

การแยกบริสุทธิ์และตรวจหาสมบัติของ สารออกฤทธิ์ต้านพิษงูเห่าในวุ้นพญางูตัวผู้

Purification and characterization of active ingredients containing cobra venom inhibiting activity in
Wanphayangoo Tuapoo (*Curcuma* sp.)

สุกัญญา เลื่อง¹⁾ ผศ.ดร.ศักดา ดาดวง^{*1)} รศ.ดร.นิสันต์ สัตยาชัย¹⁾ และ รศ.ดร.จินตนา สัตยาชัย²⁾

1) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น Email: sakdad@kku.ac.th, nison@kku.ac.th

2) ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น Email: sjinta@kku.ac.th

บทคัดย่อ

วุ้นพญางูตัวผู้เป็นสมุนไพรที่เชื่อว่าจะสามารถต้านพิษงูได้ ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารออกฤทธิ์ในวุ้นพญางูตัวผู้สามารถลดการจับกันของพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าได้ งานวิจัยนี้จึงนำวุ้นพญางูตัวผู้มาแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography ร่วมกับ Thin Layer Chromatography (TLC) และตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immunoblotting ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography พบว่าสารออกฤทธิ์นั้นถูกชะออกมาด้วย Ethanol แต่เมื่อศึกษาองค์ประกอบพบว่ายังไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้จึงทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC พบว่ามีแถบเดียวเท่านั้นบน TLC plate ที่สามารถลดการจับกันของพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า ซึ่งการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC สามารถทำให้สารออกฤทธิ์มีความบริสุทธิ์ขึ้นในระดับหนึ่ง

คำสำคัญ : สมุนไพร, พิษงู

1.บทนำ

การรักษาอาการของผู้ป่วยที่ถูกงูกัดในปัจจุบันใช้วิธีฉีดซีรัมแก่พิษงูให้กับผู้ป่วยทางเส้นเลือด ซีรัมที่ใช้เตรียมได้โดยฉีดพิษงูในม้าเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน การผลิตซีรัมต้องอาศัยความชำนาญและกระทำในสถานที่เฉพาะ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ และเพื่อให้ได้ซีรัมปริมาณมากจึงต้องกระทำในสัตว์ใหญ่ อีกทั้งซีรัมที่ใช้ในปัจจุบันทำให้ผู้ป่วยบางคนมีอาการแพ้เนื่องจากโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ในซีรัมของม้า (McQueen,1980) นอกจากนี้การรักษาด้วยซีรัมจำเป็นที่ผู้ป่วยจะต้องเดินทางไปยังโรงพยาบาลหรือสถานเฝ้าเลี้ยงที่มีซีรัม ซึ่งหากอยู่ห่างไกลผู้ป่วยอาจได้รับซีรัมไม่ทันและเสียชีวิตได้ จากความเชื่อที่ว่าสมุนไพรมีหลายชนิดที่สามารถแก้พิษงูและพิษของแมลงต่าง ๆ ได้ซึ่งถ้าหากสมุนไพรมีฤทธิ์ดังกล่าวสามารถต้านการออกฤทธิ์ของพิษงูได้จริง จะทำให้ผู้ป่วยที่ถูกงูกัดลด

อัตราการเสียชีวิตลงได้ เพราะประชาชนทั่วไปสามารถปลูกสมุนไพรมีฤทธิ์เองอีกทั้งวิธีใช้และการเก็บรักษาทำได้ง่ายกว่าการใช้ซีรัมจากม้า ดังนั้นจึงมีผู้สนใจตรวจหาสมุนไพรมีฤทธิ์ที่สามารถต้านพิษงูได้ (Cherdchu และคณะ, 1977 และ Cherdchu และคณะ, 1978) แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาสมุนไพรมีฤทธิ์ที่สามารถต้านพิษงูในอดีตจะใช้วิธีการที่ทดสอบกับอวัยวะแยกกล้ามเนื้อกระบังลมหนู (isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้ความชำนาญสูง ใช้เวลามาก สิ้นเปลืองและศึกษาสมุนไพรมีน้อยชนิด ดังนั้นจึงได้มีแนวคิดที่จะตรวจหาสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านพิษงูโดยดัดแปลงวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัดเวลากว่าและมีความน่าเชื่อถือสามารถตรวจหาสมุนไพรมีฤทธิ์ที่หลายชนิด จากการศึกษาค้นพบว่าวุ้นพญางูตัวผู้และวุ้นพญางูตัวผู้สามารถลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อ

