

615.942

ร 331 ก

ร.๕

การเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงู ที่ได้จากงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*)
ที่มีดอกจันสมบูรณ์และดอกจันไม่สมบูรณ์

23 ต.ค. 2539

ปริญญานิพนธ์

ของ

ภัชรี หนูณรงค์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

กันยายน 2538

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

197077

การเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงู ที่ได้จากงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*)
ที่มีดอกจันสมบูรณ์และดอกจันไม่สมบูรณ์

บทคัดย่อ
ของ
ภัชรี หนูณรงค์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตรเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
กันยายน 2538

ดอกจันเป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้ในการบ่งบอกชนิดของงูเห่า โดยทั่วไป งูเห่าไทย มีดอกจันแบบวงแหวน จากการศึกษาของคุณไพบุลย์ จินตกุล พบว่าดอกจันของงูเห่ามีหลายแบบ จึงเป็นที่น่าสนใจเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันแตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ และไม่สมบูรณ์

เราแยกองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ และดอกจันไม่สมบูรณ์แต่ละตัว ด้วยวิธี RP - HPLC โดยใช้ คอลัมน์ชนิด คาร์บอน - 18 (ขนาด 250 x 4.6 mm., 10 μ m) ได้ 13 ส่วน และนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบความเป็นพิษ วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเพส เอทู อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส และแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

การศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยของกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์และดอกจันไม่สมบูรณ์ คล้ายคลึงกัน ในกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ พบองค์ประกอบส่วนที่ VIII ในพิษงูเห่า 2 ตัว และพบ องค์ประกอบส่วนที่ X ในพิษงูเห่า 5 ตัวที่เหลือ ส่วนในกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์พบองค์ประกอบ ส่วนที่ VIII ในพิษงูเห่า 3 ตัว และองค์ประกอบส่วนที่ X ในพิษงูเห่า 4 ตัวที่เหลือ การศึกษา สมบัติของแต่ละองค์ประกอบพิษงูเห่าไทยทั้ง 2 กลุ่มให้ผลเหมือนกัน แอกติวิตีของฟอสโฟไลเพส เอทู พบในองค์ประกอบส่วนที่ VII และ VIII แอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส พบในส่วนที่ III, IV, V และ VI ตามลำดับ แอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกมีอยู่ในส่วนที่ VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ส่วนการตรวจสอบความเป็นพิษนั้นพบว่าองค์ประกอบส่วนที่ IV มีความเป็นพิษสูงสุดซึ่งบ่งชี้ว่าองค์ประกอบส่วนนี้เป็นนิวโรทอกซิน จากผลการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ ให้เห็นว่าพิษงูที่ได้จากงูเห่าที่มีดอกจันสมบูรณ์ และดอกจันไม่สมบูรณ์มีองค์ประกอบที่เหมือนกัน แต่มีความเข้มข้นต่างกัน

COMPARISON OF PROTEIN COMPONENTS OF VENOM FROM SIAMESE COBRAS
(*NAJA KAOUTHIA*) WITH COMPLETE AND INCOMPLETE HOOD MARKINGS

AN ABSTRACT

BY

PATCHRAEE NOONARONG

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

September 1995

The hood marking is an important characteristic to identify cobras. Most Thai cobras (*Naja kaouthia*) have monocellated hood marking (single ring) Piboon Jintakune has studied some characteristics of Thai cobras and he found that there are thirteen different hood markings. In this study the protein components from *Naja kaouthia* venom of different hood markings (the complete monocellated and the incompleated) were compared

Two groups of cobra venom have been isolated by RP - HPLC on a chromospher C - 18 column (250 x 4.6 mm, 10 μ m). Thirteen fractions were collected and each fraction was assayed for toxicity test, phospholipase A_2 , acetylcholinesterase and direct lytic factor activities.

The chromatographic patterns obtained from HPLC of the groups do not show the difference in protein components. However in complete hood marking groups , fraction VIII was found only in the venom of 2 cobras whereas fraction X was found in other 5 cobras. In the incomplete groups hood marking , fraction VIII was found in the venoms of 3 cobras whereas fraction X was found in the venoms of others 4 cobras. Phospholipase A_2 activities were showed in fractions VII and VIII Acetylcholinesterase activities were identified in fraction III - VI. Direct lytic factor was identified and the activities were showed in fraction VI - XIII. The toxicity test of both groups was identified and showed that fraction IV is the most toxic fraction which indicated neurotoxic activities. We can conclude that the venom of the two groups contained identical protein components.

คณะกรรมการควบคุม และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

..... ประธาน
(อ. นฤมล พัทธมณี)

..... กรรมการ
(ดร. สายสนม ธรรมพิทักษ์)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
(อ. นฤมล พัทธมณี)

..... กรรมการ
(ดร. สายสนม ธรรมพิทักษ์)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผศ.ดร. ธำรรัตน์ ศุภศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลัก
สูตรปริญญาวิตยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ดร. ศิริญา พูลสุวรรณ)

วันที่ . 20 . . . เดือน . กันยายน พ.ศ. 2538 . . .

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความช่วยเหลือ แนะนำและความอนุเคราะห์อย่างใกล้ชิด ด้วยดีจาก อาจารย์ณฤมล พักมณี กองวิทยาศาสตร์สภากาชาดไทย และ ดร.สายสนม ธรรมพิทักษ์ รวมทั้ง ผศ.ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำทั้งมาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ดร. วิศิษฎ์ สิตปรีชา ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านสถานที่และเครื่องมือในการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณไพบูลย์ จินตกุล แห่งกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่กรุณาให้คำแนะนำและถ่ายภาพ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.สุภากร พัฒนอักษร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนในการศึกษา รวมทั้ง ร.ต.อ. ธวัช สิทธิกิจโยธิน เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ และผู้มีพระคุณที่ได้กล่าวนาม ที่ให้คำแนะนำความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และที่สำคัญที่สุดคือกำลังใจที่มอบให้จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ภัชรี นพคุณวงศ์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	งูเห่าไทย	2
	ส่วนประกอบของพิษงู	5
	งานวิจัยและแนวคิดที่เกี่ยวข้อง	6
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	10
	ขอบเขตของการวิจัย	10
	ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	10
	เอนไซม์ที่ศึกษาในพิษงูเห่าไทย	11
	เอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช	12
	เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	13
	โคเรคท์ ไลติค แพ็คเตอร์	13
	วิธีการที่ใช้แยกและวิเคราะห์พิษงูเห่า	13
	ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี	13
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	16
2	วิธีวิจัย	17
	การรวบรวมงูเห่าไทย ที่มีดอกจันสมบูรณ์ และดอกจันไม่สมบูรณ์	17
	การรีดและเก็บพิษงู	17
	การเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงู จากงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ และไม่สมบูรณ์	17
	การแยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี	17
	การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของลาวรี	19

การวัดค่าแอกติวิตีของฟอสฟอไรเฟส เอช ตามวิธีของแมบส์ และซาเมจิมา	20
การวัดค่าแอกติวิตีของอะซิติกโคลิคเอนเอสเตอเรส ตามวิธีของลี	22
การวัดค่าแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ตามวิธีของ คาร์ลสัน อาร์นเบอร์กและเอเคอร์	23
การหาค่าความเป็นพิษ ตามวิธีของคาร์เบอร์ เมเยอร์ และแมนเฟรด	24
3 ผลการวิจัย	28
ผลการศึกษางูเห่าไทย และองค์ประกอบของพิษงูที่ได้จากงูเห่าไทย กลุ่มที่มี ดอกจันสมบูรณ์ และกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์	28
3.1 ผลการวิจัยของงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์	28
3.1.1 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก	28
3.1.2 ผลการแยกพิษงูเห่าไทยแต่ละตัวด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี ในกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์	29
3.1.3 ผลการศึกษาสสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยแต่ละส่วนที่แยกได้	37
3.1.3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีน ในแต่ละส่วนที่แยกได้	37
3.1.3.2 ผลการวัดแอกติวิตีของฟอสฟอไรเฟส เอช	39
3.1.3.3 ผลการวัดแอกติวิตีของอะซิติกโคลิคเอนเอสเตอเรส	39
3.1.3.4 ผลการวัดแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก	39
3.1.3.5 ผลการศึกษาความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทย	39
3.2 ผลการวิจัยของงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์	40
3.2.1 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก	40
3.2.2 ผลการแยกพิษงูเห่าแต่ละตัวด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี	41
3.2.3 ผลการศึกษาสสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยแต่ละส่วนที่แยกได้	49
3.2.3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้	49

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	แสดงความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ทั้งที่ยังไม่ได้แยกและ แต่ละส่วนที่แยกได้ในการหาค่าความเป็นพิษ	26
2	แสดงความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ทั้งที่ยังไม่ได้แยก และแต่ละส่วนที่แยกได้ในการหาค่าความเป็นพิษ	27
3	แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกและปริมาณพิษงูสดของงูเห่าไทยกลุ่มที่มี ดอกจันสมบูรณ์	28
4	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ที่แยกได้	38
5	แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกและปริมาณพิษงูสดของงูเห่าไทยกลุ่มที่มี ดอกจันไม่สมบูรณ์	40
6	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ที่แยกได้	50

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงภาพงูเห่าไทย	3
2 แสดงภาพดอกจันของงูเห่าแถบเอเชีย (ก) แบบ Monocellate (ข) แบบ Binocellate และ (ค) แบบ Acellate	4
3 แสดงภาพดอกจันของงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์	7
4 แสดงภาพดอกจันของงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์	7
5 แสดงการย่อยสลายของฟอสโฟไลปิดด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเพส เอช	11
6 แสดงปฏิกิริยาเอสเทอร์ไฮโดรไลซิส ของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	12
7 แสดงโครงสร้างของ Octadecyl silanols	16
8 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 1	30
9 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 2	31
10 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 3	32
11 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 4	33
12 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 5	34
13 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 6	35
14 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 7	36

15	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 1	42
16	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 2	43
17	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 3	44
18	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 4	45
19	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 5	46
20	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 6	47
21	โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 7	48
22	สเปกตรัมแสดงมวลโมเลกุล ขององค์ประกอบของพืชงูส่วนที่ IV กลุ่มที่มี ดอกจันสมบูรณ์ วิเคราะห์โดย แมสสเปกโตรเมตรี	62

บทที่ 1

บทนำ

งูเป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีอยู่ทั่วโลก ซึ่งจัดอยู่ใน Class : Reptilia , Subclass : Symatosausia , Order . Squamata , Suborder Serpentes แบ่งได้เป็น 23 วงศ์ (Families) โดยอาศัยจากแหล่งที่อยู่อาศัยของงู รูปร่างลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะหัว เขี้ยว เกล็ด สีตัว ฯลฯ และรวมทั้งลักษณะทางอิมมูโนวิทยา งูทั้ง 23 วงศ์นี้ ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2,340 ชนิด (species) มีทั้งงูพิษและงูไม่มีพิษ แต่งูพิษนั้นส่วนใหญ่มีอยู่เฉพาะประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่นและเขตร้อน และในประเทศเหล่านี้ยังมีงูไม่มีพิษปนอยู่ด้วย จำนวนงูเหล่านี้จะมีอัตราส่วนกันระหว่างงูมีพิษและงูไม่มีพิษอย่างไรมันแล้วแต่ประเทศ (ประดิษฐ์ กาญจนพันธ์. 2519) ในรัฐแทสมาเนีย ประเทศออสเตรเลีย งูที่มีอยู่เป็นงูที่มีพิษทั้งสิ้น หุบเขาเมซอนซึ่งมีงูไม่มากนัก เป็นงูพิษเพียง 3-5 % ของจำนวนงูทั้งสิ้น ประเทศที่อยู่ในหมู่เกาะ เช่น เกาะฮา-วาย นิวซีแลนด์ นิวคาลิโดเนีย ไอร์แลนด์ และส่วนอื่นๆของโลก เช่น ในเขตขั้วโลกเหนือ มีงูที่ไม่มีพิษทั้งสิ้น แต่อย่างไรก็ดี ในหมู่เกาะเขตร้อนแถบมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรอินเดีย และบางแห่งไม่มีงูบก มีแต่งูทะเล ซึ่งเป็นงูที่มีพิษปนอยู่ด้วย (Hunter. 1961) และในจำนวนนั้นจัดเป็นงูพิษ 4 วงศ์ มีงูอยู่ประมาณ 300 - 400 ชนิด งูพิษทั้ง 4 วงศ์นี้ได้แก่ อีแลปตี (Elapidae) เช่น งูเห่า งูเห่าพันพิษ งูจงอาง งูสามเหลี่ยม ไวเพอริตี (Viperidae) เช่น งูแมวเซา ครอตาลิดี (Crotalidae) เช่น งูกะปะ งูเหียวหางไหม้ และ ไฮโดรฟิดี (Hydrophidae) ซึ่งได้แก่งูพิษทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในทะเล เช่น งูคออ่อน งูชายธง งูผ้าชีวรี เป็นต้น งูที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ มีรูปร่างลักษณะภายนอกเป็นทรงกระบอกเรียวยาว หางมักจะเรียวยาว เล็ก ไม่มีระยาง ไม่มีเปลือกตา และไม่มีช่องหูเปิด ห่อหุ้มด้วยผิวหนังที่มีเกล็ด (Dowling and Duellman. 1978 ; บุญเย็น ทุมวิภาตและวิโรจน์ นุตพันธ์. 2525)

ลักษณะพิเศษของงูพิษที่ต่างจากงูไม่มีพิษคือ งูพิษจะต้องมีเขี้ยว ซึ่งมีท่อต่อไปสู่ต่อมพิษ เมื่องูกัดเหยื่อ กล้ามเนื้อรอบต่อมพิษจะบีบตัว ทำให้น้ำพิษไหลออกจากต่อมไปสู่เขี้ยว ฉะนั้นรอยแผลของผู้ที่ถูกงูกัด จะต้องมียุติ 2 จุด ซึ่งแสดงถึงรอยเขี้ยวและอาจมีเลือดซึม รอยเขี้ยวส่วนใหญ่มี 2 รอย ห่างกันประมาณ 0.5 - 3 เซนติเมตร ตามขนาดของงู ส่วนงูที่ไม่มีพิษจะไม่มีเขี้ยว แผลที่มองเห็นจึงเป็นเพียงรอยถากหรือถลอกเท่านั้น (มุกดา ตฤณานนท์. 2522)

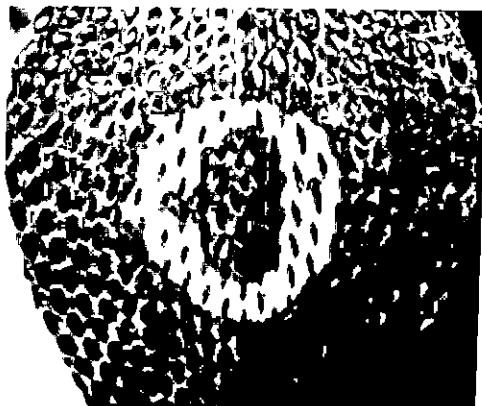
ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อน พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งเหมาะที่จะเป็นที่อยู่อาศัยของงูเป็นอย่างยิ่ง จึงมีทั้งงูบกและงูทะเล และมีทุกชุมมากตามชนบท แต่ยังไม่มีการศึกษาว่าจำนวนงูในประเทศไทยจะมีอัตราส่วนกันระหว่างงูที่มีพิษและงูที่ไม่มีพิษมีอัตราส่วนอย่างไร และในจำนวนนี้มีงูพิษที่สำคัญในประเทศไทย 7 ชนิด คือ งูเห่า (cobra) งูจงอาง (king cobra) งูสามเหลี่ยม (banded krait) งูทะเล (sea snake) งูกะปะ (malayan pit viper) งูแมวเซา (russell's viper) และงูเขียวหางไหม้ (green pit viper) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามการออกฤทธิ์ของพิษงู คือ กลุ่มงูที่มีพิษออกฤทธิ์ทางระบบประสาท ได้แก่ งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม และงูทะเลส่วนใหญ่ อาการทางระบบประสาทเกิดขึ้นภายใน 1/2 - 1 ชั่วโมง โดยเริ่มจาก หนังตาตก ลิ้นตาม้วนขึ้น กล้ามเนื้อที่ช่วยในการหายใจเป็นอัมพาต และจะเสียชีวิตจากการหยุดหายใจ และกลุ่มที่มีพิษที่ออกฤทธิ์ทางระบบโลหิต ได้แก่ งูแมวเซา งูเขียวหางไหม้และงูกะปะ พิษงูจะทำให้เลือดออกตามผิวหนังของแขนขาที่ถูกกัด เลือดออกตามไรฟัน อาเจียนเป็นเลือดและเลือดออกทั่วไปซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เสียชีวิตได้ (ชาญ โพนกุล 2531)

งูเห่าไทย

งูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) หรือ Siamese cobra (ภาพประกอบ 1) เป็นงูพิษที่อยู่ในวงศ์ Elapidae ซึ่งเป็นงูที่รู้จักกันดีที่สุดและมีพิษร้ายแรง (ชาญ โพนกุล 2531) และพบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย ลักษณะทั่วไปของงูเห่าไทย คือ มีหัวบวมมน เกือบบนหัวเป็นเกล็ดขนาดใหญ่ ลูกตาดำกลม มีเขี้ยวพิษติดแน่นกับตอนหน้าของขากรรไกร บางชนิดพ่นพิษได้ สีแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อม เป็นงูขนาดกลางยาวเต็มที่ประมาณ 1.2 - 1.5 เมตร และงูในสายพันธุ์นี้มีลักษณะเด่นที่สำคัญคือ ดอกจัน ซึ่งอยู่ที่บริเวณด้านหลังของคอ สามารถมองเห็นได้ชัดเจนเมื่องูแผ่แม่เบี้ย โดยมากดอกจันของงูเห่าแถบเอเชียมีอยู่ 3 รูปแบบคือ Monocellate Binocellate และ Acellate (ภาพประกอบ 2 ก ข และ ค)



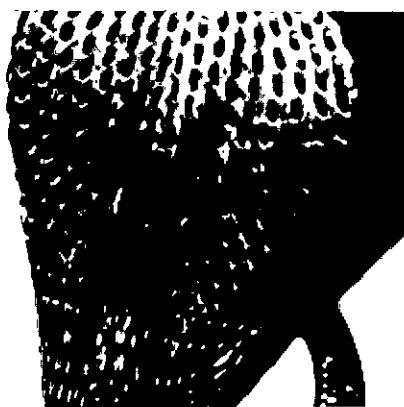
ภาพประกอบ 1 ภาพงูเห่าไทย



ก. ภาพดอกจันของงูเห่าแบบ Monocella



ข. ภาพดอกจันของงูเห่าแบบ Binocellate



ค. ภาพดอกจันของงูเห่าแบบ Acellate

ภาพประกอบ 2 ภาพดอกจันของงูเห่าแถบเอเชีย

ก. แบบ Monocellate

ข. แบบ Binocellate

ค. แบบ Acellate

ส่วนประกอบของพิษงู

พิษงูประกอบด้วยสารผสมเชิงซ้อน 80 % และน้ำ 20 % สารผสมเชิงซ้อนในพิษงู เป็นโปรตีน 90 % ที่เหลือ 10 % เป็นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน ส่วนที่เป็นโปรตีน แบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือโปรตีนที่เป็นพิษ (toxin) เช่น นิวโรทอกซิน (Neurotoxin) ที่พบในกลุ่มอิลลิปตี (Elapidae) (คณาจารย์ ภาควิชาเภสัชศาสตร์ 2529) และโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ พบแล้วประมาณ 26 ชนิด เอนไซม์ที่พบบ่อยในทุกชนิด มีประมาณ 12 ชนิด เอนไซม์บางชนิดจะพบเฉพาะในพิษงูบางชนิดเท่านั้น เช่น เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส เป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในกลุ่มอิลลิปตี สำหรับในพิษงูเห่าไทย โปรตีนส่วนที่เป็นพิษได้แก่ นิวโรทอกซิน และคาร์ดิโอทอกซิน (Cardiotoxin) (Tan 1983) ซึ่งมีประมาณ 28 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนในพิษงูเห่า และเป็นสารที่มีขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 7820 และ 6727 ดาลตันตามลำดับ (Karlsson and others, 1971)

