โดยเฉพาะฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ถ้าสามารถแยกและทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ก็จะเป็นพื้นฐานไปสู่การศึกษาถึงโครงสร้างของ CHH ก่อนที่จะศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนนี้ที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการดำรงชีวิตของกุ้งก้ามกรามให้ได้ผลดีต่อไปในอนาคต

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ความรู้ที่ได้จากการศึกษารั้งนี้จะเป็นแนวทางในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ จากก้านตากุ้งได้เป็นอย่างดี เมื่อแยกและทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้แล้วสามารถนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างองค์ประกอบทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล แหล่งสร้าง ตลอดจนบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึม กลไกการออกฤทธิ์ รวมทั้งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CHH เพราะแอนติบอดีที่ได้ อาจมีปฏิกิริยาข้ามกับฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีส่วนของโมเลกุลใกล้เคียงกับ CHH เช่น VIH, MIH เป็นต้น ช่วยให้การแยกและทำให้ฮอร์โมนเหล่านี้บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น เพราะสามารถใช้การทดสอบทางภูมิคุ้มกันมาช่วยในระหว่างการแยกฮอร์โมนด้วย โดยเฉพาะ VIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนารังไข่ ถ้ากำจัดฮอร์โมนนี้ได้ จะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งน้ำจืดและน้ำเค็มเป็นอย่างมากในแง่ของการขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งได้

การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ทดลองเพราะไม่มีผู้ใดศึกษาฮอร์โมนนี้ในกุ้งชนิดนี้มาก่อน นอกจากนี้กุ้งก้ามกรามยังมีลักษณะที่ได้เปรียบกว่ากุ้งชนิดอื่น ๆ อีกคือมีขนาด

ใหญ่ สะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและฉีดสารสกัด และเป็นกุ้งที่เจริญเติบโตในน้ำจืดจึงทำให้สะดวกในการเลี้ยงดู อีกทั้งยังมีข้อมูลค่อนข้างพร้อมในการเลี้ยงดู ราคาไม่แพงเกินไป สามารถหาซื้อได้ง่ายตลอดระยะเวลาการทดลอง เพราะมีเกษตรกรจำนวนมากที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามขายเป็นอาชีพ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดใกล้เคียงกับกรุงเทพฯ ได้แก่ นครปฐม สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา เป็นต้น ทำให้การลำเลียงกุ้งมาเลี้ยงที่สถานที่ทดลองไม่ยุ่งยากมากนัก กุ้งไม่บอบช้ำจนเกินไป สามารถนำมาเลี้ยงและทดลองต่อไปได้เป็นอย่างดี

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด โดยการตัดก้านตาของปู *Callinectes sapidus* ออกและตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่าจะมีระดับน้ำตาลในเลือดลดต่ำลง แต่เมื่อให้สารสกัดจากก้านตาคลับเข้าไปจะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น จึงสรุปว่าปัจจัยที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (diabetogenic factor) อยู่ในก้านตาของปู (Abramowitz, 1944) และจากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่าปัจจัยนี้คือฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ครึ่ง-ตาเขียน

การศึกษาถึงผลของการตัดก้านตาของปูน้ำจืด *Barytelphusa guerini* พบว่าการตัดก้านตาของปูออกทั้งสองข้างเป็นผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 1-2 ชั่วโมงแรกหลังจากการตัดก้านตา ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิด nervous shock ที่เกิดจากการตัดก้านตาหรือมีการปล่อยฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดออกมา ต่อมาระดับน้ำตาลในเลือดจะลดลงและอยู่ในสภาวะเช่นนี้นานถึง 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับระดับน้ำตาลในเลือดของปูปกติที่ไม่ตัดก้านตากับปูที่ตัดก้านตา ปรากฏว่าปูที่ตัดก้านตาจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าปูปกติ แต่เมื่อให้สารสกัดจากก้านตาคลับเข้าไปในปูที่ตัดก้านตาจะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น (Gangotri, Venkatachari and Vasantha, 1987)

ในการศึกษาผลของการฉีดสารสกัดหยาบจากต่อมไชนัสของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* เข้าไปในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus gammarus* พบว่ามีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากฉีดสารสกัดเข้าไป 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นนี้จะลดลงจนถึงระดับปกติเท่ากับกลุ่มควบคุม (Soyez and others, 1990) ต่อมาในปี 1992 วีระวรรณ สิทธิกรกุล สันติ เรืองมณีไพฑูรย์ และไพศาล สิทธิกรกุล (Sithigorngul W., S. Ruengmanee-paitoon and P. Sithigorngul, 1992) ได้ตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม

Macrobrachium rosenbergii เพื่อเป็นแนวทางในการแยกสกัดฮอร์โมนนี้และฮอร์โมนอื่น ๆ จากก้านตา กุ้ง จากการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากวางไข่ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งปกติมีความแปรปรวนสูงมาก ทั้งนี้เนื่องจากกุ้งมีความสามารถในการเปลี่ยนระดับกลูโคสในเลือดได้อย่างรวดเร็วตามความต้องการของร่างกาย ดังนั้นในขณะเก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งอาจเป็นการกระตุ้นให้มีการเคลื่อนย้ายกลูโคสจากแหล่งสะสม แต่ในกุ้งที่ถูกตัดก้านตาออกทั้งสองข้างจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำและค่อนข้างคงที่ เพราะการตัดก้านตาเป็นการกำจัดฮอร์โมนสำคัญที่เพิ่มระดับกลูโคสในเลือด เมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตา (2 ก้านตาคือตัว) เข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดก้านตาทั้งสองข้างและเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 1/2, 1, 2, 4, และ 6 ชั่วโมง พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและถึงจุดสูงสุดประมาณ 1 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งที่ถูกตัดตาโดยใช้สารสกัดจากก้านตาที่เจาะจากรดับต่าง ๆ ได้แก่ 2, 1/2, 1/8, 1/32, 1/125, 1/500 และ 1/2,000 ก้านตาคือตัว พบว่าปริมาณของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดจะแปรผันตามปริมาณของสารสกัดจากก้านตาที่ฉีดเข้าไป

ส่วนการศึกษาถึงอิทธิพลของเพศ น้ำหนัก อุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำเกลือต่อระดับกลูโคสในเลือดของกุ้ง brown shrimp, *Crangon crangon* พบว่ากุ้งเพศผู้จะมีระดับกลูโคสที่สูงที่สุด รองลงมาคือกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะฟักไข่ (ovigerous female) ส่วนกุ้งเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะฟักไข่ (non-ovigerous female) จะพบกลูโคสต่ำที่สุด การที่กุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะฟักไข่พบระดับกลูโคสมากกว่ากุ้งเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะฟักไข่ ทั้งนี้ก็เพราะว่าขณะที่กุ้งมีการพัฒนาของไข่และรังไข่จะมีการดึงกลูโคสที่สะสมอยู่ในรูปของไกลโคเจนที่บริเวณตับ-ตับอ่อนมาใช้ จึงทำให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่า และจะสูงเช่นนี้จนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัวอ่อนระดับกลูโคสจึงลดลง ในด้านอิทธิพลของน้ำหนักตัว กุ้งที่มีน้ำหนักตัวน้อยจะมีระดับกลูโคสสูงกว่ากุ้งที่มีน้ำหนักตัวมาก เมื่อนำกุ้งไปเลี้ยงในอ่างน้ำที่มีความเข้มข้นของน้ำเกลือต่าง ๆ กันคือ 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ppt. พบว่าระดับของกลูโคสในเลือดจะสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 12 ppt. และต่ำที่สุดเมื่อความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 36 ppt. ส่วนการศึกษอิทธิพลของอุณหภูมิต่อระดับกลูโคสในเลือด พบว่าจากการนำกุ้งไปเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (16-20 องศาเซลเซียส) กุ้งจะมีระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิต่ำ (7-10 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำกุ้งมีเมตาบอลิซึมลดลง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในระหว่างการเก็บเลือดระดับน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้น เป็นเพราะว่าการเก็บเลือดเป็นการกระตุ้นกระบวนการเมตาบอลิซึมให้มีการเคลื่อนย้ายกลูโคสจากแหล่งสะสมได้แก่ ตับ-ตับอ่อนเข้าสู่ระบบ

หมุนเวียน เป็นการตอบสนองต่อการกระตุ้นเป็นผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น (Spaargaren and Haefner, 1987)

ได้มีการศึกษาการแยกและการทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งลักษณะทางชีวเคมีของ CHH ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียชนิดต่าง ๆ ดังนี้ (ตาราง 1)

ในการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* จำนวน 1,065 ต่อมไชนัส โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร (pH 8.5) และนำสารสกัดที่ได้ไปผ่าน polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เลือกแถบโปรตีนที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน Sephadex G-50 พบ CHH ถูกชะออกมาตรงกับ fraction ที่ 60-68 ตรวจวัดปริมาณโปรตีนของฮอร์โมนบริสุทธิ์ที่ได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีน 280 ไมโครกรัมหรือประมาณ 3.5 มิลลิกรัมของโปรตีนทั้งหมด จากนั้นนำ CHH ที่ได้ไปตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบโดยใช้ปฏิกิริยา dansylation และ Edman degradation และการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปรากฏว่า CHH ของปูน้ำเค็มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน ปลาย N ถูกบล็อก (Keller and Wunderer, 1978)

ได้มีรายงานการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* จำนวน 2,000 ต่อมไชนัส การสกัดทำโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเปรียบเทียบกันคือ แอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (pH 8.5) และ กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Lowry method พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีปริมาณโปรตีนเป็น 0.64 และ 0.41 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกผ่าน gel chromatography Sephadex G-50 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ลักษณะของโครมาโตแกรมออกมาเหมือนกัน กล่าวคือมีเพียงพีคเดียวเท่านั้นที่แสดง biological activity และถูกชะออกมาที่เวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารสกัดจากต่อมไชนัสที่สกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร เมื่อผ่าน gel chromatography Sephadex G-50 แล้วจะมีปริมาณฮอร์โมนลดลงประมาณร้อยละ 30 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดฮอร์โมนโดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร จะได้ปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่าการสกัดด้วยแอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้ เมื่อนำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ Sephadex G-50 ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ในสัตว์ทดลอง โดยวิธี Glucose Oxidase Method

(Test Kit GOD, Perid, Boehringer) พบว่า fraction ที่ 41-55 แสดง activity การเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด จึงรวบรวมแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่สองโดยใช้ HPLC, μ -Bondapak C18 column ได้โครมาโตแกรมออกมา 2 พีค Major peak แสดง activity ส่วน minor peak ไม่แสดง activity จากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามระหว่างสปีชีส์ พบว่า CHH มีความจำเพาะมากกล่าวคือ CHH จากสปีชีส์อื่น ๆ เช่น CHH จาก *Orconectes limosus* และ *Carcinus maenas* จะไม่แสดง activity ใน *Porcellio dilatatus* แต่ถ้าเป็นในสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน เช่น CHH จาก *Carcinus maenas* และ *Uca pugilator* สามารถตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Martin and others. 1984)

ส่วนการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของกุ้ง Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* โดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด จากนั้นนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน โดยใช้ RP-HPLC (reverse phase-HPLC) ขั้นตอนแรกใช้ Nova-Pak C18 column ผลจากการทำให้บริสุทธิ์ได้พีคที่ไม่สมมาตรเพียงพีคเดียว แล้วนำสารละลายที่เก็บได้ของพีคนี้ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่สองโดยใช้ μ -Bondapak-phenyl column พบว่าได้ 3 พีคคือ A, B, และ C โดยที่พีค B และ C แสดง activity การเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อนำไปตรวจสอบทางชีวภาพ ขณะที่พีค A ไม่แสดง activity นี้ เมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE (sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) โปรตีนจากพีค B จะเคลื่อนที่แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดียว ๆ ไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่น ๆ และเมื่อเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานอยู่ในช่วง 6,000-6,500 dalton เมื่อนำมาแยกโดยใช้ IEF (isoelectric-focusing) พบว่าพีค B แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดียว ๆ ที่ pI เท่ากับ 4.79 จากการวิเคราะห์หากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน และหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน โดยการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งปฏิกิริยา dansylation พบว่าปลาย N ของเปปไทด์ B ถูกบล็อก ปลาย C เป็นไฮโดรฟิลิก (H₂O) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 หน่วย คำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากกรดอะมิโนได้เท่ากับ 6,042 dalton และพบซิสเทอีน (Cys) 4 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 2 ตำแหน่ง ไม่พบทริปโตเฟน (Trp) ฮิสติดีน (His) และเมไทโอนีน (Met) สำหรับพีค A อาจจะเป็น inactive precursor, inactive degradation product, modified hormone หรือโปรตีนอื่น ๆ ที่ชะออกมาพร้อมกับพีค B และ C ใน HPLC ขั้นตอนที่หนึ่ง (Huberman and Aguilar. 1986)

กอลเลนและคนอื่น ๆ (Kallen and others. 1986) ได้นำเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งของ CHH 3 บริเวณคือ perikarya, axon tract และต่อมไชนัสของกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* มาสกัดและตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางชีวเคมี ได้แก่ PAGE, SDS-PAGE และ HPLC พร้อมกันนี้ได้นำวิธี

dotting immunobinding assay (DIA) มาเป็นวิธีติดตาม CHH และตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองไปพร้อม ๆ กัน พบว่าหลังจากผ่าน PAGE แล้ว สารสกัดจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 บริเวณเคลื่อนที่ออกมาได้ระยะทางเท่ากัน และสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองและให้ผลบวกกับ DIA ได้เหมือนกัน แต่สารสกัดจาก perikarya ยังพบ minor peak อีกซึ่งเคลื่อนที่ออกมาได้ระยะทางน้อยกว่า major peak Minor peak นี้อาจเป็นโปรฮอร์โมนของ CHH เมื่อนำสารที่ผ่าน PAGE ไปผ่าน SDS-PAGE พบว่าสารนี้เคลื่อนที่ออกมาเป็นแถบโปรตีนเดี่ยว ๆ และตรงกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000 ดาลตัน แล้วนำสารที่ให้ผลบวกกับ DIA หลังจากผ่าน PAGE ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC ปรากฏว่าสารนี้ถูกชะออกมา 2 พิกที่เวลา 28-29 และ 52-54 นาทีตามลำดับเหมือนกันทั้ง 3 เนื้อเยื่อ

ต่อมาในปี 1988 ฮิวเบอร์แมนและอาเกิลาร์ (Huberman and Aguilar, 1988) ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของ CHH 2 รูปแบบ จากสัตว์ทดลองเดิม (*Procambarus bouvieri*) โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC, μ -Bondapak-phenyl column ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) เป็นตัวทำละลาย A และ 60 % acetonitrile (ACN) 0.1 % TFA เป็นตัวทำละลาย B ปรากฏว่าได้ CHH ออกมา 2 พิก ซึ่งแยกจากกัน และทั้ง 2 พิกก็สามารถแสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด พิกเหล่านี้พบว่าเป็น CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C และอัตราส่วนของ CHH-B ต่อ CHH-C เป็น 3:1 เมื่อนำ CHH ทั้งสองรูปแบบไปผ่าน SDS-PAGE พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่า ๆ กันและไม่มีแถบโปรตีนอื่นมาปนเปื้อนเลย นอกจากนี้ยังพบว่า CHH ทั้งสองรูปแบบมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,500 dalton เมื่อเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานคือ aprotinin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 6,500 dalton จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปฏิกริยา dansylation และการตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ ทั้ง CHH-B และ CHH-C มีความเหมือนกันอย่างมาก ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,200 dalton (คำนวณจากกรดอะมิโน) pI 4.79 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52-53 หน่วย มีซิสเทอีน (Cys) 4 หน่วย ไม่พบเมไทโอนีน (Met) ฮิสติดีน (His) ทริปโตเฟน (Trp) ปลาย N ถูกบดลิด ปลาย C เป็นไอโซลิวซีน (Ile) จำนวนกรดอะมิโนพวกกรดและอนุพันธ์มี 12 หน่วย จำนวนกรดอะมิโนพวกเบสมี 8 หน่วย CHH ทั้งสองรูปแบบมีความแตกต่างกันเล็กน้อยคือ จำนวนกรดอะมิโนลิวซีน (Leu) และฟีนิลอะลานีน (Phe) รวมทั้ง hydrophobicity ซึ่งความแตกต่างนี้เนื่องมาจากจำนวนของ

neutral hydrophobicity residues และหรือมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับกรดอะมิโนพวกกรดภายหลังได้แก่ปฏิกิริยา amidation/deamidation

นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนใน CHH จากปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไขนัสของปูชนิดนี้ แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ให้โครมาโตแกรมออกมา 2 พีค ประกอบด้วย major peak และ minor peak ซึ่ง minor peak มี activity เพียงร้อยละ 10 ของ CHH ทั้งหมด จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ CHH โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และใช้ manual microsequencing, DABITC-PITC double coupling method (DABITC: 4-N, N-dimethylaminoazobenzene -4- isothiocyanate ; PITC : phenylisothiocyanate) พบว่า CHH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,524 dalton มี ซิสเทอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 3 ตำแหน่ง (ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52) ทั้งปลาย N และปลาย C ถูกบล็อก นอกจากนี้ยังพบอีกว่า CHH มีลำดับการเรียงตัวไม่เหมือนกับเปปไทด์ฮอร์โมนหรือโปรตีนอื่น ๆ ที่เคยรู้จักมาก่อน (Kegel and others. 1989)