พิษงูเห่าได้ (พจนัพร, 2541) มีการตรวจหาโปรตีนเป้าหมายในพิษงูเห่าที่จับกับสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Western immunoblotting พบว่าแถบโปรตีนขนาด 14, 23, 27 และ 70 กิโลดาลตัน (kDa) ในพิษงูเห่าจางหายไปเมื่อ incubate แผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารสกัดจากว่านพญาตัวเมีย, ว่านพญาตัวผู้, ว่านดินสอฤๅษี, ว่านขอมทองแก่, ขมิ้นขาว และปทุมมา (Tophrom, 2001 และ คมกฤช, 2544) นำสมุนไพรที่สามารถลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าด้วยวิธี ELISA และ Western immunoblotting มาทดสอบกับอวัยวะแยกกล้ามเนื้อกระบังลมหนู พบว่าสารสกัดจากว่านพญาตัวเมีย สามารถต้านฤทธิ์ของพิษงูเห่าได้ (Tophrom, 2001) แสดงว่าการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ Western immunoblotting เป็นวิธีขั้นต้นที่อาจนำมาใช้ในการตรวจหาสมุนไพรที่สามารถต้านการออกฤทธิ์ของพิษงูได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำว่านพญาตัวผู้มาทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography ร่วมกับ Thin Layer Chromatography (TLC) และตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immunoblotting

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากว่านพญาตัวผู้

นำว่านพญาตัวผู้มาสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของว่านพญาตัวผู้ต่อ 2 มิลลิลิตรของตัวทำละลาย ทำการปั่นโดยใช้ blender ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เก็บส่วน supernatant ซึ่งจะเป็นสารละลายสีเหลือง ในการสกัดจะใช้ตัวทำละลายตัวเดิมจนกว่า supernatant จะไม่มีสีเหลืองจึงสกัดด้วยตัวทำละลายตัวใหม่ ตัวทำละลายที่ใช้คือ Hexane, Chloroform และ Ethanol ตามลำดับ

2.2 Western immunoblotting

2.2.1 SDS-PAGE

การเตรียมเจล เตรียม 15% separating gel ด้วย Mini-proteanII Dual Slab Cell Bio-Rad, U.S.A. โดยมีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมงเพื่อให้ separating gel เกิด polymerization อย่าง

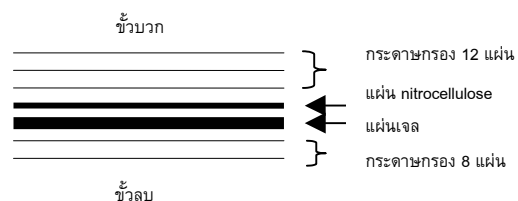
สมบูรณ์ เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้วเท 4% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel ตั้งทิ้งไว้ให้ stacking gel เกิด polymerization อย่างน้อย 30 นาที (Laemmli, 1970)

เตรียมตัวอย่างพิษงู พิษงูที่ใช้เป็นพิษงูเห่าแห้ง (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย) นำพิษงูเห่าแห้งมาละลายในน้ำแล้วผสมกับ 1x solubilizing buffer ที่ไม่มี β -mercaptoethanol (Laemmli, 1970)

การแยกโปรตีนในพิษงู นำพิษงูหรือ marker ที่ผสมกับ 1x solubilizing buffer มา load บน stacking gel โดยปรับปริมาตรให้เป็น 10 μ L ทุกหลุม พิษงูมีปริมาณโปรตีนรวมหลุมละ 3 μ g/10 μ L ส่วนหลุมของ marker มีปริมาณ 1 μ L/10 μ L จากนั้นนำชุดของเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งส่วนบนและล่างของ chamber เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 150 V ไปเรื่อย ๆ จนแถบสีของ 1x solubilizing buffer เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