นิวโรทอกซินออกฤทธิ์โดยหยุดการทำงานของกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของผู้ถูกงูเห่ากัด ในการทำงานตามปกติของระบบกล้ามเนื้อ เกิดจากอะซิติลโคลีน (acetylcholine) ที่ถูกสร้างจากอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (acetyl coenzyme A) และโคลีน (choline) ในไซโตพลาสซึมของบริเวณปลายประสาท โดยการเร่งของเอนไซม์โคลีนอะซิติลทรานส์เฟอเรส (choline acetyltransferase) อะซิติลโคลีนที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกเก็บที่ซินแนปติคเวสิเคิล (synaptic vesicles) เมื่อเกิดศักย์ไฟฟ้าที่ปลายประสาทแอกซอน (axon terminal) จะทำให้มีการไหลของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เข้าสู่เซลล์และเกิดการหลั่งของอะซิติลโคลีนออกมาจับกับนิโคติค อะซิติลโคลีน รีเซพเตอร์ (nicotinic acetylcholine receptor, Ach R) ในผนังปลายประสาทของกล้ามเนื้อลาย (postsynaptic membranes of skeleton muscles) (Burden and others, 1975) ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ จากนั้นอะซิติลโคลีน เอสเตอเรส (acetylcholine esterase) จะทำลายอะซิติลโคลีนให้หมดไป เป็นการหยุดการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อได้

กลไกการออกฤทธิ์ของนิวโรทอกซิน คือการไปขัดขวางการจับกันของอะซิติลโคลีน กับนิโคติคอะซิติลโคลีน รีเซพเตอร์ โดยนิวโรทอกซินจะเข้าไปจับกับรีเซพเตอร์ที่รอยต่อประสาทกล้ามเนื้อลาย (skeletal myoneural junction) อย่างจำเพาะ การจับนี้มีการย้อนกลับของปฏิกิริยาดำเนิน

(Lester. 1970) พบว่ามีค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constant, K_d) ประมาณ 10^{-10} - 10^{-11} โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (Weber and Chengeux. 1974 : Chicheportiche และคณะ 1975) การจับกันของนิวโรทอกซินกับรีเซพเตอร์ (receptor) นี้จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) และอิเล็กโตรสแตติก อินเทอร์แอคชัน (electrostatic interaction) ซึ่งการจับกันนี้จะทำให้กล้ามเนื้อหยุดการทำงาน ทำให้เกิดอัมพาตของกล้ามเนื้อ ทางเดินหายใจล้มเหลวและผู้ป่วยถึงแก่ชีวิต (Yang. 1972 , Cooper and Reich. 1972)

นิวโรทอกซิน แบ่งตามตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ต่อมอเตอร์เอนเพลท (motor end plate) ได้เป็น 2 ชนิด คือ โฟสซินแนพติกนิวโรทอกซิน กลไกการทำงานคือ การไปขัดขวางการจับกันของอะซิติลโคลีนกับนิโคตินิกอะซิติลโคลีน รีเซพเตอร์ โดยนิวโรทอกซินจะเข้าไปจับกับ รีเซพเตอร์ที่รอยต่อประสาทกล้ามเนื้อลายแทนอะซิติลโคลีน และพรีซินแนพติกนิวโรทอกซิน กลไกการทำงานคือ นิวโรทอกซินจะเข้าไปทำลายซินแนพติกเวสิเคิล ทำให้ไม่มีอะซิติลโคลีนไปจับกับนิโคตินิกอะซิติลโคลีน รีเซพเตอร์

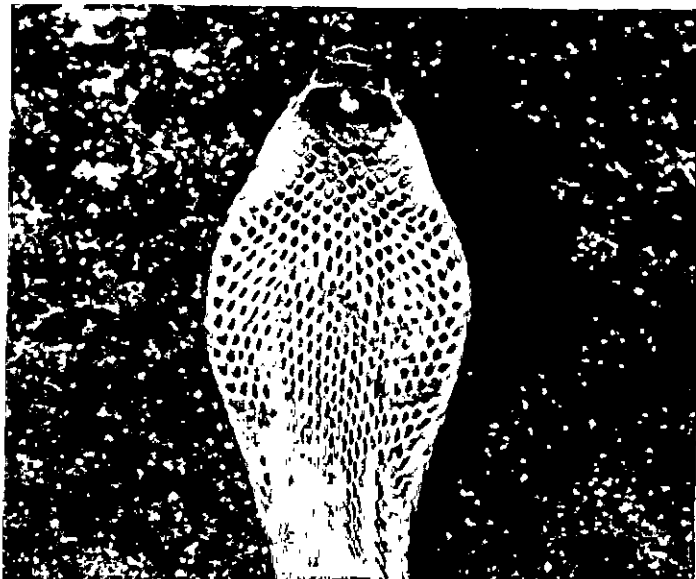
นิวโรทอกซินที่สำคัญในพิษงูเห่าไทยคือ ไสเมนซิสทอกซิน 3 (siamensis toxin 3) ซึ่งเป็นโพลีเพปไทด์ (polypeptide) ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัว ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 5 พันธะภายในสาย (Aharonov และคณะ. 1974) นิวโรทอกซินของพิษงูเห่าไทยจัดเป็นชนิดโฟสซินแนพติก นิวโรทอกซิน (post synaptic neurotoxin) มีสมบัติทนความร้อนได้ดี (Lee. 1972)

งานวิจัยและแนวคิดที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1987 คุณไพฑูรย์ จินตกุล ได้ศึกษาลักษณะของดอกจัน ของงูเห่าไทย ประมาณ 2,000 ตัว พบว่ามีดอกจันแตกต่างกันมากกว่า 10 ชนิด ซึ่งยังไม่มีการศึกษาว่างูเห่าที่มีความแตกต่างของดอกจัน จะมีองค์ประกอบของพิษงูแตกต่างกันหรือไม่ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงูที่ได้จากงูเห่าไทย ที่มีความแตกต่างของดอกจัน โดยจะศึกษาเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์และดอกจันไม่สมบูรณ์ (ภาพประกอบ 3 และ 4) เพราะทั้ง 2 กลุ่มนี้ สามารถเห็นความแตกต่างของดอกจันได้อย่างชัดเจน



ภาพประกอบ 3 ภาพดอกจันของงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์



ภาพประกอบ 4 ภาพดอกจันของงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์

การแยกองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยทำได้หลายวิธี เช่น ในปี 1966 คณะผู้วิจัยจากไต้หวันได้ทำการแยกพิษงูเห่าไต้หวัน (*Formosan cobra* , *Naja naja atra*) ด้วยคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 50 (CM - sephadex C - 50 column chromatography) โดยชะด้วยแอมโมเนียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบของพิษงูเห่าได้ 12 ส่วน (Lo , Chen and Lee. 1966) ต่อมาปี 1971 คณะผู้วิจัยซึ่งนำโดยคาร์ลสันได้แยกนิวโรทอกซิน (Neurotoxin) ของงูเห่า 2 ชนิด คือ *Naja naja naja* และ *Naja naja siamensis* โดยใช้ไอออน แอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี (Ion - exchange chromatography) ของไบโอเร็กซ์ 70 (Bio - rex 70) เป็นตัวกลาง และตามด้วย เจลฟิльтраชัน โครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ จี - 50 (Sephadex G - 50) พบว่านิวโรทอกซิน ของงูเห่าทั้ง 2 เป็นนิวโรทอกซินสายยาว (long chain neurotoxin) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัว มีพันธะไดซัลไฟด์ 5 พันธะ ส่วนที่แตกต่างกันคือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 28 และ 32 ของ *Naja naja naja* เป็น อาร์จินีน (arginine) ไกลซีน (glycine) และ เซรีน (serine) ส่วน *Naja naja siamensis* เป็น ไลซีน (Lysine) อะลานีน (alanine) และ ไอโซลิวซีน (isoleucine) (Karlsson , Arnberg and Eaker. 1971) และปี พ.ศ. 2534 วรณา ธรรมพาลเลิศ ได้แยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธี ไอออน แอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี โดยใช้ ไบโอ - เร็กซ์ 70 ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาด 2.6 X 25 เซนติเมตร แยกได้ 13 ส่วน คือ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ตามลำดับ นำพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้มาศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ ฟอสโฟไลเปส เอช และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ ฟอสโฟไลเปส เอช มีมากในพิษงูส่วนที่ II, III, IV และ V ส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส มีมากในพิษงูส่วนที่ II, III, IV, V, VI, VII, X, XI และ XII เมื่อ วิเคราะห์พิษงูส่วนที่ I และ XIII ด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่า พิษงูส่วนที่ I มีแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ พิษงูส่วนที่ XIII มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ส่วนการ วิเคราะห์พิษงู 2 ส่วนนี้ด้วยวิธีเอสดีเอส โพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิสพบว่าพิษงู ส่วนที่ I มีโปรตีนขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 10,300 - 67,000 ดาลตัน และ พิษงูส่วนที่ XIII มีโปรตีนขนาด 14,500 - 32,000 ดาลตัน ตามลำดับ

นอกจากนี้ มีผู้สนใจนำเทคนิค ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High - Performance Liquid Chromatography ,HPLC) มาใช้ในการแยกองค์ประกอบของพิษงูเห่า อย่างเช่น

ในปี 1986 Bougis , Marchot and Rochat ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเลือกใช้สภาวะ ตัวทำละลาย และส่วนของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ให้เหมาะสม เพื่อนำมาแยกองค์ประกอบของพิษงู โดยวิธี รีเวอร์ส - เฟส ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (Reverse - Phase High - Performance Liquid Chromatography , RP - HPLC) ซึ่งจะศึกษาส่วนประกอบของพิษงูกลุ่ม Elapidae คือ *Naja mossambica mossambica* และนำส่วนที่แยกได้มาทดสอบ แอคติวิตีของ แอลฟาไนโรทอกซิน และ ฟอสโฟไลเปส เอช และในปีเดียวกันนี้เอง คณะผู้วิจัยซึ่งประกอบด้วย Hoges , Agbaji , Larvery และ Hider ได้แยก คาร์ดิโอทอกซิน จากพิษงูที่แตกต่างกัน 4 ชนิด *Naja naja siamensis* , *Naja haje annulifera* , *Naja melanoleuca* และ *Hemachatus haemachatus* โดยผ่าน Gel permeation และ Ion - exchange ก่อน แล้วจึงนำส่วนของพิษงูที่มี Cardiotoxic activity ไปแยกต่อไปด้วย RP-HPLC พบว่าสามารถแยก Cardiotoxins ได้ 8 ชนิด

ต่อมาปี 1988 Osthoff , Louw and Releencke ได้ศึกษาองค์ประกอบของพิษงูในกลุ่ม Elapid ซึ่งอาศัยคุณสมบัติการชอบน้ำ (Hydrophilic) หรือไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ของโปรตีนในพิษงู สามารถแยก นิโรทอกซิน และคาร์ดิโอทอกซิน เป็นพวกที่ไม่ชอบน้ำ .จะไม่มีประจุหรือไม่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ จึงถูกชะออกมาในเวลาต่างๆ กัน (Retention time) และยังพบว่า นิโรทอกซิน และคาร์ดิโอทอกซิน เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กคือ มีขนาด 7,820 และ 6,727 ดาลตัน ตามลำดับ (Osthoff , Louw and Releencke. 1988) และในปี 1992 Namiranian and Hider ได้ศึกษาเปรียบเทียบส่วนประกอบที่เป็นพิษในพิษงูเห่าไทย 2 ชนิดคือ *Naja naja kaouthia* และ *Naja naja siamensis* โดยใช้ ไอออนเอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี (Ion - exchange chromatography) ด้วย Sp - Sephadex C - 25 พบว่า องค์ประกอบที่เป็นพิษในพิษงูเห่าทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน และนำองค์ประกอบที่เป็นพิษของพิษงูเห่าทั้ง 2 ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ RP - C₁₈ พบว่าองค์ประกอบที่เป็นพิษในพิษงูเห่าทั้ง 2 ชนิด คล้ายคลึงกัน แต่ความเข้มข้นขององค์ประกอบของพิษงูของทั้ง 2 ชนิด แตกต่างกัน

จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยมีแนวความคิดพอสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. แยกองค์ประกอบของพืชที่ได้จากงูเห่าที่มีดอกจันสมบูรณ์และดอกจันไม่สมบูรณ์ ด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี
2. ศึกษาสมบัติบางประการของพืชที่แยกได้แต่ละส่วน ของงูเห่าทั้ง 2 กลุ่ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของพืชงูเห่า ที่ได้จากงูเห่าที่มีดอกจันสมบูรณ์ และดอกจันไม่สมบูรณ์
- 2 แยกส่วนประกอบของพืช เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสมบัติบางประการของพืชที่ได้จากงูเห่าที่มีดอกจันสมบูรณ์ และดอกจันไม่สมบูรณ์

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ใช้พืชที่รื้อจากงูเห่าไทยที่สถานเสาวภารับซื้อมาเลี้ยงไว้ในสวนกุหลาบสถานเสาวภา เป็นพืชที่รื้อจากงูเห่าไทย ในกลุ่มที่มีลักษณะดอกจันแบบวงแหวนสมบูรณ์ และกลุ่มที่มีลักษณะดอกจันไม่สมบูรณ์

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

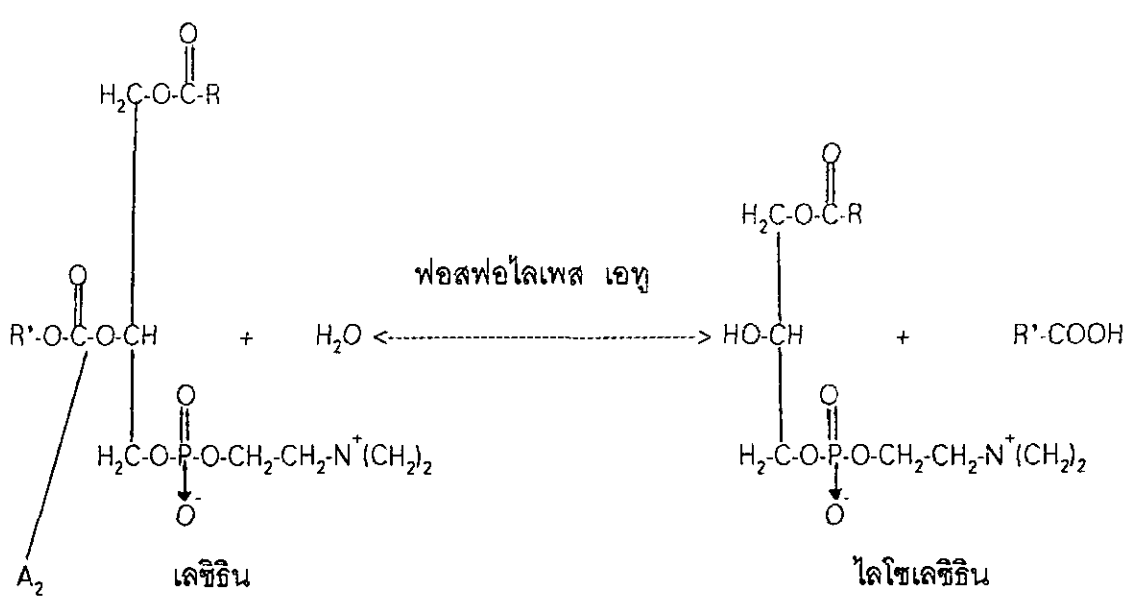
1. ทราบถึงสมบัติบางประการของพืชงูเห่าไทย เช่น เอนไซม์ (enzyme) ฟอสโฟไลเฟส เอทู อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส และผลของพืชต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในพืชงูเห่าไทย
2. เป็นแนวทางในการจัดจำแนก subspecies ของงูโดยใช้รูปแบบที่แตกต่างกันของโปรตีน
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูเห่าให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

เอนไซม์ที่ศึกษาในพิษงูเห่าไทย

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ₂ (phospholipase A₂, Ph A₂)

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ₂ พบได้ทั่วไปในพิษงู นึ่งและแมงมุม รวมทั้งเนื้อเยื่อของสัตว์ทั่วไป แต่พบมากที่สุดชนิดในพิษงูวงศ์ Viperidae , Crotalidae , Elapidae และ Hydrophidae ฟอสโฟไลเปส เอ₂ มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 7.5 - 8.5 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11,000 - 31,000 ดาลตัน สับสเตรท (substrate) ที่มีความจำเพาะและนิยมใช้ของฟอสโฟไลเปส เอ₂ คือ ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) หรือแอลฟาเลซิธิน (α - lecithin) เลซิธินจะมีอยู่ในเม็ดเลือดแดง หรือในพลาสมาของคนปกติ หรือมีในไข่แดงของสัตว์ ซึ่งเมื่อได้รับฟอสโฟไลเปส เอ₂ เลซิธินจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไลโซเลซิธิน (Lysolecithin) โดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่ตำแหน่งเบตาคาร์บอน หรือคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของฟอสโฟไลปิด ซึ่งสารไลโซเลซิธินที่เกิดขึ้นจะทำให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก หรือผนังเซลล์ของเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกายถูกทำลาย

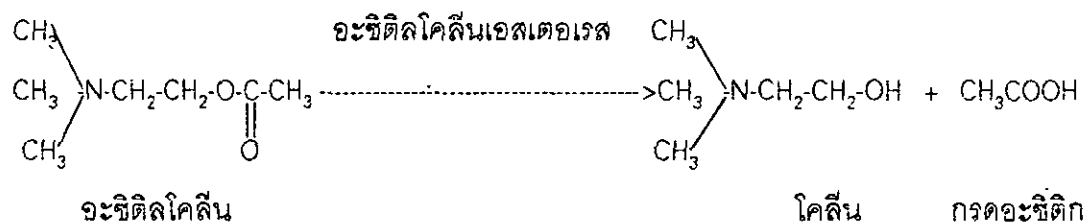
(Lee 1979 , Tan and Tan 1987 Tan and Arunmozhiaras 1989)



ภาพประกอบ 5 แสดงการย่อยสลายฟอสโฟไลปิดด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ₂

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase)

