การทำให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ

นางสาว พูลศิริ พฤกษ์กานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-679-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19196982 17 ก.ค. 2545

# PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF PEPTIDES FROM SINUS GLAND OF *Penaeus monodon*

Miss Poolsiri Prukkanone

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-679-1

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การทำให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ |
| โดย | นางสาว พูลศิริ พฤกษ์กานนท์ |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีทางชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี) | รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม))

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วีไลวัลย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

พูลศิริ พฤกษ์กานนท์ : การทำให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ (PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF PEPTIDES FROM SINUS GLAND OF *Penaeus monodon*) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อมร เพชรสม, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, 115 หน้า. ISBN 974-334-679-1.

การแยกสารเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ ทำโดยผ่าตัดต่อมไซนัสจากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 1,000 ตา นำมาบดละเอียดในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90:1:9) หลังจากนำสารสกัดผ่าน C18 Sep-Pak cartridge นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC 2-3 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ C18, C8 และ Cyano และระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ acetonitrile / trifluoroacetic acid และ acetonitrile / heptafluorobutyric acid การติดตามสารเปปไทด์ในระหว่างการแยกบริสุทธิ์ใช้วิธีดูจากโครมาโตแกรมที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร และ Dot-ELISA โดยใช้แอนติบอดี 4 ชนิด ได้แก่ mouse anti-crustacean hyperglycemic hormone (CHH) antiserum, rabbit anti-human pancreatic polypeptide c-terminal hexapeptide (PP6) antiserum, rabbit anti β-pigment dispersing hormone (PDH) antiserum, mouse anti-FMRFamide monoclonal antibody (FM-23), mouse anti-KNEFIRFamide monoclonal antibody (AF1-62) และ mouse anti-KNEYLRFamide monoclonal antibody (AF2-32) จากแฟรคชั่น 29 แฟรคชั่น ของ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 สามารถทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ได้ 99 ตัวอย่าง ซึ่งจากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 932.6-9,103.1 ดาลตัน ตัวอย่างที่แยกได้เกือบทั้งหมดมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างจากสารเปปไทด์ที่รายงานในกุ้งกุลาดำ, กุ้งคุรุมา และ กุ้งก้ามกราม จึงคาดว่าสารเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ได้นี้ส่วนใหญ่น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของสารเปปไทด์ที่เคยรายงานมาก่อน

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....พูลศิริ.....พฤกษ์กานนท์.....

สาขาวิชา ..เทคโนโลยีทางชีวภาพ.. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 3971250923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Penaeus monodon* / NEUROPEPTIDE / SINUS GLAND

POOLSIRI PRUKKANONE : PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF PEPTIDES FROM SINUS GLAND OF *Penaeus monodon*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D., 115 pp. ISBN 974-334-679-1

Isolation of peptides from sinus glands of *Penaeus monodon* was performed by dissecting out of sinus glands from the 1,000 eyestalks before extracting in methanol-acetic acid–water (90:1:9). The extract was partially purified using C18 cartridge and was further purifiec by 2 to 3 steps of RP-HPLC using 3 types of columns i.e. C18, C8 and Cyano and 2 solvent systems i.e. acetonitrile / trifluoroacetic acid, acetonitrile / heptafluorobutyric acid. The chromatograms were detected at the absorbance of 215 nm. During each step of purification, the peptides were assayed by Dot-ELISA against 4 antibodies specific to different peptides : mouse anti-crustacean hyperglycemic hormone (CHH) antiserum, rabbit anti-human pancreatic polypeptide c-terminal hexapeptide (PP6) antiserum, rabbit anti β-pigment dispersing hormone (PDH) antiserum and combination of monoclonal antibodies made against FMRFamide (FM-23), KNEFIRFamide (AF1-62) and KNEYLRFamide (AF2-32). Ninety nine fractions of pure peptide were obtained from the twenty nine fractions of the first step of HPLC. The molecular weight of the peptides determined by MALDI-TOF mass spectrometry were ranging from 932.6 to 9103.1 daltons. Most of the peptides were different from previous peptides reported in *Penaeus monodon*, *Penaeus japonoicus* and *Macrobrachium rosenbergii*. Therefore, almost all of the peptides obtained from this study are expected to be different sequences from those previously reported.

