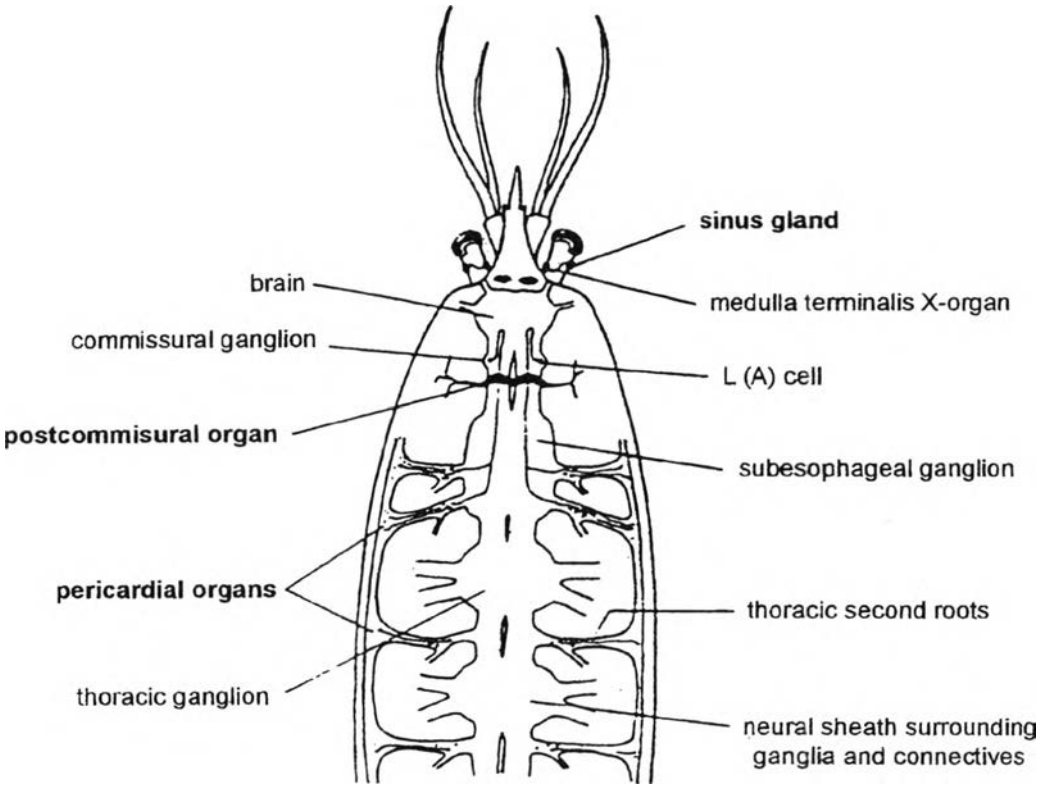
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

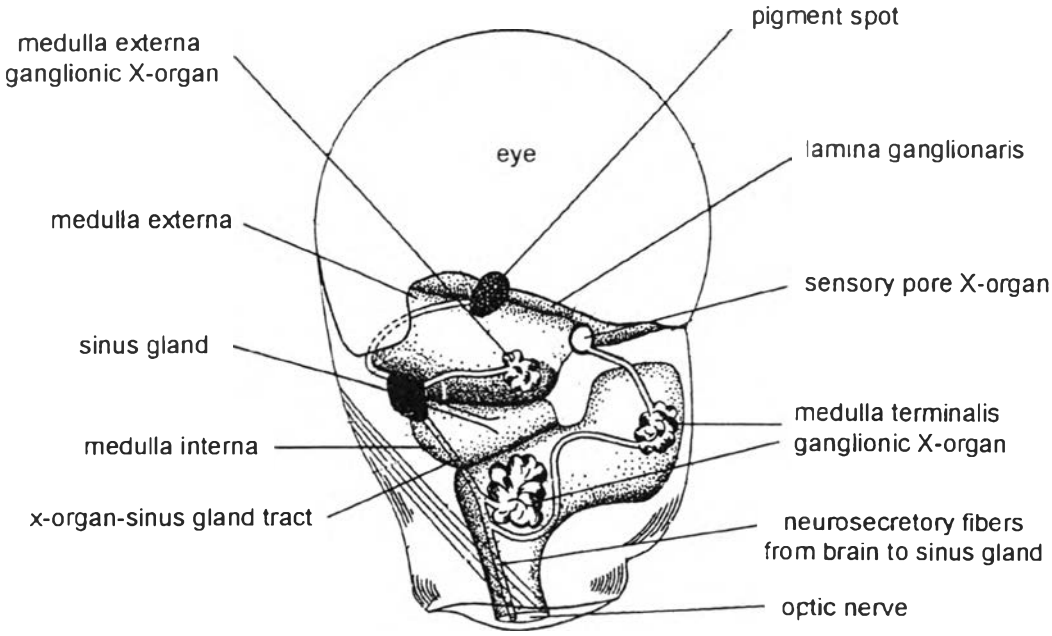
การควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน (crustacean) โดยเฉพาะพวกเดคาพอด (decapod) เช่น กุ้ง ปู กั้ง และ crayfish ส่วนหนึ่งจะมีการควบคุมโดยระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ซึ่งประกอบด้วย neurosecretory cell และ neurohemal organ โดยที่ neurosecretory cell จะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ผลิตและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่สร้างขึ้นไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยฮอร์โมนจะลำเลียงไปตามกระแสเลือดหรือฮีโมลิมป์ (hemolymph) สำหรับต่อมไร้ท่อที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน (ภาพประกอบ 2.1) ได้แก่ X-organ ในก้านตา (eyestalk) ประกอบด้วย neurosecretory cell ซึ่งเป็นแหล่งสร้างนิวโรฮอร์โมนและส่งไปสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland) Postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งสะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งที่สะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบ (molting hormone) Androgenic gland เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญของอวัยวะเพศผู้ และ รังไข่ (ovary) เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman,1987)