มีในพิษงูวงศ์ Elapidae และ Hydrophidae เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์อะซิติลโคลีน (acetylcholine) เป็นโคลีน (choline) และกรดอะซิติก (acetic acid) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 126,000 ดาลตัน การย่อยสลายอะซิติลโคลีนจะเกิดได้ดีที่สุดในช่วง พีเอช 8 - 8.5 ที่อุณหภูมิ 37 - 38 องศาเซลเซียส มีอะซิติลโคลีนเป็นซับสเตรท เมื่อถูกพิษงูเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส จะทำลายอะซิติลโคลีนที่หลังจากปลายประสาทให้เป็นโคลีน และกรดอะซิติก ทำให้สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนถูกทำลาย การส่งกระแสประสาทจากพรีแกงกลีโอนิคไฟเบอร์ (preganglionic fiber) ไปยังโพสต์ซินแนปติกเมมเบรน (postsynaptic membrane) ไม่เกิดขึ้นทำให้การส่งงานทางระบบประสาทหยุดชะงักไม่สามารถส่งงานไปยังอวัยวะต่างๆ ได้ (Chang and Lee, 1965 ; Lee 1979)



ภาพประกอบ 6 แสดงปฏิกิริยาเอสเทอร์ไฮโดรไลซิส (ester hydrolysis) ของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

ไดเรคท์ ไลติก แฟคเตอร์ (Direct Lytic Factor, DLF)

ไดเรคท์ ไลติก แฟคเตอร์ หรือ ไดเรคท์ ฮีโมไลซิน (Direct hemolysin) จากการศึกษาดิเรคท์ ไลติก แฟคเตอร์ ในพิษงูเห่า พบว่าเป็นโปรตีนสายเดี่ยว (Single chain) สมบัติเป็นเบสอย่างแรง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,000 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 ตัวเรียงกัน มีพันธะไดซัลไฟด์ 4 พันธะ ความเป็นเบสของสารนี้เกิดจากโครงสร้างประกอบด้วย กรดอะมิโนซึ่งส่วนมากแสดงสมบัติเป็นเบส แม้แต่กรดอะมิโนบางตัวที่แสดงสมบัติเป็นกรดก็อยู่ในรูปของ เอไมด์

ทั้งไดเรคท์ โลดิง แพลคเตอร์ และฟอสโฟไลเฟส เอ ต่างก็แสดงคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แต่เมื่อสารทั้งสองทำงานร่วมกัน จะแสดงสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสูง ซึ่งเป็นการแสดง Synergistic action มีรายงานว่าสารทั้งสองมี synergistic action ในการทำให้เฟลตเลต และไมโตคอนเดรียแตกเช่นกัน (ชัยฤทธิ์ โพธิสุข. 2515 ; Aloof and other. 1968 ; Kirschmann 1964 ; Condrea and Mager. 1965)

วิธีการที่แยกและวิเคราะห์พิษงูเห่า

ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี

พิษงูประกอบด้วยสารชีวโมเลกุล ดังนั้นการแยกพิษงูจึงแยกโดยใช้เทคนิค การแยกสารทางชีวเคมี ซึ่งมีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คือ ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (มนตรี จุฬาวฒนทล. 2530) ซึ่งมีหลักการเหมือนลิกวิดโครมาโตกราฟีแบบธรรมดา แต่ได้รับการพัฒนาให้ใช้ขนาดเฟลที่อยู่กับที่ ให้มีขนาดเล็กลงสำหรับบรรจุลงในคอลัมน์ เพื่อให้พื้นที่ผิวสัมผัสของเฟลที่อยู่กับที่ที่เกิดแรงกระทำต่อสารผสมที่ต้องการแยกให้มากขึ้น และมีการใช้มีคุณภาพสูงอัดเฟลที่เคลื่อนที่ (ซึ่งเป็นของเหลวด้วยความดันสูง เพื่อให้ของเหลวไหลเร็ว เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารผสมออกจากกันให้เร็วขึ้น) ถ้าองค์ประกอบของเฟลที่เคลื่อนที่มีเพียงองค์ประกอบเดียวและคงที่ จะเรียกการชะแบบนี้ว่า การชะ แบบไอโซคราติก (isocratic elution) ถ้าองค์ประกอบของเฟลเคลื่อนที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบขณะที่แยกสาร จะเรียกการชะแบบนี้ว่า การชะแบบเกรเดียนท์ อีลูชัน (gradient elution)

ประเภท HPLC นั้นประยุกต์มาจากโครมาโตกราฟีแบบใช้ของเหลวแบบใช้คอลัมน์ ดังนั้นองค์ประกอบของ HPLC จึงคล้ายกับโครมาโตกราฟีแบบใช้ของเหลวดังนี้

1. HPLC ประเภทการดูดซับ (Adsorption Chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ ซิลิกาเจลที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำบอนด์เฟส (unmodified silicas)

เป็นเฟสที่อยู่กับที่ และใช้ส่วนของหมู่ silanol (Si-OH) บนผิวของซิลิกาเป็นตัวดูดซับ (แรงที่เกิดขึ้นในระหว่างการดูดซับอาจเป็นแรงไดโพล - ไดโพล แรงเหนี่ยวนำไดโพลหรือพันธะไฮโดรเจนอย่างใดอย่างหนึ่ง) เทคนิคนี้สามารถใช้ได้โดยอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการดูดซับของสารบนผิวของซิลิกา

2. HPLC ประเภทพาร์ติชัน (Partition Chromatography)

เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างสองวัฏภาค โดยวัฏภาคหนึ่งอยู่กับที่ (stationary phase) ส่วนอีกวัฏภาคหนึ่งเคลื่อนที่ได้ (mobile phase) สารที่แยกด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับสารเหล่านี้จะละลายในตัวทำละลายสองชนิด (ซึ่งไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน) ด้วยอัตราส่วนไม่เท่ากัน อาจกล่าวได้ว่าสารเหล่านั้นมีค่า partition หรือ distribution coefficient ต่างกัน

3. HPLC ประเภทการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange Chromatography)

HPLC ประเภทนี้อาศัยความแตกต่างของประจุของสารที่ต้องการแยก และใช้หลักการดูดซับ และการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน สารที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนส่วนมากเป็นสารอินทรีย์พวกเรซิน (resin) เช่น โพลีสไตรีน (polystyrene) และอนุพันธ์ของโพลีสไตรีน หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose) โดยที่เรซินเป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนกับสารอื่นจะต้องมีสมบัติทั้งสามารถดูดซับ และมีไอออนพร้อมที่จะให้ไอออนอื่นมาแทนที่ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารละลายที่เป็นตัวชะอย่างเหมาะสม

4 HPLC ประเภทการเกิดไอออนคู่ (Ion-pair Chromatography)

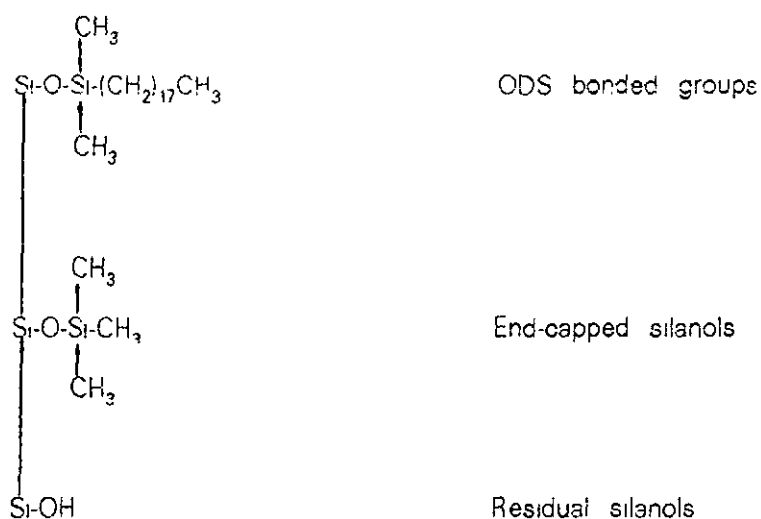
อาศัยหลักการคือ หาไอออนที่เหมาะสมมาจับเป็นไอออนคู่กับไอออนที่เราจะแยก ไอออนที่เหมาะสม จะเรียกว่า pairing agent จากนั้นก็ผ่านลงใน reverse phase ของ C - 18 โดยมีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสที่เคลื่อนที่

5. HPLC ประเภทแยกขนาดจำเพาะ (Size Exclusion Chromatography)

HPLC ประเภทนี้จะแยกสารโดยอาศัยขนาดจำเพาะ (ขนาดโมเลกุล และรูปร่างโมเลกุลของสาร) หลักการแยกโดยเทคนิคนี้ อาศัยหลักการที่ว่าองค์ประกอบต่าง ๆ จะซึมผ่านรูพรุนของวัสดุที่ใช้บรรจุคอลัมน์ได้มากน้อยต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลชนิดนั้นในสารละลายทำให้การถูกชะออกมาในเวลาต่างกัน และเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลขนาดเล็กออกจากโมเลกุลขนาดใหญ่

6 HPLC ประเภทบอนด์เฟส (Bonded Phase Chromatography)

ในงานวิจัยนี้ใช้ HPLC ประเภทบอนด์เฟส โดยชนิดของบอนด์เฟสคือ C-18 ซึ่งอาศัยหลักการแยกสารด้วย reverse phase สารจะถูกชะออกมาตามลำดับของสภาพขั้ว (in order of polarity) ยิ่งมีสภาพขั้วมากจะถูกชะออกมาก่อน ซึ่งการแยกสารด้วย reverse phase เป็นการเกิดเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่กระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ชนิดไม่มีขั้ว (non - polar stationary phase) กับเฟสที่เคลื่อนที่มีขั้ว (polar mobile phase) ทำให้สารที่ไม่มีขั้วจะละลาย (หรือถูกยึด) กับเฟสที่อยู่กับที่แล้วค่อยๆ ถูกชะออกมาที่หลังสารที่มีขั้ว เราอาจจะเปลี่ยนความสามารถในการกระจายของสารในสองเฟสได้โดยเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสที่เคลื่อนที่ทำให้เฟสที่เคลื่อนที่มีสภาพขั้วลดลง (เพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ) ทำให้ค่าการคงไว้ของสารที่ไม่มีขั้วลดลง แต่เราอาจจะเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสที่อยู่กับที่ก็ได้ เช่น ทำบอนด์ที่มี nonpolar groups ที่ต่างกัน (นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์ และคนอื่นๆ 2536 ; Brown and Hartwick. 1989 ; Rossomando. 1987 ; Scott. 1992 ; Synder and Kirkland. 1988 ; Willard and Dean. 1965)



ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างของ Octadecyl silanols (ODS , C-18)

(Lindsay Sandy. 1991)

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

แอลดี₅₀ (LD₅₀) หมายถึง ปริมาณพิษที่สามารถทำให้หนูขาวหนัก 18 กรัม ตาย 50 % ของจำนวนหนูขาวทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัย

บทที่ 2

วิธีวิจัย

1. การรวบรวมงูเห่าไทย ที่มีดอกจันสมบูรณ์ และดอกจันไม่สมบูรณ์

1.1 รวบรวมงูเห่าไทยที่มีผู้นำมาขายให้แก่สวนงู สถานเสาวภา

1.2 แยกงูเห่าไทยออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว

กลุ่มที่ 1 งูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์

กลุ่มที่ 2 งูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์

1.3 บันทึกน้ำหนัก ความยาวทั้งตัว ความยาวเฉพาะสวนหางงู เพศของงูแต่ละตัว

2. การรีดและเก็บพิษงู

2.1 นำงูเห่าแต่ละตัว ในแต่ละกลุ่ม มารีดพิษ บันทึกน้ำหนักของพิษงูสดที่รีดได้ทั้งหมด

2.2 เก็บพิษงูเห่าที่รีดได้โดยการนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

3 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงูจาก งูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์

3.1 การแยกพิษงูเห่าโดยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ประเภท Bonded Phase Chromatography (Namiranian and Hider 1992)

สารเคมี

1 พิษงูเห่าสดของงูเห่าไทยแต่ละตัว ที่เก็บไว้ตามข้อ 2

2. สารละลายแอมโมเนียม ฟอर्मेट (Ammonium formate) เข้มข้น 0.15 โมลต่ออวก-
บาทส์เดซิเมตร พีเอช 2.7

3. อะซิโตไนล์ (Acetonitrile) เกรดที่ใช้สำหรับ HPLC

อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ของเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Spectra Physic ซึ่งประกอบด้วย
 - P4000 (ชุดปั๊ม)
 - UV1000 (detector)
 - PC1000 เป็น computer
 - SN4000 (controll ตัวควบคุม)
2. คอลัมน์ ใช้คอลัมน์ชนิด ODS หรือ RP- C_{18} ที่มีขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Spectra Physic ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องปั๊มสูญญากาศ ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Rathur H. Thomas ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ก๊าซฮีเลียม ขนาด 6 ลูกบาศก์เมตร
6. Microsyringe ขนาด 25 ไมโครลิตร

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายพิษของแต่ละตัวของทั้ง 2 กลุ่ม โดยนำสารละลายพิษมาเจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต เข้มข้น 0.15 มิลลิต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 2.7 โดยเจือจาง 10 เท่า
2. กรองสารละลายพิษด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร
3. ใส่ฟองอากาศที่ปะปนอยู่ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต และสารละลายอะซิโตนไธล์ โดยการผ่านก๊าซฮีเลียม
4. เตรียมเครื่อง HPLC ให้พร้อม โดยตั้งโปรแกรมสำหรับแยกพิษ คือ เมื่อฉีดพิษเข้าไปในคอลัมน์แล้ว เวลา 0 - 10 นาที เริ่มชะด้วยสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ความเข้มข้น

0.15 มิลลิต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 2.7 และเวลา 10 - 100 นาที ตามด้วยการชะแบบลิเนียร์เกรเดียนท์ (Linear gradient) ของอะซิโตนไไตรล์ ตั้งแต่ความเข้มข้น 0 % ถึง 45 % ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟตโดยให้อัตราเร็วของการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที โปรแกรมข้างต้นจะถูกเก็บไว้ในหน่วยความจำของคอมพิวเตอร์ PC1000

5. ฉีดสารละลายพิษจำนวน 20 ไมโครลิตรเข้าในคอลัมน์โดยผ่านลูบ สำหรับฉีดสารละลายตัวอย่าง เปิดโปรแกรม ข้อ 4

6. สารละลายที่ออกจากคอลัมน์จะผ่านเข้าส่วน UV detector วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และบันทึกเป็นโครมาโตแกรม

7. เก็บแยกส่วนของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ซึ่งอยู่ภายใต้พีคเดียวกันไว้เป็นส่วน ๆ

8. นำสารละลายพิษที่แยกได้แต่ละส่วน ไปหา ปริมาณโปรตีน ค่าความเป็นพิษ สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอทู สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส และแอคติวิตีของพิษในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

3.2 การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของลาวรี่ (Lowry, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A สารละลายไซเตียมคาร์โบเนต เข้มข้น 2 % ในสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 มิลลิต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

2. สารละลาย B สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 0.5 % ในสารละลายไซเตียมโปแตสเซียมตาร์เตรต เข้มข้น 1 %

3. สารละลาย C : สารละลายผสมของสารละลาย A 50 ลูกบาศก์เซนติเมตรและสารละลาย B 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. สารละลาย D สารละลายผสมของฟีนอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน กับน้ำกลั่น 1 ส่วน

5. สารละลายพิษที่ยังไม่ได้แยก และสารละลายพิษที่แยกได้แต่ละพีค

6. อัลบูมินจากเซรัมวัว (Bovine Serum Albumin) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

7 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

อุปกรณ์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น DU 6 ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำสารละลายพิษที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที
2. เติมน้ำสารละลาย D ปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
4. อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (อัลบูมินจากเซรัมวัว)

3.3 การวัดค่าแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช ตามวิธีของเมบส์และซามะจิม่า (Mebis and Samejima, 1986)

สารเคมี

1. พิษที่ยังไม่ได้แยกและพิษแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายไข่แดง
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
4. สารละลายโซเดียมบาร์บิตอล (โซเดียมบาร์บิตอล 4.124 กรัม ในสารละลาย

โซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร

อุปกรณ์

1. เครื่องย่นสาร รุ่น SW 1 - V ผลิตภัณท์ของบริษัท Julabo Labortechnik GmbH ประเทศเยอรมัน
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายโซเดียมโดยใช้โซเดียมจากโซ่ไกวปริมาณ 0.5 - 0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. ปรับ พีเอช ของสารละลายโซเดียมในข้อ 1 ให้มี พีเอช 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมบาร์บิตอล
3. เจือจางสารละลายโซเดียมในข้อ 2 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ของสารละลายโซเดียม เป็น 0.600
4. ผสมสารละลายโซเดียมในข้อ 3 ปริมาตร 2.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับพิฆูปริมาณ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปย่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ของสารละลายในข้อ 4 นำผลที่ได้คำนวณหาค่าสเปซิฟิคแอคทิวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดย 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตร ลดลง 1.0 มิลลิเดลต้า ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตรในเวลา 10 นาที)

3.4 การวัดค่าแควตตีวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสตามวิธีของลี (Lee, 1979)

สารเคมี

1. พืชที่ยังไม่ได้แยกและพืชแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.04 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
4. สารละลายอะซิติลโคลีนคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
5. สารละลายอัลคาไลน์ ไฮดรอกซิลามีน ซึ่งเป็นสารละลายผสมระหว่างสารละลายไฮดรอกซิลามีน เข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.75 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ในอัตราส่วน 1 : 1
6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 3.0 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
7. สารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ เข้มข้น 1.85 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายพืช ที่ต้องการวัดแควตตีวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ และ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ อย่างละ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. นำส่วนผสมในข้อ 1 ไปอุ่นในเครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
3. เติมสารละลายอะซิติลโคลีนคลอไรด์ หลอดละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำไปอุ่นในเครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลายอัลคาไลน์ไฮดรอกซิลามีน 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายไฮโดรคลอริก 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

6. ทำกราฟมาตรฐานของอะซิติลโคลิน โดยใช้สารละลายมาตรฐานอะซิติลโคลินที่มี ปริมาณอะซิติลโคลินเป็น 1,000 3,000 5,000 7,000 และ 9,000 ไมโครโมล ตามลำดับ และทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 1 - 5 เพียงแต่ไม่เติมสารละลายพิษงู และสารละลายอะซิติลโคลินคลอไรด์

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากข้อ 5 เทียบค่าจากกราฟมาตรฐานจากข้อ 6 จะได้จำนวนไมโครโมลอะซิติลโคลินที่เหลืออยู่

8. คำนวณหาจำนวนอะซิติลโคลินที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยเอาจำนวนอะซิติลโคลินเริ่มต้นคือ 10,000 ไมโครโมล หักออกด้วย จำนวนอะซิติลโคลินที่เหลืออยู่ เมื่อหารจำนวนอะซิติลโคลินที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วย 10 นาที จะได้ค่าแอกติวิตีของอะซิติลโคลินเอสเตอเรส เป็นยูนิต

9. คำนวณหาค่าสเปซิฟิคแอกติวิตีของอะซิติลโคลินเอสเตอเรส เป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.5 การวัดค่าแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ตามวิธีของคาร์ลสัน อาร์นเบิร์ก และเอเคอร์ (Karlsson , Arnberg and Eaker 1971)