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....พลศิริ.....พฤกษ์กานนท์...

สาขาวิชา ..เทคโนโลยีทางชีวภาพ.. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.อมร เพชรสม ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้แนวความคิด คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยรวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ และ ผศ.ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณะผู้บริหารและบุคคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีทางชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สถานที่ และสารเคมีในการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล คุณศิวาพร ลงยันต์ คุณจีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม คุณศิริรัตน์ สมพันธุ์ และคุณจันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อรวรรณ สัตยาลัย ภาควิชาชีววิทยา และบุคคลากรทุกท่านในโรงเพาะเลี้ยง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสถานที่ในการเลี้ยงและตัดตากุ้ง

ขอขอบคุณ ดร.อรพร หมื่นพล ที่กรุณาให้คำแนะนำอันมีคุณค่ายิ่งต่อการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้องๆ ที่สถาบันเทคโนโลยีทางชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาในด้านการเงิน รวมทั้งขอบคุณน้องชาย ที่ให้ความเข้าใจ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ที่เป็นกำลังอันสำคัญยิ่งต่อผู้วิจัยตลอดมา และขอขอบคุณผู้ที่ช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ในที่นี้

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี..... 4

2.2 ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ..... 8

2.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 13

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 28

3.1 สัตว์ทดลอง..... 28

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 28

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 30

3.3.1 การเก็บรวบรวมต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ..... 30

3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ..... 30

3.3.3 การทำให้บริสุทธิ์ของสารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC..... 31

3.3.4 การตรวจหาสารเปปไทด์โดยวิธี Dot-ELISA..... 32

3.3.5 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS..... 33

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการวิจัย..... 36

5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... 93

รายการอ้างอิง..... 104

ภาคผนวก..... 112

ประวัติผู้เขียน..... 115

# สารบัญตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ CHH/MIH/GIH ในสัตว์พวกครัสตาเซียนต่างๆ..... | 20 |
| 2.2 | การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ FMRFamide ในสัตว์พวกครัสตาเซียนต่างๆ..... | 26 |
| 4.1 | ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของสารเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC .... | 88 |
| 5.1 | สารคล้าย FMRFamide..... | 97 |
| 5.2 | สารคล้าย CHH..... | 98 |
| 5.3 | สารคล้าย CHH และ FMRFamide..... | 99 |
| 5.4 | สารคล้าย PDH..... | 100 |
| 5.5 | สารคล้าย PDH และ PP6..... | 101 |
| 5.6 | สาร Unknown..... | 101 |

# สารบัญภาพ


| ภาพประกอบ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | ระบบต่อมไร้ท่อของสัตว์พวกครัสตาเซียน | 5 |
| 2.2 | ตา และ ก้านตา ของกุ้ง *Palaemon* | 5 |
| 2.3 | โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ | 10 |
| 2.4 | ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย | 12 |
| 3.1 | ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ | 32 |
| 3.2 | ขั้นตอนการทำ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Link Immunosorbant Assay) | 35 |
| 4.1 | โครมาโตแกรมของสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำจำนวน 1,000 ต่อม หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก และแผนภูมิแท่งแสดงแฟรคชั่นที่พบสารคล้าย FMRFamide และ CHH | 37 |
| 4.2 | Dot-ELISA ของสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก (ก) สารคล้าย FMRFamide (ข) สารคล้ายCHH | 38 |
| 4.3 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชั่นที่ 19 ถึง แฟรคชั่นที่ 23 | 43 |
| 4.4 | โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP19.29 (1), SGP19.36 (2) และ SGP19.42 (3) | 44 |
| 4.5 | โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP19.46 (1), SGP20.29 (2) และ SGP20.48 (3) | 45 |
| 4.6 | โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP21.34 (1), SGP21.38 (2) และ SGP21.39 (3) | 46 |
| 4.7 | โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP23.31 (1) และ SGP23.41 (2) | 47 |
| 4.8 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชั่นที่ 25 ถึง แฟรคชั่นที่ 30 | 48 |
| 4.9 | โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP25.36 (1) และ SGP26.45 (2) | 49 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