โซเยซและคนอื่น ๆ (Soyez and others. 1990) ได้แยกสกัด CHH จากต่อมไขนัสของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยใช้สารหลายชนิดสกัดได้แก่ กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 กรดไฮโดรคลอริกที่ร้อน (80 °C) เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และกรดอะซิติกที่ร้อน (80 °C) ปรากฏว่าถึงแม้จะใช้สารต่างชนิดกันสกัด หรือ ใช้สารชนิดเดียวกันสกัดแต่ใช้อุณหภูมิต่างกัน ก็ให้โครมาโตแกรมออกมาเหมือนกัน แต่การสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 จะทำให้มีการสูญเสียฮอร์โมนไปบ้าง ขณะที่การสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ร้อน ปริมาณของฮอร์โมนก็ยังคงสภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ร้อนไปผ่าน RP-HPLC Nucleosil C18 column ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.1 % TFA ในน้ำ และ 0.1 % TFA ใน n-propanol ได้เปปไทด์ออกมา 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเปปไทด์ย่อย ๆ 2 กลุ่มรวมกัน (กลุ่ม 1 คือ No.1, 2 กลุ่ม 2 คือ No.3, 4 และกลุ่ม 3 คือ No.5, 6) แต่มีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดคือ กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3 ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่แสดง activity นี้เมื่อตรวจสอบในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus gammarus* ขณะที่เมื่อทดสอบในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* และ *Astacus leptodactylus* เปปไทด์ทั้งสามกลุ่มจะแสดง activity ได้ทั้งหมด เมื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB/MS (Fast atom bombardment-mass spectrometry) พบว่าพีคที่มี hydrophobic น้อย (No.1 และ No.2) มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 dalton เมื่อนำไปผ่าน IEF พบว่าเป็นเปปไทด์พวกเบส

มี pI 8.7 ขณะที่พิกที่มี hydrophobic มาก (No.5 และ No.6) มีน้ำหนักโมเลกุล 8,577 dalton เป็นเปปไทด์พวกกรด มี pI 5.0 จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ปรากฏว่าเปปไทด์ 1 และ 2 เปปไทด์ 5 และ 6 มีความเหมือนกันอย่างมาก มีความแตกต่างกันบ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่จำนวนกรดอะมิโนในพวกอะโรมาติกที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ เมื่อตรวจวัดด้วย double UV detection ที่ 220/280 นาโนเมตร แต่ละกลุ่มของเปปไทด์ให้ค่าดูดกลืนแสงต่างกัน และจากการศึกษาศักยภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดพบว่า เปปไทด์ทั้ง 4 สามารถทำให้มีการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เท่า ๆ กัน

ในปีต่อมาเทนเซ็นและคนอื่น ๆ (Tensen and others, 1991) ได้ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของ CHH 2 รูปแบบในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยสกัด CHH จากต่อมไชนัสด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ร้อนเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนโดยใช้ RP-HPLC สามารถแยก CHH ออกมาได้ 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH 2 รูปแบบ จากการนำเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่มมาศึกษาทางด้านลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกัน ได้แก่ การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ การหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Edman degradation และการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB/MS พบว่าเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่ม ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีโพโรกลูตาเมต (pGlu) ที่ปลาย N แต่มีความแตกต่างกันในด้านกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ อัตราส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน acidity, hydrophobicity รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลด้วย โดยที่เปปไทด์กลุ่มแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 dalton ส่วนกลุ่มที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล $8,655 \pm 25$ dalton

สำหรับการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* โดยสกัด CHH จากต่อมไชนัสและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC เลือกพิกที่มีปริมาณฮอริโมนมากที่สุดมาหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเปปไทด์ฮอริโมนโดยวิธี manual Edman micro-sequencing พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีโพโรกลูตาเมตที่ปลาย N ส่วนปลาย C เป็นแวลีน มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 3 ตำแหน่ง (ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52) เมื่อทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยคำนวณจากกรดอะมิโนที่ตรวจวิเคราะห์ได้และจากเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) พบว่าฮอริโมนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 8,400 dalton เมื่อเปรียบเทียบจำนวนกรดอะมิโนใน CHH จาก *Orconectes limosus* กับ CHH จาก *Carcinus maenas* ปรากฏว่ามี

กรดอะมิโนที่ซ้ำกันถึงร้อยละ 61 และซ้ำกับ MIH จาก *Homarus americanus* ถึงร้อยละ 81 (Kegel and others. 1991)

ต่อมาในปี 1993 ฮิวเบอร์แมนและคนอื่น ๆ (Huberman and others. 1993) ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างปฐมภูมิของ CHH จากสัตว์ครึ่งตัวเขียนชนิดต่าง ๆ พบว่า CHH-isomorph ของ *Procambarus bouvieri* มีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนนี้ซ้ำกับ CHH จาก *Orconectes limosus*, *Carcinus maenas* และ CHH-A, CHH-B ของ *Homarus americanus* ถึงร้อยละ 98.6, 61.1, 83.3 และ 79.2 ตามลำดับ ดังตาราง 2

ในปีเดียวกัน ได้มีรายงานการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของ wood lice, (isopod) *Armadillidium vulgare* จำนวน 600 ต่อมไชนัสด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC ระบบสารละลายที่ใช้คือ ACN/TFA นำสารที่ชะออกจากคอลัมน์ของแต่ละ fraction ไปตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง เลือก fraction ที่พบ CHH ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่องแมสสเปคโตรเมตรี พบว่า CHH ของ isopod มีน้ำหนักโมเลกุล 8,729.3 ดาลตัน และมีความบริสุทธิ์อย่างน้อย 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ CHH ที่ได้ไปหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และปฏิกิริยา Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 73 หน่วย มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridges 3 ตำแหน่ง คือระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52 ปลาย N ไม่ถูกบดล็อก ปลาย C จะเกิดปฏิกิริยา amidation กับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ (Martin, Sorokine and Dorsselaer. 1993)

ในปี 1994 ได้มีรายงานศึกษา CHH ใน Norway lobster, *Nephrops norvegicus* โดยสกัดฮอร์โมนนี้จากต่อมไชนัสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร สารสกัดที่ได้สามารถทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นจนถึง 5 ชั่วโมง จึงนำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC Nucleosil C18 column พบว่าเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) โดยใช้ anti-*Orconectes* CHH antiserum Fraction ที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดคือ 34-37 โดย fraction ที่ 35 และ 36 แสดง activity นี้ได้สูงที่สุด จากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ออกมาตรงกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8,000 dalton และมีแถบโปรตีนอื่น ๆ ปะปนอยู่บ้างเล็กน้อย (Smullen and Bently. 1994) และในปีเดียวกัน วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล และ นิรันดร์ บุญอิงเพริศพงศ์ (Sithigorngul W., P. Sithigorngul and N. Boon-ingpirdpong. 1994) ได้ศึกษา

แนวทางการแยก CHH เบื้องต้นในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่าการสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (methanol : acetic acid / 90:1) ให้ผลดีทั้งในด้านการคงสภาพและความบริสุทธิ์ ซึ่งดีกว่าการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 และน้ำเดือด

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการแยก CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (methanol : acetic acid / 90:1) นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายต่าง ๆ กัน แล้วทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH โดยตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งหลังจากฉีดสารสกัดที่แยกสกัดได้ในขั้นตอนต่าง ๆ ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน โดยเฉพาะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับ CHH ในด้านกระบวนการเมตาบอลิซึมในสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิด และเป็นแนวทางในการแยกสกัดฮอร์โมนอื่น ๆ ต่อไป เช่น VIH

ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืด ซึ่งมีการจัดลำดับหมวดหมู่ (classification) ทางอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Holthius. 1980; Dore and Frimodt. 1987)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Infraorder	Caridea
Superfamily	Palaemonoidea
Family	Palaemonidae
Subfamily	Palaemoninae
Genus	<i>Macrobrachium</i>
Species	<i>rosenbergii</i>

ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีโครงร่างแข็งแรงภายนอกปกคลุมร่างกาย โดยทั่วไปจะมีสีน้ำเงินเข้มทั้งตัวโดยเฉพาะขาเดินคู่ที่เป็นก้ามและส่วนของลำตัวปลายของขาเป็นสีชมพูอมแดง แขนงตอนปลายทั้งด้านในและด้านนอกก็มีสีชมพูอมแดงเช่นกัน มีรายงานพบว่ากุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของประเทศไทย ตัวโตที่สุดเท่าที่เคยพบ มีความยาวจากหัวถึงปลายหาง 25 เซนติเมตรหนัก 470 กรัม พบที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (ประจวบ หล้าอุบล. 2527) โดยทั่วไปเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ซึ่งเพศผู้จะมีลำตัวยาวถึง 32 เซนติเมตร ส่วนเพศเมียมีลำตัวยาวประมาณ 25 เซนติเมตร (Dore and Frimodt. 1987)

อาหารของกุ้งก้ามกรามเป็นพวกสาหร่าย พรรณไม้ น้ำบางชนิด แมลงและสัตว์ขนาดเล็กในน้ำ กุ้งก้ามกรามมีเหงือกเป็นอวัยวะในการแลกเปลี่ยนก๊าซ มีระบบหมุนเวียนเป็นระบบเปิด การขับถ่ายของเสียจะใช้ต่อมขับถ่าย (green gland) ซึ่งมีอยู่ 1 คู่ที่ฐานของแอนเทนนา (บพิตร จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. 2528)

การแพร่กระจาย

กุ้งก้ามกราม มีการแพร่กระจายกว้างขวางมากทั้งในเขตน้ำกร่อยและบริเวณน้ำจืด กุ้งก้ามกรามในแต่ละท้องถิ่นที่มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปเช่น กุ้งใหญ่ แม่กุ้ง กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งแห กุ้งก้ามเกลี้ยง เป็นต้น ในประเทศไทยจะพบมากบริเวณภาคกลางเกือบทุกจังหวัด นอกจากประเทศไทยแล้วยังพบกุ้งก้ามกรามแพร่กระจายทั่วไปในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ สิงคโปร์ มาเลเซีย เวียดนาม กัมพูชา พม่า และอินโดนีเซีย เป็นต้น (ประจวบ หล้าอุบล. 2527)

การสืบพันธุ์ การวางไข่และการฟักไข่

กุ้งเพศเมียที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไปเป็นกุ้งที่พร้อมจะผสมพันธุ์ได้ กุ้งเพศเมียที่มีไข่แก่พร้อมที่จะผสมพันธุ์จะสังเกตได้จากส่วนหัวจะปรากฏเป็นสีส้มแก่เป็นก้อนบริเวณกลางหัวซึ่งเป็นรังไข่ของกุ้งและกุ้งจะลอกคราบก่อนผสมพันธุ์ครั้งหนึ่ง ในปีหนึ่ง ๆ กุ้งมักจะวางไข่ในเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายน แต่จะพบกุ้งเพศเมียที่มีไข่ติดหน้าท้องตลอดปี เมื่อผสมพันธุ์แล้วกุ้งจะวางไข่ไว้ที่ขนอ่อน ๆ บริเวณขาว่ายน้ำ หลังจากนั้นอีกประมาณ 17-19 วันกุ้งจะฟักออกจากไข่ หลังจากผสมพันธุ์แล้วแม่กุ้งจะอพยพออกสูปากแม่น้ำเพื่อฟักไข่ในบริเวณน้ำกร่อย ลูกกุ้งวัยอ่อนจะเจริญเติบโตในน้ำ-

กร่อย เมื่อถูกกุ้งเข้าสู่วัยรุ่นจะอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีน้ำจืดสนิท (ประจวบ หล้าอุบล. 2527; ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. 2529)

ลักษณะภายนอก

กุ้งก้ามกรามมีโครงร่างแข็งปกคลุมร่างกาย (exoskeleton) เปลือกกุ้งเป็นสารพวกไคติน ร่างกายของกุ้งก้ามกรามแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ (ภาพประกอบ 1 และ 2)

1.เซฟาโลธอแรกซ์ (cephalothorax) เป็นส่วนที่ปกคลุมอยู่ที่ส่วนหัว ส่วนนี้ประกอบด้วยหัว และอกรวมกัน เปลือกส่วนที่คลุมส่วนหัวเรียกว่าคาราเปส (carapace) บนคาราเปสมีร่องแยกส่วนหัว และอกออกจากกันเรียกร่องนี้ว่า cervical groove ด้านข้างของคาราเปสที่คลุมบริเวณอกมีร่องที่เรียกว่า branchiostegite คาราเปสส่วนหน้าที่ยื่นแหลมออกไปมีลักษณะเป็นฟันเลื่อยอยู่ทางด้านหลังและ ด้านท้อง เรียกว่ากรวยนี้ว่ากริ (rostrum) ตรงโคนของกริจะเห็นลูกตาซึ่งติดอยู่บนก้านตา ก้านตาดังกล่าวสามารถยกลูกตาขึ้นลงได้เช่นเดียวกับของปู บนขอบของคาราเปสด้านหน้าใกล้ตามีหนามอยู่ อันหนึ่งเรียกว่า antennal spine ถัด antennal spine ไปทางด้านหลังเลื้อนต่ำลงมาเล็กน้อยมีหนามอีก อันหนึ่งซึ่งมีขนาดเล็กเรียกว่า hepatic spine

2.ส่วนท้อง (abdomen) เปลือกที่คลุมส่วนท้องมีทั้งหมด 6 ปล้อง เปลือกที่คลุมส่วนท้องนี้ เรียกว่าสเคลอไรท์ (sclerite) สเคลอไรท์ส่วนที่คลุมอยู่ทางด้านบนเรียกว่าเทอร์กัม (tergum) ส่วน ที่คลุมอยู่ทางด้านท้องเรียกว่าสเตอร์นัม (sternum) ส่วนเปลือกที่คลุมด้านข้างลำตัวเรียกว่าพลูรอล (pleural) เยื่อเหนียว ๆ ที่หุ้มโคนขาให้ติดต่อกับพลูรอลและสเตอร์นัมเรียกว่าอีพิเมอร์อน (epimeron) ส่วนสุดท้ายของส่วนท้องเป็นหนามแหลมลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยมยื่นออกไป เรียกส่วนนี้ว่า เทลสัน (telson) ส่วนนี้ไม่นับเป็นปล้อง ด้านข้างของเทลสันมีแพนหางที่เรียกว่ายูโรพอด (uropod) ขนาบอยู่ทางด้านข้าง ๆ ละหนึ่งอัน ทั้งเทลสันและยูโรพอดรวมกันเรียกว่า tail fan ตรงโคนของ เทลสันทางด้านท้องมีรอยนูนเล็ก ๆ บนรอยนูนนี้มีช่องเปิดของทวารหนัก (anus) ช่องนี้ทำหน้าที่ ขับถ่ายพวกกากอาหารเช่นเดียวกับทวารหนักของสัตว์ชนิดอื่น (ธวัช ดอนสกุล. 2520)

ระยางค์ (Appendage)

ระยางค์มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันคืออาจเป็นแบบ uniramous คือมีลักษณะเป็นข้อต่อกันไป หรือบางชนิดเป็นแบบ biramous คือมีลักษณะแตกออกเป็นง่ามคล้ายง่ามนิ้วมือ ระยางค์ของ

กุ้งก้ามกรามมี 3 ชนิดคือ

1. ระวังค์ส่วนหัว (cephalic appendages) เป็นระวังค์ที่อยู่บริเวณหัวและรอบ ๆ ปาก มี 5 คู่ ได้แก่

แอนเทนนูล (antennule) เป็นระวังค์หนวดคู่แรกอยู่หน้าสุด ที่โคนหนวดมีอวัยวะในการทรงตัวคือสแตโตซิส (statocyst) นอกจากนี้หนวดคู่แรกยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการรับความรู้สึกเช่นเดียวกับหนวดคู่ที่ 2 อีกด้วย

แอนเทนนา (antenna) เป็นระวังค์หนวดคู่ที่ 2 ซึ่งยาวกว่าหนวดคู่แรก โคนหนวดมีขนาดใหญ่มีอวัยวะจับตัวย่อย

ขากรรไกร (mandible) เป็นระวังค์ช่วยในการตัดและบดอาหาร อยู่ภายในอัมปากมีลักษณะ คล้ายเรือใบ

แมกซิลลา (maxilla) เป็นระวังค์ช่วยในการกินอาหาร มีขนาดเล็กบางและคล้ายใบไม้ แมกซิลลามืออยู่ 2 คู่อยู่ตอนท้ายของปาก ระวังค์นี้นอกจากจะช่วยกินอาหารแล้วยังช่วยพัดน้ำเข้าช่องเหงือกทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซจึงถือว่าเป็นระวังค์ช่วยในการหายใจด้วย