สารเคมี

1. พิษงูที่ยังไม่ได้แยกและพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.9 %
3. เลือดคนที่มีสารกันแข็งตัว

อุปกรณ์

1. บันเลือดคน ที่ความเร็ว 350 x g เป็นเวลา 10 นาที เก็บเม็ดเลือดแดงไว้ ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % 5 ครั้ง
2. นำเม็ดเลือดแดงจากข้อ 1 มาเตรียมสารละลายแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงโดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเม็ดเลือดแดง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เป็น

0.8 ในสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.9 %

3. เตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดงที่กำหนดให้แตกตัว 100 % โดยนำเม็ดเลือดแดงในข้อ 2 มา 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่น 0.25 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำมาเขย่าเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่น 3.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร บั่นที่ความเร็ว 350 x g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนโสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. เตรียมสารละลายพิษูที่ต้องการวัดแอกติวิตีของพิษูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยนำเม็ดเลือดแดงในข้อ 2 มา 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายพิษู 0.25 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำมาเขย่าเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่น 3.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร บั่นที่ความเร็ว 350 X g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนโสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำไปคำนวณแอกติวิตีของพิษูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของการแตกตัว 100 เปอร์เซ็นต์ ของเม็ดเลือดจากข้อ 3

3.6 การหาค่าความเป็นพิษู แอลดี₅₀ ตามวิธีของคาร์เบอร์ เมเยอร์ และแมนเฟรด

(Karber , Mayer and Manfred. 1963)

สารเคมี

1. พิษูที่ยังไม่ได้แยกและพิษูแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายไฮเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.9 %

อุปกรณ์และวัสดุทดลอง

1. หลอดจีดยาพร้อมเข็มจีดยา ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายพิษที่ยังไม่ได้แยก และพิษแต่ละส่วนที่แยกได้ให้มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน (ตามตาราง 1 และ 2) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %
2. จัดสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าทางเส้นเลือดดำที่หางหนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม โดยใช้หนู 5 ตัวต่อสารละลายแต่ละความเข้มข้น
- 3 บันทึกจำนวนหนูตายของแต่ละความเข้มข้นของสารละลาย เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง
- 4 นำผลการทดลองที่ได้ ในข้อ 3 คำนวณหาค่า แอลดี₅₀ ตามวิธีของคาร์เบอร์ เมเยอร์ และแมนเฟรด (Karber , Mayer and Manfred. 1961)

สูตรการคำนวณหาค่า แอลดี₅₀ ตามวิธีของ คาร์เบอร์ เมเยอร์ และแมนเฟรด
(Karber , Meryer and Manfred 1961)

$$m = X_s - d (S_i - 1/2)$$

m คือ log แอลดี₅₀

X_s คือ log ของขนาดพิษที่เริ่มทำให้หนูขาวตาย 100 %

d คือ log ของค่าคงที่ของการหารระหว่างขนาดของพิษ

S_i คือ ผลรวมของ response ratio

response ratio คือ อัตราส่วนระหว่างจำนวนหนูที่ตายกับจำนวนหนูทั้งหมด

ตาราง 6 แสดงความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ทั้งที่ยังไม่ได้แยก และแต่ละส่วนที่แยกได้ในการหาค่าความเป็นพิษ

ส่วนของพิษงู	ความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่ใช้ฉีดหนู mice หนักตัวละ 18 กรัม			
	ในการหาค่าความเป็นพิษ (มิลลิกรัมต่อ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร)			
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	0.003	0.006	0.012	-
I	0.025	0.075	0.225	-
II	0.040	0.120	0.360	-
III	0.005	0.007	0.010	0.015
IV	0.002	0.004	0.006	0.008
V	0.026	0.052	0.104	-
VI	0.005	0.015	0.047	-
VII	0.017	0.066	0.266	-
VIII	0.034	0.067	0.134	0.286
IX	0.050	0.060	0.072	-
X	0.047	0.095	0.189	0.378
XI	0.014	0.028	0.057	0.114
XII	0.023	0.047	0.094	0.187
XIII	0.040	0.162	0.645	-

ตาราง 2 แสดงความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ทั้งที่ยังไม่ได้แยก และแต่ละส่วนที่แยกได้ในการหาค่าความเป็นพิษ

ความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่ใช้ฉีดหนู mice หนักตัวละ 18 กรัม				
ส่วนของพิษงู	ในการหาค่าความเป็นพิษ (มีผลลิกรัมต่อ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร)			
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	0.002	0.003	0.006	0.012
I	0.042	0.168	0.672	-
II	0.098	0.294	0.882	-
III	0.004	0.009	0.017	-
IV	0.001	0.002	0.004	-
V	0.011	0.022	0.043	0.086
VI	0.005	0.014	0.043	0.130
VII	0.029	0.087	0.262	-
VIII	0.030	0.060	0.120	0.24
IX	0.012	0.024	0.048	0.096
X	0.093	0.186	0.371	0.742
XI	0.020	0.060	0.180	-
XII	0.040	0.080	0.16	0.32
XIII	0.050	0.200	0.79	-

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการศึกษางูเห่าไทยและองค์ประกอบของพิษงูที่ได้จากงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์และกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์

3.1 ผลการวิจัยของงูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์

3.1.1 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก

ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของงูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ 7 ตัว พบว่า ความยาวตลอดตัวของลำตัวงูเห่าไทยมีความยาวตั้งแต่ 135 - 160 เซนติเมตร ความยาวเฉพาะส่วนหางมีความยาวตั้งแต่ 18 - 25 เซนติเมตร มีน้ำหนักตั้งแต่ 500 - 1,200 กรัม และประกอบด้วยเพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 5 ตัว (ตาราง 3)

ตาราง 3 แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกและปริมาณพิษงูสดของงูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์

ตัวที่	ความยาวตลอดตัว (เซนติเมตร)	ความยาวเฉพาะส่วนหาง (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กรัม)	เพศ	ปริมาณพิษงูสด (มิลลิกรัม)
1	155	23	1,200	เมีย	750
2	138	21	900	เมีย	500
3	160	24	1,100	ผู้	720
4	140	18	500	เมีย	610
5	135	18	700	เมีย	600
6	146	25	900	ผู้	610
7	145	25	500	เมีย	500

3.1.2 ผลการแยกพิษงูเห่าไทยแต่ละตัวด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนท์ ลิควิด โครมาโตกราฟี ในกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์

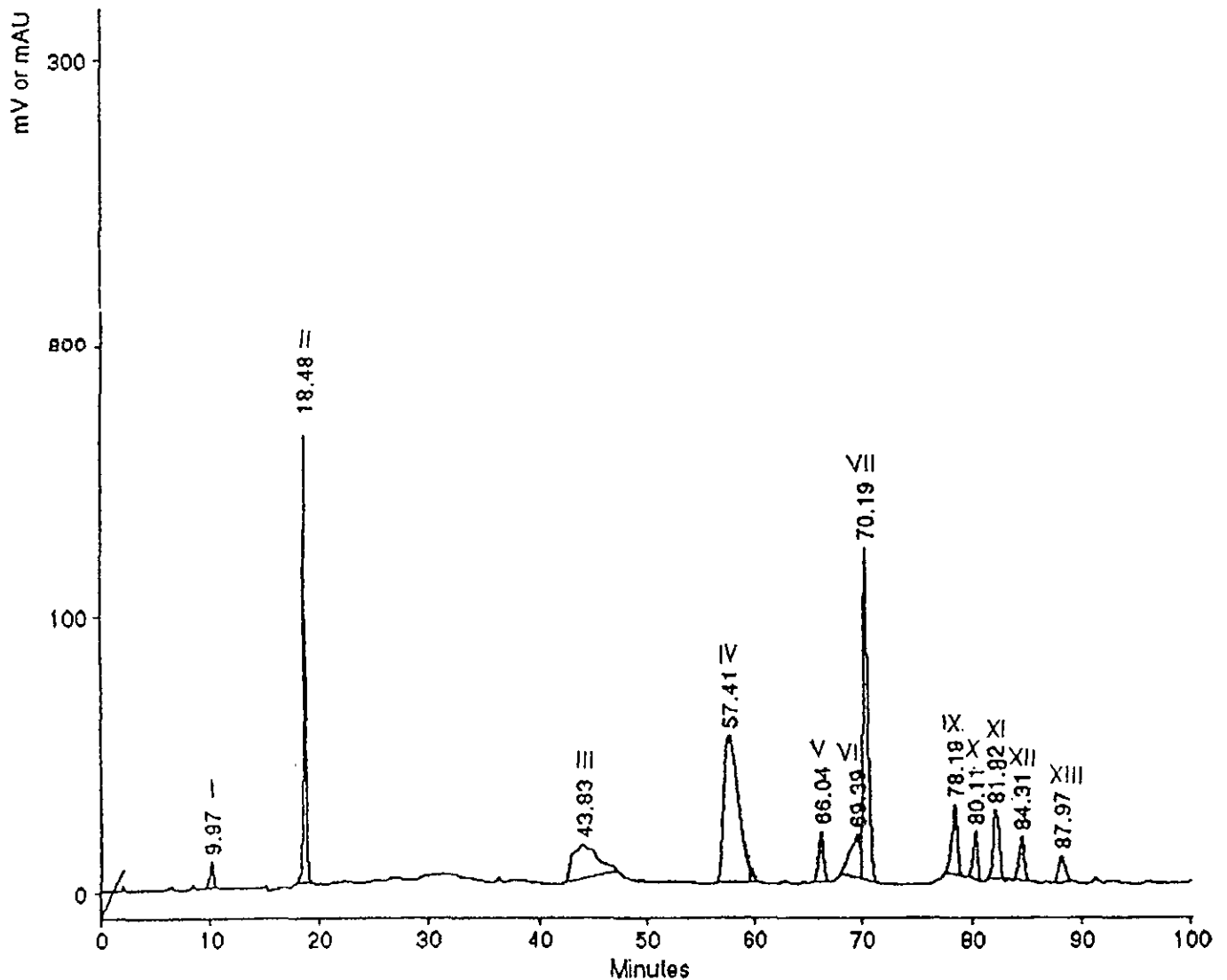
เมื่อผ่านพิษงูเห่าไทยซึ่งเจือจาง (crude venom) 10 เท่า ด้วยสารละลาย 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอร์เมต พีเอช 2.7 ปริมาตร 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ขนาด 250 X 4.6 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร แล้วชะด้วยสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 2.7 ในช่วงเวลา 0 - 10 นาที และตามด้วย ลิเนีย เกรเดียนท์ ของ 0 - 45 % อะซิโตนไตรล์ ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 2.7 เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพิษงูที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์ ในช่วงเวลา 10 - 100 นาที พบว่าพิษงูที่ได้จากงูเห่าไทยในกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์แต่ละตัวแยกได้ 12 ส่วน คือ ส่วนที่ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ตามลำดับ

พิษงูเห่าไทย ตัวที่ 1 แยกได้เป็นส่วนที่ I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XII และ XIII โดยไม่พบองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ VIII (ภาพประกอบ 8)

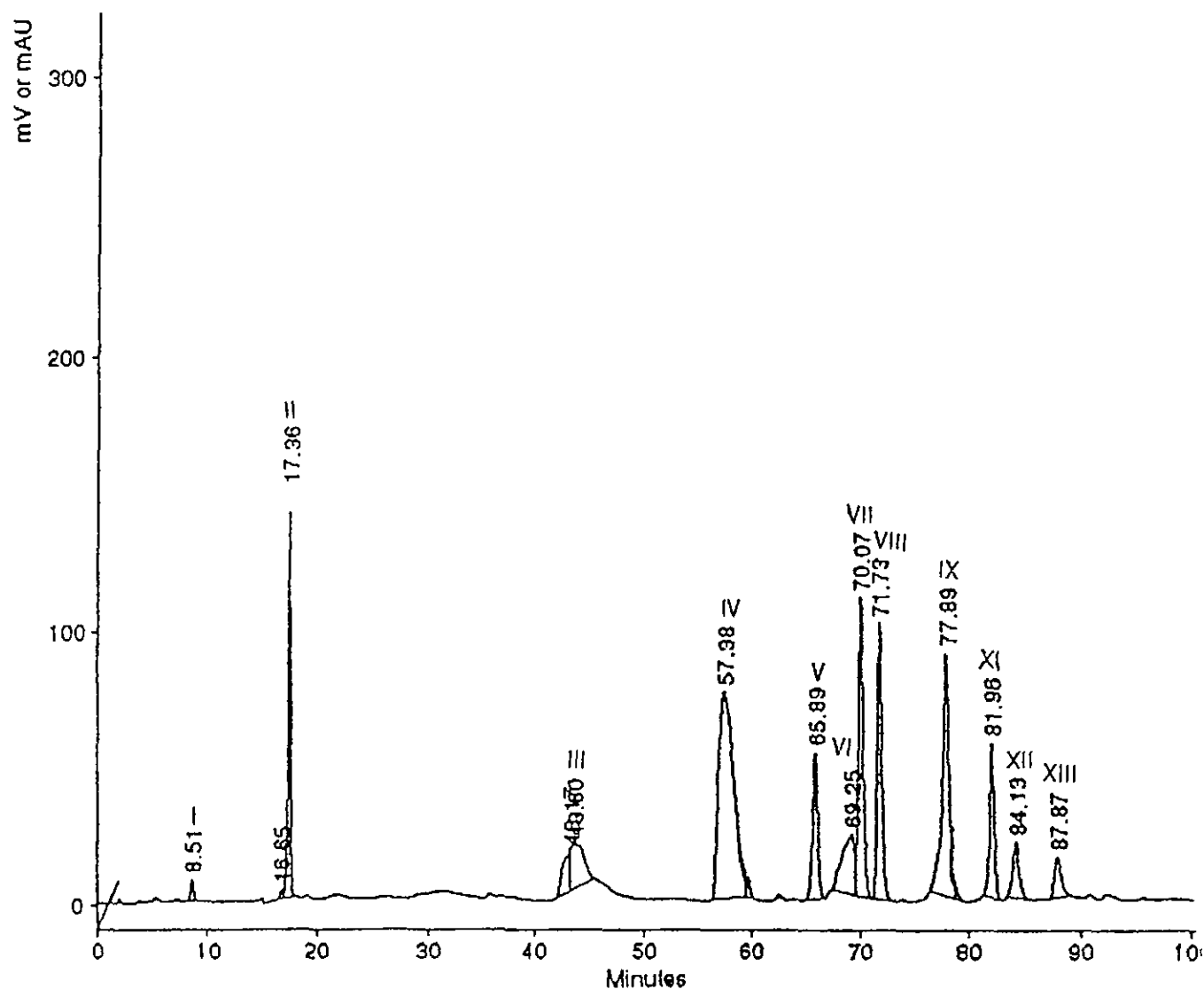
พิษงูเห่าไทย ตัวที่ 2 แยกได้ 12 ส่วน โดยไม่พบองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ X แต่พบองค์ประกอบ ส่วนที่ VIII (ภาพประกอบ 9)

พิษงูเห่าไทย ตัวที่ 3 เช่นเดียวกับพิษงูเห่าไทย ตัวที่ 2 คือ ไม่พบองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ X แต่พบส่วนที่ VIII (ภาพประกอบ 10)

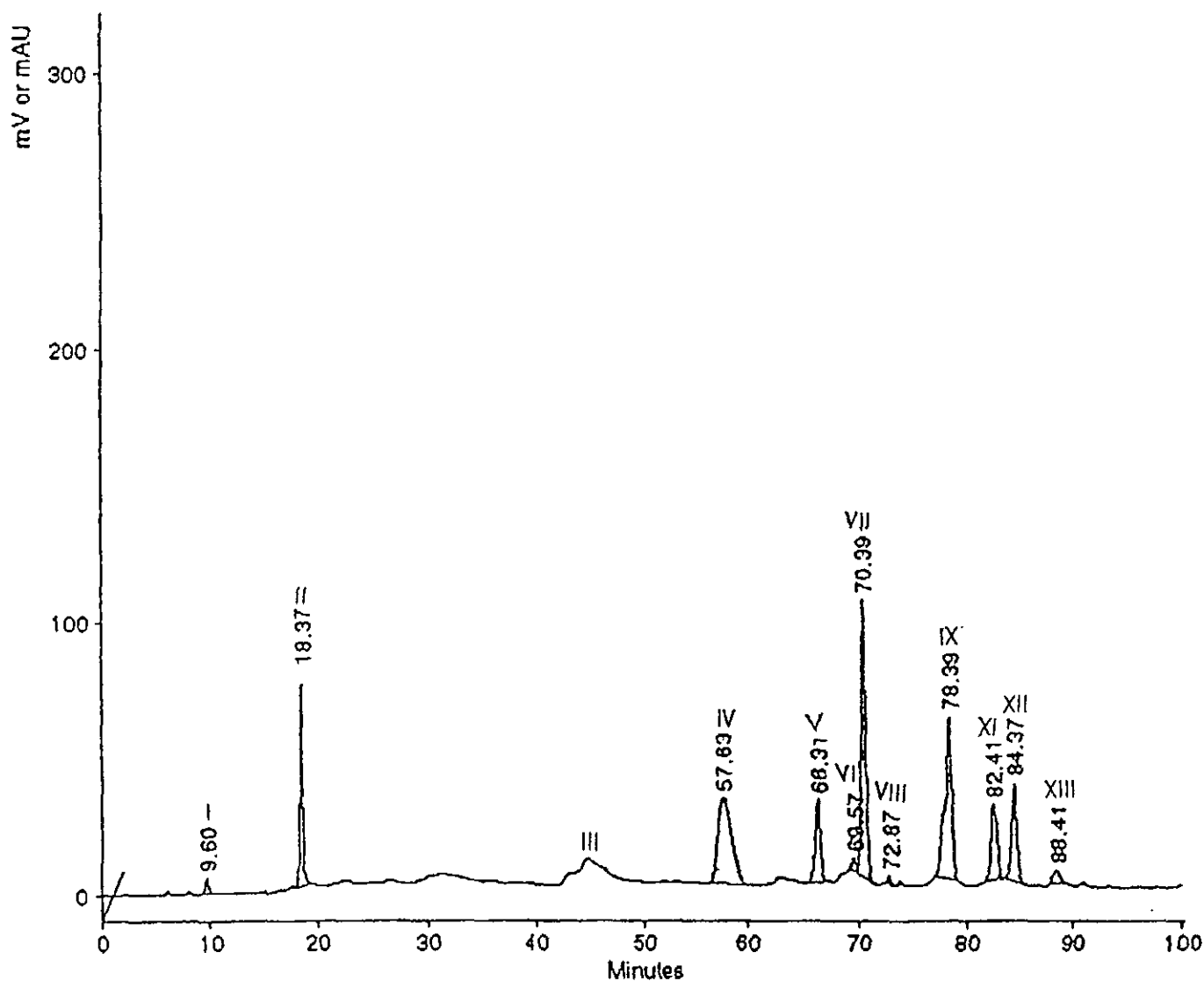
ในทำนองเดียวกับพิษงูเห่าไทย ตัวที่ 1 พิษงูเห่าไทย ตัวที่ 4, 5, 6, และ 7 แยกได้ 12 ส่วน โดยไม่พบองค์ประกอบของพิษงู ส่วนที่ VIII (ภาพประกอบ 11, 12, 13, 14)