ในก้านตาที่เพิ่งตัดใหม่ๆจะมองเห็นต่อมไซนัสเป็นโครงสร้างสีขาวอยู่ที่ผิวของปมประสาทตา (optic ganglia) บริเวณส่วนบนหรือด้านข้างของส่วนบน ในระดับของ medulla interna และ medulla externa (Cooke and Sullivan,1982) ต่อมไซนัส จัดเป็น neurohemal organ ที่สำคัญในก้านตา ประกอบด้วยส่วนปลายของเส้นใยประสาทแอกซอนที่พองออก ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากตัวเซลล์ประสาทที่ตั้งอยู่ในที่ต่าง ๆ ภายในปมประสาทก้านตา ตัวเซลล์ประสาทรวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า X-organ โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปเพื่อระบุตำแหน่ง เช่น Medulla Terminalis Ganglionic X-organ (MTGX) หรือ Sensory pore X-organ (SPX) เป็นต้น (ภาพประกอบ 2.2) สารที่สร้างขึ้นภายในตัวเซลล์ประสาทเคลื่อนไปตามแอกซอนไปสิ้นสุดที่ต่อมไซนัส แล้วจึงปล่อยเข้าสู่ฮีโมลิมป์ (Carlisle and Knowles,1959)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบ 2.1 ระบบต่อมไร้ท่อของสัตว์พวกครัสตาเซียน (Beltz,1988)



ภาพประกอบ 2.2 ตา และ ก้านตา ของกุ้ง *Palaemon* (Carlisle and Knowles,1959)

ต่อมไซนัสเป็นต่อมที่สำคัญในการสะสมและปล่อยนิวโรฮอร์โมนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น ฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว (red pigment concentrating hormone - RPCH) (Fernlund and Josefsson,1972) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์ (pigment dispersing hormone - PDH) (Fernlund,1976 ; Kleinholz and others,1986) ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (crustacean hyperglycemic hormone - CHH) (Huberman and Aguilar,1986) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone - MIH) (Chang, Bruce and Newcomb,1987) และ ฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (vitellogenesis inhibiting hormone - VIH or gonad inhibiting hormone - GIH) (Soyez, Deijnen and Martin,1987)

Red pigment concentrating hormone (RPCH) เป็น crustacean neuropeptide ตัวแรกที่ทราบโครงสร้างอย่างสมบูรณ์ โดยแยกจากก้านตาของกุ้ง *Pandalus borealis* (Fernlund and Josefsson,1968) มีโครงสร้างเป็น octapeptide น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 ดาลตัน มีบทบาทในการควบคุมรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว นิวโรเปปไทด์ตัวต่อมาที่ทราบโครงสร้างคือ Pigment dispersing hormone (PDH) ซึ่งได้ศึกษาการแยกและหาลำดับการดอะมิโนจากก้านตาของกุ้ง *Pandalus borealis* (Fernlund,1976) พบว่าเป็น octadecapeptide ทำหน้าที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์

ในช่วงระยะสิบปีที่ผ่านมามีผู้ให้ความสนใจกับ CHH, MIH และ VIH เป็นอย่างมาก โดยนิวโรฮอร์โมนทั้งสามจัดอยู่ในเปปไทด์ตระกูลเดียวกัน เรียกว่า CHH/MIH/VIH Family ซึ่งมีลักษณะร่วมกันดังนี้ 1). มีซิสเตอีน 6 หน่วย ในตำแหน่งเดียวกัน

2). เกิดพันธะไดซัลไฟด์ ที่ตำแหน่ง C^{7}-C^{43}, C^{23}-C^{39}, C^{26}-C^{52}

3). ความยาวของสายเปปไทด์ประกอบด้วย กรดอะมิโน 72-78 หน่วย

4).มีกรดอะมิโนที่เหมือนกันอยู่จำนวนมาก (Van Herp,1998)

CHH เป็นฮอร์โมนที่มีอยู่มากในต่อมไซนัส มีบทบาทในกระบวนการเมตาบอลิสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งโครงสร้างปฐมภูมิของ CHH ตัวแรกศึกษาได้จาก *Carcinus maenas* ต่อมาได้มีการแยกสกัดและศึกษาโครงสร้างของ CHH ในครัสตาเซียนอีกหลายสปีชีส์ พบว่า CHH เป็นสารประเภทโพลีเปปไทด์ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 72 หน่วย มีซิสเตอีน 6 หน่วยทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8,000–9,000 ดาลตัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสัตว์พวกครัสตาเซียนแต่ละชนิด โดยมีความแตกต่างกันในส่วนประกอบและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน ในสัตว์สปีชีส์เดียวกันอาจมี CHH ได้

หลายรูปแบบ (polymorphism) เช่น *Homarus americanus* พบ CHH 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 และรูปแบบที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล 8,655 ± 25 ดาลตัน (Tensen and others,1991) โครงสร้างปฐมภูมิของนิวโรเปปไทด์ที่มีทั้ง molt-inhibiting และ hyperglycemic activity อธิบายไว้ใน *H. americanus* (Chang, Prestwich and Bruce,1990) และ *Penaeus japonicus* (Yang and others,1996) ส่วน putative MIH ซึ่งมีผลในการยับยั้งการสร้าง ecdysteroid ใน Y-organ ที่เลี้ยงภายในหลอดทดลอง ได้มีการศึกษาใน *Carcinus maenas* (Webster,1991) และ *Procambarus clarkii* (Nagasawa and others,1996) ขณะที่การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ VIH มีเพียงใน *H. americanus* (Soyez and others,1991) และ *Procambarus bouvieri* (Aguilar and others,1992)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเปปไทด์ฮอร์โมนอีกหลายชนิดในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน เช่น FMRFamide, Small Cardioactive Peptide (SCP), substance P, Proctolin, และ Cholecystokinin (CCK) ซึ่งเปปไทด์ฮอร์โมนเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็น สารสื่อประสาท หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (Callaway, Masinovsky and Graubard,1987; Keller,1992; Schmidt and Ache,1994; Turrigiano and Selverston,1989)