2. ระวังค์ส่วนอก (thoracic appendages) ประกอบด้วยระวังค์ขาเดินและระวังค์ช่วยในการกินอาหารและหายใจ

(2.1) ระวังค์ขาเดิน (walking legs or pereopods) เป็นขาที่ใช้สำหรับเดินอยู่ที่อกมีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 5 คู่ โดยขาเดินคู่แรกและคู่ที่ 2 จะมีลักษณะแตกต่างจากขาเดินคู่อื่น ๆ กล่าวคือ คู่แรกเป็นระวังค์ยาวเรียวยาวปลายเป็นก้ามหนีบเรียกว่าชิลิปีด (chelipid) ส่วนขาเดินคู่ที่ 2 เป็นระวังค์ขนาดใหญ่ยาวปลายเป็นก้ามหนีบเรียกว่าเกรทชิลลา (great chela) ใช้สำหรับต่อสู้ป้องกันตัว กุ้งที่โตเต็มวัยขาเดินคู่ที่ 2 ของเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าของเพศเมียมาก ช่วงใต้ท้องของกุ้งเพศผู้แคบกว่าของเพศเมีย ในฤดูวางไข่ตัวเมียจะ 3 คู่แรกจะมีขนละเอียดเกิดขึ้นมากมายสำหรับเป็นที่ยึดเกาะของไข่ขณะฟัก ช่องปล่อยน้ำเชื้อของเพศผู้อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 เพศเมียมีช่องปล่อยไข่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3

(2.2) แมกซิลลิปีด (maxillipid) เป็นระวังค์ช่วยในการกินอาหารและหายใจมี 3 คู่ มีลักษณะเป็นแผ่นแบนบางเรียงต่อมาจากแมกซิลลาอยู่ทางด้านหน้าของขาเดินทั้ง 5 คู่

3. ระวังค์ส่วนท้อง (abdominal appendages) มี 6 คู่ เป็นระวังค์ว่ายน้ำ (swimmerets or pleopod) 5 คู่ ส่วนคู่ที่ 6 เป็นระวังค์ที่อยู่สุดท้ายของส่วนท้องเรียกว่ายูโรพอด หรือแพนหางขนาน

อยู่สองข้างของเทลสัน ทั้งยูโรพอดและเทลสันรวมกันเรียกว่า tail fan ทำหน้าที่เป็นหางเสือขณะกึ่งว่ายน้ำ (ธวัช ดอนสกุล. 2520; บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์. 2528; ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. 2529; ยนต์ มุสิก. 2529)

ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างกึ่งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย

กึ่งก้ามกรามมีเพศแยกกัน กึ่งที่โตเต็มวัยเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ก้ามของเพศผู้จะมีขนาดใหญ่ ก้ามของเพศเมียจะมีขนาดเล็ก เปลือกหุ้มตัวส่วนท้องของเพศผู้จะแคบแต่ของเพศเมียจะกว้าง สำหรับกึ่งที่ยังไม่โตเต็มที่อาจจะใช้ลักษณะอื่นเข้าช่วยซึ่งจะต้องดูละเอียดขึ้น ลักษณะที่สามารถใช้แยกตัวกึ่งตั้งแต่ตัวเล็กถึงตัวโตคือ ลักษณะของขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย กึ่งเพศเมียตรงปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ตรงปล้องสุดท้ายจะแยกออกเป็นแขนง 3 อัน โดยอันเล็กสุดอยู่ด้านใน ส่วนกึ่งเพศผู้ปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 จะแยกเป็นแขนง 4 อัน โดยมีเพิ่มเข้ามาอีก 1 อัน ระหว่างอันที่ 2 และ 3 ส่วนที่เพิ่มขึ้นมานี้เรียกว่าแอฟเพนดิก มัสคูลินา (appendix masculina) พบเฉพาะในกึ่งเพศผู้ ซึ่งจะแทรกอยู่ระหว่างแขนงอันที่ 2 คือ เอ็นโดพอด (endopod) และแขนงอันที่ 3 คือ แอฟเพนดิก อินเทอร์นา (appendix interna) (ภาพประกอบ 3) สำหรับแขนงอันที่ 1 มีชื่อเรียกเฉพาะว่าเอ็กโซพอด (exopod) การแยกเพศกึ่งโดยวิธีดูปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 นี้ ถ้าเป็นกึ่งขนาดโตก็สามารถแยกได้ง่าย แต่ถ้าเป็นกึ่งขนาดเล็กต้องใช้แว่นขยายหรือกล้องจุลทรรศน์ช่วยจึงจะเห็นได้ชัด ลักษณะอื่น ๆ ที่สามารถจะใช้แยกเพศกึ่งขนาดปานกลางหรือขนาดใหญ่ได้แก่ ช่องเปิดสำหรับเชื้อเพศผู้และช่องเปิดสำหรับไข่ โดยในเพศผู้ช่องเปิดจะอยู่ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนเพศเมียช่องเปิดจะอยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ลักษณะอีกอย่างหนึ่งที่อาจช่วยในการแยกเพศกึ่งคือ ปล้อง ที่ 1 ของส่วนท้องของกึ่งเพศผู้ตรงกลางด้านท้องจะเป็นปุ่มเล็ก ๆ สามารถรู้สึกได้โดยใช้นิ้วมือสัมผัสซึ่งในกึ่งเพศเมียจะไม่พบ (ธวัช ดอนสกุล. 2520; ประจวบ หล้าอุบล. 2527; บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์. 2528)

เลือดของกึ่งก้ามกราม

กึ่งก้ามกรามมีระบบไหลเวียนโลหิตเป็นแบบระบบเปิด มีปริมาตรของเลือดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ในเลือดของกึ่งก้ามกรามจะมีสารฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนและทองแดงและสามารถรวมตัวกับออกซิเจนได้ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะไม่มีสี แต่เมื่อมีออกซิเจนจะมีสีฟ้า เนื่องจากฮีโมไซยานินที่มีการเติมออกซิเจนเข้าไปจนถึงจุดอิ่มตัว ทองแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานินจะอยู่ในรูป Cu^{2+} ทำให้เกิดสีขึ้น ในทางตรงกันข้ามถ้าอยู่ในสภาพ

Cu^+ ไม่มีออกซิเจนจะไม่มีสี (ประจวบ หล้าอุบล. 2537)

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยที่ฮอร์โมนนี้ยังคงประสิทธิภาพอยู่
2. เพื่อศึกษาวิธีการทำให้ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม บริสุทธิ์ด้วย Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทราบวิธีการแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยที่ยังคงประสิทธิภาพของฮอร์โมนนี้อยู่
2. ได้ฮอร์โมนบริสุทธิ์เพื่อนำไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่อไป
3. ผลการวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานในการแยกและทำให้บริสุทธิ์นิวโรเปปไทด์ฮอร์โมนอื่น ๆ จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยเฉพาะฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH)

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. แยกสกัดฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม
2. คำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดที่แยกสกัดได้
3. ทำให้ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดที่แยกสกัดได้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC
4. ตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดที่แยกได้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

ตาราง 1 การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของ CHH ในสัตว์
ครึ่งตาเขียนชนิดต่าง ๆ

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลการวิจัย
เคลเลอร์และ วันเดอร์เรอ. 1978. (Keller and Wunderer. 1978)	<i>Carcinus maenas</i>	-PAGE -Gel filtration -Dansylation -Edman degradation	-กรดอะมิโน 57 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน -ปลาย N ถูกบล็อก
มาร์ตินและคณะ. 1984. (Martin and others.1984)	<i>Porcellio dilatatus</i>	-Sephadex G 50 -HPLC -Dansylation	-กรดอะมิโน 50-52 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 5,800-6,100 ดาลตัน -ปลาย N ถูกบล็อก
ฮิวเบอร์แมนและ อาเกิลาร์. 1986. (Huberman and Aguilar. 1986)	<i>Procambarus bouvieri</i>	-RP-HPLC -SDS-PAGE -Dansylation -IEF	-กรดอะมิโน 52 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,042 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 4 หน่วย -ปลาย N ถูกบล็อก -ปลาย C เป็นแวลีน -ไม่พบฮิสติดีน ทริปโตเฟน และเมไทโอนีน -มี pI 4.79
กอลเลนและ คณะ. 1986. (Kallen and others. 1986)	<i>Astacus leptodactylus</i>	-PAGE -SDS-PAGE -HPLC -DIA	-พบ CHH 2 พิก -น้ำหนักโมเลกุล 7,000 ดาลตัน

ตาราง 1 (ต่อ)

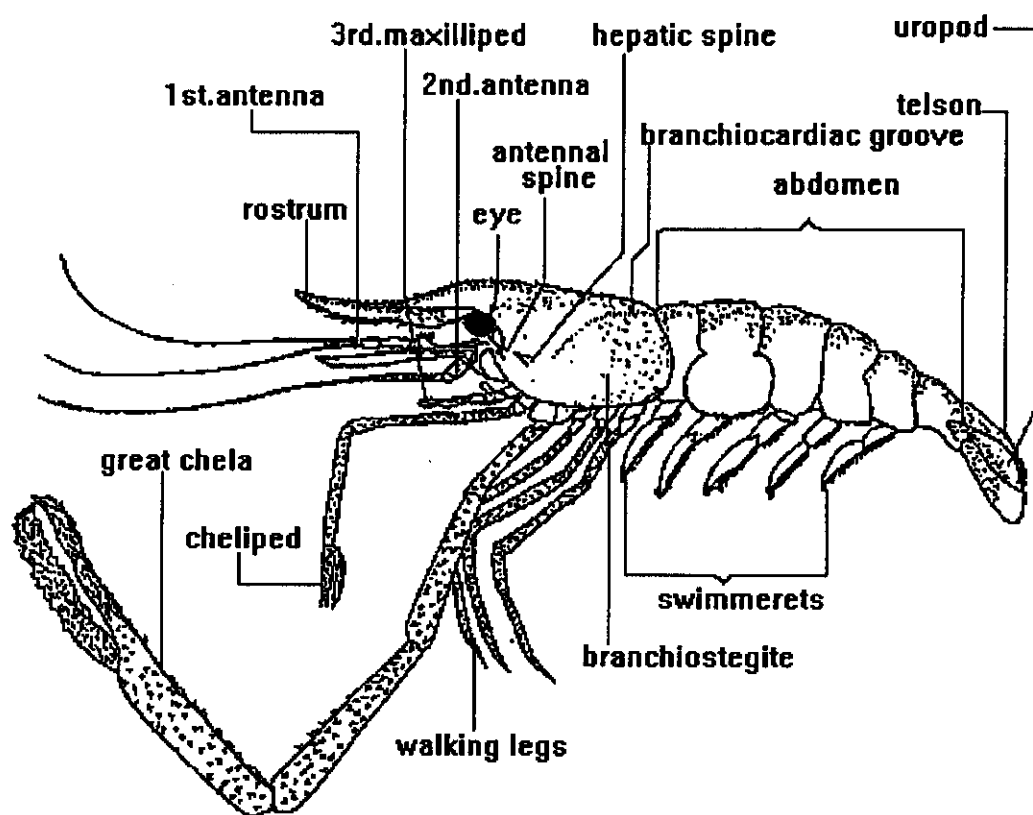
ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลการวิจัย
ฮิวเบอร์แมนและ อาากิลาร์. 1988. (Huberman and Aguilar. 1988)	<i>Procambarus bouvieri</i>	-RP-HPLC -Dansylation -IEF	-กรดอะมิโน 52-53 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,000-6,200 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 6 หน่วย -ปลาย C เป็นไฮโดรฟิลิก -ปลาย N ถูกบดบัง -มี pI 4.79 -พบ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C
คีเกลและคณะ. 1989. (Kegel and others. 1989)	<i>Carcinus maenas</i>	-HPLC -DABITC-PITC double- coupling method	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 6 หน่วย -ปลาย N และ ปลาย C ถูกบดบัง
โซเยซและคณะ 1990. (Soyez and others. 1990)	<i>Homarus americanus</i>	-RP-HPLC -FAB/MS -IEF	-พบ CHH 2 กลุ่ม -กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 ดาลตัน และมี pI 8.7 มีกรดอะมิโน 68 หน่วย -กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน และมี pI 5.0 มีกรดอะมิโน 61 หน่วย

ตาราง 1 (ต่อ)

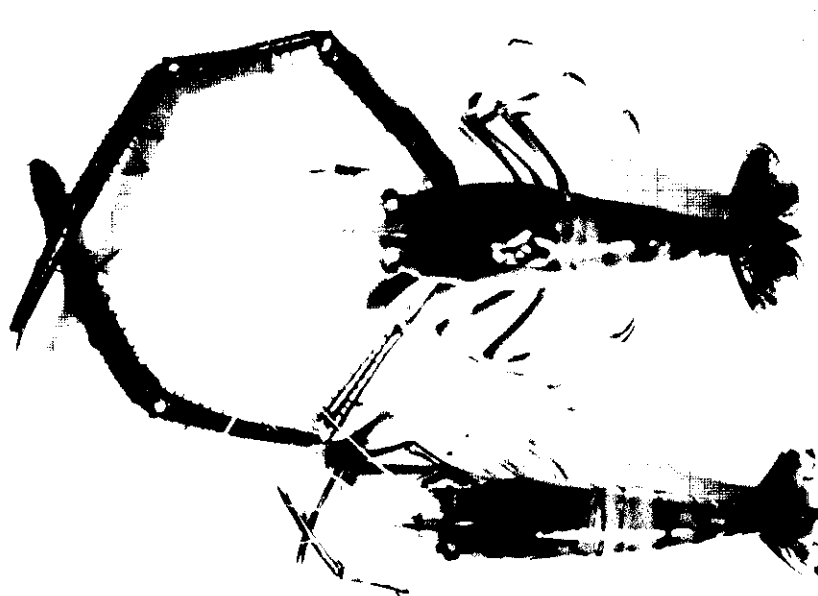
ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลวิจัย
เทนเซ็นและคณะ. 1991. (Tensen and others. 1991)	<i>Homarus americanus</i>	-RP-HPLC -Edman degradation -FAB/MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -พบ CHH 2 กลุ่ม -กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน -กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,655 $\pm$ 25 ดาลตัน
คีเกลและคณะ. 1991. (Kegel and others. 1991)	<i>Orconectes limosus</i>	-RP-HPLC -Edman degradation	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,400 ดาลตัน -ปลาย N เป็นไฮโดรอกซิล -ปลาย C เป็นแอสปาร์ทิก -ซิสเตอีน 6 หน่วย
มาร์ตินและคณะ. 1993. (Martin and others. 1993)	<i>Armadillidium vulgare</i>	-RP-HPLC -Edman degradation	-กรดอะมิโน 73 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,729.3 ดาลตัน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
ฮิวเบอร์แมนและอาากีลาร์. 1993. (Huberman and Aguilar. 1993)	<i>Procambarus bouvieri</i>	-RP-HPLC -Edman degradation -MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,388 ดาลตัน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
สมุลเลนและเบนท์ลี. 1994. (Smullen and Bently. 1994)	<i>Nephrops norvegicus</i>	-RP-HPLC -ELISA -SDS-PAGE	-น้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน

ตาราง 2 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครึ่งตาเขียนบางชนิด
-กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้แสดงกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก CHH ของ *Procambarus bouvieri*
(Huberman and others. 1993)

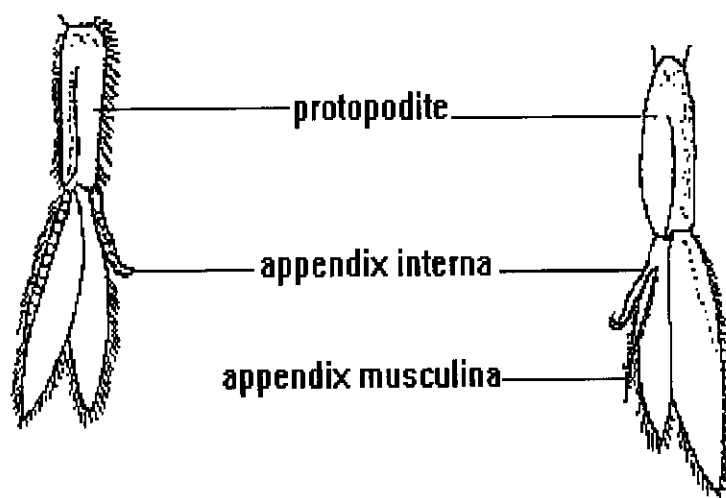
	10	20	30	40	
Prb I	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED CYNLY RKPYV ATTCT
Orl	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED CYNLY RKPYV ATTCT
Hoa a	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLD	RVCED CYNLY RKPEV ATTCT
Hoa b	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLN	RVCED CYNLY RKPEI VTTCT
Cam	pEIYDI	SCKGV	YDRAL	FNDLE	HVCDD CYNLY RISYV ASACR
	50	60	70		
Prb I	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	WDEY ISGVQ TV-NH ₂
Orl	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VLDEY ISGVQ TV-NH ₂
Hoa a	ENCYS	NWVFR	QCLDD	LLLSQ	VIDEY VSNVQ MV-NH ₂
Hoa b	ENCYS	NRVFR	QCLDD	LLMID	VIDEY VSNVQ MV-NH ₂
Cam	SNCYS	NLVFR	QCMDD	LLMMD	EEDQY ARKVO MV-NH ₂
Prb I	<i>Procambarus bouvieri</i> ,			Orl	<i>Orconectes limosus</i> ,
Hoa a	<i>Homarus americanus</i> CHH-A,			Cam	<i>Carcinus maenas</i> ,
Hoa b	<i>Homarus americanus</i> CHH-B				