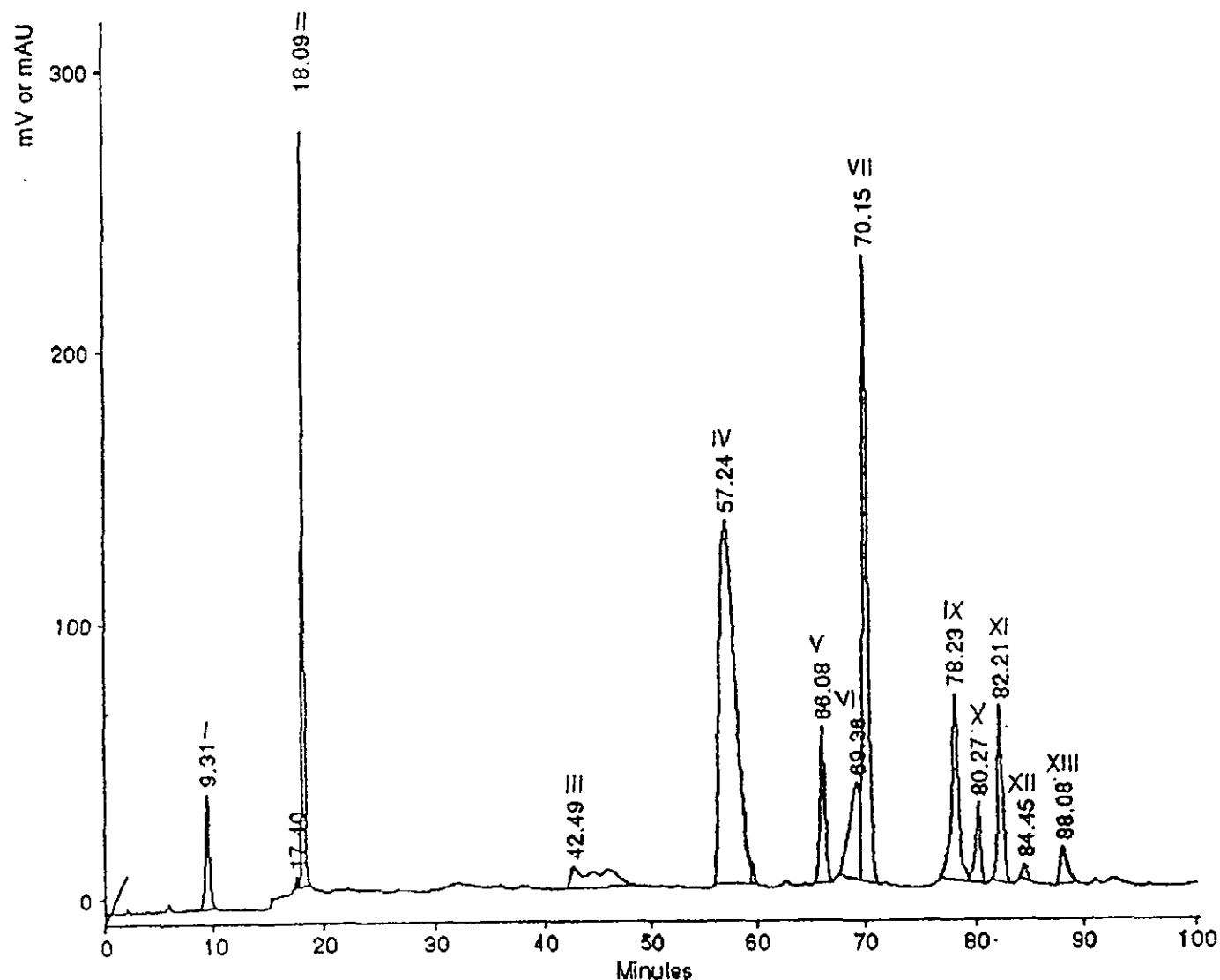
ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 1 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตรต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียมฟอร์เมต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตนไทรล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต ที่อัตรา 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพิษงูที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



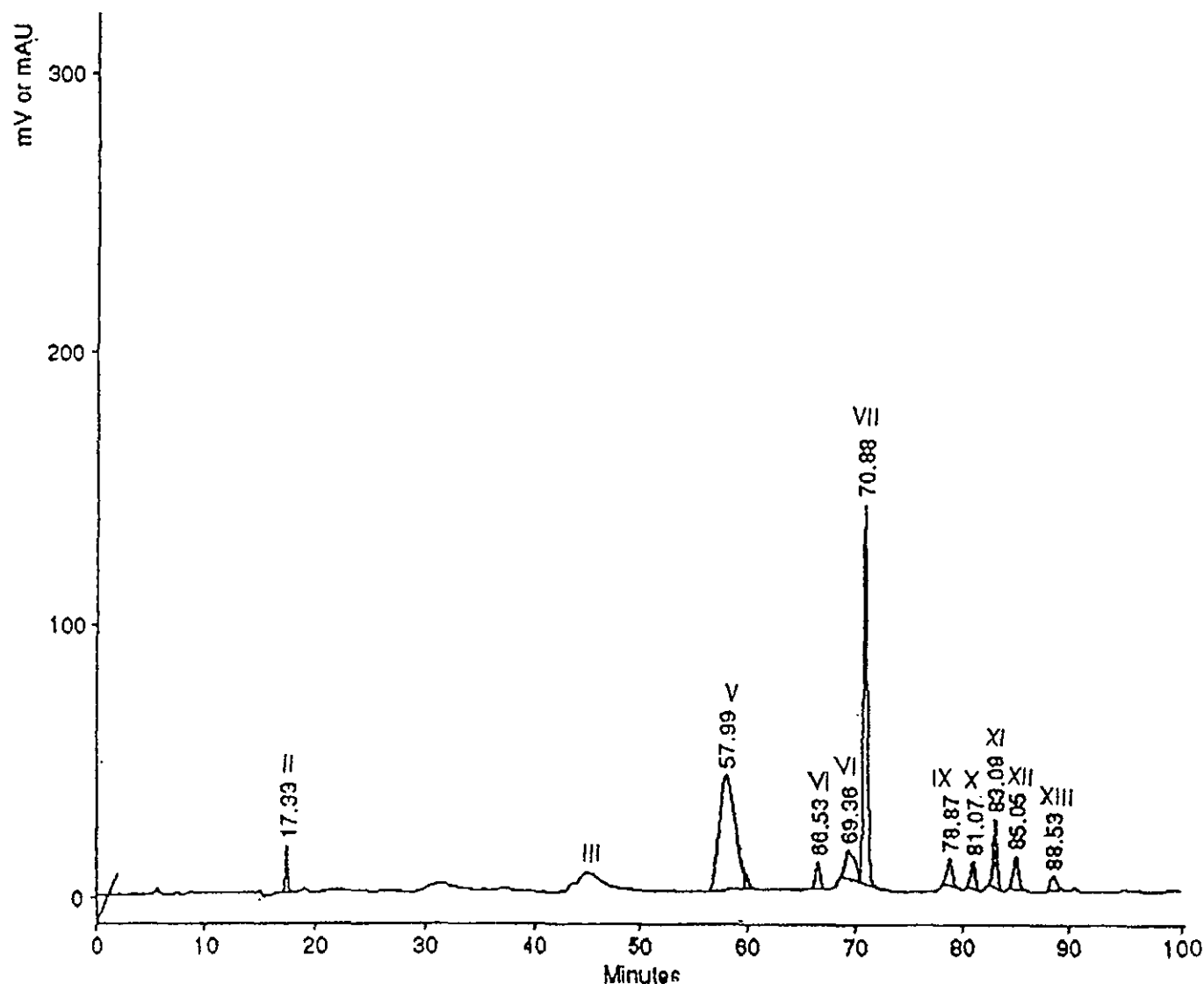
ภาพประกอบ 9 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่ที่ดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 2 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 X 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ชะด้วย 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอร์เมต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนไตรล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต ที่อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



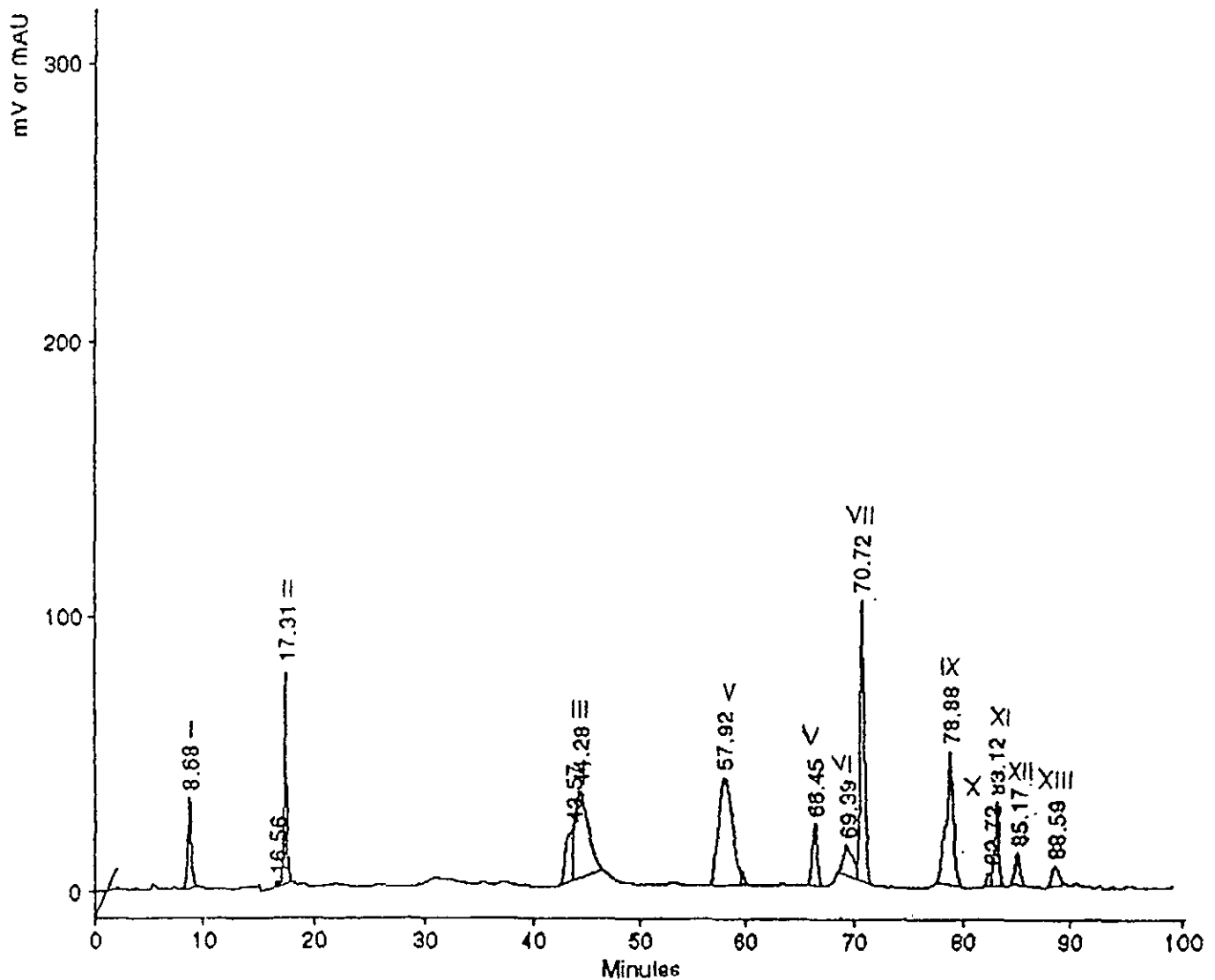
ภาพประกอบ 10 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 3 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตร ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่ อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลายพิษงูที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



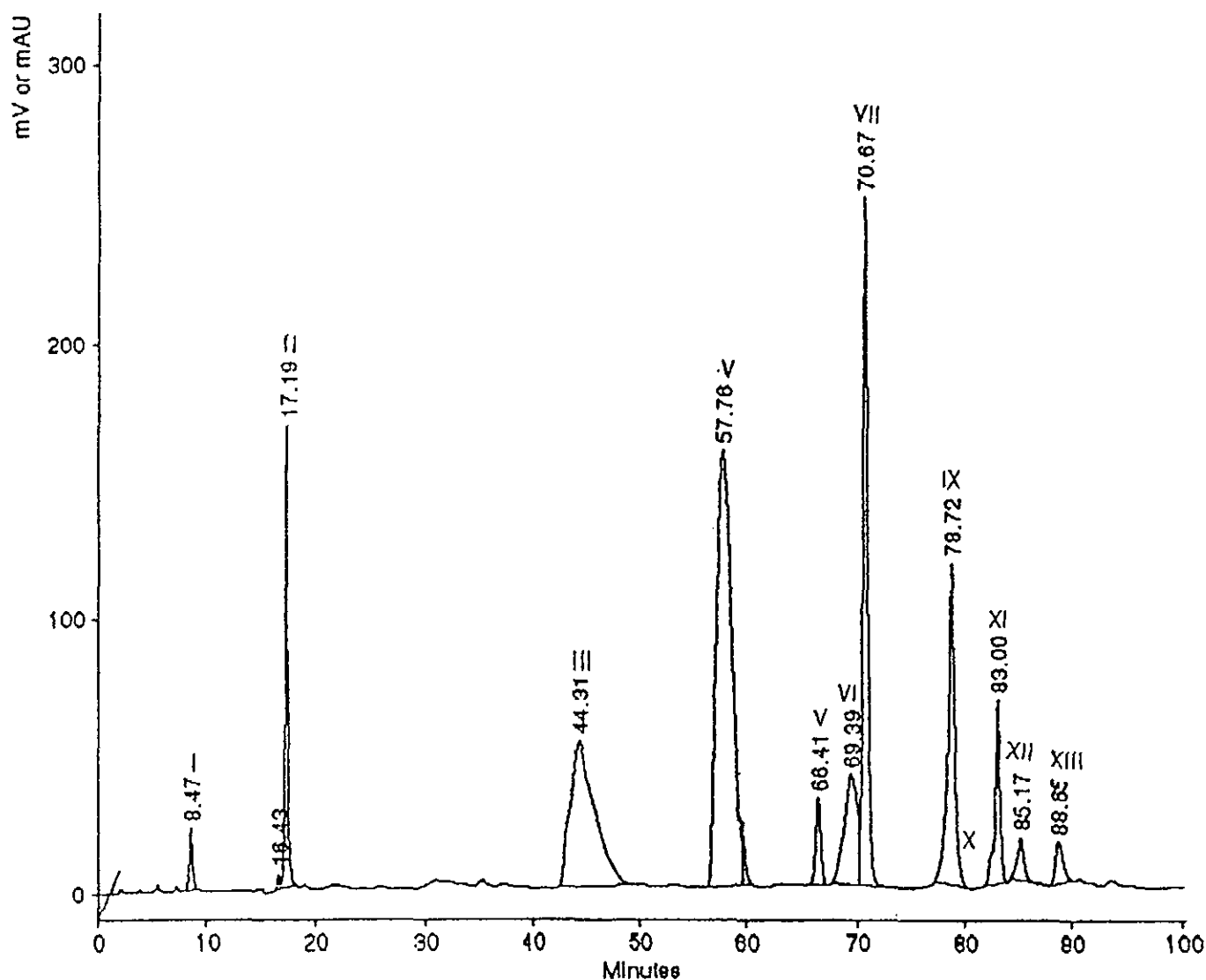
ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจัน สมบูรณ์ ตัวที่ 4 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอร์เมต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตนไทรล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต ที่ อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เดซิเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ สารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบุรณ์ ตัวที่ 5 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตร ลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอร์เมต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต ที่ อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ที่มีความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 6 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาด 0.15 ไมครอน ลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอर्मेट พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอर्मेट ที่ อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมแสดงส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ ตัวที่ 7 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 X 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ชะด้วย 0.15 มิลต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอ์เมต เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของ อะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอ์เมต ที่อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพิษงูที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์

3.1.3 ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยแต่ละส่วนที่แยกได้

จากผลการศึกษาในข้อ 3.1.2 พิษงูของงูเห่าไทยแต่ละตัว แยกได้ 12 ส่วน และแต่ละส่วนออกมาที่เวลา (Retention time) ตรงกัน จึงนำส่วนที่ตรงกันของพิษงูเห่าจากงูเห่าไทยแต่ละตัวมารวมกัน แล้วจึงนำมาศึกษาสมบัติต่าง ๆ คือ หาปริมาณโปรตีน แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเพส เอช แอคติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส แอคติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และค่าความเป็นพิษ (แอลดี₅₀)

3.1.3.1 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีนในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้

จากการหาปริมาณโปรตีนในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ เทียบกับปริมาณโปรตีนในพิษงูที่ไม่ได้แยกจะเห็นว่าพิษงูส่วนที่ IX เป็นส่วนประกอบที่มีในพิษงูเห่ามากที่สุด คือ 21.00 % รองลงมาคือ พิษงูส่วนที่ XI (13.13 %) และ IV (9.15 %) ตามลำดับ (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันสมบูรณ์ที่แยกได้

ส่วนของพิษงู	total protein (ไมโครกรัม)	%yield (%)	LD ₅₀ (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม)	สเปซิฟิคแอกติวิตี ของฟอสโฟไลเพส เอช (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	สเปซิฟิคแอกติวิตี ของอะซิติลโคลีน เอสเตอเรส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกติวิตี ของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (เปอร์เซ็นต์)
I	63	1.96	>17.32	0	0	0
II	98	3.06	>28.10	0	0	0
III	200	6.25	0.49	0	1176	0
IV	302	9.15	0.26	0	888	0
V	147	4.50	1.93	0	1666	0
VI	168	3.93	1.83	0	1333	4.80
VII	60	1.88	3.19	5315	0	11.90
VIII	60	1.88	5.95	5565	0	11.20
IX	672	21.00	3.41	0	0	25.50
X	245	6.00	8.60	0	0	9.30
XI	420	13.13	1.97	0	0	5.30
XII	168	5.52	4.21	0	0	5.30
XIII	112	3.50	7.84	0	0	5.30
รวม	-	81.75	-	-	-	-
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก						
ยังไม่ได้แยก	3200	100.00	0.31	216.50	353.50	93.56

3.1.3.2 ผลการวัดแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช

จากการศึกษาแอกติวิตี (activity) ของฟอสโฟไลเฟส เอช ในแต่ละส่วนที่แยกได้ พบว่าแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช มีมากในพิษงูส่วนที่ VII และ VIII (ตาราง 4) โดยที่พิษงูส่วนที่ VIII มีสเปซิฟิคแอกติวิตี 5565 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และพิษงูส่วนที่ VII มีสเปซิฟิคแอกติวิตี 5315 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ไม่พบแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช ในพิษงูส่วนที่ I, II, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII และ XIII

3.1.3.3 ผลการวัดแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

ผลการศึกษาแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสดังแสดงใน ตาราง 4 พบว่ามีสเปซิฟิคแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส มากที่สุดในพิษงูส่วนที่ V และรองลงมาในพิษงูส่วนที่ VI, III และ IV ตามลำดับ