2.2.2 Western transfer

ทำการ transfer โปรตีนจากแผ่นเจลผ่านการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ไปยังแผ่น nitrocellulose โดยจัดวางแผ่นเจลและอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังรูป



ทั้งแผ่น nitrocellulose และกระดาดขกรองต้องชุ่มด้วย transfer buffer จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปโดยให้มีความต่างศักย์คงที่ที่ 160 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โปรตีนบนแผ่นเจลจะถูก transfer ไปอยู่บนแผ่น nitrocellulose (Vaessen และคณะ, 1981)

2.2.3 การตรวจหาโปรตีนโดยใช้หลักการ

immunoblotting

หลังจากการทำ Western transfer แล้ว ทำการตรวจ

หาโปรตีนด้วยวิธี immunoblotting (Daduang และคณะ, 1998) โดยนำแผ่น nitrocellulose ไปแช่ในสารละลาย blocking solution เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4°C ข้ามคืน ตัดแผ่น nitrocellulose เป็นแถบยาวแล้วนำแต่ละแถบไป incubate กับสารสกัดจากสมุนไพรรซึ่งเจือจางใน PBS buffer pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแถบ nitrocellulose ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที พร้อมเขย่า แล้วนำแถบ nitrocellulose มา incubate กับ Globulin refined horse anti venom antibody ซึ่งเจือจาง 1:100 ใน TBST buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแถบ nitrocellulose ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที พร้อมเขย่า แล้วนำไป incubate ด้วย Rec-Protein G linked alkaline phosphatase ซึ่งเจือจาง 1:500 ใน TBST buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแถบ nitrocellulose ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที พร้อมเขย่า แล้วล้างต่อด้วย TBS buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที พร้อมเขย่า แช่แถบ nitrocellulose ใน substrate buffer pH 9.5 เป็นเวลา 30 วินาที 2 ครั้งพร้อมเขย่า เติม substrate solution (NBT และ BCIP ใน substrate buffer pH 9.5) ลงไปบนแถบ nitrocellulose เขย่าจนปรากฏแถบสีม่วงของโปรตีนชัดเจนจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

2.3 Thin Layer Chromatography (TLC)

ซึ่ง silica gel GF 254 มาละลายน้ำในอัตราส่วน 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตัก silica gel ลงบนกระจกสไลด์แล้วเคาะให้ silica gel กระจายเสมอทั่วแผ่น สำหรับ TLC plate แผ่นใหญ่ทำได้โดยใช้เครื่อง CAMAG TLC Plate coater, hand operator จากนั้นนำไปอบที่ 80°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เตรียม mobile phase คือ chloroform เทลงไปใน developing chamber ปิดฝาแล้วตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ใช้หลอด capillary ดูดเอาสารสกัดจากสมุนไพรมานำ spot บน TLC plate อย่างน้อย 5 ครั้งต่อ 1 ตำแหน่ง โดยหยดแล้วรอให้ spot แห้งจึงหยดซ้ำ วาง TLC plate ใน developing chamber ปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้จนกระทั่ง solvent front เคลื่อนที่ไปจนเกือบถึงปลาย

บนของ TLC plate จึงยกออก ชีตตำแหน่ง solvent front จากนั้นนำไปสังเกตภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 nm.

2.4 Column Chromatography

เตรียม column ขนาด 1.5 x 30 เซนติเมตร ใส่ตัวทำละลายเข้าไปใน column แล้วใส่ใยแก้วในปริมาณที่เหมาะสมพร้อมทั้งดันเบา ๆ ด้วยแท่งแก้วจนกระทั่งใยแก้วติดอยู่ที่ก้น column ใส่ Stationary phase (เฟสคงที่) ให้สูงประมาณ 10-20 เซนติเมตร ตัดกระดาษกรองเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ column ปิดผิวหน้าของเฟสคงที่ ปล่ยตัวทำละลายออกจนเหลือพอดีกับผิวหน้าของเฟสคงที่ ใส่สารสกัดจากวุ้นพญางูตัวผู้ แล้วเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกจนเหลือพอดีกับผิวหน้าของเฟสคงที่ จากนั้นชะสารตัวอย่างออกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมและเก็บ fraction เพื่อนำไปตรวจสอบสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immunoblotting