FMRFamide พบครั้งแรกจากปมประสาทของหอยสองฝา มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 หน่วย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 และจัดเป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardioexitatory neuropeptide) (Price and Greenberg,1977) ต่อมาได้มีรายงานการตรวจพบสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับสาร FMRFamide โดยจะมีโครงสร้างทางด้านปลาย C (carboxy terminus) เป็น –Arg-Phe-NH_2 (-RFamide) เหมือนกัน จึงทำให้พบสารนี้ได้หลายรูปแบบ ดังนั้นจึงเรียกสารเหล่านี้ว่า สารคล้าย FMRFamide ซึ่งส่วนใหญ่พบว่า สารคล้าย FMRFamide มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน 4 หน่วยทางด้านปลาย C เป็น Phe-X-Arg-Phe-NH_2 โดยที่ X อาจจะเป็น Met, Leu หรือ Ile ก็ได้ (Krajniak and Price,1990) จากการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่างๆ พบว่าสารนี้เป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีบทบาทต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายคือ กระตุ้นการทำงานของหัวใจ กระตุ้นการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อลาย และมีผลต่อการทำงานของระบบหมุนเวียนโลหิตและระบบประสาท

Pancreatic polypeptide (PP) สร้างจากเซลล์ที่เรียกว่า เซลล์ที่มี PP (PP cell) หรือ เซลล์เอฟ (F cell) ในไอส์เลตออฟแลงเกอฮานส์ (islets of Langerhans) ที่ตับอ่อน โดยพบเซลล์ที่

มี PP อยู่ที่บริเวณขอบ ๆ ของไอส์เลตส์ (Norris, 1997) มีการพบ PP ครั้งแรกในตับอ่อนของไก่ (Kimmel Pollock and Hazelwood,1968) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนของสัตว์มีกระดูกสันหลังอีกหลายชนิด PP มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 4,200 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย ที่ด้านปลาย C มี tyrosine amide ฤทธิ์ทางชีวภาพยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ได้มีรายงานการพบและการปรากฏร่วมของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในปมประสาทส่วนอกและส่วนท้องของตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* (Swales and Evans,1995) และเปปไทด์ทั้งสองมีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C คล้ายกัน คือ –RY amide และ –RFamide ซึ่งอาจมีปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reactivity) ระหว่างแอนติบอดีทั้งสองชนิดได้

2.2 ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่ง มีขนาดใหญ่ มีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า giant tiger prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* กุ้งชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Penaeidae (Dore and Frimodt,1987) ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำได้แก่ น่านน้ำแถบไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และพบมากที่ออสเตรเลีย และ อินเดีย (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2531) สำหรับประเทศไทยพบกุ้งชนิดนี้มากที่บริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราชและทางด้านทะเลอันดามันบริเวณนอกฝั่งของจังหวัดระนองและภูเก็ต (ปัญญา สุวรรณสมุทร, 2534) กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึกห่างออกจากฝั่ง และชอบพื้นทะเลที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2531)

การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ มีการจัดดังนี้ (Holthuis,1980)

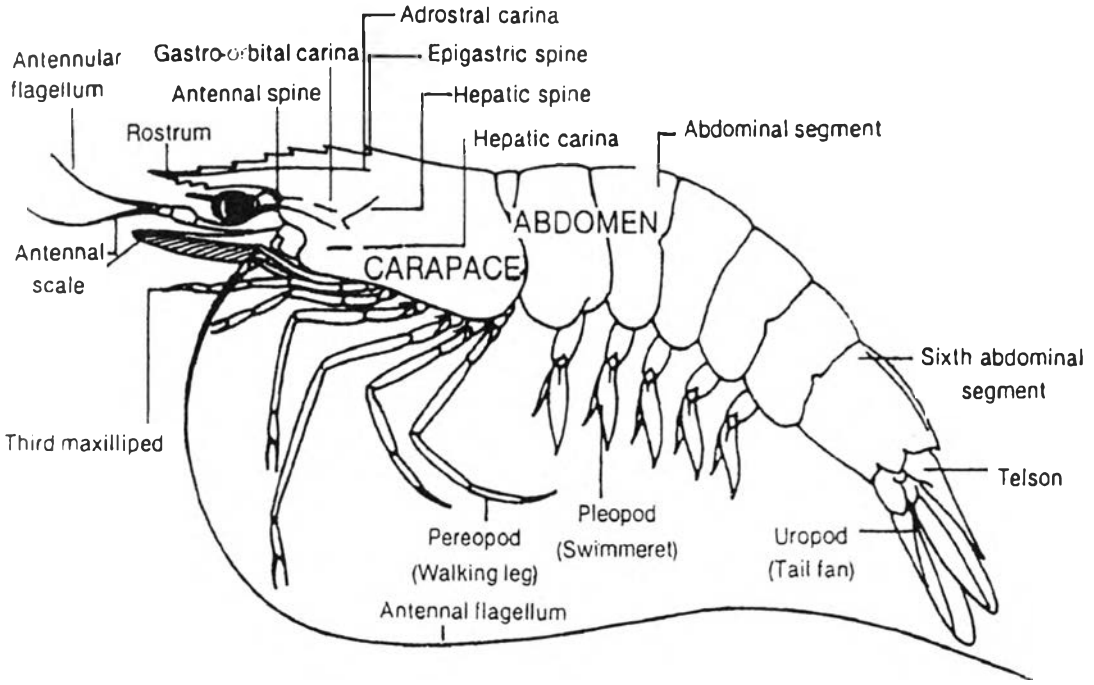
Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natania
Infraorder	Penaeidae
Family	Penaeidae
Genus	Penaeus
Species	monodon

ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางลำตัวเป็นปล้องๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7 - 8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรีทั้งสองด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2531) ลักษณะที่สำคัญของกุ้งกุลาดำโดยทั่วไป คือ ลำตัวเป็นข้อปล้อง มีทั้งหมดประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ 1 คู่ ระยางค์แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกัน ลำตัวของกุ้งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนหัว ส่วนอก และลำตัว ส่วนหัวมี 5 ปล้องแต่รวมเป็นปล้องเดียวมีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่หนึ่งจะยื่นเป็นฟันแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า "กรี" ใต้กรีมีตา 1 คู่ ปากกุ้งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยางค์ 5 คู่ ซึ่งสองคู่แรกเป็นหนวดใช้ในการสัมผัส ระยางค์คู่ที่ 3 ได้แก่ ขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนระยางค์คู่ที่ 4 และ คู่ที่ 5 เป็นขากรรไกรบน มีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง ส่วนอกมี 8 ปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6 - 13 ระยางค์ 3 คู่แรก (คู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอก เรียกว่า maxilliped มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae ระยางค์สามคู่นี้มีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปาก หรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และคู่ที่ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดตัว และในส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่ 2 ไม่ทับกับปล้องแรก ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพาย ใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 หรือหาง ประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัด สามารถยกขึ้นลงได้ (บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2529;บังอร ศรีมุกดา, 2530) (ภาพประกอบ 2.3)

วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำมีอายุประมาณ 18-24 เดือน วางไข่ในทะเลที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-40 เมตร ใกล้กับพื้นดิน กุ้งกุลาดำขนาด 50-150 กรัม จะวางไข่ประมาณ 1,000,000-1,200,000 ฟอง แม่กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่ง ๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วจะเจริญและฟักออกมาเป็นตัวภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง กุ้งวัยอ่อนจะพัฒนาและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน จากนั้นตัวอ่อนจะค่อย ๆ เคลื่อนตัวเข้าหาชายฝั่งบริเวณป่าไม้ชายเลนเพื่อดำรงชีวิตและเลี้ยงตัวอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลและผสมพันธุ์วางไข่ต่อไป (บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2529 ; บังอร ศรีมุกดา, 2530; วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2531)



ภาพประกอบ 2.3 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Solis,1988)

เปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถที่จะเพิ่มขนาดได้ดังเช่นกระดองปูหรือเปลือกหอย ดังนั้นในการเพิ่มขนาดของตัวกุ้งแต่ละครั้ง จึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมาแทน กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และลอกคราบไปเรื่อย ๆ จนชั่วชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติ โดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งโดยเร็วหลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมดลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 2-8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งจะควบคุมโดยประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออก จะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น และรังไข่ก็เจริญขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย เช่น วัยของกุ้ง อาหาร แสง และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม กุ้งจะใช้เวลาในการลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 22-27 วัน (ปิยะพงษ์ โชติพันธ์, 2529; วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2531)

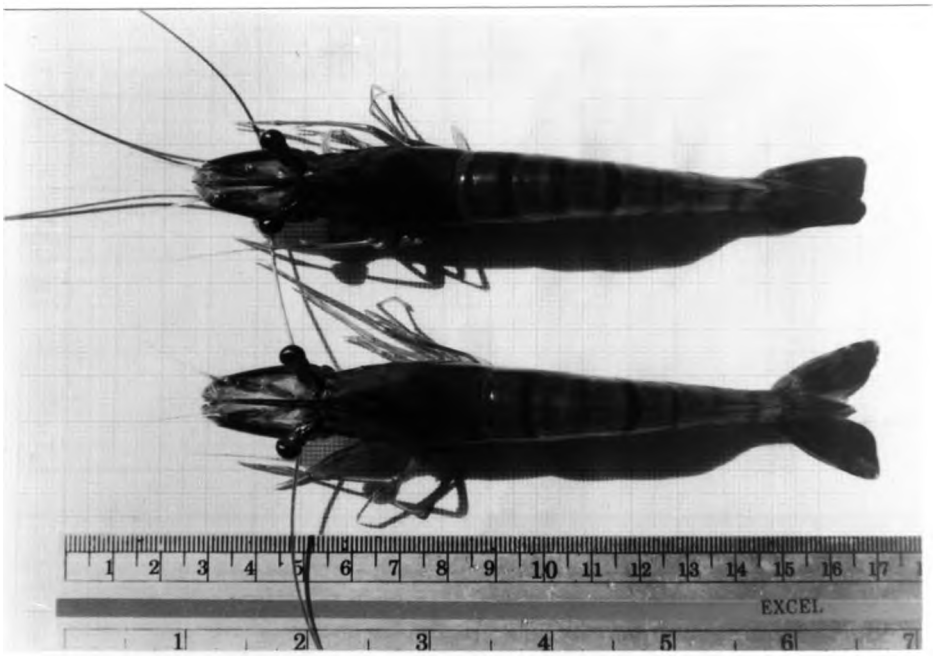
การสืบพันธุ์

กุ้งกุลาดำจะมีการผสมพันธุ์กันก็ต่อเมื่อตัวเมียได้ลอกคราบแล้วและอยู่ในสภาพที่เปลือกยังนิ่มอยู่เท่านั้น ส่วนมากจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน ตัวผู้เมื่อเห็นตัวเมียลอกคราบใหม่ๆ จะพยายามว่ายน้ำเข้าประกบในระยะนี้ถ้าตัวผู้หิวจัด กุ้งตัวผู้อาจจะกินกุ้งตัวเมียได้ แต่ถ้าอาหารอุดมสมบูรณ์ กุ้งตัวผู้จะพยายามเคล้าเคลียและเร่งเร้าตัวเมียให้ว่ายน้ำไปด้วยกัน ถ้าสำเร็จกุ้งทั้งคู่จะว่ายน้ำขนานกันไปโดยกุ้งตัวผู้จะอยู่ข้างล่างและตัวเมียอยู่ข้างบน เมื่อได้จังหวะจะหงายท้องชิดตัวเมียพร้อมกับถ่ายน้ำเชื้อให้กุ้งตัวเมีย โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า พีเทสมา (petasma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า ทีไลคัม (thelycum) พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในระยะหลัง เมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่จะถูกขับออกมาทางช่องเปิดตรงโคนขาเดินคู่ที่ 3 และจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ ซึ่งไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็ก ๆ ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 ของตัวเมีย ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ถูกขับออกมาใหม่ ๆ จะมีลักษณะกลมมีเมือกห่อหุ้ม ต่อไปไข่จะค่อย ๆ พัฒนาจนฟักออกเป็นตัว ภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง จากนั้นลูกกุ้งจะมีพัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน (บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2529; วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2531)