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่ว ๆ ไปของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)
(ธวัช ดอนสกุล. 2520)



ภาพประกอบ 2 เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เพศผู้และ
 กุ้งก้ามกรามเพศเมีย ภาพบนเพศผู้ ภาพล่างเพศเมีย



ภาพประกอบ 3 เปรียบเทียบขาเดินคู่ที่ 2 ระหว่างกุ้งก้ามกรามเพศผู้ (ภาพขวา) และเพศเมีย
 (ภาพซ้าย) (ธวัช ดอนสกุล. 2520)

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กุ้งก้ามกรามเทศเมย์ (*Macrobrachium rosenbergii* : De Man) ขนาดตัวโตเต็มวัย มีน้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม ซื้อจากตลาดกลาง อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. เครื่องบดเนื้อเยื่อทำให้เซลล์แตก (homogenizer, Janke and Kunkel)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sigma, model Z-15)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge, Beckman model J2-21)
5. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
6. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator, Crest)
7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Shimadzu UV-visible model UV-160 A)
8. ตู้เย็น และ ultrafreezer (-20, -70 องศาเซลเซียส, Revco)
9. ELISA microtiter plate 96 หลุม (Maxisorp. Nunc 442404)
10. เครื่องอ่านค่า ELISA (Microplate reader, BIO-TEK instruments EL 312 e)
11. อ่างเลี้ยงกุ้งขนาด 100, 500 และ 800 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการเลี้ยงกุ้ง
12. กระบอกล้างยาพร้อมเข็มฉีดยา
13. Pipette ขนาดต่าง ๆ
14. หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
15. ครกหิน
16. ออโตไปเปตและไปเปตทิพ (autopipette and pipet tip)
17. Speed vacuum concentrator (Savant)
18. High Performance Liquid Chromatography-HPLC (Gilson)
19. C18 Sep-Pak Cartridge (Waters)

20. PrepPak C18 column ขนาด 25x100 มิลลิเมตร (Waters)
21. PrepPak C8 column ขนาด 25x100 มิลลิเมตร (Waters)
22. C8 column ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
23. Phenyl column ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
24. Cyano column ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
25. อุปกรณ์อื่น ๆ

สารเคมี

1. น้ำกลั่น และ น้ำกลั่น 3 ครั้ง (triple distilled water)
2. น้ำแข็ง และ น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
3. Methanol (analytical grade, Merck)
4. Acetic acid (analytical grade, Merck)
5. Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade, Sigma)
6. Acetonitrile (ACN, HPLC grade, Mallinckrodt)
7. Bovine serum albumin (BSA, Sigma)
8. Heptafluorobutyric acid (HFBA, HPLC grade, Sigma)
9. Triethylamine (TEA, HPLC grade Sigma)
10. Glucose
11. NaCl
12. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
13. KCl
14. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15. NaHCO_3
16. Enzymatic Glucose Oxidase Colorimetric Determination (procedure No.510, Sigma Diagnostic Kit) (วิธีเตรียมคุณภาพคณวก)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสัณฐานทดลอง
2. การเก็บรวบรวมตากุ้ง
3. การเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตา
4. การทำให้ CHH บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง Reverse phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)
5. การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH
6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม
7. การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ CHH

1. การเตรียมสัณฐานทดลอง

นำกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* : De Man) เพศเมียมาพักเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ ขนาด 100x250x50 เซนติเมตร โดยเลี้ยงอาหารวันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าและตอนเย็น อาหารที่เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับกุ้งก้ามกราม ผลิตโดยบริษัทเครือ ป.เจริญพันธุ์ น้ำและอาหารที่เหลือจะถูกดูดทิ้งและเปลี่ยนน้ำในตอนเช้าของทุกวัน อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงและทดลองอยู่ในระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส ความยาวช่วงแสงตามธรรมชาติ

2. การเก็บรวบรวมตากุ้ง

รวบรวมตากุ้งจำนวน 5,000 ตา โดยใช้กรรไกรตัดก้านตาจากกุ้งก้ามกรามเพศเมียในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ แล้วนำไปแช่ให้แข็งทันทีบนก้อนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำตากุ้งที่รวบรวมได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้องการใช้

3. การเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตา

นำตากุ้งมาบดเป็นผงละเอียดในขณะที่เย็นจัด โดยบดในครกที่แช่ให้เย็นในน้ำแข็งแห้ง

จากนั้นเทเมฆก้านตาลลงในสารละลาย methanol : acetic acid (90:1) ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อ ก้านตา คนให้ทั่วและทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกตะกอน ออกด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้แล้วล้างตะกอนและสกัด ซ้ำด้วยสารละลายและวิธีการเดิมอีกครั้ง รวมส่วนสารสกัดในสารละลายเข้าด้วยกัน แล้วนำไป ระเหยเอากรดอะซิติกและเมทานอลออกด้วยเครื่อง vacuum concentrator จากนั้นเติมด้วย 0.1 % trifluoroacetic acid ในปริมาณเท่าเดิม นำสารละลายไปผ่านเพื่อดูดซับใน C18 Cartridge แล้วชะ สารสกัดออกด้วย 50 % acetonitrile 0.1 % TFA นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum concentrator แล้วปรับสารที่ได้ด้วย 80 % acetonitrile 0.1% TFA ให้มีความเข้มข้นของ acetonitrile ประมาณ 15 % แล้วเก็บสารที่ได้รวบรวมไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แบ่งสารสกัดที่ได้จำนวน 50 ก้านตาไปทำ bioassay เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้ และส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์ ต่อในขั้นตอนที่ 4

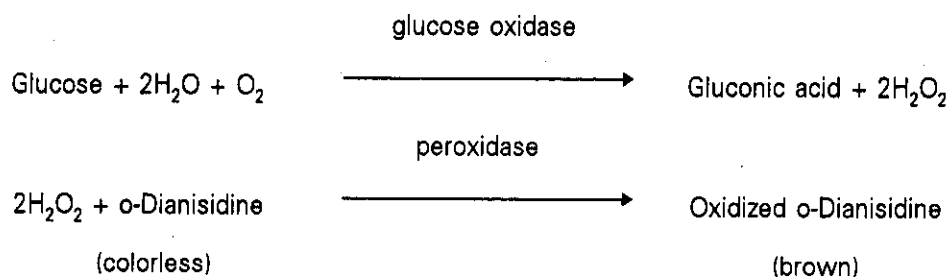
4. การทำให้ CHH บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3 ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายส่วนใสนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ PrepPak C18 และใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ ซึ่งประกอบด้วยปั๊ม A และปั๊ม B จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 20-80% B (A=0.1% TFA, B=80% ACN 0.1% TFA) อัตราการไหล 5 มิลลิลิตร/นาที การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% B ต่อนาที รวบรวมสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงใน microcentrifuge tube โดยเครื่อง fraction collector ทุก ๆ 1 นาที แบ่ง สารละลายออกไปทดสอบ โดยเติมสารละลายแต่ละส่วนด้วยสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 ไมโครกรัมต่อก้านตา แล้วระเหย acetonitrile และ TFA ให้แห้งด้วย vacuum concentrator จากนั้นนำไปตรวจหาฮอร์โมน CHH ตามวิธีในข้อ 5 โดยฉีดสารสกัดประมาณ 1-2 ก้านตาต่อถุง 1 ตัว นำ fraction ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น ไปผ่าน HPLC โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8, Cyano, Phenyl และใช้ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ กัน เช่น acetonitrile/heptafluorobutyric acid (HFBA), acetonitrile/TFA, acetonitrile/TEA หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่ง ได้ฮอร์โมนบริสุทธิ์ซึ่งจะปรากฏพีคบนโครมาโตแกรมเห็นเพียงพีคเดียว

5. การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH

นำกุ้งก้ามกรามเพศเมียมาตัดตาทั้งสองข้าง นำไปเลี้ยงให้อาหารตามปกติประมาณ 1-2 วัน แล้วให้อุดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บเลือดจากขาเดินคู่ที่ 4 ของกุ้งทุกตัว ประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วฉีดด้วยสารสกัดจากก้านตาที่เจือจางด้วยน้ำเกลือ (*Macrobrachium rosenbergii* - isotonic physiological saline, pH 7.6 ; Nagamine and others. 1980) ระดับต่าง ๆ ประมาณ 100 ไมโครลิตร ที่ขาเดินคู่ที่ 2 หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง เก็บเลือดจากขาเดินคู่ที่ 4 ประมาณ 100 ไมโครลิตร นำเลือดก่อนฉีดและหลังฉีดสารสกัดไปหาปริมาณน้ำตาลในเลือดโดยวิธี Glucose Oxidase Method หากระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีดสารสกัดปริมาณต่าง ๆ นำไปเขียนกราฟเปรียบเทียบเพื่อหาประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากก้านตา กุ้งกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวนกุ้งที่ใช้ทดสอบในแต่ละ fraction ประมาณ 2-4 ตัว

การหาระดับน้ำตาลในเลือด เป็นการตรวจหาปริมาณกลูโคสในเลือด โดยใช้ Enzymatic Glucose Oxidase Colorimetric Determination ดัดแปลงจาก procedure No.510 (Sigma Diagnostic Kit) ทำโดยนำเลือดตัวอย่างมาทิ้งให้แข็งตัว เก็บเฉพาะน้ำใสของเลือดปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วผสมกับ สารละลายเอนไซม์และสี (glucose oxidase, peroxidase, o-Dianisidine-PGO) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใน microtiter plate ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐาน ปฏิกิริยาเป็นดังนี้



6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

ตัดก้านตากุ้งก้ามกรามเพศเมีย โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของก้านตากรึ่งที่ยังมีชีวิตอยู่ แช่แข็งทันทีในน้ำแข็งแห้ง รวบรวมเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก้านตา

ที่เก็บรวบรวมได้จำนวน 250 ก้านตามาผ่าตัดเปลือกหุ้มตาออก แล้วนำมาบดในหลอดแก้ว (glass homogenizer) ในน้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*-isotonic physiological saline pH 7.6) ในอัตราส่วน 1 ก้านตาต่อสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ แล้วสกัดส่วนที่เป็นตะกอนซ้ำด้วยสารละลายน้ำเกลือและนำไปปั่นเช่นเดียวกันกับตอนแรก แยกส่วนน้ำใสที่ได้มารวมกับส่วนแรกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ สารสกัดที่ได้นี้จะนำไปใช้เป็น positive control ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ที่แยกได้จากกระบวนการ RP-HPLC

7. การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ CHH

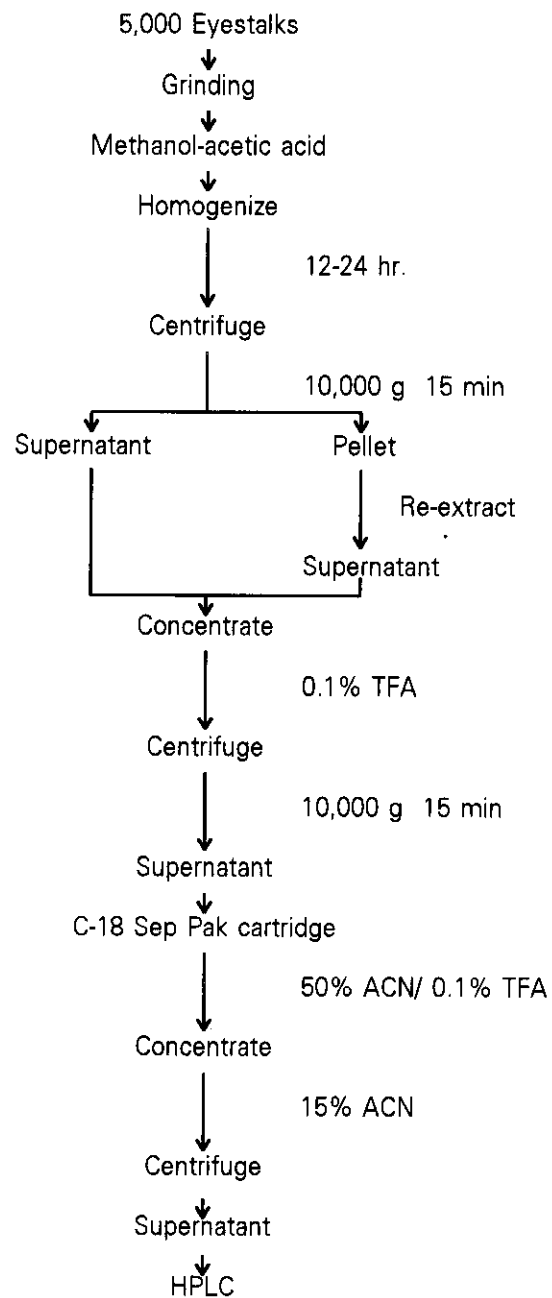
การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของฮอร์โมน CHH ทำได้โดยเปรียบเทียบปริมาณฮอร์โมนที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ 1 หน่วย (25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของเลือด) ในสารสกัดด้วยน้ำเกลือกับสารสกัดด้วย methanol acetic acid

ร้อยละของการคงสภาพของฮอร์โมน CHH

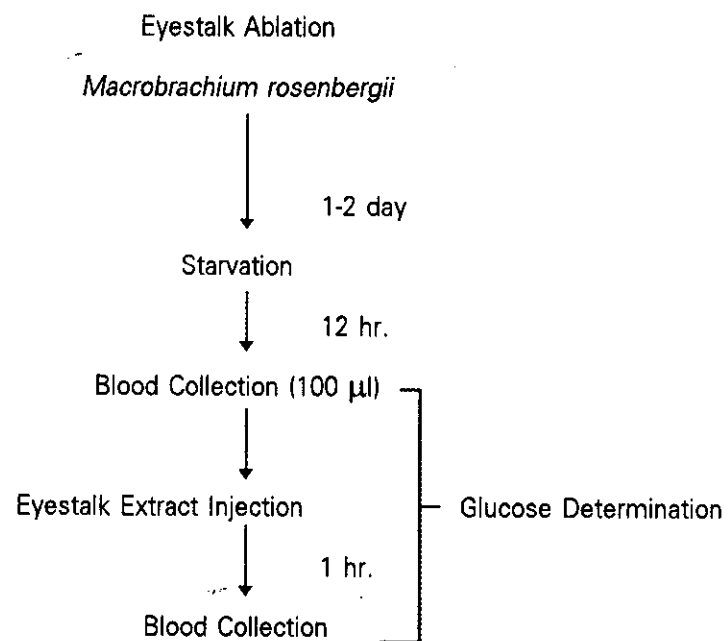
$$= \frac{\text{จำนวนก้านตาในสารสกัดด้วย methanol-acetic acid ที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาล 1 หน่วย}}{\text{จำนวนก้านตาใน fraction ของการทำให้บริสุทธิ์ที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาล 1 หน่วย}} \times 100$$

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

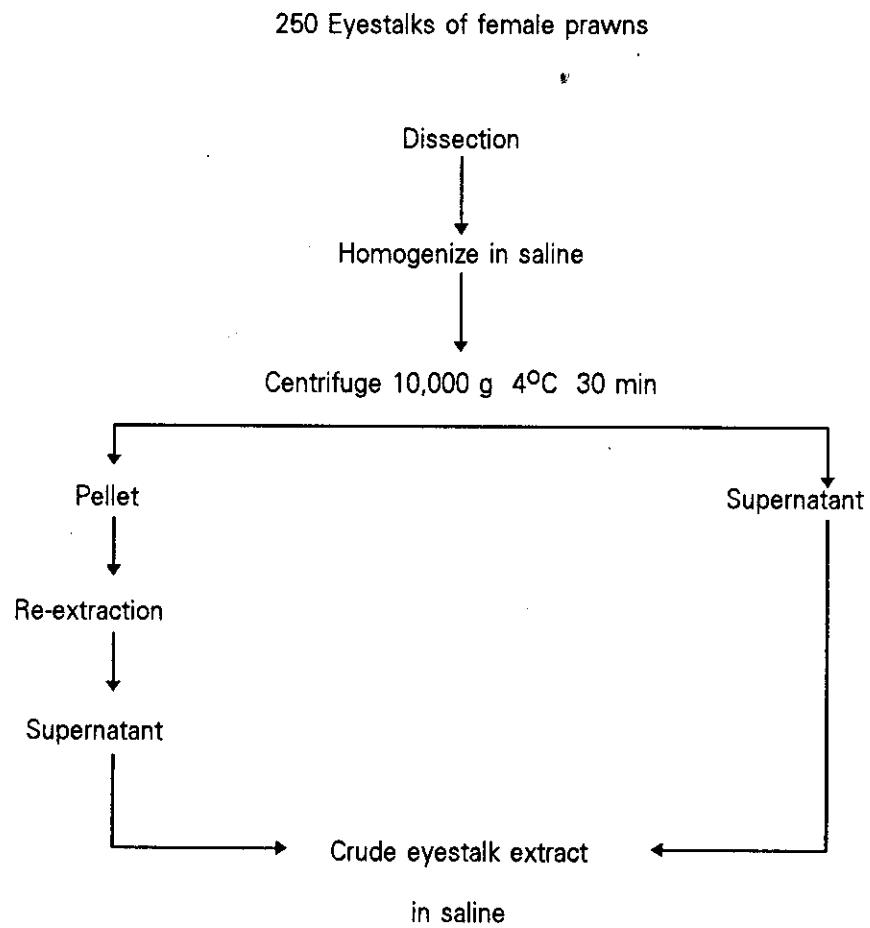
1. ตรวจวัดและคำนวณปริมาณน้ำตาลในเลือดก่อนและหลังจากฉีดสารสกัดเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมมาตรฐาน
2. ตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกรามของสารสกัดใน fraction ต่าง ๆ เทียบกับสารสกัดเริ่มต้น
3. ตรวจสอบลักษณะของพีคจากโครมาโตแกรม



ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตาของงูก้ามกรม



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH



ภาพประกอบ 6 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากก้านตาของกุ่มกุ่มกรม

จากการสกัดฮอริโมน CHH จากก้านตาของกุ่มกุ่มกรมจำนวน 5,000 ก้านตาด้วยสารละลาย methanol-acetic acid แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ่มกุ่มกรม โดยฉีดสารสกัดที่เจือจางระดับต่าง ๆ กลับเข้าไปในกุ่มที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง หลังจากนั้นอีก 1 ชั่วโมงตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดีมาก กล่าวคือในสารสกัดที่เจือจางเป็น 1:50 (ตาราง 3) สามารถตรวจหาฮอริโมน CHH ได้ 1 หน่วย (1 unit= ความสามารถของฮอริโมนในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรของเลือด) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัด CHH ด้วยสารละลาย methanol-acetic acid ให้การคงสภาพของฮอริโมนนี้ค่อนข้างสูง

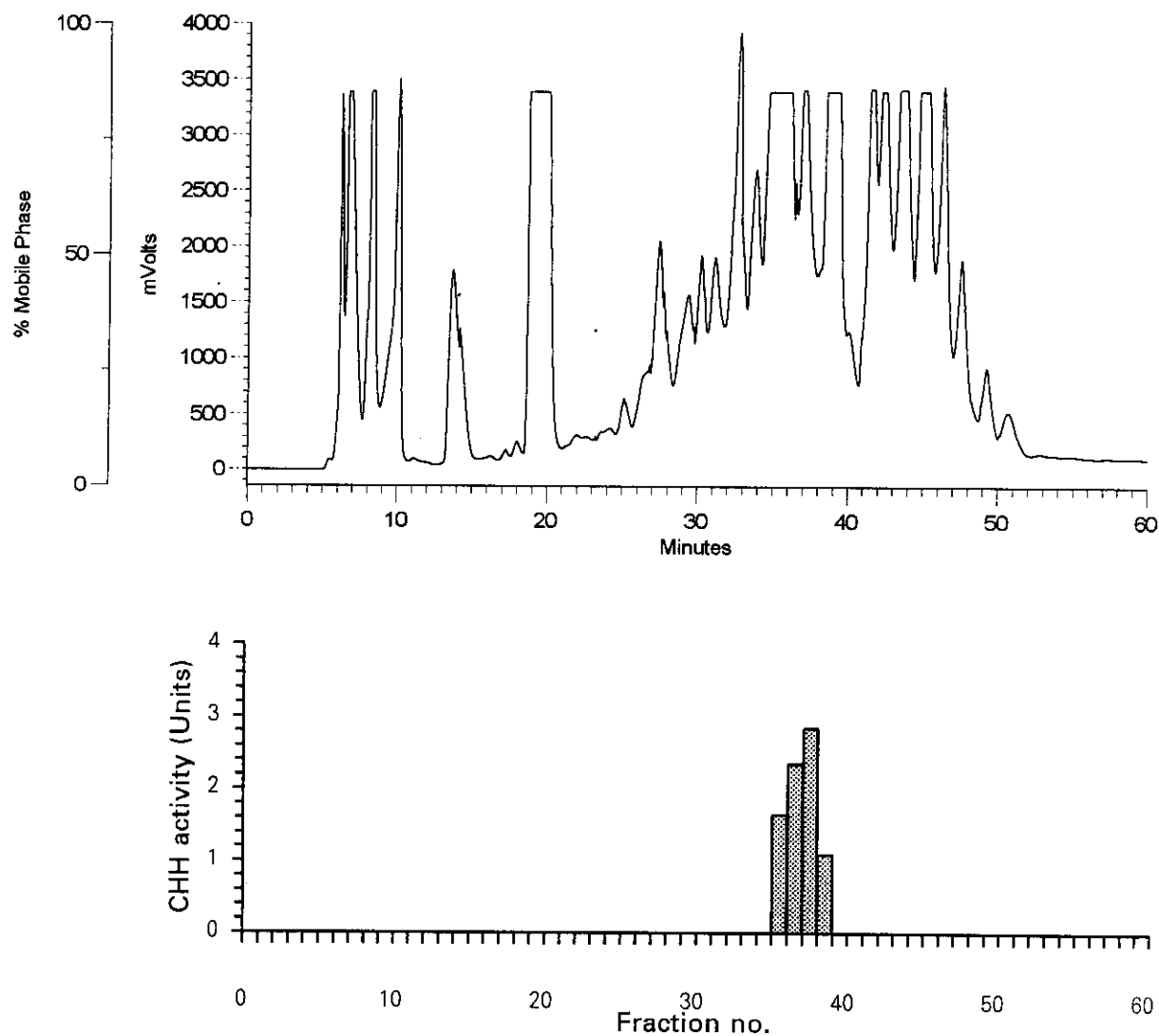
เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง RP-HPLC โดยผ่านคอลัมน์และตัวทำละลายระบบต่าง ๆ กัน และติดตามฮอริโมนนี้โดยการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ไปพร้อมกัน โดยใช้ enzymatic glucose oxidase colorimetric determination สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ 1 รูปแบบ

ตาราง 3 ระดับความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดกุ่มที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง ก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาที่สกัดด้วย methanol:acetic acid (90:1) และเจือจางที่ระดับต่าง ๆ 5 ระดับ เข้าไปนาน 1 ชั่วโมง (จำนวนกุ่มที่ใช้ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 3 ตัว)

กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100ml)		
	ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับที่เพิ่มขึ้น
1. น้ำเกลือ	8.45	13.59	5.14
2. สารสกัด 1:125 ก้านตา/ตัว	11.58	19.75	8.17
3. สารสกัด 1:50 ก้านตา/ตัว	15.46	40.28	24.82
4. สารสกัด 1:25 ก้านตา/ตัว	19.74	72.35	52.61
5. สารสกัด 1:5 ก้านตา/ตัว	21.66	89.38	67.72
6. สารสกัด 1 ก้านตา/ตัว	16.81	94.24	77.43

2. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1

จากการนำสารสกัดจากก้านตาเริ่มต้นจำนวน 5,000 ก้านตาไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA โดยชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-80% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง กล่าวคือครั้งแรก 1,000 ก้านตา ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 ครั้งละ 2,000 ก้านตา แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 1 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งก้ามกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง fraction ละ 2 ตัว พบว่า CHH activity กระจายอยู่ใน fraction ต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง (ภาพประกอบ 7) กล่าวคือ พบ CHH activity ใน fraction ที่ 36, 37, 38 และ 39 มีปริมาณฮอร์โมน 1.64, 2.35, 2.83 และ 1.09 หน่วยตามลำดับสำหรับครั้งที่ 1 (1.1) ส่วนครั้งที่ 2 (1.2) ก็พบใน fraction ที่ 36, 37, 38 และ 39 เช่นเดียวกับในครั้งที่ 1 มีปริมาณฮอร์โมน 1.97, 3.45, 2.67 และ 1.83 หน่วยตามลำดับ และในครั้งที่ 3 (1.3) ก็พบ CHH ใน fraction ที่ 36, 37, 38 และ 39 เช่นกัน โดยมีปริมาณฮอร์โมน 2.16, 3.25, 2.92 และ 1.55 หน่วยตามลำดับ ส่วน fraction อื่น ๆ ไม่พบ CHH activity เหมือนกันทั้ง 3 ครั้ง (ตาราง 4)



ภาพประกอบ 7 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของงูงัก้ามกรวมที่สกัดด้วยสารละลาย methanol-acetic acid จำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ ฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 36-39

ตาราง 4 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ทั้งสามครั้ง (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/-TFA) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100 ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย/ก้านตา)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1-4	0.10	-	-
5-8	0.06	-	-
9-12	0.07	-	-
13-16	0.16	-	-
17-20	0.07	-	-
21-24	0.08	-	-
25-28	0.08	-	-
29	0.06	-	-
30	0.14	-	-
31	0.31	-	-
32	0.01	-	-
33	0.05	-	-
34	0.20	-	-
35	0.23	0.45	0.29
36	1.64 *	1.97 *	2.16 *
37	2.35 *	3.45 *	3.25 *
38	2.83 *	2.67 *	2.92 *
39	1.09 *	1.83 *	1.55 *
40	0.22	0.09	0.26
41-44	0.54	-	-
45-48	0.47	-	-
49-52	0.03	-	-
53-56	0.20	-	-

- ไม่ได้ทำการทดสอบ

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วยซึ่งเป็น fraction ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2

จากการรวบรวม fraction ที่พบ CHH activity ทั้ง 3 ครั้งในขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/HFBA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 25-70% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2 นี้เป็น 3 ครั้งกล่าวคือ (สรุปในตาราง 5)

2.1 จากการรวบรวม fraction ที่ 37 ของทั้ง 3 ครั้งในขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน HPLC (ภาพประกอบ 8) แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้าม-กรรม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 36, 37, 38, 39 และ 40 โดยมีปริมาณฮอร์โมน 1.69, 1.77, 2.28, 2.76 และ 2.24 หน่วยตามลำดับ

2.2 จากการรวบรวม fraction ที่ 38 ของทั้ง 3 ครั้งในขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน HPLC (ภาพประกอบ 9) แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้าม-กรรมเช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2.1 พบ CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 39, 40 และ 41 มีปริมาณฮอร์โมน 2.42, 1.94 และ 2.39 หน่วยตามลำดับ

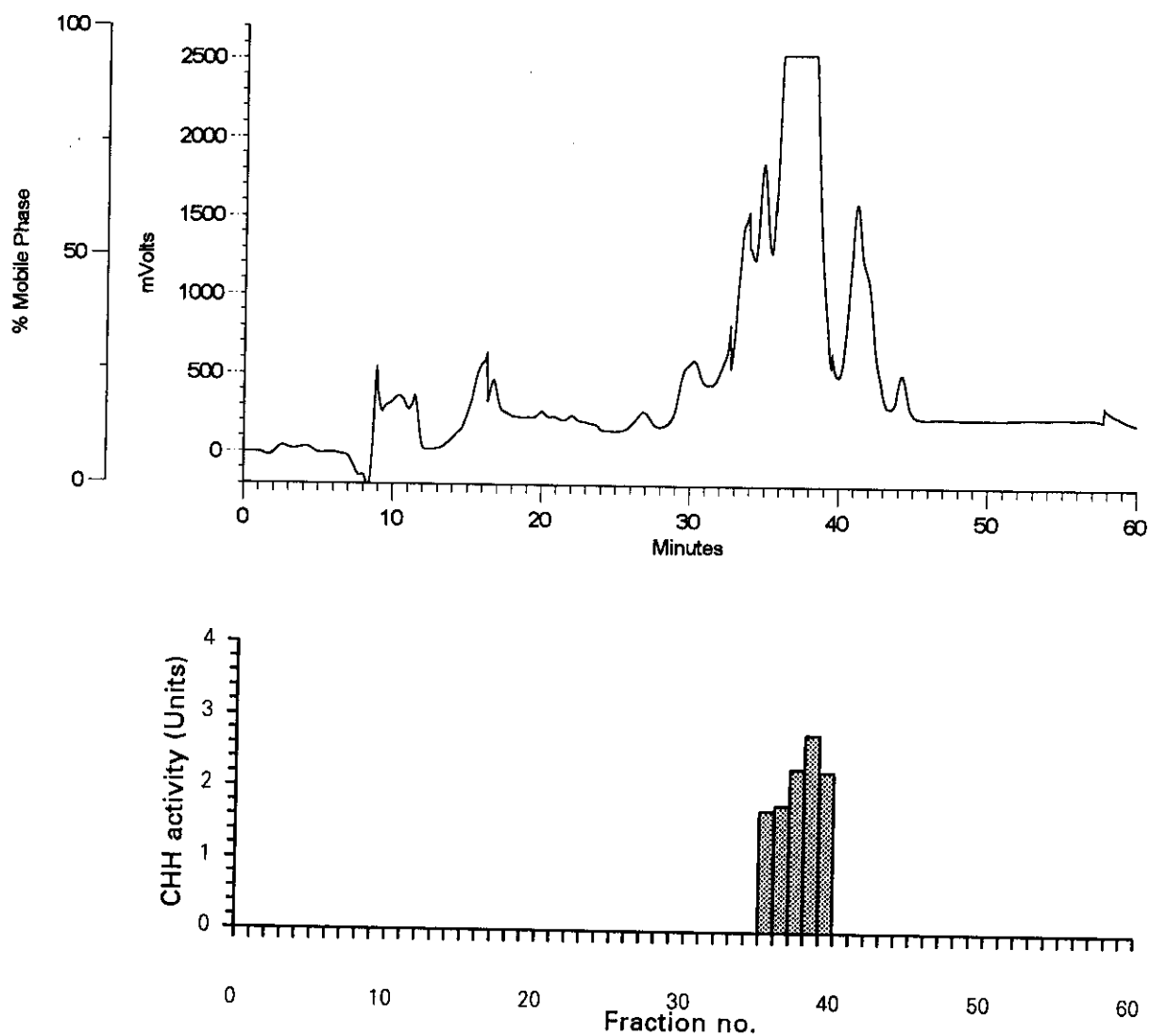
2.3 จากการรวบรวม fraction ที่ 36 และ 39 ของทั้ง 3 ครั้งในขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน HPLC (ภาพประกอบ 10) แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสัตว์ทดลองเช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2.1 และ 2.2 พบ CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 36, 37 และ 38 มีปริมาณฮอร์โมนเรียงตามลำดับดังนี้คือ 1.67, 2.19 และ 1.47 หน่วย

ตาราง 5 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 2 ทั้งสามครั้ง (คอลัมน์ PrepPak : C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/-HFBA) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100 ml = 1หน่วย/ก้านตา

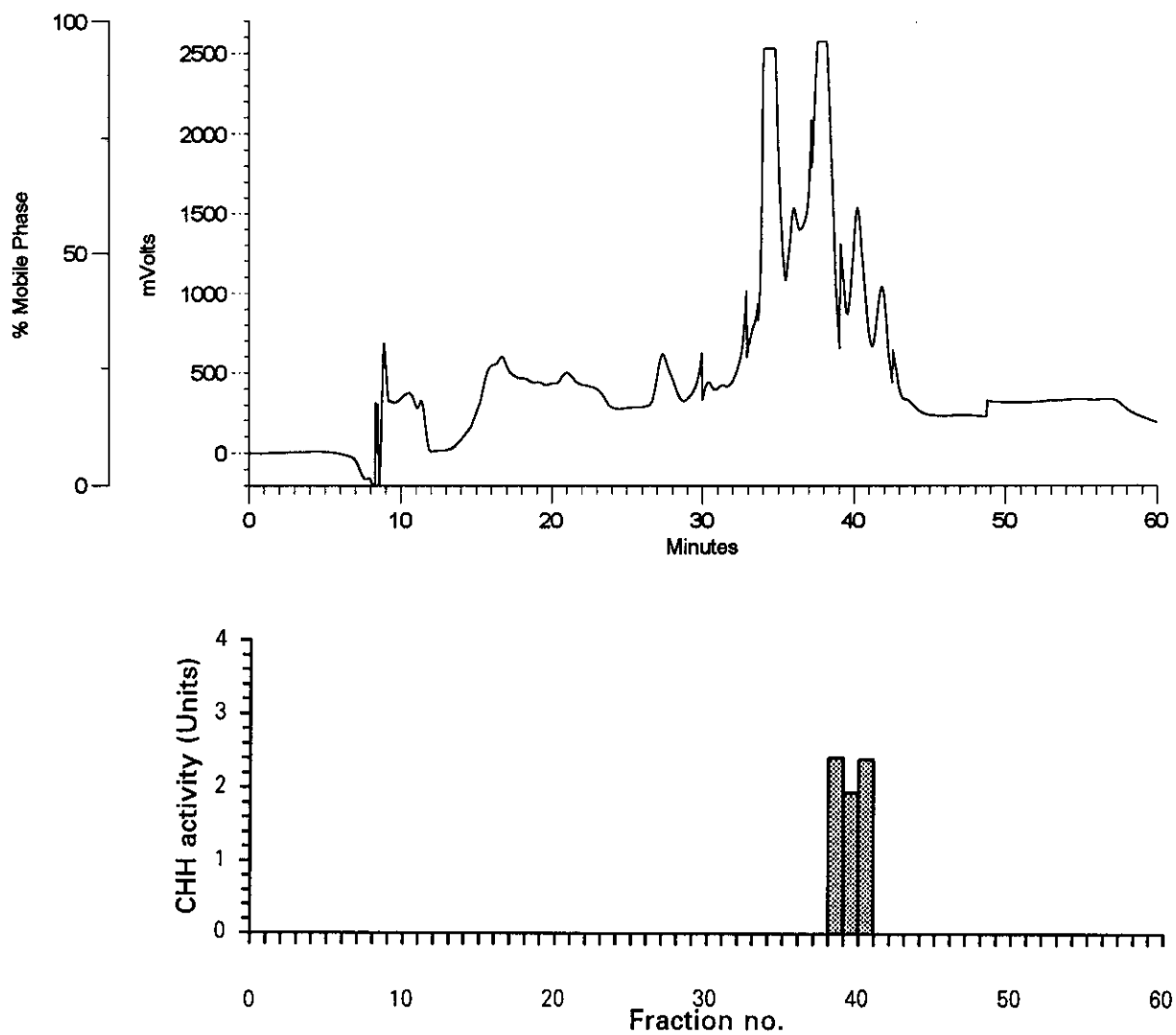
Fraction No.	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย/ก้านตา)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
25-27	0.12	-	-
28-31	0.39	-	-
32-35	0.11	-	0.48
36	1.69 *	0.12	1.67 *
37	1.77 *	0.56	2.19 *
38	2.28 *	0.59	1.47 *
39	2.76 *	2.42 *	0.42
40	2.24 *	1.94 *	0.15
41	0.36	2.39 *	0.02
42	0.32	0.07	0.07
43-46	0.59	0.73	0.47