3.1.3.4 ผลการวัดแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

ในตาราง 4 แสดงผลการศึกษาแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกพบว่าแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก มากในพิษงู ส่วนที่ IX, VII, VIII และ X ตามลำดับ พิษงูส่วนอื่น ๆ (VI, XI, XII และ XIII) มีแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อย และพิษงูส่วนที่ I, II, III, IV และ V ไม่พบแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

3.1.3.5 ผลการศึกษาคือความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทย ที่ไม่ได้แยกและแต่ละส่วนที่แยกได้

ผลการศึกษาดังแสดงในตาราง 4 พบว่า ส่วนของพิษงูที่มีค่าความเป็นพิษมากที่สุดคือ พิษงูในส่วนที่ IV มีค่า 0.26 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก (0.31 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม) ถึง 12 เท่า

3.2 ผลการวิจัยของงูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์

3.2.1 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก

ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของงูเห่าไทยแต่ละตัวในกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์พบว่า ความยาวตลอดตัวของงูเห่าไทยมีความยาวตั้งแต่ 107 - 185 เซนติเมตร ความยาวเฉพาะส่วนหางมีความยาวตั้งแต่ 15 - 25 เซนติเมตร มีน้ำหนักตั้งแต่ 500 - 1,000 กรัม และงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ 7 ตัว เป็นเพศผู้ 4 ตัว และเพศเมีย 3 ตัว (ตาราง 5)

ตาราง 5 แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกและปริมาณพิษสูงสุดของงูเห่าไทยกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์

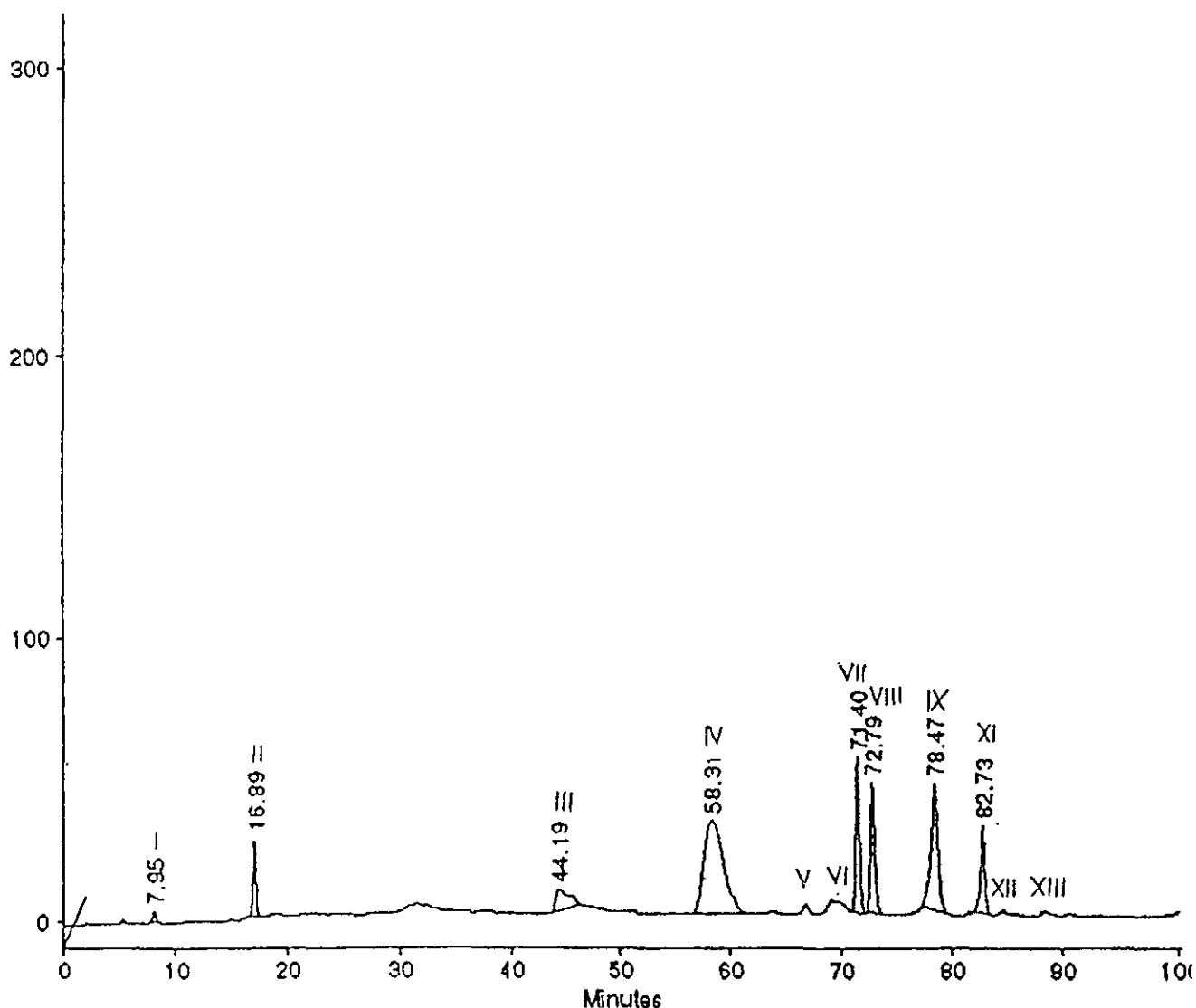
ตัวที่	ความยาวตลอดตัว (เซนติเมตร)	ความยาวเฉพาะส่วนหาง (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กรัม)	เพศ	ปริมาณพิษสูงสุด (มิลลิกรัม)
1	185	25.0	1,000	ผู้	500
2	128	22.5	500	เมีย	470
3	131	22.0	500	เมีย	360
4	107	หางด้วน	700	ผู้	630
5	115	15.0	500	ผู้	280
6	137	21.0	700	เมีย	410
7	106	19.0	400	ผู้	190

3.2.2 ผลการแยกพิษงูเห่าไทยแต่ละตัวด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี

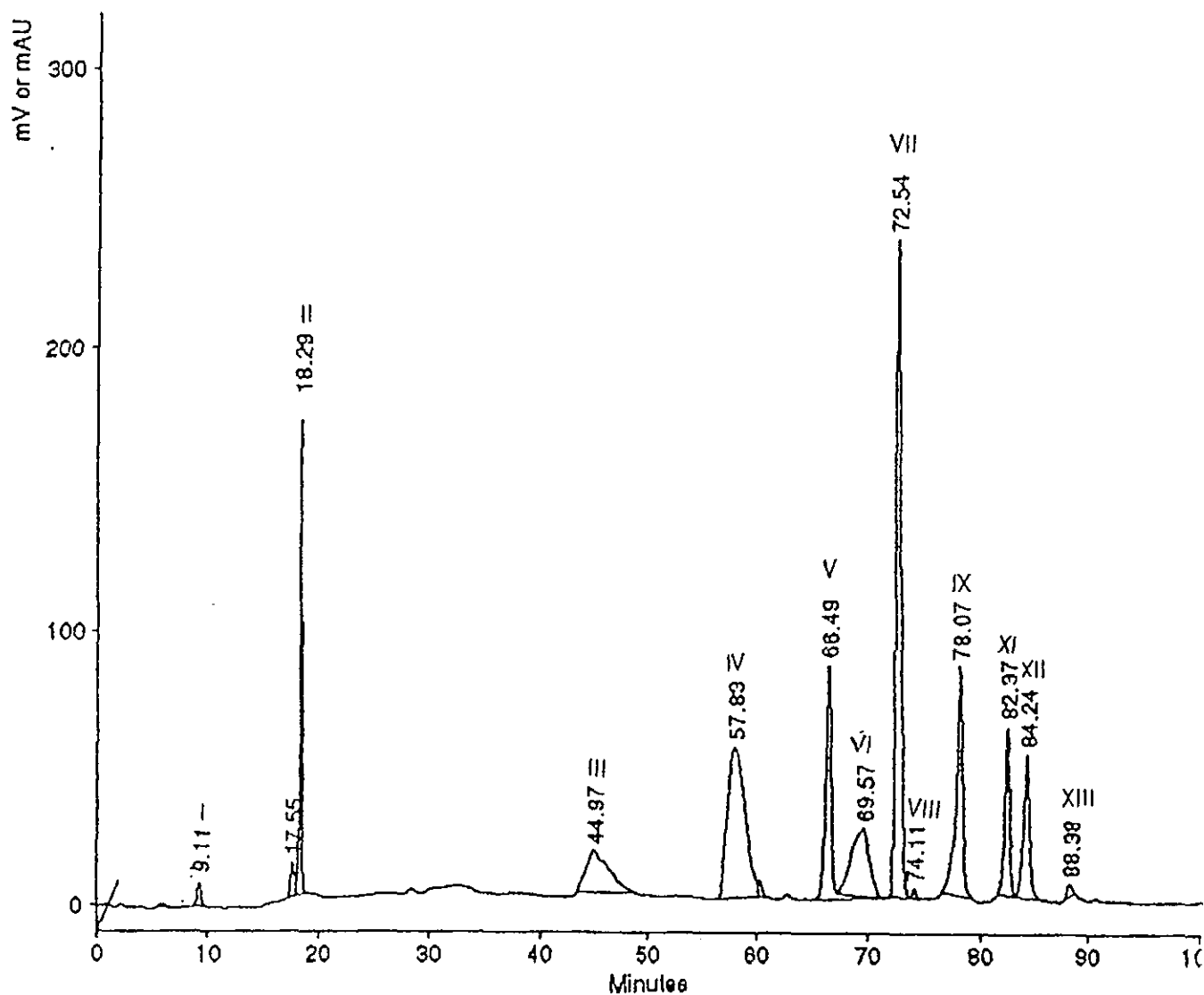
เมื่อผ่านพิษงูเห่าไทยซึ่งเจือจางพิษงู (crude venom) 10 เท่า ด้วยสารละลาย 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอร์เมต พีเอช 2.7 ปริมาตร 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร แล้วชะด้วยสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 2.7 ในช่วงเวลา 0 - 10 นาที และตามด้วย ลิเนีย เกรเดียนท์ ของ 0 - 45 % อะซิโตนไไตรล์ ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 2.7 เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพิษงูที่ออกจากคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์ พบว่าพิษงูที่ได้จากงูเห่าไทยในกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ แต่ละตัวแยกได้ 12 ส่วน คือ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ตามลำดับ

พิษงูเห่าไทย ตัวที่ 1, 2 และ 3 แยกได้เป็นส่วนที่ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XI, XII และ XIII โดยไม่พบองค์ประกอบของพิษงู ส่วนที่ X (ภาพประกอบ 15, 16 และ 17)

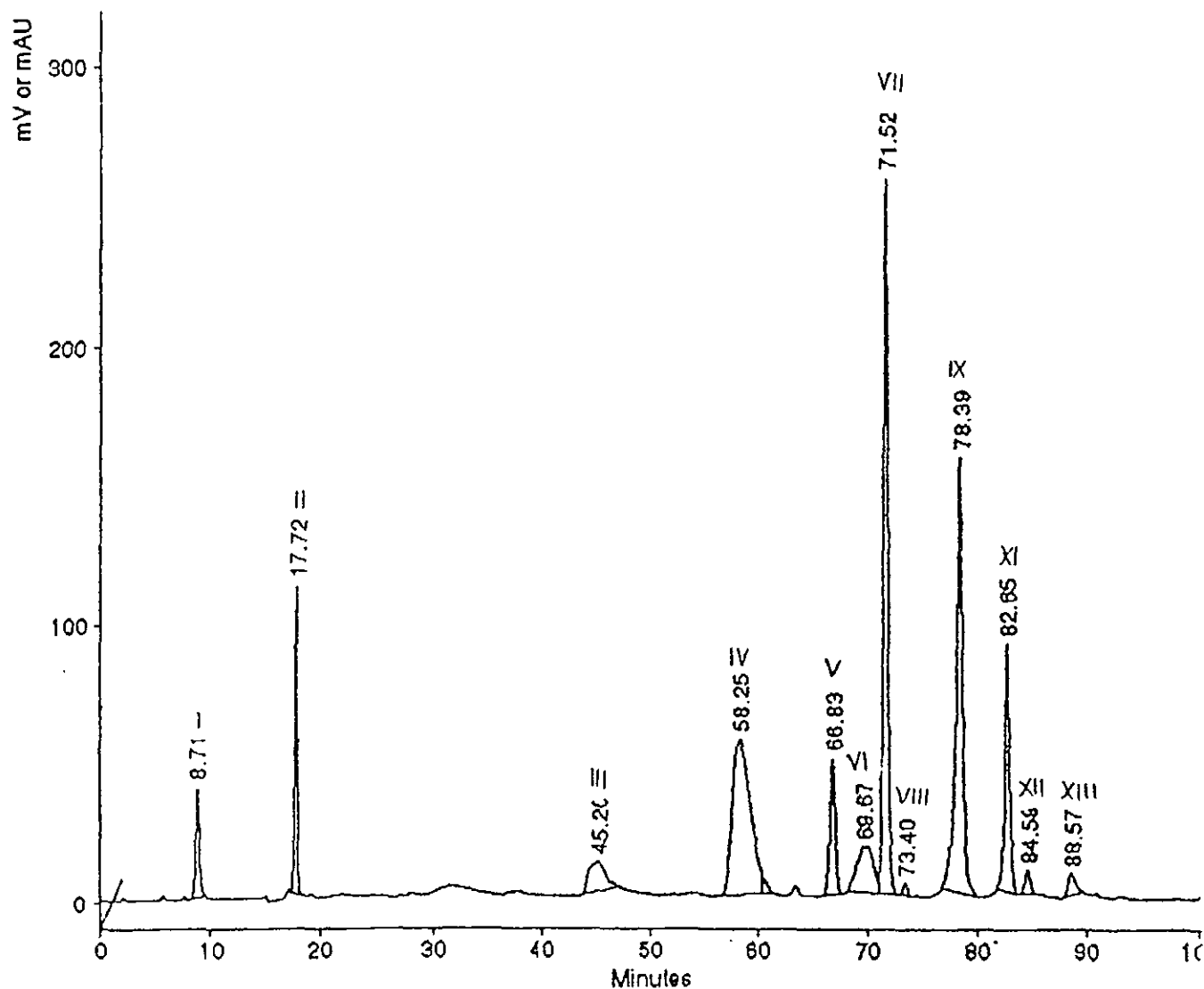
พิษงูเห่าไทย ตัวที่ 4, 5, 6 และ 7 แยกได้ 12 ส่วน คือ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XI, XII และ XIII โดยไม่พบองค์ประกอบของพิษงู ส่วนที่ X (ภาพประกอบ 18, 19, 20 และ 21)



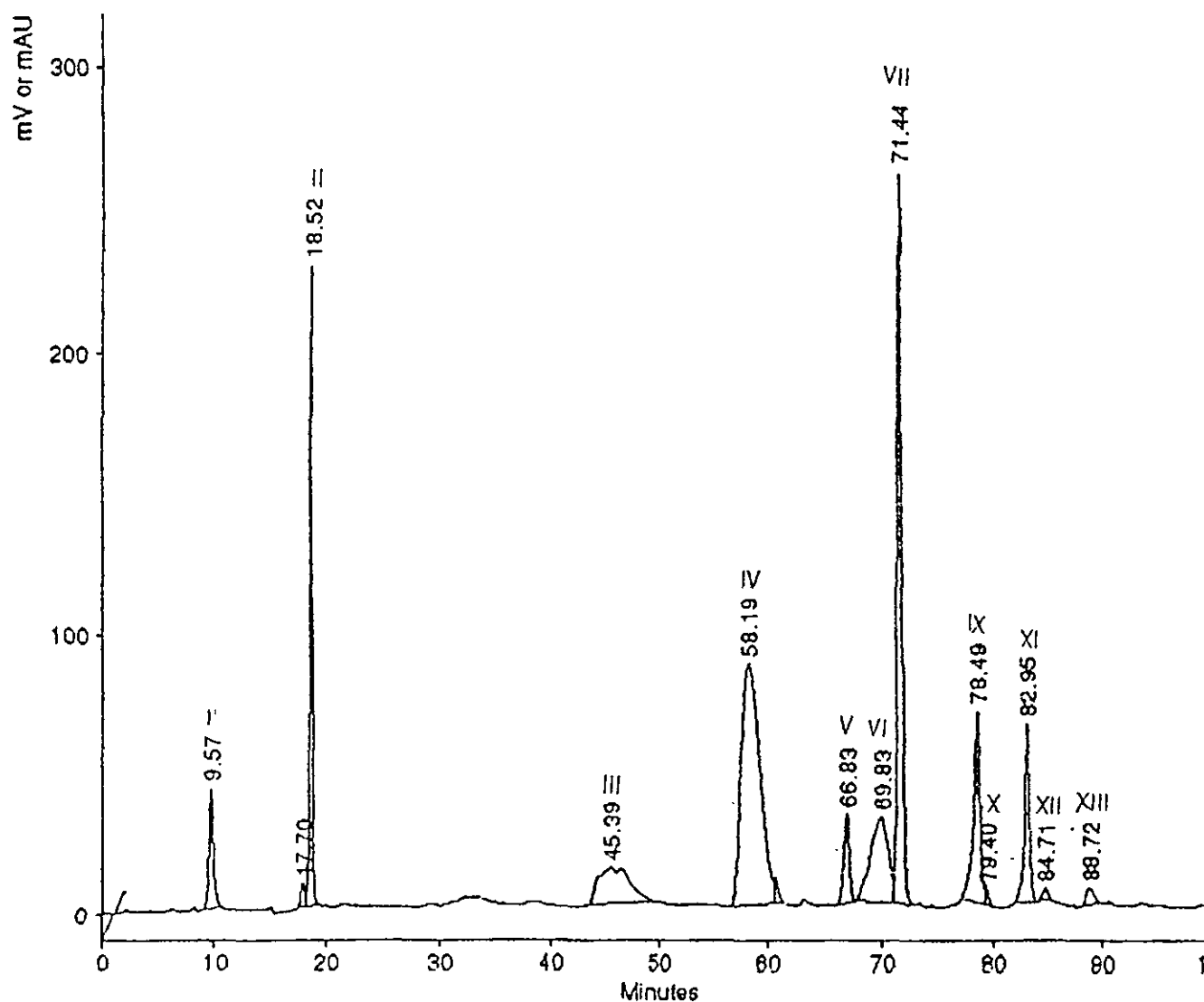
ภาพประกอบ 15 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทยกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 1 แยกด้วยวิธี ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตร ต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่ pH 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (C-45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่อัตราการใช้ 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ที่มีความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