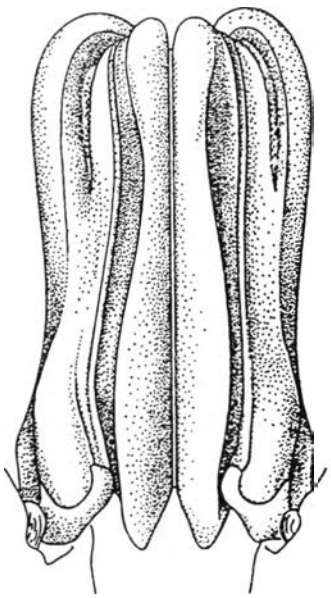
ความแตกต่างของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

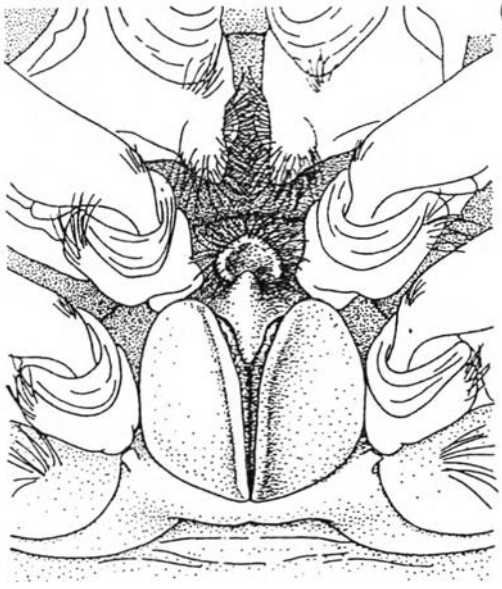
กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่มีอายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศเมียหรือกุ้งเพศผู้นั้น สังเกตได้จากกุ้งเพศผู้จะมีพีเทสมา ซึ่งพัฒนามาจากส่วนของแขนงอันใน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่หนึ่ง พีเทสมามีลักษณะคล้ายเดือยยางแข็ง 2 อัน ซ้ายขวา ติดกันด้วยคิวติเคิล (cuticle) บาง ๆ ทับซ้อนกันที่บริเวณโคนขาและสามารถคลี่ออกเป็นแผ่นกว้างได้ กุ้งวัยรุ่นเพศผู้นั้นพีเทสมาจะยึดติดกับส่วนโคนของขาว่ายน้ำเมื่อการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเป็นกุ้งที่โตเต็มวัย ขอบของพีเทสมาประมาณครึ่งหนึ่งจะแผ่ออกติดกันตลอดอันและมีปุ่มคล้ายติ่งทำหน้าที่ช่วยในการยึดติดในเวลาผสมพันธุ์ กุ้งเพศผู้จะมีท่อส่งน้ำเชื้อไปเปิดออกบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 และปล่อยน้ำเชื้อออกทางช่องเปิดไปที่บริเวณด้านท้อง หรือด้านหลังของทีไลคัมของกุ้งเพศเมีย ซึ่งบริเวณนี้จะมีขนอ่อน ๆ ช่วยโบกพัดให้น้ำเชื้อตัวผู้เข้าไปสู่ถุงเก็บน้ำเชื้อของตัวเมีย ส่วนในกุ้งเพศเมียนั้นสังเกตได้จากบริเวณส่วนท้องของตัวเมียจะมีติ่งแบน ๆ เรียกว่า ทีไลคัม มีลักษณะคล้ายลอนหรือพูเล็ก ๆ หลายอัน เรียงกันอยู่ตรงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่สี่และห้า ซึ่งด้านในมีถุงสำหรับเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ในเวลามีการผสมพันธุ์ และมีท่อนำไข่เปิดออกโคนขาเดินคู่ที่สาม (ปิยะพงษ์ โชติพันธ์, 2529 ; ปัญญา สุวรรณสมุทร, 2534 ; บังอร ศรีมุกดา, 2530) (ภาพประกอบ 2.4)

(ก)



(ข)





พีเทสมา (Petasma)

ทีไลคัม (Thelycum)

ภาพประกอบ 2.4 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

(ก) ภาพกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

(ข) ภาพวาดแสดงพีเทสมาของกุ้งกุลาดำเพศผู้ และ ทีไลคัมของกุ้งกุลาดำเพศเมีย (Farfante and Kensley,1997)

2.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

CHH/MIH/GIH family

การศึกษาสารนิวโรเปปไทด์ตระกูล CHH, MIH และ GIH ของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน ได้มีรายงานการศึกษาการแยกสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อหาโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีรวมทั้งลักษณะทางชีวเคมีของเปปไทด์ ในสัตว์ครัสตาเซียนหลายสปีชีส์ (ตารางที่ 2.1) ซึ่งมีรายงานการทำให้บริสุทธิ์สาร Hyperglycemic hormone เป็นครั้งแรกจากต่อมไซนัสของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร (pH 8.5) สกัดแล้วนำไปผ่าน polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เลือกแถบโปรตีนที่แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน Sephadex G-50 จากนั้นนำ CHH ที่ได้ไปตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบโดยใช้ปฏิกิริยา dansylation และ Edman degradation และจากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่า CHH ของปูน้ำเค็มประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน ปลาย N ถูกบล็อค (Keller and Wunderer, 1978)