- ไม่ได้ทำการทดสอบ

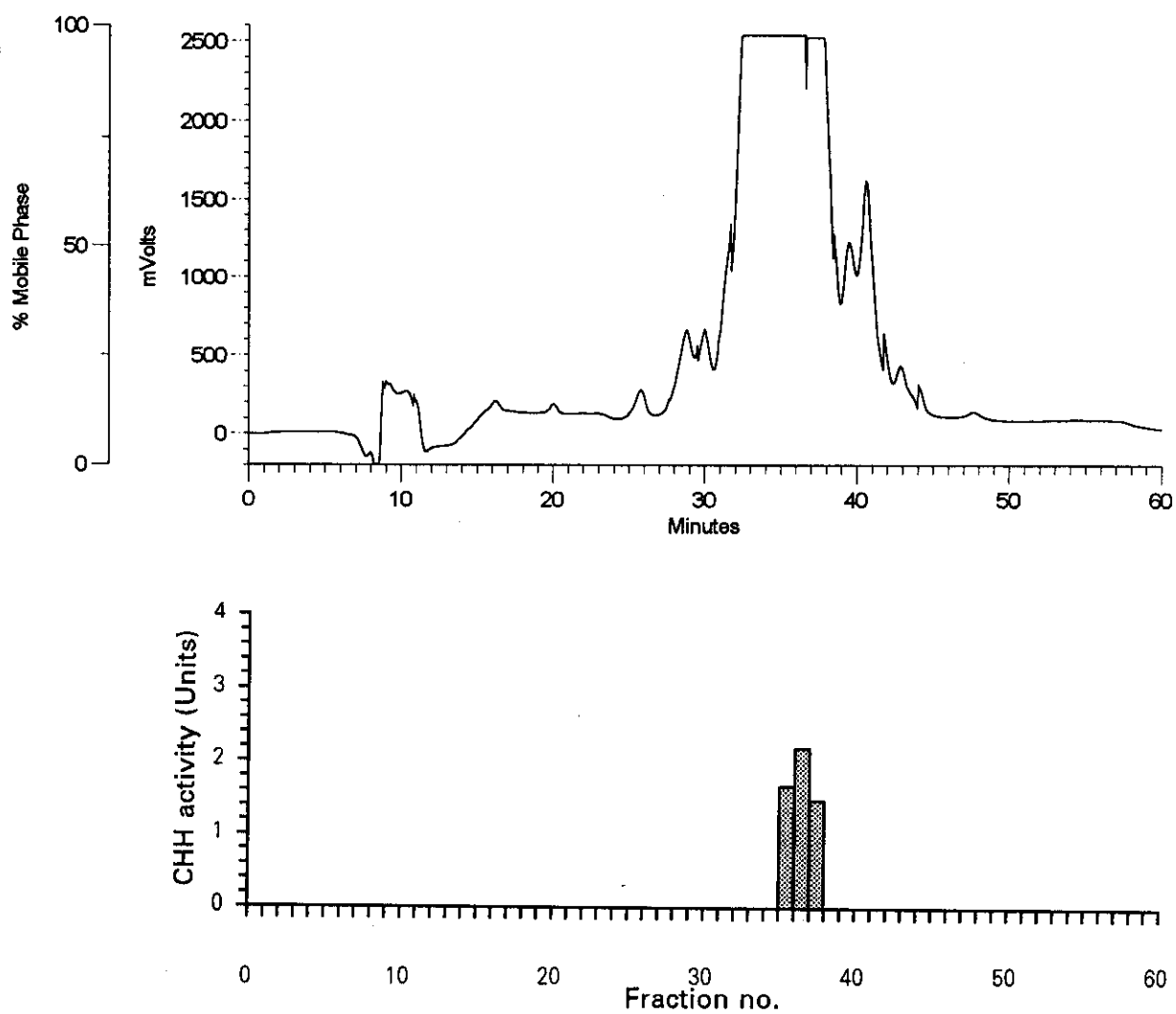
* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วยซึ่งเป็น fraction ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ่มก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.1 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 36-40



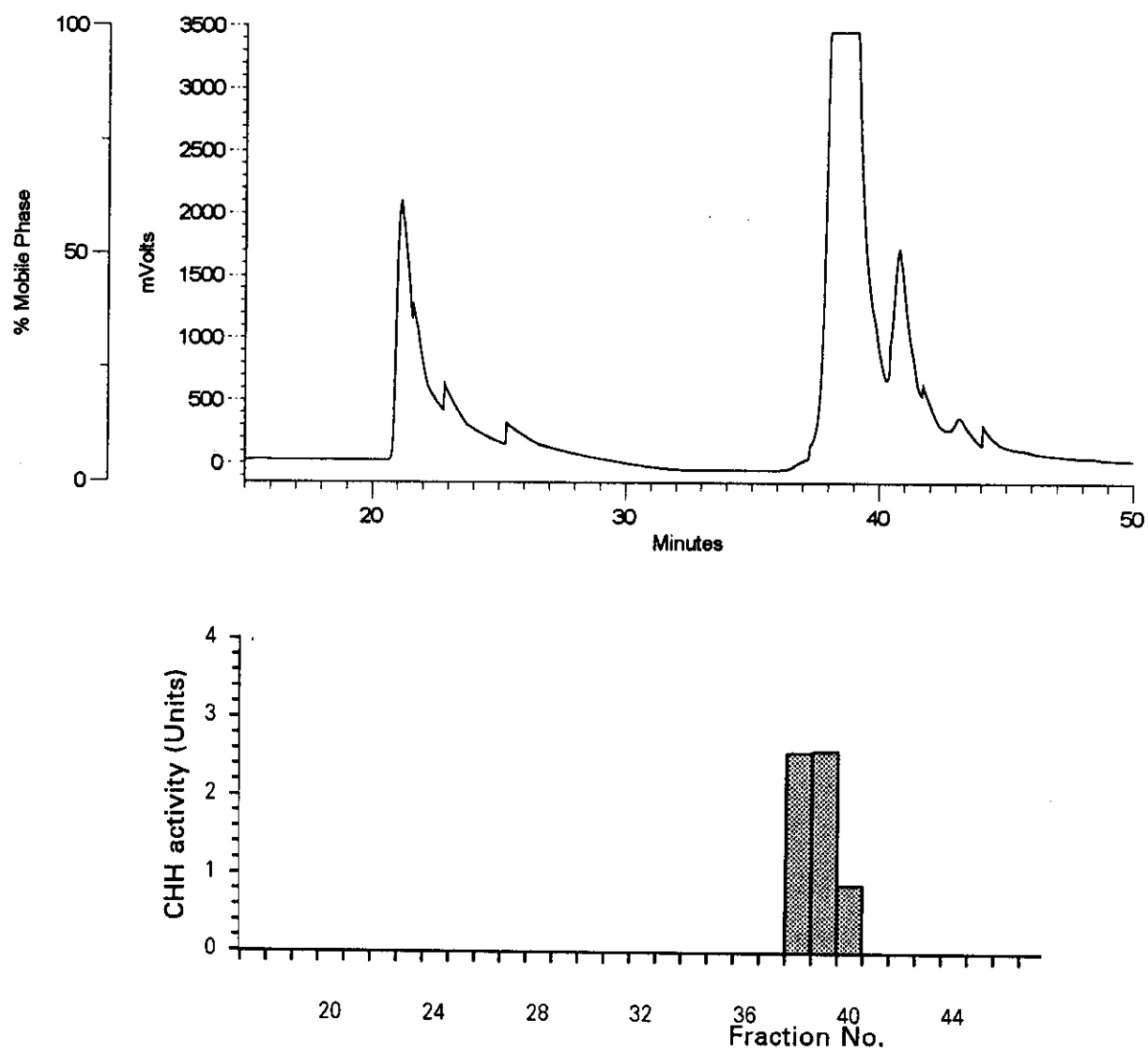
ภาพประกอบ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกราคม ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิ-แท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 39-41



ภาพประกอบ 10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากลุ่มก้ามกราม ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.3 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 36-38

4. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 3

จากการรวบรวม fraction ที่ 38 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2 มาผ่านคอลัมน์ PrepPak C18 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-80% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที (ภาพประกอบ 11) แ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 2 แก้วต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 38, 39 และ 40 โดยมีปริมาณฮอร์โมน 2.57, 2.60 และ 0.88 หน่วยตามลำดับ (ตาราง 6)



ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอริโมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction 38-40

ตาราง 6 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 3 และ 4 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100 ml = 1หน่วย/ก้านตา

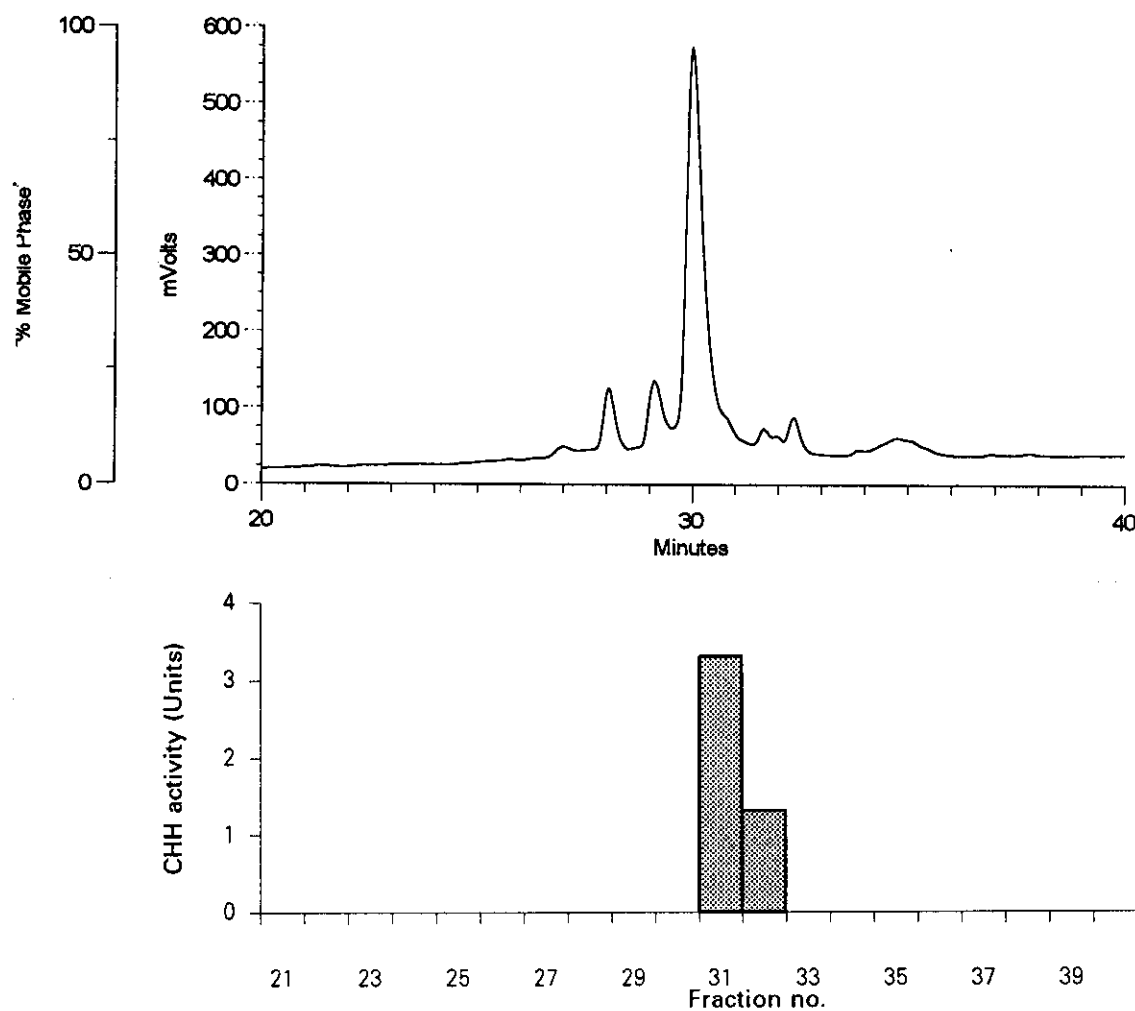
ขั้นตอนที่	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย)	
	3	4
คอลัมน์/ระบบตัวทำละลาย	PrepPak C18 ACN/TEA	Cyano ACN/TFA
จำนวนก้านตา	2	10
Fraction No.		
20	0.17	-
21	0.12	-
22	0.11	-
23	0.07	-
24-27	0.13	-
28	0.47	-
29	0.03	0.28
30	0.33	0.66
31	0.17	3.30*
32	0.45	1.31*
33	0.23	0.39
34	0.05	0.33
35	0.26	-
36	0.12	-
37	0.25	-
38	2.57*	-
39	2.60*	-
40	0.88	-
41	0.46	-

- ไม่ได้ทดสอบ

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วยซึ่งเป็น fraction ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

5. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 4

จากการรวบรวม fraction ที่ 38 และ 39 ของการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 3 มาผ่าน Microsorb-MV cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-75% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (ภาพประกอบ 12) จากโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารปนเปื้อนอื่น ๆ ได้แยกออกจาก CHH ไปในระดับหนึ่งแล้วเมื่อเทียบกับพีคจากโครมาโตแกรมของขั้นตอนที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นแบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบ CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 31 และ 32 มีปริมาณฮอร์โมน 3.30 และ 1.31 หน่วยตามลำดับ (ตาราง 6)



ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 31 และ 32

6. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5

จากการรวบรวม fraction ที่ 31 และ 32 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 4 มาผ่าน Microsorb-MV phenyl column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-65% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 33, 34 และ 35 (ภาพประกอบ 13-1) มีปริมาณฮอร์โมน 2.77, 3.60 และ 3.68 หน่วยตามลำดับ (ตาราง 7)

7. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 6

จากการรวบรวม fraction ที่ 33, 34 และ 35 ของการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb-MV cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-80% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นแบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 40 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity กระจายอยู่ใน fraction ที่ 41-47 (ภาพประกอบ 13-2) โดยมีปริมาณฮอร์โมน 1.99, 2.50, 2.76, 2.64, 1.75, 2.59 และ 1.88 หน่วยตามลำดับ (ตาราง 7) ขั้นตอนนี้ไม่มีการแยกขององค์ประกอบในสารตัวอย่างกล่าวคือรวมอยู่ในพีคเดียว และ CHH activity กระจายออกไป จึงรวบรวม fraction ทั้งหมดนำไปผ่านคอลัมน์ในการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่อไป

8. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 7

เมื่อรวบรวม fraction ที่พบ CHH ทั้ง 7 fraction จากขั้นตอนที่ 6 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (ภาพประกอบ 13-3) โดยใช้คอลัมน์ phenyl ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/HFBA ชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-65% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity ในสัตว์ทดลอง โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 40 ไมโครลิตรต่อตัว พบ CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 53, 54 และ 55 มีปริมาณฮอร์โมน 4.35, 2.59 และ 3.33 หน่วยตามลำดับ (ตาราง 7)

9. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 8

จากการนำ fraction ที่ 53 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 7 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 โดยใช้คอลัมน์ C18 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA แล้วชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-65% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity ในสัปดาห์ต่อไป โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อตัว พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 31 และ 32 โดยมีปริมาณฮอร์โมน 1.03 และ 1.91 หน่วยตามลำดับ (ตาราง 7) จากโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ปนมากับ CHH จากสารสกัดเริ่มต้น และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 8 ขั้นตอนได้ถูกแยกออกไปจนกระทั่งเหลือเพียง CHH ที่บริสุทธิ์โดยดูจากโครมาโตแกรมเห็นเพียงพีกเดียว และตรงกับการตรวจสอบ activity ของฮอร์โมนนี้ตรงกัน จากการนำตัวอย่างนี้ไปผ่าน cyano column โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ได้โครมาโตแกรมประกอบด้วยพีกเพียง 1 พีก และมี CHH activity จึงคาดว่า CHH ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง

10. การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ CHH

จากการสังเกตปริมาณสารสกัดจากก้านตาที่ใช้ในการทดสอบ activity ของ CHH พบว่าต้องเพิ่มปริมาณสารสกัดในการทดสอบทุกขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (ตาราง 4) โดยเฉพาะในขั้นตอนที่ 8 ต้องใช้สารสกัดในปริมาณ 50 ไมโครลิตรจึงสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เพียง 3 หน่วย (ตาราง 7) ในขณะที่สารสกัดด้วย methanol-acetic acid ใช้ปริมาณสารสกัดเพียง 1:50 ไมโครลิตรก็สามารถเพิ่มน้ำตาลได้ 1 หน่วย (ตาราง 3) ดังนั้นฮอร์โมน CHH ที่ได้รับเท่ากับ 0.12% ของสารสกัดเริ่มต้นเท่านั้น

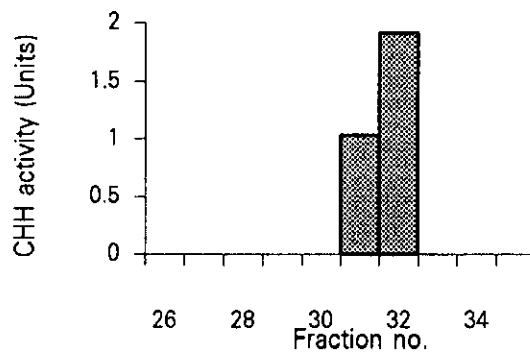
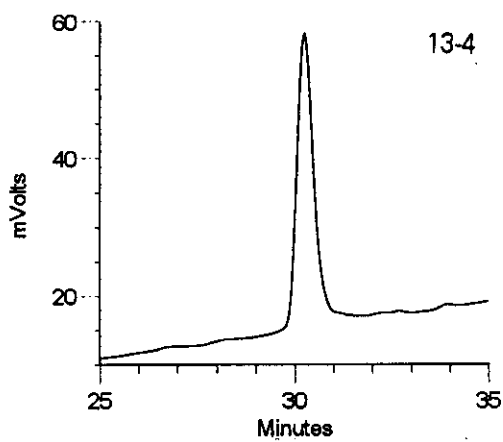
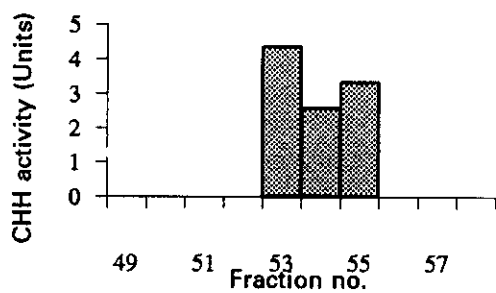
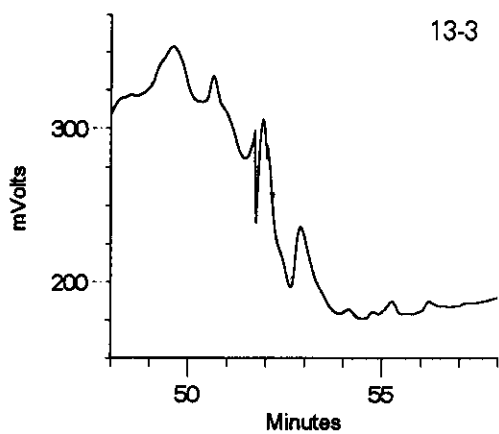
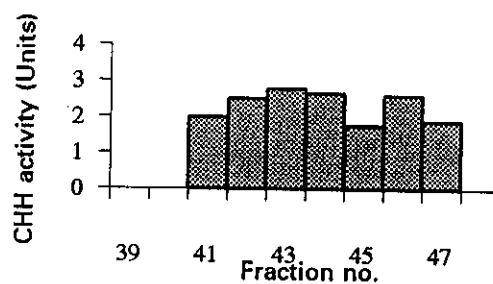
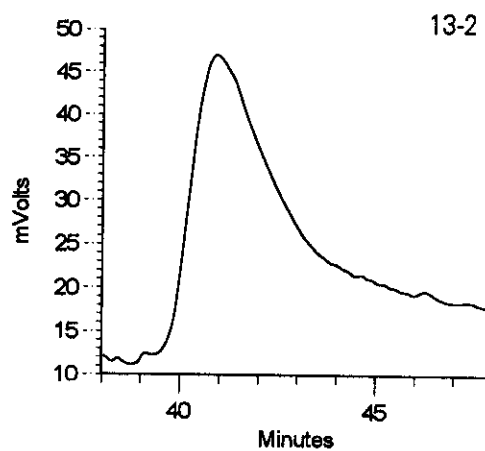
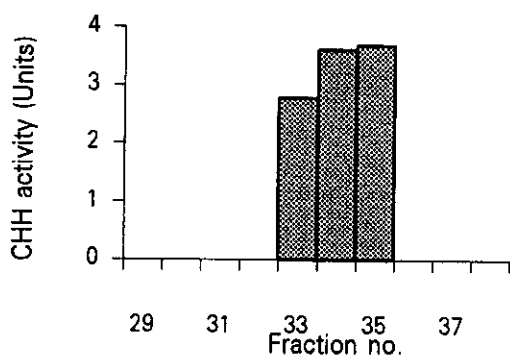
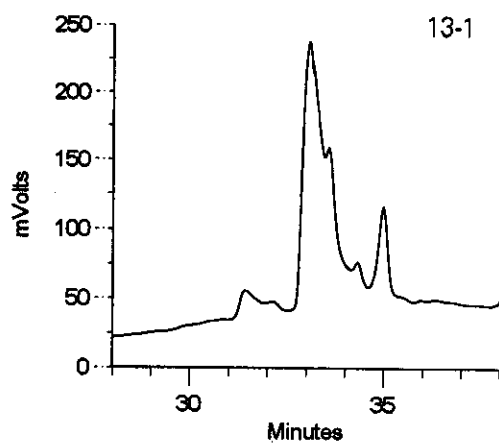
ภาพประกอบ 13 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

13-1 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 (คอลัมน์ : Phenyl ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอริโมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 33-35

13-2 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอริโมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 33-37

13-3 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (คอลัมน์ : Phenyl ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอริโมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 53-55

13-4 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 (คอลัมน์ C18 : ระบบตัวทำละลาย ; ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอริโมน CHH ที่ปรากฏใน fraction ที่ 31 และ 32



ตาราง 7 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 5, 6, 7 และ 8 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100 ml = 1หน่วย/ก้านตา

ขั้นตอนที่	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย)			
	5	6	7	8
คอลัมน์/ระบบ	Phenyl	Cyano	Phenyl	C18
ตัวทำละลาย	ACN/TFA	ACN/TEA	ACN/HFBA	ACN/TEA
จำนวนก้านตา	20	40	40	50
Fraction No.				
29	-	-	-	0.35
30	-	-	-	0.04
31	-	-	-	1.03*
32	0.24	-	-	1.91*
33	2.77*	-	-	0.10
34	3.60*	-	-	0.04
35	3.68*	-	-	0.07
36	0.26	-	-	-
37	0.35	-	-	-
38	0.44	-	0.23	-
39	-	0.88	0.34	-
40	-	0.11	0.22	-
41	-	1.99*	0.24	-
42	-	2.50*	0.24	-
43	-	2.76*	0.24	-
44	-	2.64*	0.24	-
45	-	1.75*	0.57	-

ตาราง 7 ต่อ

ขั้นตอนที่	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย)			
	5	6	7	8
คอลัมน์/ระบบ	Phenyl	Cyano	Phenyl	C18 ACN/TEA
ตัวทำละลาย	ACN/TFA	ACN/TEA	ACN/HFBA	
จำนวนก้านตา	20	40	40	50
Fraction No.				
46	-	2.59*	0.04	-
47	-	1.88*	0.12	-
48	-	0.24	0.12	-
49	-	-	0.07	-
50	-	-	0.13	--
51	-	-	0.34	--
52	-	-	0.71	--
53	-	-	4.35*	--
54	-	-	2.59*	--
55	-	-	3.33*	--
56	-	-	0.33	--

- ไม่ได้ทดสอบ

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วยซึ่งเป็น fraction ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไป

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากความพยายามทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมน CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ 1 รูปแบบ คาดว่ายังมี CHH อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะจากขั้นตอนการแยกโดย HPLC ขั้นตอนแรกจะพบ CHH activity กระจายอยู่ 3-4 fraction เสมอ และจากโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาที่ผ่าน HPLC ในขั้นตอนที่ 7 พบ CHH activity ในพีคต่าง ๆ กัน (รูป 13-3) จึงจำเป็นต้องมีการแยก fraction ที่เหลือให้บริสุทธิ์ต่อไป จึงจะพิสูจน์ได้ว่า fraction เหล่านั้นมี CHH รูปแบบที่แตกต่างไปจากรูปแบบที่ได้นี้ จากรายงานการทำให้ CHH บริสุทธิ์ในสัตว์ครึ่งตัวอื่น ๆ พบ CHH หลายรูปแบบ เช่นใน Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* พบ CHH-B และ CHH-C (Huberman and Aguilar. 1988) ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* พบพีคที่มี CHH activity 2 พีค (Kegel and others. 1991) ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* พบ CHH 2 รูปแบบ (Tensen and others. 1991)

แต่อย่างไรก็ตามการที่พบ CHH activity ในสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามในหลาย fraction อาจเกิดเนื่องจากการสกัดใช้ก้านตาทั้งก้านตาและวิธีการสกัดอาจได้ precursor ของ CHH (อาจอยู่ในรูป preprohormone หรือ prohormone) ออกมาด้วย เพราะจากรายงานการแยกสกัด CHH ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ถึงแม้จะใช้เพียงต่อมไชนัสในการแยกสกัด CHH ก็สามารถพบ CHH-related peptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 38 หน่วยเพิ่มจาก CHH (Tensen and others. 1991) อย่างไรก็ดี สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกประการหนึ่งคือ ในระหว่างการแยกสกัด CHH ขั้นตอนต่าง ๆ อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ CHH เกิดขึ้น ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของโมเลกุลต่างไปจากเดิม เช่น อาจเกิดปฏิกิริยา oxidation ของกรดอะมิโนเช่น เมไทโอนีนและฮิสติดีน หรืออาจเกิดการ hydrolysis ของฮอร์โมนทำให้พบส่วนของฮอร์โมนกระจายไปใน fraction ต่าง ๆ

สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งในการแยกสกัด CHH จะพบว่าในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอน CHH activity จะลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งการลดลงของ CHH activity นี้ไม่น่าเป็นสาเหตุจากการที่ CHH รูปแบบต่าง ๆ แยกจากกันเพียงอย่างเดียวเพราะ CHH activity ของ CHH บริสุทธิ์ที่ได้ในขั้นตอนที่ 8 เหลือน้อยกว่า 1% ของ CHH ในสารสกัดเริ่มต้น ดังนั้นจึงคาดว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ CHH ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่าง ๆ โดยเฉพาะในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย

phenyl column ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA พบว่า CHH activity สูญเสียไปมาก ดังนั้น จึงคาดว่า CHH จากกุ้งก้ามกรามมีระดับการคงสภาพต่ำมาก (labile) ในตัวทำละลายที่ใช้ และในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5-8 ระบบตัวทำละลายที่ใช้อาจทำให้ CHH activity เสียไปได้ ซึ่งต่างจาก CHH จากสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดอื่นที่มีการใช้ขั้นตอนการแยกสกัดที่รุนแรงก็ยังคงรักษา CHH activity ได้ เช่นในกรณีของ isopod, *Porcellio dilatatus* การแยกสกัด CHH ทำโดยใช้แอมโมเนียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (pH 8.5) กับการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร พบว่า CHH activity จากการแยกสกัดทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (Martin and others. 1984) กุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* เป็นตัวอย่างที่แยกสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และผ่าน SDS-PAGE (Kallen and others. 1986) กุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* แยกสกัด CHH โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (Tensen and others. 1991) หรือกรดไฮโดรคลอริกที่ร้อน 85 องศาเซลเซียส หรือในกรดอะซิติกที่ร้อน 80 องศาเซลเซียส (Soyez and others. 1990) ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Nephrops norvegicus* แยกสกัด CHH ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (Smullen and Bntly. 1994) ก็ยังคงรักษา CHH activity อยู่ ซึ่งต่างจากการศึกษาการแยกสกัดเบื้องต้นของ CHH จากกุ้งก้ามกรามโดยใช้สารละลายต่าง ๆ พบว่าการแยกสกัดในน้ำเดือด หรือ กรดอะซิติกเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร การคงสภาพของ CHH activity ต่ำกว่าการแยกสกัดใน 90% methanol 1% acetic acid มาก (Sithigorngul and others. 1994) ดังนั้นจึงเชื่อได้ว่า CHH ในกุ้งก้ามกรามน่าจะมีลักษณะที่แตกต่างรวมทั้งการคงสภาพก็อาจแตกต่างจาก CHH ของสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดอื่น ๆ

ข้อสังเกตในการทำให้บริสุทธิ์ของ CHH จากกุ้งก้ามกรามคือต้องใช้กระบวนการทาง RP-HPLC ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ถึง 8 ขั้นตอนจึงจะได้ CHH บริสุทธิ์ ซึ่งต่างจากรายงานการทำให้ CHH บริสุทธิ์ในสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดอื่น ๆ ซึ่งใช้กระบวนการทาง RP-HPLC เพียง 1-3 ขั้นตอนก็สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ (Soyez and others. 1990, Tensen and others. 1991, Smullen and Bently. 1994) ทั้งนี้เพราะการเตรียมสารสกัด CHH ในการศึกษาเหล่านี้เตรียมจากต่อมไชนัส ดังนั้นการปนเปื้อนของสิ่งเจือปนต่าง ๆ ในสารสกัดจึงน้อยกว่าการใช้ทั้งก้ามตาดังที่ปฏิบัติในการแยกสกัด CHH จากกุ้งก้ามกราม

การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาที่สำคัญ เพราะสามารถทราบขั้นตอนที่ทำให้ CHH บริสุทธิ์และคงสภาพอยู่ได้ ซึ่งจะทำให้การแยกสกัด CHH รูปแบบอื่น ๆ ทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง

ขึ้น และเป็นข้อมูลในการศึกษาการแยกสกัดฮอร์โมนขนาดใหญ่อื่น ๆ โดยเฉพาะ Gonad Inhibiting Hormone-GIH หรือ Vitellogenesis Inhibiting Hormone -VIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีขนาดและลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ CHH (Soyez and others. 1991) นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับ CHH ในกิ้งก่ามุกรามจะมีประโยชน์กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกิ้งต่อไป เพราะฮอร์โมนนี้มีความสำคัญกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของกิ้งโดยตรง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ธวัช ดอนสกุล. ปฏิบัติการสัตวศาสตร์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน, 2520.
- บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. ปฏิบัติการสัตววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : บุรพาสาน, 2528.
- ประจวบ หล้าอุบล. กุ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ม.ป.ท., 2527.
- _____. สรีรวิทยาของกุ้ง. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, 2537.
- ปิยะพงศ์ โชติพันธ์. การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2529.
- ยนต์ มุสิก. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2529.
- Abramowitz, A.A., F.L., Hisaw and D.N., Papandrea. "The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans, in crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives," Biol.Bull. 86 : 1-5 ; 1944.
- Aguilar and others. "Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann)," Comp.Biochem.Physiol. 102B : 491-498 ; 1992.
- Beltz, B.S. "Crustacean neurohormone", In : Endocrinology of selected invertebrate types. Edited. H. Laufer and R.G.H. Downer, New York ; Alan R. Liss. Inc., pp.235-258 ; 1988.
- Chang, E.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. "Purification and amino acid composition of a peptide with molt-inhibiting activity from the lobster, *Homarus americanus*," Gen. Comp. Endocrinol. 65 : 56-64 ; 1987.
- Dore, I. and C. Frimodt. An illustrated guide to shrimp of the world. New York : Van Nostrand Reinhold, 86-87, 1987.
- Fernlund, P. and L. Josefsson. "Crustacean color change hormone : Amino acid sequence and chemical synthesis," Science. 177 : 173-175 ; 1972.