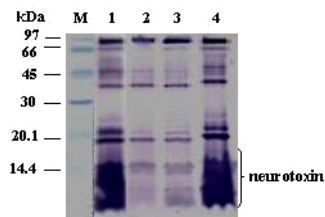
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 การสกัดและตรวจสอบสารออกฤทธิ์จากวุ้นพญางูตัวผู้

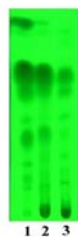
ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากวุ้นพญางูตัวผู้ด้วย Hexane, Chloroform และ Ethanol ตามลำดับ แล้วตรวจสอบสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immunoblotting พบว่าสารออกฤทธิ์นั้นถูกสกัดออกมาใน Hexane และ Chloroform (รูปที่ 1) จากนั้นศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดใน Hexane (Crude 1), Chloroform (Crude 2) และ Ethanol (Crude 3) ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (รูปที่ 2) ซึ่งพบว่า Crude 2 มีสารที่เป็นองค์ประกอบน้อยกว่า Crude 1

3.2 แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography ร่วมกับ Thin Layer Chromatography (TLC)

การแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography โดยมี Amberlite XAD-7 HP เป็น stationary phase และ mobile phase คือ double distilled water (DDW), 50% Ethanol และ Ethanol ตามลำดับ การเก็บ fraction จะสังเกตสีของแต่ละ fraction ที่ต่างกันเมื่อชะด้วย mobile phase แต่ละชนิด โดยนำ Crude 2 มาทำ

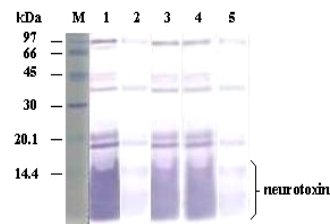


รูปที่ 1 การนำสารสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดมาตรวจหาสารออกฤทธิ์ที่สามารถลดการจับกันของพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane1 คือ พิษงูเห่าที่ไม่ได้ incubate กับสารสกัดจากวุ้นงูตัวผู้, Lane2 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 1, Lane3 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 2 และ Lane4 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 3

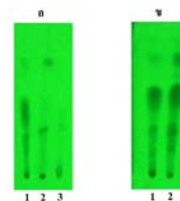


รูปที่ 2 ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิดโดยวิธี TLC โดย Lane 1 คือ Crude 1, Lane 2 คือ Crude 2, Lane 3 คือ Crude 3

การแยกบริสุทธิ์และตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immunoblotting (รูปที่ 3) แล้วศึกษาองค์ประกอบของสารที่ถูกชะด้วย mobile phase แต่ละชนิดด้วยวิธี TLC (รูปที่ 4) พบว่ายังไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ จากนั้นนำ Crude 1 มาแยกบริสุทธิ์ พบว่าไม่สามารถเก็บ fraction จากการสังเกตสี เนื่องจากการจางลงของสีเมื่อ load ลงใน column จึงชะด้วย mobile phase ปริมาตร 3 เท่าของความสูงของ stationary phase แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 nm (ตารางที่ 1) และรวม fraction ได้ดังนี้คือ fraction 2-5 (ชะด้วย DDW), 15-18 (ชะด้วย 50% Ethanol), 28-30 (ชะด้วย Ethanol) และ 31-34 (ชะด้วย Ethanol) แล้วตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immunoblotting (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 แยกบริสุทธิ์ crude 2 ด้วยวิธี column chromatography โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane1 คือ พิษงูเห่าที่ไม่ได้ incubate กับสารสกัดจากวุ้นงูตัวผู้, Lane2 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 2, Lane3 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารที่ถูกชะด้วย DDW, Lane4 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารที่ถูกชะด้วย 50% Ethanol, Lane5 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารที่ถูกชะด้วย Ethanol