ปี ค.ศ.1989 Kegel และคณะ ได้ศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ CHH จากปู *C. maenas* โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัส แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ได้พีคที่แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (hyperglycemic activity) 2 พีค จากนั้นจึงนำพีคหลักของ CHH มาศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และใช้ manual microsequencing (DABITC-PITC double-coupling method) หาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ Fast atom bombardment-mass spectrometry (FAB-MS) พบว่า CHH ของ *C. maenas* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้างพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-29 และ 26-52 ปลาย N เป็น pyroglutamate และปลาย C เป็น amide

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของ putative molt-inhibiting hormone ของปู *C. maenas* โดยสกัดจากต่อมไซนัส แล้วผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-50 และทดสอบ molt-inhibiting activity โดยใช้วิธี *in vitro* bioassay แล้วติดตามสารเปปไทด์ด้วยวิธี RIA จากการศึกษาลักษณะของเปปไทด์พบว่า MIH เสถียรต่อความร้อน (heat-stable) และจากการซะผ่านเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-50 จะอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 6-14 กิโลดาลตัน (Webster,1986) ต่อมาในปี ค.ศ.1991 Webster ได้ศึกษาลำดับกรดอะมิโน

ของ putative MIH จากต่อมไซนัสของ *C. maenas* โดยใช้ automated Edman degradation ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ วิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย FAB-MS พบว่า putative MIH ของ *C. maenas* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 78 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 9,181 ดาลตัน พันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ปลาย N และ ปลาย C ไม่ถูกบล็อค

จากการศึกษาในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยการแยกสกัดจากต่อมไซนัสด้วย 1N กรดไฮโดรคลอริก ที่ 80°C และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน C-18 Sep-Pak cartridge ต่อด้วยกระบวนการ RP-HPLC ทดสอบ molt-inhibiting activity โดยใช้ bioassay และติดตามสารนี้ด้วยวิธี RIA พบว่าเปปไทด์ที่แยกได้สามารถลดไตเตอร์ของ ecdysteroid ในกระแสเลือด และเพิ่ม molt interval ของกุ้งลอบสเตอร์ที่ตัดตาออก จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบปรากฏว่าน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์โดยประมาณ 8,700 ดาลตัน (Chang, Bruce and Newcomb, 1987)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1990 Chang, Prestwich และ Bruce ได้ศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ MIH ที่แยกได้จากต่อมไซนัสของ *H. americanus* ซึ่งมีทั้ง molt-inhibiting activity และ hyperglycemic activity หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC แล้วจึงนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่า MIH ของลอบสเตอร์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย

ได้มีรายงานการศึกษาคุณลักษณะของ CHH ที่แยกได้จากต่อมไซนัสของกุ้งลอบสเตอร์ *H. americanus* โดยใช้สารหลายชนิดสกัด ได้แก่ 10% กรดอะซิติก, 1 N กรดไฮโดรคลอริก ที่ 85°C และกรดอะซิติกที่ 80°C นำสารสกัดที่ได้ผ่าน RP-HPLC ปรากฏว่าถึงแม้จะใช้สารสกัดต่างชนิดกันหรือชนิดเดียวกันแต่อุณหภูมิต่างกัน ก็จะได้โครมาโตแกรมเหมือนกัน แต่การสกัดด้วย 10% กรดอะซิติก จะทำให้สูญเสียฮอร์โมนไปบ้าง ในขณะที่การสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ 85°C ให้ปริมาณ CHH คงที่ จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ร้อนผ่านคอลัมน์ Nucleosil C18 ระบบตัวทำละลาย 0.1%TFA ในน้ำ และ 0.1%TFA ใน n-propanol พบว่า แยกเปปไทด์ได้ 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเปปไทด์ย่อย 2 เปปไทด์ (กลุ่ม 1 คือ No.1, 2 กลุ่ม 2 คือ No.3, 4 และ กลุ่ม3 คือ No.5, 6) แต่มีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดกุ้ง *H. gammarus* คือกลุ่ม 1 และ กลุ่ม 3 ขณะที่เมื่อทดสอบในกุ้งเครย์ฟิช *Orconectes limosus* และ *Astacus leptodactylus* เปปไทด์ทั้งสามกลุ่มจะแสดง activity ได้ทั้งหมด เมื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB-MS พบว่าเปปไทด์กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 ดาลตัน เมื่อนำไปผ่าน Isoelectric focusing (IEF) พบว่าเป็นเปปไทด์พวกเบส มีค่า pI 8.7 เปปไทด์กลุ่มที่ 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,577 ดาลตัน มีค่า pI 5 และจาก

การวิเคราะห์กรดอะมิโนของเปปไทด์ปรากฏว่าเปปไทด์ 1 และ 2 เปปไทด์ 5 และ 6 มีความเหมือนกันอย่างมาก (Soyez and others, 1990)

ในปีต่อมา Tensen และคณะ (1991) ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของ CHH 2 รูปแบบในกุ้ง *H. americanus* โดยสกัดจากต่อมไซนัสด้วย 0.1N กรดไฮโดรคลอริกที่ 80°C แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC 2 ขั้นตอน สามารถแยก CHH ออกมาได้ 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH 2 เปปไทด์ เมื่อศึกษาลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกัน ได้แก่ การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ การหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Edman degradation และการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี FAB-MS พบว่าเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่ม ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มี pyroglutamate (pGlu) ที่ปลาย N แต่มีความแตกต่างกันในด้านกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ อัตราส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลด้วย โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน และ 8,655 ± 25 ดาลตัน ตามลำดับ