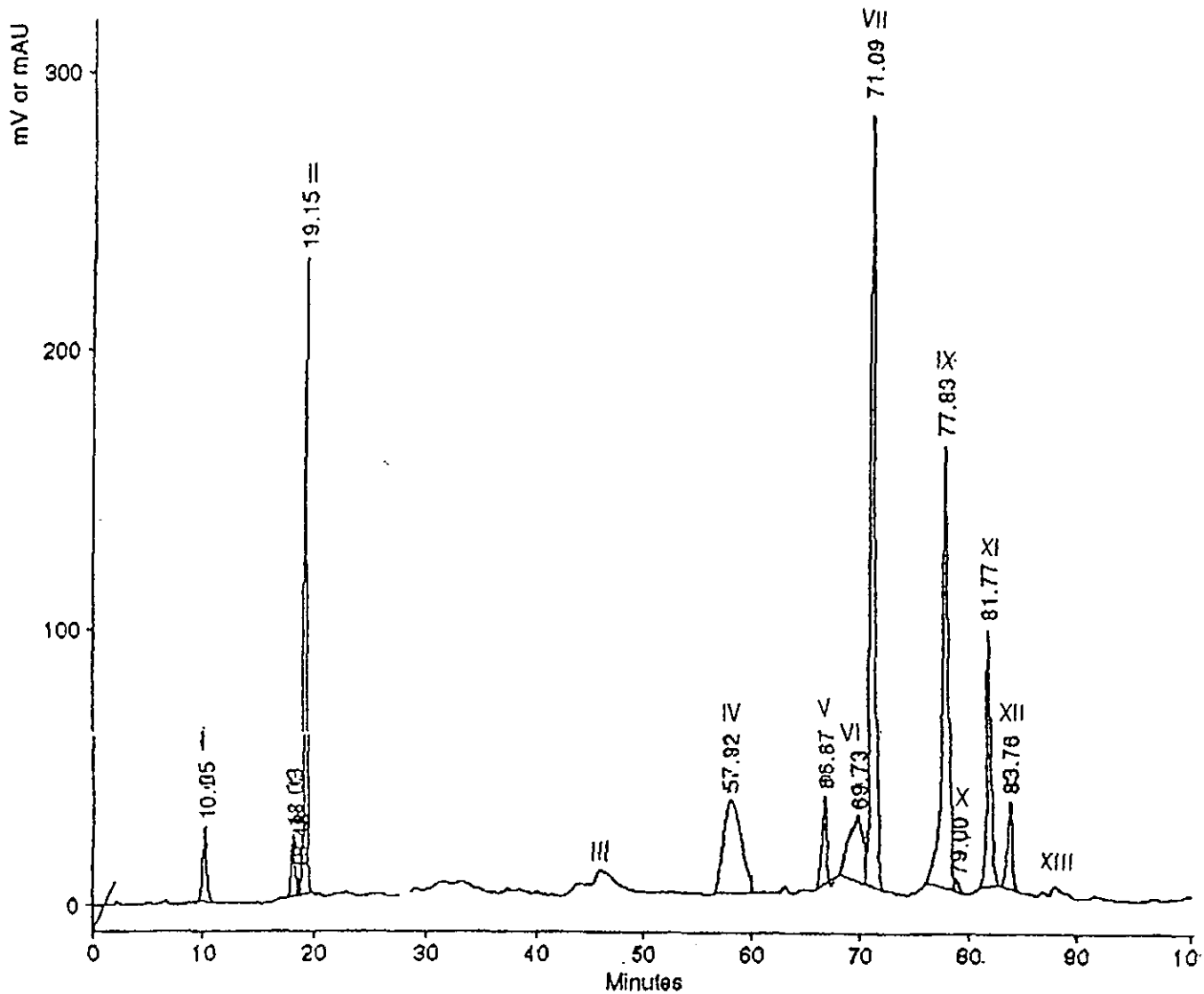
ภาพประกอบ 16 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 2 แยกด้วย วิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตรต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนไตรล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



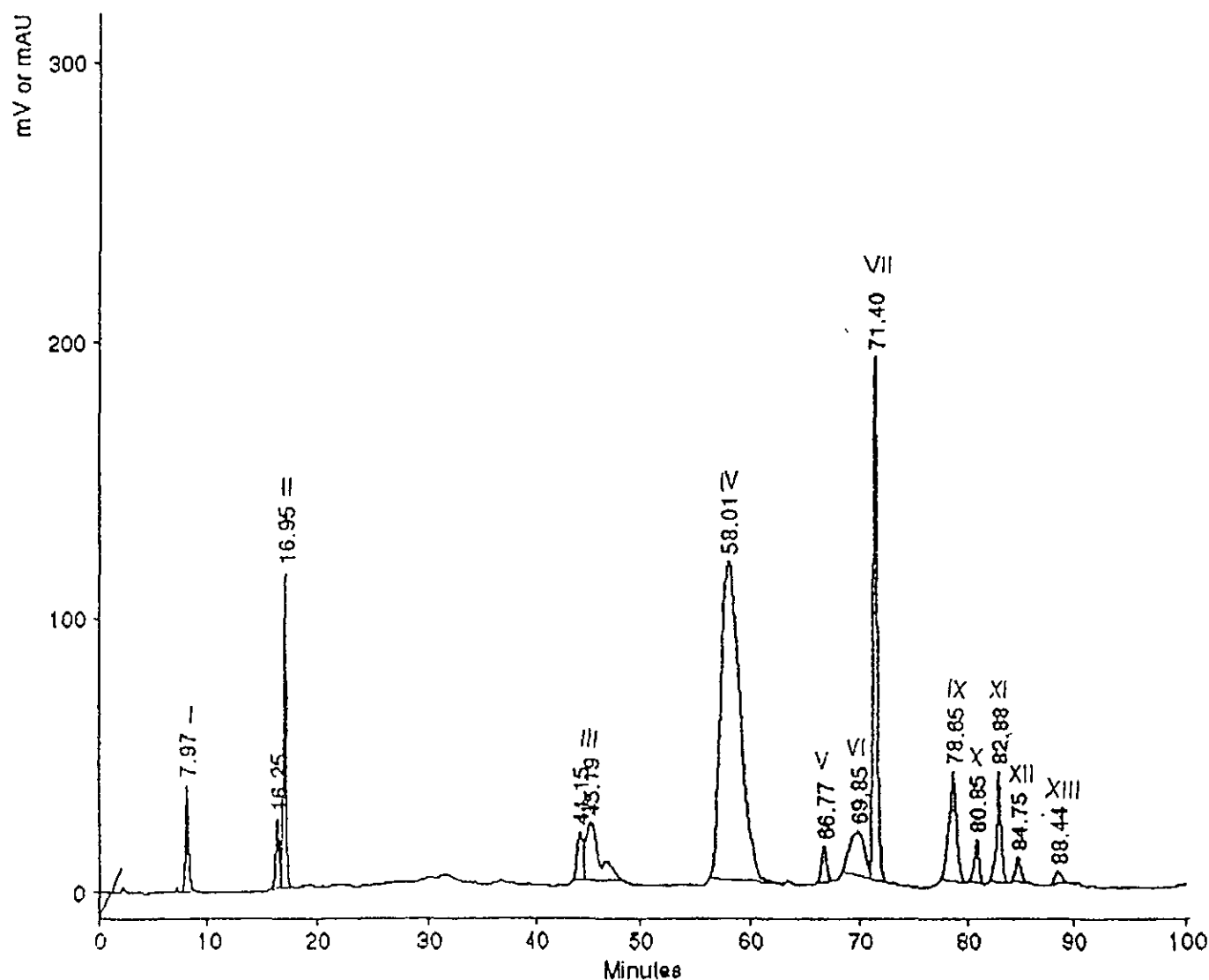
ภาพประกอบ 17 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 3 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์-ลิควิด โครมาโตกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตร ลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่ อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



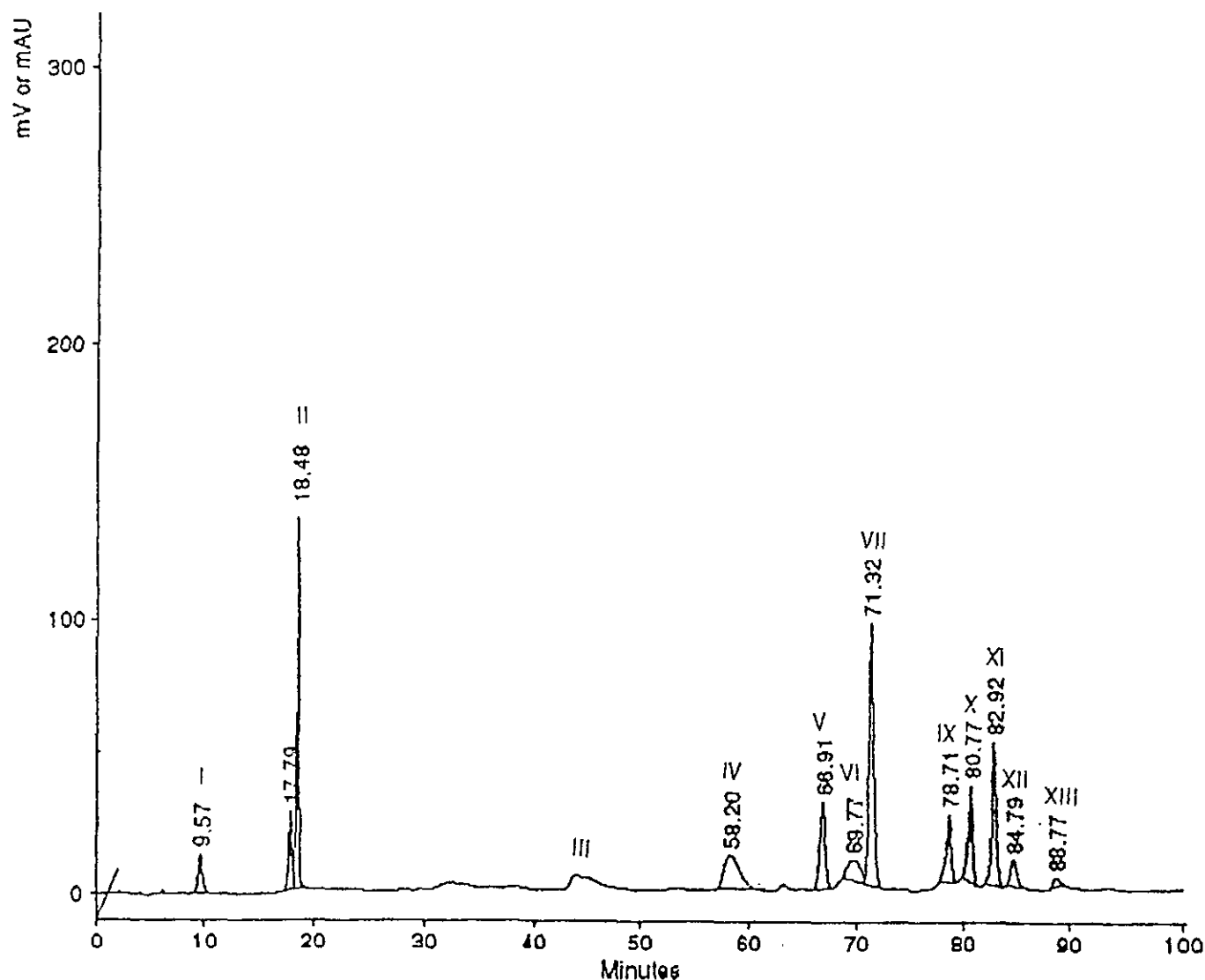
ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชงูเห่าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 4 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตนไทรล์ (0 - 45 % acetonitrile) โรสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่อัตรา 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



ภาพประกอบ 19 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 5 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เดซิเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



ภาพประกอบ 20 โครมาโตแกรมแสดงส่วนประกอบของพืชเหง้าไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 6 แยกด้วยวิธี ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิลิตร/นาที/เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตไนล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เดซิเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชที่ออกจากคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์



ภาพประกอบ 21 โครมาโตแกรมแสดงส่วนประกอบของพืชมูกเห็บไทย กลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ ตัวที่ 7 แยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 X 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร ขนาดด้วย 0.15 มิลลิเมตร ลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียม ฟอสเฟต พีเอช 2.7 เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Linear gradient ของอะซิโตนไทรล์ (0 - 45 % acetonitrile) ในสารละลายแอมโมเนียม ฟอสเฟต ที่อัตราการไหล 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพืชมูกเห็บที่ออกจากคอลัมน์ด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย ยูวี ดีเทคเตอร์

3.2.3 ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยแต่ละส่วนที่แยกได้

จากผลการศึกษาในข้อ 3.2.2 พิษงูของงูเห่าไทยแต่ละตัวแยกได้ 12 ส่วน และแต่ละตัวออกมาเป็นเวลา (Retention time) ตรงกัน จึงนำส่วนที่ตรงกัน ของพิษงูเห่าจากงูเห่าไทยแต่ละตัวมารวมกัน แล้วจึงนำมาศึกษาสมบัติต่าง ๆ คือ หาปริมาณโปรตีน แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอชทู แอคติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส แอคติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และค่าความเป็นพิษ (แอลดี 50)

3.2.3.1 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีนในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้

จากการหาปริมาณโปรตีนในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ เทียบกับปริมาณโปรตีนในพิษงูที่ไม่ได้แยกจะเห็นว่าพิษงูส่วนที่ IX เป็นส่วนประกอบที่มีในพิษงูเห่ามากที่สุด คือ 19.09 % รองลงมาคือ พิษงูส่วนที่ IV (16.70 %) และ VI (10.73 %) ตามลำดับ (ตาราง 6)

ตาราง 6 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์

ส่วนของพิษงู	total protein (ไมโครกรัม)	%yield (%)	LD ₅₀ (มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม)	สเปซิฟิคแอกติวิตี ของฟอสโฟไลเฟส เอทู (ยูนิตต่อมิลลิ กรัมโปรตีน)	สเปซิฟิคแอกติวิตี ของอะซิติลโคลีน เอสเตอเรส (ยูนิตต่อมิลลิ กรัมโปรตีน)	แอกติวิตีของพิษงูในการทำ ให้เม็ดเลือดแดงแตก (เปอร์เซ็นต์)
I	52.5	1.19	>25.00	0	0	0
II	105.0	2.38	>38.79	0	0	0
III	171.5	3.88	0.45	0	1142	0
IV	735.0	16.70	0.10	0	236	0
V	346.5	4.38	1.97	0	482	0
VI	367.0	10.73	1.70	0	533	4.50
VII	76.0	1.72	4.23	3094	0	10.6
VIII	18.0	0.40	5.42	10941	0	17.3
IX	840.0	19.09	2.16	0	0	32.6
X	332.0	7.50	12.72	0	0	9.3
XI	416.0	9.45	2.86	0	0	9.3
XII	182.0	4.13	7.15	0	0	5.3
XIII	70.0	1.59	9.65	0	0	N.D
รวม	-	84.36	-	-	-	-
พิษงูที่						
ยังไม่	4400	100.00	0.27	116.5	218.5	97.33
ได้แยก						

N.D คือ not detect

3.2.3.2 ผลการวัดแอกติวิตีของฟอสฟอไรเฟส เอช

จากการศึกษาแอกติวิตี ของฟอสฟอไรเฟส เอช ในแต่ละส่วนของพืชที่แยกได้ พบว่าแอกติวิตีของฟอสฟอไรเฟส เอช มีเฉพาะในพืชส่วนที่ VII และ VIII (ตาราง 6) โดยสเปซิฟิคแอกติวิตีของฟอสฟอไรเฟส เอช ในพืชส่วนที่ VIII มากกว่า ในพืชส่วนที่ VII

3.2.3.3 ผลการวัดแอกติวิตีของอะซิติลโคไลน์เอสเตอเรส

ผลการศึกษาแอกติวิตีของอะซิติลโคไลน์เอสเตอเรส ดังแสดงในตาราง 6 พบว่ามีสเปซิฟิคแอกติวิตีของอะซิติลโคไลน์เอสเตอเรส มากในพืชส่วนที่ III, IV, V และ VI พืชส่วนที่เหลือไม่มีสเปซิฟิคแอกติวิตีของอะซิติลโคไลน์เอสเตอเรส

3.2.3.4 ผลของการวัดแอกติวิตีของพืชในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

ผลการศึกษาแอกติวิตีของพืชในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แสดงในตาราง 6 พบว่าแอกติวิตีของพืชในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก มากในพืชส่วนที่ IX, VIII และ VII พืชส่วนอื่น ๆ (X, XI และ XII) มีแอกติวิตีของพืชในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อย และพืชส่วนที่เหลือไม่พบแอกติวิตีของพืชในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

3.2.3.55 ผลการศึกษาความเป็นพิษของพืชงูเห่าไทย ที่ไม่ได้แยกและแต่ละส่วนที่แยกได้

ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าส่วนของพืชที่มีค่าความเป็นพิษสูงสุดคือ พืชในสวนที่ IV มีค่า 0.10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่าพืชที่ไม่ได้แยก (0.27 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม) ถึง 2.7 เท่า

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการแยกองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยทั้ง 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีดอกจันสมบุรณ์ และกลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบุรณ์ โดยใช้ RP - HPLC พบว่ามีรูปแบบขององค์ประกอบที่แยกได้เหมือนกัน (ภาพประกอบ 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 และ 21) แต่จะแตกต่างกันในสัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า งูเห่าไทยที่เราใช้ในการศึกษาเป็นงูที่สถานเสาวภาซื้อมาจากพ่อค้า งูแต่ละตัวมาจากแหล่งต่างๆ กัน สภาพที่อยู่อาศัยต่างกัน อาหารต่างกันและอายุของงูก็อาจจะต่างกัน สภาพที่ต่างกันนี้มีผลต่อความเข้มข้นของโปรตีนองค์ประกอบในพิษงู (Lee 1979) จากรูปแบบขององค์ประกอบของพิษงูเห่าทั้ง 2 กลุ่มที่แยกได้ ทำให้เราแยกพิษงูเห่าที่ใช้ในการศึกษาได้เป็น 2 พวก คือ พวกที่มีส่วนที่ VIII และพวกที่มีส่วนที่ X และจะเห็นว่าการที่พิษงูของงูเห่าไทยในกลุ่มเดียวกัน มีความแตกต่างกันที่ส่วนที่ VIII และส่วนที่ X ไม่ได้เป็นผลที่เนื่องมาจากความแตกต่างของลักษณะของดอกจัน

เมื่อศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทย ในกลุ่มที่มีดอกจันสมบุรณ์ โดยนำองค์ประกอบแต่ละส่วนของพิษงูจากงูเห่าไทยในกลุ่มนี้แต่ละตัว มารวมกันพบว่าองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ VII และส่วนที่ VIII มีแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเพส เอช (ตารางที่ 4) จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า พิษงูเห่าไทยพวกที่มีองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ X แต่ไม่มีองค์ประกอบของพิษงู ส่วนที่ VIII แอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเพสเอชมาจากองค์ประกอบของพิษงู ส่วนที่ VII การที่เราพบแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเพส เอช ส่วนที่ VII และส่วนที่ VIII ซึ่งถูกชะออกมาที่ RT ต่างกันแต่ใกล้เคียงกันนั้นอาจเนื่องมาจากทั้ง 2 ส่วน เป็น isozyme กัน เพราะมีรายงานของนักวิจัยหลายคนพบว่าเอนไซม์ฟอสโฟไลเพส เอช มีหลาย isozyme (Joubert and Taljaard. 1980 Karlsson and Pongsanasdi. 1980 , Lee. 1979 , Namiranian. 1992)