ภาพประกอบ หน้า

4.10 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP28.34 (1), SGP28.35 (2) และ SGP28.36 (3)..... 50

4.11 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP30.35 (1), SGP30.41 (2) และ SGP31.24 (3)..... 51

4.12 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชั่นที่ 31 ถึง แฟรคชั่นที่ 34..... 52

4.13 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP31.25 (1), SGP31.32 (2) และ SGP31.33 (4)..... 53

4.14 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP32.30 (1) และ SGP32.31 (2)..... 54

4.15 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP33.24 (1), SGP33.30 (2) และ SGP33.31 (3)..... 55

4.16 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP33.39 (1), SGP34.22 (2) และ SGP34.28 (3)..... 56

4.17 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชั่นที่ 35 ถึง แฟรคชั่นที่ 39..... 57

4.18 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP34.30 (1), SGP35.20 (2) และ SGP35.24 (3)..... 58

4.19 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP35.39 (1), SGP36.36 (2) และ SGP36.37 (3)..... 59

4.20 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP36.41 (1) และ SGP36.42 (2)..... 60

4.21 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP37.22 (1), SGP37.24 (2) และ SGP37.25 (3)..... 61

4.22 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเบบไทด์ (ข) SGP37.32 (1), SGP37.39 (2) และ SGP38.25 (3)..... 62

# สารบัญภาพ (ต่อ)


ภาพประกอบ หน้า

4.23 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP38.29 (1), SGP38.43 (2) และ SGP38.44 (3)..... 63

4.24 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP38.47 (1) และ SGP39.29 (2)..... 64

4.25 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชั่นที่ 40 ถึง แฟรคชั่นที่ 42..... 65

4.26 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP40.23 (1) และ SGP40.41 (2)..... 66

4.27 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP40.40.32 (1), SGP40.40.33 (2) และ SGP40.40.34 (3)..... 67

4.28 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP41.39 (1), SGP41.40 (2) และ SGP41.41 (3)..... 68

4.29 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP41.42 (1), SGP42.34 (2) และ SGP42.36 (3)..... 69

4.30 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP42.37 (1), SGP42.39 (2) และ SGP42.41 (3)..... 70

4.31 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชั่นที่ 43 ถึง แฟรคชั่นที่ 46..... 71

4.32 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP43.22 (1) และ SGP43.40 (2)..... 72

4.33 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP45.23 (1), SGP45.24 (2) และ SGP45.27 (3)..... 73

4.34 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP45.28 (1) และ SGP45.35 (2)..... 74

4.35 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP46.29 (1), SGP46.39 (2) และ SGP47.31 (3)..... 75

# สารบัญภาพ (ต่อ)


ภาพประกอบ หน้า

4.36 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของ แฟรคชั่นที่ 47 ถึง แฟรคชั่นที่ 48 ..... 76

4.37 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP47.36 (1), SGP47.37 (2) และ SGP47.38 (3) ..... 77

4.38 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP47.39 (1), SGP47.40.22 (2) และ SGP47.40.24 (3) ..... 78

4.39 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP48.39.26 (1) และ SGP48.39.27 (2) ..... 79

4.40 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP48.41.29 (1), SGP48.41.30 (2) และ SGP48.41.31 (3) ..... 80

4.41 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP48.45 (1) และ SGP49.38 (2) ..... 81

4.42 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของ แฟรคชั่นที่ 49 ถึง แฟรคชั่นที่ 52 ..... 82

4.43 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP49.39.26 (1), SGP49.39.27 (2) และ SGP49.39.28 (3) ..... 83

4.44 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP49.41.27 (1) และ SGP49.41.28 (2) ..... 84

4.45 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP49.41.29 (1) และ SGP49.41.30 (2) ..... 85

4.46 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP50.34 (1), SGP50.37 (2) และ SGP50.38 (3) ..... 86

4.47 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข) SGP51.34 (1), SGP51.38 (2) และ SGP51.41 (3) ..... 87