ส่วนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของ VIH จากต่อมไซนัสของ *H. americanus* ศึกษาโดย Soyez, Deijnen และ Martin ในปี ค.ศ. 1987 ทำการสกัดต่อมไซนัสด้วย 0.1N กรดไฮโดรคลอริก แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้ระบบ gradient แยกได้ 6 พีคหลัก แล้วจึงนำพีค 1+2, 3+4 และ 5+6 ไปทดสอบ vitellogenesis inhibiting activity ในกุ้ง *Palaemonetes varians* และทดสอบ hyperglycemic activity ใน *O. limosus* พบว่าพีค 3+4 แสดงการยับยั้งการเจริญของรังไข่อย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นจึงเลือกแฟรคชั่นจากพีค 3 และพีค 4 ของขั้นตอนแรกมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ระบบ isocratic และ SDS-urea-PAGE พบว่าพีค 3 ไม่ให้ผลในการทดสอบ CHH bioassay แต่ให้ผล VIH activity ซึ่งตรงข้ามกับ พีค 4 ไม่ให้ผลทั้งใน CHH และ VIH bioassay ส่วนพีคที่ 1, 2, 5 และ 6 แสดง hyperglycemic activity และผลจากการทำ SDS-urea-PAGE ของพีค 3 จะประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ใกล้เคียงกับ 7.5 กิโลดาลตัน ต่อมาในปี ค.ศ.1991 Soyez และคณะ ได้ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของ VIH 2 รูปแบบจากลอบสเตอร์ *H. americanus* โดยการหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนด้วย gas-phase microsequencing และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย FAB-MS พบว่า Hoa-VIH ทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 9,135 ดาลตัน และปลาย N เป็นอิสระ

สำหรับการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ CHH ในกุ้งเครย์ฟิช *O. limosus* โดยสกัดจากต่อมไซนัสและทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC เลือกพีคที่มี

ปริมาณฮอร์โมนมากที่สุดมาหาลำดับกรดอะมิโน โดยวิธี manual Edman microsequencing พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มี pyroglutamate ที่ปลาย N ส่วนปลาย C เป็น Val-NH_2 มีซิสเตอีน 6 หน่วย ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ เมื่อทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยคำนวณจากกรดอะมิโนที่ตรวจวิเคราะห์ได้และจากเจลฟิลเตรชัน พบว่าฮอร์โมนมีน้ำหนักโมเลกุล 8,400 ดาลตัน และเมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัวของกรดอะมิโนกับ CHH ของ *C. maenas* พบว่า มีลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกันถึง 61% และซ้ำกับ MIH ของ *H. americanus* ถึง 81% (Kegel and others,1991)

ส่วนการแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของกุ้ง Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* โดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้ Nova-pak C-18 column ผลจากการทำให้บริสุทธิ์ได้พีคที่ไม่สมมาตรเพียงพีคเดียว แล้วนำสารละลายที่เก็บได้ของพีคนี้ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2 โดยใช้ μ-Bondapak phenyl column พบว่าได้ 3 พีค คือ A, B และ C โดยที่พีค B และ C แสดงความสามารถการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อตรวจสอบทางชีวภาพ ขณะที่พีค A ไม่แสดง เมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE โปรตีนจากพีค B จะเคลื่อนที่แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดี่ยว ๆ ไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่น ๆ และเมื่อเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานอยู่ในช่วง 6,000-6,500 ดาลตัน จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบพบว่า ปลาย N ของเปปไทด์ B ถูกบล็อค ปลาย C เป็น Isoleucine (Ile) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 หน่วย คำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากกรดอะมิโนได้เท่ากับ 6,042 ดาลตันและพบซิสเตอีน 4 หน่วย ซึ่งไม่พบ Tryptophane (Trp), Histidine (His) และ Methionine (Met) (Huberman and Aguilar,1986) ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 Huberman และ Aguilar ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C ที่แยกสกัดจากต่อมไซนัสของสัตว์ทดลองเดิม แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC เมื่อนำ CHH ทั้งสองรูปแบบไปแยกโดยใช้ SDS-PAGE พบว่า เปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่า ๆ กัน และไม่มีแถบโปรตีนมาปนเปื้อนเลย เมื่อเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานแล้ว CHH ทั้งสองรูปแบบมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,500 ดาลตัน จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปฏิกิริยา dansylation และการตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ พบว่า เปปไทด์ CHH-B และ CHH-C มีความเหมือนกันอย่างมาก ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,200 ดาลตัน (คำนวณจากกรดอะมิโน), pI 4.79 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52-53 หน่วย มีซิสเตอีน 4 หน่วย ไม่พบ Met, His และ Trp ปลาย N ถูกบล็อค ปลาย C เป็น Ile

หลังจากนั้น Huberman และ Aguilar (1989) ได้ศึกษาคุณลักษณะเปปไทด์ของ ฟีค A ที่ได้จากการสกัดต่อมไซนัสของ *P. bouvieri* และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC 1 ขั้นตอน ซึ่งไม่มี CHH activity พบว่าเมื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ Y-organs culture ของ *O. limosus* แล้วมี molt-inhibiting activity จากการนำเปปไทด์ไปแยกโดยใช้ SDS-PAGE จะเคลื่อนที่เป็นแถบเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 6,000 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ พบว่า MIH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53-55 หน่วย คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 6,243-6,402 ดาลตัน ไม่มี Trp, His และ Met ปลาย N ถูกบล็อค และปลาย C เป็น Ile ต่อมาในปี ค.ศ.1993 Huberman และคณะ ได้ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของ CHH-I ที่แยกได้จากต่อมไซนัสของ *P. bouvieri* พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 8,388 ดาลตัน มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้างพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-29 และ 26-52 ปลาย N และปลาย C ถูกบล็อก และเมื่อเปรียบเทียบกับ CHH จากสัตว์ครัสตาเชียนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกับ CHH ของ *O. limosus* (Ori-CHH), *C. maenas* (Cam-CHH) และ *H. americanus* (Hoa-CHH A และ Hoa-CHH B) ถึง 98.6%, 61.1%, 83.3% และ 79.2% ตามลำดับ