พิษงูเห่านอกจากจะออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท แล้วยังพบว่าพิษงูเห่าสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ จากการศึกษาครั้งนี้เราพบว่าองค์ประกอบของพิษงูเห่าส่วนที่ VI, VII, VIII, IX, XII และ XIII ตามลำดับ มีแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (ตารางที่ 4) ในพิษงูส่วนที่

VII และ VIII เราพบว่ามีแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอพอยู่ด้วย และเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอพ ก็สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เช่นกัน ดังนั้นแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกที่วัดได้ในพิษงูส่วนที่ VII และ VIII น่าจะเป็น synergistic action ของฟอสโฟไลเฟส เอพ และตัวการอื่นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เช่น Direct Lytic Factor (ชัยฤทธิ์ โพธิสุข 2515 , Aloof and others 1968 , Kirschmann 1964 , Condrea and Mager 1965) องค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ VI นอกจากจะมีแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ยังมีแอกติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ส่วนองค์ประกอบที่พบว่ามีเฉพาะแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก คือ องค์ประกอบส่วนที่ IX, X, XI, XII และ XIII ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษากันต่อไปว่าองค์ประกอบเหล่านี้ เป็นตัวการที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ต่างชนิดกันหรือเป็น isozyme กัน

เมื่อพิจารณาค่า แอลดี 50 แอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอพ และแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่าองค์ประกอบของพิษงูมีค่า แอลดี 50 ต่ำสุด หรือมีความเป็นพิษสูงสุด คือองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ IV ซึ่งไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอพ และแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เป็นการบ่งชี้ว่า เอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอพ และแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ไม่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทย จากการศึกษาร่องประกอบของพิษงูส่วนที่ IV พบว่ามีแอลดี 50 ต่ำสุดนั้น อาจจะเป็นนิวโรทอกซิน จากการศึกษาร่อง Lee ในปี 1979 กล่าวว่าในพิษงูเห่าไทย ส่วนที่มีพิษสูงสุดคือ นิวโรทอกซิน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 7280 ดาลตัน เมื่อเรานำพิษงูส่วนที่ IV ไปหาน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ Mass spectrometry (MS) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 7619 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับ นิวโรทอกซินที่ Lee ได้รายงานไว้

จากผลการศึกษาของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในพิษงูกลุ่มอีแลปตี) ในพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้พบว่า องค์ประกอบส่วนที่ VIII และ X ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส แต่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ตัวนี้ในองค์ประกอบของพิษงูส่วนที่ III, IV, V และ VI เป็นการบ่งชี้ว่าเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสไม่เกี่ยวข้องกับการที่พิษของงูเห่าบางตัวมีองค์ประกอบส่วนที่ VIII และบางตัวมีองค์ประกอบส่วนที่ X

สำหรับพิษงูเห่ากลุ่มที่มีดอกจันไม่สมบูรณ์ เมื่อศึกษาผลของแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช เอชเอ็มอะซิติกโคลิเนสเอสเตอเรส แอคติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และศึกษาความเป็นพิษ (แอลดี 50) พบว่าสมบัติของพิษงูและองค์ประกอบของพิษงูได้ผลเช่นเดียวกับกลุ่มที่มีดอกจันสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และตาราง 5)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรจะแยกพิษงูเห่าไทยด้วย วิธีอื่นก่อน เช่น แยกด้วย เจล ฟิลเตรชัน (Gel filtration) เพื่อที่จะแยกขนาดของโมเลกุลก่อนที่จะแยกด้วยวิธี ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High - Performance Liquid Chromatography) เพื่อที่จะได้ ส่วนของพิษงูที่แยกได้บริสุทธิ์ขึ้น
2. ควรจะเลือกคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง มากกว่า ขนาด 250 X 4.6 มิลลิเมตร เพราะจะได้แยกสารมีปริมาณมากขึ้นเพื่อนำไปศึกษาสมบัติของพิษงูได้มากกว่าเดิม
3. ควรจะศึกษาเน้นไปทางด้านของ Neurotoxin และ Cardiotoxin เพราะว่าทั้ง 2 ส่วนนี้เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้ผู้ถูกงูเห่ากัดถึงแก่ชีวิต
4. ในด้านการศึกษาลักษณะภายนอก ของงูเห่าไทย ควรจะศึกษาดังแต่งูเห่ายังเล็ก ๆ เพราะจะได้ควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่มาเกี่ยวข้อง ของงูเห่าไทยทุก ๆ ตัว ของทั้ง 2 กลุ่ม และควรจะศึกษาร่วมกันกับทางด้านอิมมูโนวิทยา

បទដេញដោល

บรรณานุกรม

- ชาญ โพชนุกูล "งูพิษกัดในประเทศไทย," ในพิษจากพืช สัตว์ และจุลชีพ หน้า 21 - 31
กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2531
- ชัยฤทธิ์ โพธิ์สุข. การศึกษาความเป็นพิษและการศึกษาเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา. วิทยานิพนธ์ จท.ม.
กรุงเทพฯ . จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2515. อัดสำเนา
- ธัญญ์ เพ็ญชาติ "ความรู้เกี่ยวกับงูพิษที่สำคัญในเมืองไทย," จุลสารสมาคมศิษย์เก่าแพทย์
จุฬาลงกรณ์ 2(5) : 16-26 , พฤษภาคม, 2521
- นิพนธ์ ตั้งคณานุกรษ และคนอื่นๆ เทคนิคการแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี. 4-1,4-103 ;
2536.
- บุญเย็น ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธ์. การรักษาผู้ป่วยงูพิษกัด. 1-162 ; 2525.
- ประดิษฐ์ กาญจนพันธ์. งูพิษในประเทศไทย. 1-70 ; 2519.
- มนตรี จุฬาวัดนทล ชีวเคมี. 15-36 , 2530
- มุกดา ตฤณานันท์ และคนอื่นๆ "สัตว์มีพิษและการรักษาสัตว์," ในโครงการตำราศิริราช.
หน้า 21 - 33 กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหิดล, 2528.
- วิทยาศาสตร์, กอง งูพิษและสุนัขบ้า. 1-36 , 2538
- วรรณ ธรรมพาลเลิศ. การศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
เฉพาะบริเวณ ปรินญาณิพนธ์ จท.ม. กรุงเทพฯ . มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร , 2530 อัดสำเนา.
- สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล การศึกษาสมบัติเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอช จากงูแมวเซา. ปรินญา
ณิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร , 2530.
อัดสำเนา.
- สัณห์ พนิชกุล การศึกษาแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วนๆ เพื่อศึกษาทางเอนไซม์ วิทยา
ณิพนธ์ จท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2510 อัดสำเนา
- Aharonov, A., D. Gurari and S. Fuchs. "Immunochemical Characterization of *Naja naja*
siamensis Toxin and of a Chemically Modified Toxin," Eur.J.Biochem. 45 : 297-
303 ; 1974
- Aloof, S. and others. "The Direct Lytic Factor of Cobra Venom ; Purification and
Chemical Characterization," Biochem.biophys.Acta. 154 : 50-53 ; 1968

- Bougis, P.E., P. Marchot and H. Rochant "Characterization of Elapidae Snake Venom Components Using Optimized Reverse - Phase High - Performance Liquid Chromatographic Conditions and Screening Assays for α - Neurotoxin and Phospholipase A₂ Activity," Biochemistry, 25 : 7235-7243 ; 1986.
- Brown, R.P. and R.A. Hartwick. High Performance Liquid Chromatography, 1-668 , 1989
- Burden, S.J. and others. "Acetylcholine Receptors at Neuromuscular Synapses , Phylogenetic Difference Detected by Snake α - Neurotoxins," Proc.Nat.Acad.Sci 72 : 3245-3249 , 1975
- Chicheportiche, R and others. "Structure - function Relationship in the Binding of Snake Neurotoxins to the Torpedo Membrane Receptor," Biochemistry, 14 : 2081-2091 , 1975
- Condrea, E. and others. "Mitochondrial Swelling and Phospholipid Splitting Induced by Snake Venom," Biochem.biophys Acta, 110 : 330-337 ; 1965.
- Cooper, D. and E. Reich "Neurotoxin from Venom of the Cobra, *Naja naja siamensis*," Biol.Chem. 247 : 3008-3013 ; 1972
- Dowling, H.G. and W.E. Dullman "Asynopsis of Families and Higher Categories," Systematic Herpetology, 100-102 , 1978.
- Frylund, L. and D. Eaker "The Complete Amino-acid Sequence of a Cardiotoxin from the Venom of *Naja naja* (Cambodian cobra)," Biochemistry, 14 : 2860-2865 , 1975
- Hamilton, R.J. and P.A. Swell Introduction to High Performance Liquid Chromatography, 1-183 , 1977.
- Hodges, S.J. and others "Cobra Cardiotoxin Purification, Effects on Skeletal Muscle and Structure / Activity Relationships," Eur.J.Biochem, 165 : 373-383 ; 1987.
- Hunter, W. and others "Snake," A manual of trop, 630-631 , 1961
- Jintakune P. "Proceedings of the First Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins Held in Singapore," Progress in Venom and Toxin Research, 76-77 , 1987
- Jouberg, F.J. and N. Taljaard. "Purification some Properties and Amino acid Sequences of two Phospholipases A (cM - II and cM - III) from *Naja naja kaouthia* Venom," Eur.J.Biochem, 112 : 493-499 ; 1980.
- Karber, E.A. Mager and Manired. Experimental Immunochimistry U.S.A. Charles C. Thomas Publishen, 1961.
- Karlsson, E., H. Arnberg and D. Eaker "Isolation of the Principal Neurotoxins of two *Naja naja* Subspecies," Eur.J.Biochem, 21 : 1-15 ; 1971.
- Kirschman, Ch. and others. "Action of snake venom on human platelet phospholipid," Arch.intern Pharmacology, 150 : 360-372 ; 1964
- Lee, C.Y. "Enzyme in Snake Venom," in Handbook of Experiment Pharmacology, 121-123, 141-143 ; 1979.
- Lester, H.A. "Postsynaptic Action of Cobra Toxin at the Myoneural Junction," Nature, 227 : 727-728 , 1970
- Lindsay, Sandy. High Performance Liquid Chromatography, 1-243 ; 1991.
- Lowry, O.H. and others. "Protein Measurement with the Folin Phenol Regent," Chemistry, 193 : 265-275 ; 1951.

- Meb, D. and Y. Samajima. "Isolation and Characterization of Myotoxic Phospholipase A₂ from Crotalid Venom," Toxicon 24 : 161-162 , 1986.
- Namiranian, S and R.C. Hider "Use of HPLC Demonstrate Variation of Toxin Composition in the Thailand Cobra Venoms *Naja naja kaouthia* and *Naja naja siamensis*," Toxicon 30(1) : 47-61 ; 1992.
- Ohkura, K, S. Inoue and others. "Amino - acid Sequences of four Cytotoxins (Cytotoxin I, II, III and IV) Purified from the Venom of the Thailand Cobra, *Naja naja siamensis*," Biochimica et Biophysica Acta 954 : 148-153 , 1988.
- Osthoff, G and others "Correlation Between the Surface Hydrophobicities and Elution Orders of Elapid Neurotoxins and Cardiotoxin on Hydrophobic - interaction High Performance Liquid Chromatography," Toxicon 26 : 475-483 , 1988.
- Rossomando, F.E. High Performance Liquid Chromatography in Enzymatic Analysis 1-253 , 1987.
- Scott, W Liquid Chromatography Column Theory 175-212 ; 1992.
- Snyder, R.L and J.J. Kirkland Practical HPLC Method Development 1-260 , 1988.
- Tan, N.H. "Improvement of malayan Cobra (*Naja naja sputatrix*) Antivenin 21 75-79 ; 1983
- Weber, M and J.P. Chengeux "Binding of *Naja nigricollis* (³H) Toxin to Membrane Fragments from Electrophorus and Torpedo Electric Organ. Binding of the Tritiated Neurotoxin in the Absence of Effector," Mol Pharmacol 10 1-14 ; 1974
- Willard, H.H. and J.A. Dean. Instrumental Methods of Analysis 32-121 , 1965
- Yang, C.C "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms," Toxicon 1-43 ; 1974.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์พิษงูเห่าไทยด้วยวิธี แมสสเปกโตรเมตรี (Mass - Spectrometry , MS) ตามวิธีของ สวิตแมน และคนอื่น ๆ (Sweetman and others, 1992)

สารเคมี

1. พิษงูที่ผ่านการทำให้แห้ง lyophilized ในส่วนที่ IV ที่ได้จาก RP - HPLC
2. อะซิโตไนล์ เกรด HPLC
3. สารละลายกรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์

ชุดอุปกรณ์ของเครื่อง แมสสเปกโตรเมตรี

- 626 บีม (ชุดบีม)
- Manlynx 2 software (ชุดคอมพิวเตอร์)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำพิษงูส่วนที่ IV ที่ผ่านการทำให้แห้ง จำนวน 57 ไมโครกรัม ละลายใน 0.6 ลูกบาศก์เซนติเมตรของสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ซึ่งมีกรดฟอร์มิก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร)

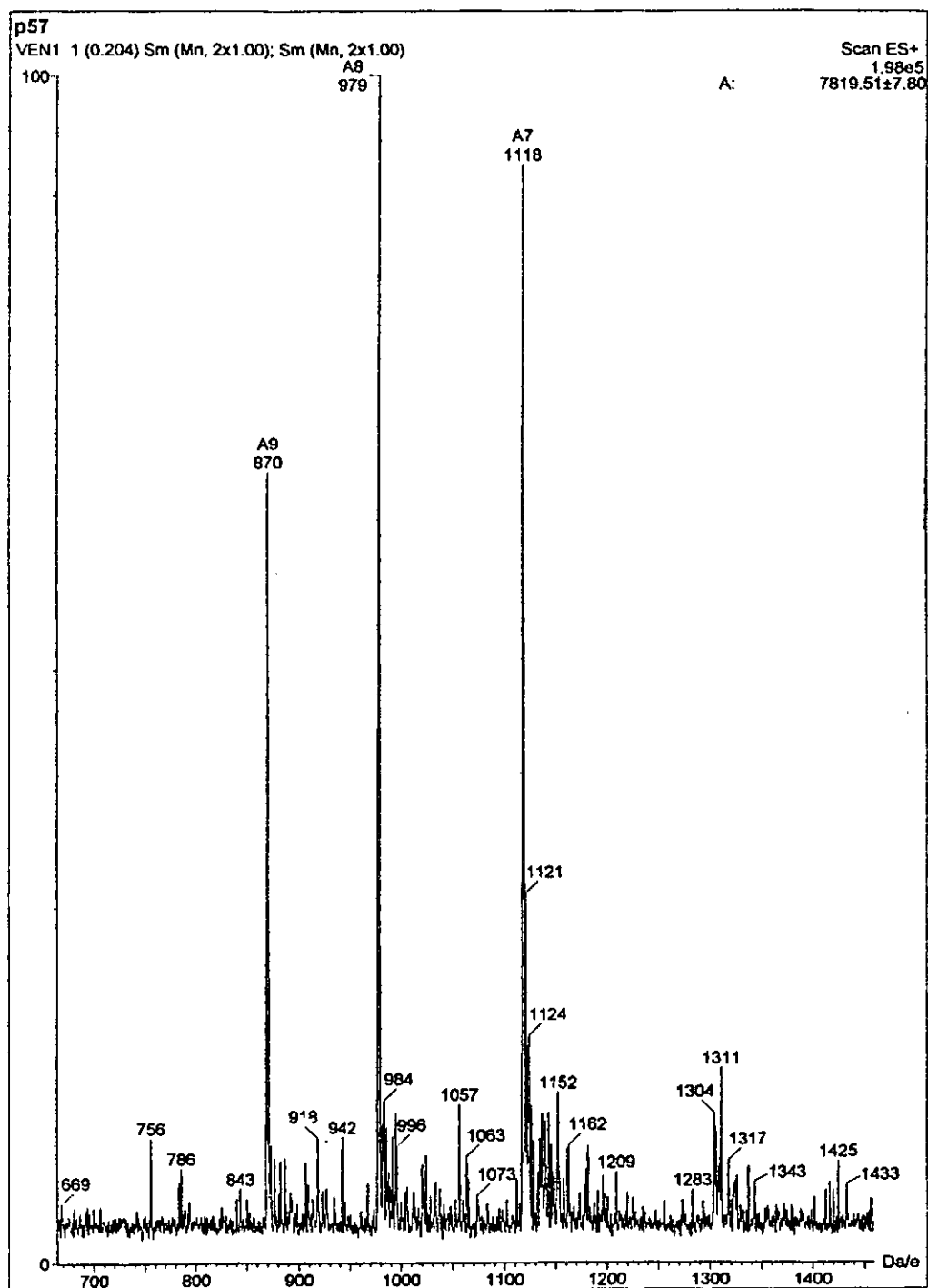
2. จัดสารละลายพิษงูที่เตรียมไว้ตามข้อ 1 เข้าไปในแหล่งกำเนิดไอออนโดยตรงของเครื่องแมสสเปกโตรเมตรี

3. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพิษงู ส่วนที่ IV ทำได้โดยผ่านสารละลายผสมระหว่างน้ำและอะซิโตไนล์ (1 : 1 โดยปริมาตร) ซึ่งมีกรดฟอร์มิก 1.0 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ด้วยอัตราการไหล 1 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อทำให้น้ำหนักโมเลกุลของพิษงู เกิดเป็นไอออนที่มีประจุบวก ซึ่งเรียกว่าไอออนโมเลกุล (molecular ion)

4. ไอออนที่มีประจุบวกที่เกิดขึ้นนี้ จะถูกเร่งด้วยความต่างศักย์ 33 และ 3700 โวลต์ โดย

ที่ไอออนจะมีความเร็วสูงขึ้น และเคลื่อนที่ผ่านช่องเล็ก ๆ เข้าสู่หน่วยวิเคราะห์ไอออน (analyser unit) ซึ่งจะแยกไอออนที่มีค่า m/e ต่างกันต่อไป และแมสสเปกตรัมจะถูกบันทึกไว้ ในที่สุดจะได้แมสสเปกตรัมของไอออนที่มีค่า m/e ต่าง ๆ กันเมื่อค่าความต่างศักย์เปลี่ยน

5. อุปกรณ์ที่ใช้บันทึก (recorder) และการนำเสนอสเปกตรัม โดยเราอาจจะวาดภาพ (scan) ของแมสสเปกตรัมจากค่า m/e ต่ำ ไปยังค่า m/e สูง คือช่วง m/e 800 ถึง m/e 1500 ในเวลา 10 นาที (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 22 สเปกตรัมแสดงมวลโมเลกุล ขององค์ประกอบของพืชส่วนที่ IV กลุ่มที่มีดอก
จันสมบุรณ์วิเคราะห์โดย แมสสเปกโตรเมตรี

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาว ภัทรี ชิตสกุล หนูณรงค์

เกิดวันที่ 12 เดือน ตุลาคม พุทธศักราช 2512

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 23/116 ซอยสิทธิชัย
แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ
กรุงเทพฯ 10800

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษาที่จบ
มัธยมศึกษาปีที่ 6	โรงเรียนปัญญาวรคุณ	พ.ศ. 2531
ค.บ. (เคมี)	วิทยาลัยครูจันทระเกษม	พ.ศ. 2535
วท.ม. (เคมีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	พ.ศ. 2538