- Fernlund, P. "Structure of the red pigment concentrating hormone of the shrimp *Pandalus borealis*, in the demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptide AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species", Biochem Biophys. Acta. 371 : 304-311 ; 1974.
- Gangotri, M.S., S.A.T. Venkatachari and N.Vasantha. "Neuroendocrine control of blood sugar regulation in the freshwater crab, *Barytelphusa guerini* (H.MilineEdward) (Decapoda, potamidea)," Crustacean. 53 (1) : 5-14 ; 1987.
- Holthius, L.B. FAO species catalogue Vol. 1 shrimps and prawns of the world. FAO fisheries synopsis No.125. Volume 1. 1980.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. "A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone," Comp. Biochem. Physiol. 85B (1) : 197-203 ; 1986.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. "A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-II. Structural comparison of two isoforms of the hormone," Comp. Biochem. Physiol. 91B : (2) 345 -349 ; 1988.
- Huberman, A., M.B. Aguilar and K. Brew. "Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann) : interspecies comparison," Peptides. 14 : 7-16 ; 1993.
- Kallen, J.L. and F. Van Herp. "Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Nordmann,1842)," J. Morphology. 170 : 347-355 ; 1981.
- Kallen, J.L. and others. "Biochemical analysis of the crayfish, *Astacus leptodactylus*," Gen. Comp. Endocrinol. 61 : 248-259 ; 1986.
- Kegel, G. and others. "Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*," FEBS Letters. 25 (1) : 10-14 ; 1989.
- Kegel, G. and others. "Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus* : Emergence of a novel neuropeptide family," Peptides. 12 : 909-913 ; 1991.

- Keller, R. and G. Wunderer. "Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab, *Carcinus maenas*," Gen. Comp. Endocrinol. 34 : 328-335 ; 1978.
- Keller, R., P.P. Jaros and G. Kegal. "Crustacean hyperglycemic neuropeptides," Amer. Zool. 25 : 207-221 ; 1985.
- Keller, R. and D. Sedlmeier. "A metabolic hormone in Crustaceans : The hyperglycemic neuropeptide. In : Endocrinology of selected invertebrate types." Edited. H. Laufer and R.G.H. Downer. Alan R. Liss. Inc., New York. pp. 315-326 ; 1988.
- Kleinholz, L.H. and others. "Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*," Biol. Bull. 170 : 135-143 ; 1986.
- Martin, G. and others. "The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. I. Isolation and Characterization," Gen. Comp. Endocrinol. 55 : 208-216 ; 1984.
- Martin, G. and others. "The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. II. Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system," Gen. Comp. Endocrinol. 55 : 217-226 ; 1984.
- Martin, G., O. Sorokine and A.V. Dorsselaer. "Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea)," J. Biochem. 211 : 601-607 ; 1993.
- Nagamine, C. and others. "Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapod, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod," Gen. Comp. Endocrinol. 41 : 423-441 ; 1980.
- Rao, K.R. and J.P. Riehm. "Pigment- dispersing hormone : A novel family of neuropeptides from arthropods," Peptides. 9 : 153-159 ; 1988.
- Santos, E.A. and R. Keller. "Review : Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives," Comp. Biochem. Physiol. 106A (3) : 405-411 ; 1993.

- Schooneveld, H. and others. "Demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptides AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species," Brain Research. 406 : 224-232 ; 1987.
- Sedlmeier, D. and R. Keller. "The mode of action of crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides," Gen. Comp. Endocrinol. 45 : 82-90 ; 1981.
- Sedlmeier, D. "The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland," Peptides. 20 : 91-98 ; 1988.
- Sithigorngul W., S. Ruengmanee-paitoon and P. Sithigorngul. "Determination of crustacean hyperglycemic hormone in *Macrobrachium rosenbergii*," Srinakharinwirot Univ. Sci. J. 8 (1) : 38-46 ; 1992.
- Sithigorngul W., P. Sithigorngul. and N. Boon-ingpirdpong. "Purification of gonad inhibiting hormone in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. I: Preliminary Study," National Budget (1993) Final Report. 55p ; 1994.
- Smullen, R.P. and M.G. Bentley. "Studies on crustacean hyperglycaemic hormone of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.)," Invert. Rep. Dev. 26(1) : 23-32 ; 1994.
- Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. "Isolation and characterization of a Vitellogenesis-Inhibiting Factor from sinus gland of the lobster, *Homarus americanus*," J. Exp. Zool. 244 : 479-484 ; 1987.
- Soyez, D. and others. "Neuropeptides from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* : Characterization of hyperglycemic peptides," Gen. Comp. Endocrinol. 79 : 261-274 ; 1990.
- Soyez, D. and others. "Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster, *Homarus americanus*," Neuropeptides. 20 : 25-32 ; 1991.
- Spaargaren, D.H. and P.A. Haefner. "The effect of environmental osmotic conditions on blood and tissue glucose levels in the brown shrimp, *Crangon crangon* (L.)," Comp. Biochem. Physiol. 87A (4) : 1045-1050 ; 1987.
- Tensen, C.P. and others "Characterization of hyperglycemic neuropeptides from the lobster, *Homarus americanus*," Peptides. 12 : 241-249 ; 1991.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตาราง 8 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1.1 (จำนวน 1,000 ก้านดา) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านดา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านดา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณฮอร์โมน หน่วย/ก้านดา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
1-4	1	18.55	21.05	2.50	0.10
5-8	1	8.09	9.50	1.41	0.06
9-12	1	10.10	11.89	1.79	0.07
13-16	1	10.07	14.15	4.08	0.16
17-20	1	13.37	15.15	1.78	0.07
21-24	1	13.90	15.95	2.05	0.08
25-28	1	8.39	10.41	2.02	0.08
29	1	13.40	14.90	1.50	0.06
30	1	12.30	15.85	3.55	0.14
31	1	7.74	15.50	7.76	0.31
32	1	9.78	10.04	0.26	0.01
33	1	6.42	7.75	1.33	0.05
34	1	3.34	8.42	5.08	0.20
35	1	15.35	21.05	5.70	0.23
36	1	9.10	50.03	40.93	1.64*
37	1	10.36	69.05	58.69	2.35*
38	1	13.65	84.34	70.69	2.83*
39	1	9.64	36.97	27.33	1.09*
40	1	12.95	18.35	5.40	0.22
41-44	1	9.58	23.00	13.42	0.54
45-48	1	5.81	17.65	11.84	0.47
49-52	1	11.25	12.10	0.85	0.03
53-56	1	18.50	23.50	5.00	0.20

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 9 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1.2 (จำนวน 2,000 ก้านตา) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
35	1	3.81	15.10	11.29	0.45
36	1	6.42	55.71	49.29	1.97*
37	1	4.78	91.05	86.27	3.45*
38	1	2.21	68.98	66.77	2.67*
39	1	1.32	46.96	45.64	1.83*
40	1	0.86	3.10	2.24	0.09
41	1	0.81	5.42	4.61	0.17
42	1	3.57	15.95	12.38	0.50

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 10 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1.3 (จำนวน 2,000 ก้านตา) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด $25 \text{ mg}/100\text{ml} = 1$ หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
35	1	2.57	9.92	7.35	0.29
36	1	3.71	57.70	53.99	2.16*
37	1	3.14	84.30	81.16	3.25*
38	1	12.39	85.40	73.01	2.92*
39	1	9.00	47.63	38.63	1.55*
40	1	6.37	12.85	6.48	0.26
41	1	7.66	9.15	1.49	0.06
42	1	12.87	24.75	11.88	0.48

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 11 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 2.1 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
25-27	1	13.45	16.45	3.00	0.12
28-31	1	9.28	18.93	9.65	0.39
32-35	1	8.41	11.26	2.85	0.11
36	1	15.70	57.99	42.29	1.69*
37	1	8.35	52.64	44.29	1.77*
38	1	12.80	69.79	56.99	2.28*
39	1	10.78	79.71	68.93	2.76*
40	1	11.17	67.08	55.91	2.24*
41	1	7.67	16.67	8.97	0.36
42	1	10.24	18.25	8.01	0.32
43-46	1	1.68	16.30	14.62	0.59

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 12 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 2.2 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
36	1	4.65	7.57	2.92	0.12
37	1	8.65	22.55	13.90	0.56
38	1	3.94	18.64	14.70	0.59
39	1	15.25	75.86	60.61	2.42*
40	1	10.40	58.85	48.45	1.94*
41	1	17.27	76.96	59.69	2.39*
42	1	0.98	2.83	1.85	0.07
43-46	1	4.95	23.30	18.35	0.73

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 13 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 2.3 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
35	1	16.15	28.15	12.00	0.48
36	1	11.00	52.85	41.85	1.67*
37	1	12.00	66.69	54.69	2.19*
38	1	6.52	43.27	36.75	1.47*
39	1	9.68	20.25	10.57	0.42
40	1	10.82	14.48	3.66	0.15
41	1	5.33	5.93	0.60	0.02
42	1	19.30	21.15	1.85	0.07
43-46	1	13.50	25.20	11.70	0.47

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 14 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 3 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
35	2	9.86	16.30	6.44	0.26
36	2	10.25	13.20	2.95	0.12
37	2	23.30	29.46	6.15	0.25
38	2	18.45	82.70	64.25	2.57*
39	2	8.36	73.46	65.10	2.60*
40	2	1.74	23.75	22.01	0.88
41	2	12.90	14.05	1.15	0.05

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 15 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 4 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
29	10	17.75	24.75	7.00	0.28
30	10	7.44	23.85	16.41	0.66
31	10	12.80	95.39	82.59	3.30*
32	10	4.83	37.55	32.72	1.31*
33	10	15.20	24.95	9.75	0.39
34	10	28.08	36.33	8.25	0.33

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 16 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 5 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
32	20	13.30	19.40	6.10	0.24
33	20	33.21	102.51	69.30	2.77*
34	20	18.60	108.70	90.10	3.60*
35	20	14.64	106.65	92.01	3.68*
36	20	6.90	13.48	6.58	0.26
37	20	20.66	29.32	8.66	0.35
38	20	21.47	32.55	11.08	0.44

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 17 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 6 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	หน่วย/ก้านตา
39	40	11.30	33.20	21.90	0.88
40	40	13.85	16.60	2.75	0.11
41	40	16.15	65.85	49.70	1.99*
42	40	23.70	86.15	62.45	2.50*
43	40	18.65	87.73	69.08	2.76*
44	40	26.10	92.00	65.90	2.64*
45	40	16.40	60.20	43.80	1.75*
46	40	11.18	75.91	64.73	2.59*
47	40	12.95	59.90	46.95	1.88*
48	40	18.72	24.79	6.07	0.24

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 18 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 7 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
38	40	8.82	14.60	5.78	0.23
39	40	11.50	20.00	8.50	0.34
40	40	14.80	20.40	5.60	0.22
41-44	40	7.65	13.60	5.95	0.24
45	40	16.00	30.30	14.30	0.57
46	40	9.25	10.20	0.95	0.04
47	40	2.67	5.56	2.89	0.12
48	40	4.70	7.77	3.07	0.12
49	40	12.90	14.60	1.70	0.07
50	40	3.04	6.24	3.20	0.13
51	40	8.45	17.00	8.55	0.34
52	40	14.60	32.30	17.70	0.71
53	40	19.85	128.50	108.65	4.35*
54	40	12.75	77.58	64.83	2.59*
55	40	9.54	92.80	83.26	3.33*
56	40	18.20	26.40	8.20	0.33

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 19 ผลการตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) จาก fraction ต่าง ๆ
 ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 8 ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25
 mg/100ml = 1 หน่วย/ก้านตา

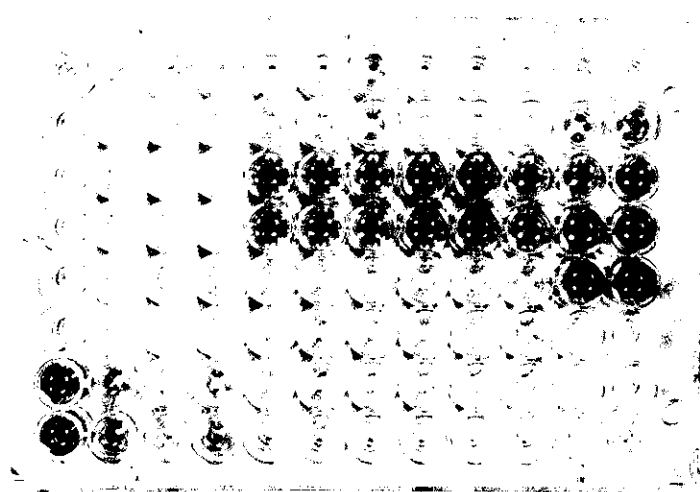
Fraction No.	ปริมาณ ก้านตา	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100 ml)			ปริมาณ ฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น	
29	50	3.67	12.50	8.83	0.35
30	50	3.65	4.77	1.12	0.04
31	50	2.52	28.30	25.78	1.03*
32	50	5.12	52.93	47.81	1.91*
33	50	3.03	5.56	2.53	0.10
34	50	2.99	3.91	0.92	0.04
35-38	50	3.06	4.85	1.79	0.07
39-42	50	3.33	7.93	4.60	0.18

* พบ ฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วย

ตาราง 20 ระดับความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง ก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาด้วยน้ำเกลือ (saline) และเจือจางที่ระดับต่าง ๆ 5 ระดับเข้าป้อนาน 1 ชั่วโมง (จำนวนกึ่งที่ใช้ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 3 ตัว)

กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100ml)		
	ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับที่เพิ่มขึ้น
1. น้ำเกลือ	10.36	14.44	4.08
2. สารสกัด 1:125 ก้านตา/ตัว	9.83	38.25	28.42
3. สารสกัด 1:50 ก้านตา/ตัว	14.73	77.67	62.94
4. สารสกัด 1: 25 ก้านตา/ตัว	14.59	99.36	84.77
5. สารสกัด 1:5 ก้านตา/ตัว	16.20	102.30	86.10
6. สารสกัด 1 ก้านตา/ตัว	23.25	108.96	85.17

ภาคผนวก ข



ภาพประกอบ 14 แสดงตัวอย่าง microtiter plate ที่ใช้ในการตรวจหาน้ำตาลในตัวอย่างเลือดของกิ้งก่ามกราม หลุมที่ 11 และ 12 A เป็น blank หลุมที่ 11 และ 12 (B-E) ใส่กลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ส่วนหลุมอื่น ๆ ที่เหลือใส่ตัวอย่างเลือดก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัด ถ้าหลุมใดปรากฏสีขึ้นแสดงว่าหลุมนั้นมีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มของสีที่ปรากฏจะแปรผันตามปริมาณของกลูโคสที่มีอยู่ในตัวอย่างเลือด

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

1. น้ำเกลือสำหรับกึ่งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* - isotonic physiological saline pH

7.6, Nagamine and others. 1980)

NaCl	11.00	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.91	กรัม
KCl	0.52	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.47	กรัม
NaHCO ₃	0.17	กรัม
H ₂ O (distilled)	1000.00	มิลลิลิตร

2. สารละลายเอนไซม์และสี (Glucose Oxidase, Peroxidase, o-Dianisidine-PGO, Sigma.

Diagnostic Kit)

PGO	1	แคปซูล
o-Dianisidine	1.60	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled)	100.00	มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นายสมปอง ชื้อสกุล ใจดีเอย

เกิดวันที่ 21 เมษายน พุทธศักราช 2513

สถานที่เกิด อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 187 หมู่บ้านศรีรับสุข ซอยข้าหลวง ถนนวิภาวดีรังสิต
แขวงตลาดบางเขน เขตดอนเมือง กรุงเทพฯ 10210

ประวัติการศึกษา

- | | |
|----------|--|
| พ.ศ.2531 | มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนบางลี่วิทยา อำเภอ
สองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี |
| พ.ศ.2535 | กศ.บ. (วิชาเอกวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา) (เกียรตินิยม) จากมหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน |
| พ.ศ.2538 | วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร |

การแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตา
ของกิ้งก่ามรกต

บทคัดย่อ
ของ
สมปอง ใจดีเฉย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2539

จากการใช้กระบวนการ RP-HPLC 8 ขั้นตอนในการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม และใช้วิธีติดตามตรวจสอบ fraction ที่มีฮอร์โมนนี้ด้วยการฉีดสารสกัดจาก fraction ต่าง ๆ กลับเข้าไปในกุ้งก้ามกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง โดยตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้น สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ 1 รูปแบบ แต่ activity ของ CHH ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่า CHH จากก้านตากุ้งก้ามกรามมีระดับการคงสภาพต่ำมากและอาจมีรูปแบบแตกต่างจากที่มีรายงานมาก่อนในสัตว์ครัสตาเซียนชนิดอื่น

ISOLATION OF CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE FROM
THE EYESTALK OF THE GIANT FRESHWATER PRAWN,
Macrobrachium rosenbergii (DE MAN)

AN ABSTRACT

BY

SOMPONG JAIDEECHOEY

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakarinwirot University

May 1996

An isoform of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) was isolated from an eyestalk extract of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* by using 8 steps of RP-HPLC. The detection of the hormone during the purification was done by injection of the purified extract into eye-ablated prawns and determination of the elevation of glucose levels in the haemolymph. The CHH activity in each step of purification decreased rapidly suggested that the CHH in this prawn is very labile and different from the CHH previously described in other crustacean.