รูปที่ 4 ศึกษาองค์ประกอบของสารที่ชะด้วย mobile phase แต่ละชนิด โดย (รูป ก) Lane1 คือ Crude 2, Lane2 คือ สารที่ถูกชะออกมาด้วย DDW, Lane3 คือ สารที่ถูกชะออกมาด้วย 50% Ethanol, (รูป ข) Lane1 คือ Crude 2, Lane2 คือ สารที่ถูกชะออกมาด้วย Ethanol

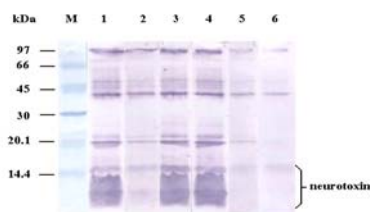
เนื่องจากการแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography ยังไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC โดยนำ Crude 2 มาแยกบริสุทธิ์ (รูปที่ 6) ทำการสกัดสารออกฤทธิ์จาก TLC plate ด้วย Ethanol แล้วตรวจหาสารออกฤทธิ์ (รูปที่ 7) และนำ Crude1 มาแยกบริสุทธิ์ (รูปที่ 8) ทำการสกัดสารออกฤทธิ์จาก TLC plate ด้วย Ethanol แล้วตรวจหาสารออกฤทธิ์ (รูปที่ 9)

4. สรุปผลการทดลอง

วุ้นงูตัวผู้เป็นสมุนไพรที่สามารถลดการจับกันของพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าเมื่อศึกษาดังวิธี

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 350 นาโนเมตร ของ crude 1 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography

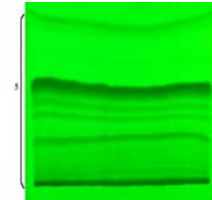
fraction	A ₃₅₀	fraction	A ₃₅₀	fraction	A ₃₅₀
1	0.002	14	0.001	27	0.007
2	2.201	15	0.009	28	0.089
3	2.054	16	0.014	29	0.157
4	0.110	17	0.006	30	0.124
5	0.022	18	0.008	31	0.073
6	0.009	19	0.010	32	0.047
7	0.005	20	0.010	33	0.035
8	0.002	21	0.010	34	0.031
9	0.001	22	0.010	35	0.021
10	0.001	23	0.009	36	0.017
11	0.001	24	0.008	37	0.014
12	0.001	25	0.008	38	0.013
13	0.001	26	0.008	39	0.009



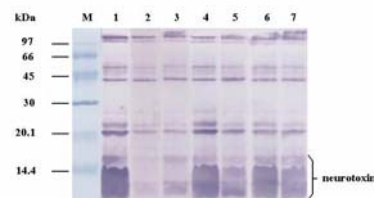
รูปที่ 5 แยกบริสุทธิ์ crude 1 ด้วยวิธี column chromatography โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane1 คือ พิษงูเห่าที่ไม่ได้ incubate กับสารสกัดจาก วานพญาตัวผู้, Lane2 คือพิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 1, Lane3 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัด fraction รวม 2-5, Lane4 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ สารสกัด fraction รวม 15-18, Lane5 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัด fraction รวม 28-30, Lane6 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัด fraction รวม 31-34

ELISA การที่ทำให้วานพญาตัวผู้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จนสามารถนำไปหาโครงสร้างโมเลกุลได้นั้นย่อมมีประโยชน์ต่อการศึกษานในอนาคต จึงได้ทำการสกัดและแยกบริสุทธิ์หาสารออกฤทธิ์ในวานพญาตัวผู้พร้อมกับตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western immuno blotting โดยขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยตัวทำ

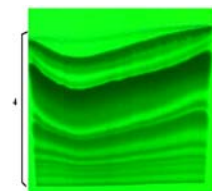
ละลายแต่ละชนิดและตรวจหาสารออกฤทธิ์ พบว่าสารออกฤทธิ์ถูกสกัดออกมาใน Hexane และ Chloroform จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography นำสารสกัดด้วย Chloroform มาแยกบริสุทธิ์



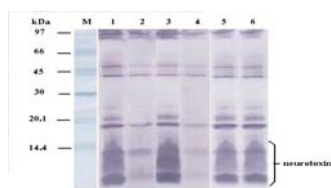
รูปที่ 6 การแยกบริสุทธิ์ Crude 2 ด้วยวิธี TLC หลังจากการแยกได้แบ่งแถบสารออกเป็นแถบหลัก 5 แถบ เพื่อนำไปสกัดออกมาทดสอบ



รูปที่ 7 ตรวจหาสารออกฤทธิ์ที่สามารถลดการจับกันของพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า เมื่อแยกบริสุทธิ์ Crude 2 ด้วยวิธี TLC โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane1 คือ พิษงูเห่าที่ไม่ได้ incubate กับสารสกัดจากวานพญาตัวผู้, Lane2 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 2, Lane3 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 1, Lane4 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 2, Lane5 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 3, Lane6 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 4, Lane7 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 5



รูปที่ 8 การแยกบริสุทธิ์ Crude 1 ด้วยวิธี TLC หลังจากการแยกได้แบ่งแถบสารออกเป็นแถบหลัก 4 แถบ เพื่อนำไปสกัดออกมาทดสอบ



รูปที่ 9 แยกบริสุทธิ์ Crude 1 ด้วยวิธี TLC โดย Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane1 คือ พิษงูเห่าที่ไม่ได้ incubate กับสารสกัดจากงูพิษงูตัวผู้, Lane2 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับ Crude 1, Lane3 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 1, Lane4 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 2, Lane5 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 3, Lane6 คือ พิษงูเห่าที่ incubate กับสารสกัดแถบที่ 4

พบว่าสารออกฤทธิ์ถูกชะออกมาด้วย Ethanol และเมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารที่ถูกชะในแต่ละ phase พบว่ายังไม่สามารถที่จะแยกให้บริสุทธิ์ได้อาจเนื่องจากการยังไม่เหมาะสม แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดด้วย Hexane นำแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 nm พบว่าสารออกฤทธิ์ถูกชะออกมาด้วย Ethanol เช่นเดียวกับสารสกัดด้วย Chloroform เนื่องจากวิธีการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography ยังไม่เหมาะสม จึงนำมาแยกบริสุทธิ์สารด้วยวิธี TLC พบว่าทั้งสารสกัดด้วย Hexane และ Chloroform มีแถบสารเพียง 1 แถบเท่านั้นที่มีสารออกฤทธิ์ ถึงแม้ว่าวิธี TLC สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้แต่ปริมาณสารที่ได้มีน้อยอาจไม่พอสำหรับการนำไปหาโครงสร้างทางเคมี จึงควรศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

คมกฤษ อรุณฉายพงศ์, การตรวจหาโปรตีน เป้าหมายในพิษงูเห่าที่ถูกลดการจับกับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าด้วยสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร โดยใช้วิธี Western immunoblotting. รายงานโครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. **2544**.

พจนันพร สุธาวา, การหาสมุนไพรที่มีสารซึ่งสามารถจับกับพิษงูเห่าได้. รายงานโครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. **2541**.

Cherdchu, C.; Poopyruchpong, N.; Adcharyasucha, R. and Ratanabanangkoon, K., . The absence of antagonism between extracts of *Clinacanthus nutans* Burm. and *Naja naja siamensis* venom. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **1977**, 8(2), 249-254.

Cherdchu, C., Srisukawat, K. and Ratanabanangkoon, K., . Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). *J Med Assoc Thai*, **1978**, 61(9), 544-554.

Daduang, S., Kimura, K., Nagata, S. and Fukui, Y., Density dependent elevation of phosphatidylinositol-3 kinase level in rat 3Y1 cells. *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1401(1), 113-120.

Laemmli, U.K., . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227(259), 680-685.

McQueen, E.G. Chapter 7 Pharmacology of polypeptides toxins in snake venoms. *Annu. Rev. Pharmacol.* **1972**, 12, 265-281.

Tophrom, P. Study of the extract form *Curcuma* sp. Containing cobra venom inhibiting activity. A thesis for the degree of master of science. Khonkaen University. **2001**

Vaessen, R.T., Kreike, J. and Groot, G.S., . Protein transfer to nitrocellulose filters. A simple method for quantitation of single proteins in complex mixtures. *FEBS Lett*, **1981**, 124(2), 193-196.