ได้มีรายงานการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิที่สมบูรณ์ของ MIH ของ *P. bouvieri* (Aguilar and others,1996) โดยหาการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วทำ manual Edman degradation และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ MALDI-TOF MS พบว่า MIH นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีซิสเตอีน 6 หน่วย ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-29 และ 26-52 น้ำหนักโมเลกุล 8,322 ดาลตัน ปลาย N และปลาย C ถูกบล็อค และไม่มี His, Trp, Met ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกับ CHH ของ *P. bouvieri* ถึง 90% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ MIH ของสัตว์ครัสตาเชียนชนิดอื่นพบว่า ซ้ำกับ MIH ของ *H. americanus* , *P. vannamei* และ *C. maenas* 79%, 46% และ 28% ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1992 Aguilar และคณะ ได้ศึกษาการแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการศึกษาลักษณะของ VIH จาก *P. bouvieri* โดยแยกสกัดจากต่อมไซนัส และทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC เพียงขั้นตอนเดียว และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี *in vitro* bioassay พบว่า สามารถลดการสร้าง vitellogenin ใน ovaries culture ของ *Peneaus vannamei* ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย electrospray ionization (EI) พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 8,388 ± 2 ดาลตัน จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบพบว่า VIH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-74 หน่วย และไม่มี Trp, His และ Met และจากการใช้วิธี dansyl-Cl method พบว่า ปลาย N ถูกบล็อค

ปี ค.ศ.1995 Huberman, Aguilar และ Quackenbush รายงานการศึกษากลุ่มของนิวโรเปปไทด์ที่แยกได้จากต่อมไซนัสของกุ้งเครย์ฟิช *Procambarus bouvieri* พบว่า แยกเปปไทด์ได้ 4 ชนิด คือ GIH, MIH, CHH-I และ CHH-II โดยมีลักษณะที่เหมือนกันคือ

1). มีค่า pI ในช่วงเป็นกรด

2). มีคุณสมบัติ hydrophobicity

3). มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8,300-8,400 ดาลตัน

4). ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย

5). ปลาย N และ ปลาย C ถูกบล็อก

6). มีซิสเตอีน 6 หน่วย

7). ไม่มีฮิสทิดีน เมไทโอนีน ทริปโทเฟน

สำหรับ CHH-I สามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีปลาย N คือ pyroglutamate และ ปลาย C คือ Val amide มีน้ำหนักโมเลกุล 8,373 ดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับลำดับกรดอะมิโนที่หาได้

ในปี ค.ศ.1994 Yasuda และคณะ ศึกษาลักษณะของ CHH จากต่อมไซนัสของกุ้งเครย์ฟิช *Procambarus clarkii* โดยการแยกสกัดด้วย 0.1 N กรดไฮโดรคลอริก ที่ 80°C แล้วนำไปทำเจลฟิลเตรชันบน Sephadex G-75 column พบว่า แฟรคชั่นที่ 4 มี hyperglycemic activity จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC สามารถแยกออกมาได้ 2 พีค คือ Prc-CHH I และ Prc-CHH II แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน พบว่า ฮอร์โมนทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-29 และ 26-52 แตกต่างกันโดย D/L epimerization ของ phenylalanine ที่ตำแหน่งที่ 3 ซึ่ง Prc-CHH II มี D-amino acid นอกจากนี้ฮอร์โมนยังสามารถลดการสร้าง ecdysteroid ใน Y-organ culture จากผลที่ได้อาจจะบ่งชี้ว่า stereoinversion ในโมเลกุลของ CHH นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของฮอร์โมน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษานิวโรเปปไทด์ที่มี molt-inhibiting activity จากต่อมไซนัสของกุ้ง *P. clarkii* โดยสกัดด้วย 80% acetonitrile ที่มี 0.9% NaCl แล้วทดสอบ MIH activity ด้วยวิธี *in vitro* bioassay ใน Y-organ culture ของ *P. clarkii* ติดตามสารด้วยวิธี RIA และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC พบว่ามีหนึ่งแฟรคชั่นที่คาดว่าเป็น MIH ของ *P. clarkii* (Terauchi and others,1996) ซึ่งต่อมา Nagasawa และคณะ (Nagasawa and others,1996)

ได้ศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ MIH นี้พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 75 หน่วย และมีปลาย C เป็น amide ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของ Prc-MI:- นี้เหมือนกับ Cam-MIH มากกว่า Hoa-MIH

ปี ค.ศ.1995 Yang, Aida และ Nagasawa ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH และเปปไทด์คล้าย CHH จากกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยสกัดแยกเปปไทด์จากต่อมไซนัส 1,500 ต่อม ด้วยสารละลาย 0.9% NaCl ใน 30% acetonitrile และนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC ที่ความเข้มข้น 0-50% acetonitrile ใน 0.05% TFA พบว่าแยกเปปไทด์ได้ 5 พีคหลัก คือ พีคที่ 34, 40, 42, 45 และ 50 ปริมาณเปปไทด์ที่แยกได้เป็น 1.5, 0.6, 2.8, 1.8 และ 0.9 นาโนโมล และมีน้ำหนักโมเลกุลคือ 8,368, 8,487, 8,353, 8,328 และ 8,314 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อนำเปปไทด์ที่แยกได้ไปหาลำดับกรดอะมิโนและทดสอบทางชีววิทยา (bioassay) พบว่า เปปไทด์ No.42 แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด และประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย ส่วนเปปไทด์อีก 4 ชนิด มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ CHH เมื่อเปรียบเทียบกับ CHH ของสัตว์ชนิดอื่น พบว่า จำนวนกรดอะมิโน การกระจายของซิสเตอีน 6 หน่วย และปลาย C เป็น amide มีลักษณะเหมือนกัน โดยในส่วนปลาย N จะมีความเหมือนกันมากกว่า ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกับ Cam-CHH เป็น 42%, Orl-CHH เป็น 50%, Hoa-CHH A เป็น 50%, Hoa-CHH B เป็น 42%, Prb-CHH เป็น 40% และ Prc-CHH เป็น 50% ในขณะที่ซ้ำกับ Cam-MIH เพียง 29% และ Hoa-GIH เพียง 26% เท่านั้น

ต่อมาในปี ค.ศ.1996 Yang และคณะ ได้ศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ MIH จากกุ้ง *P. japonicus* ที่มี molt-inhibiting activity เมื่อทดลองด้วยวิธี *in vitro* bioassay โดยใช้ Y-organ ของกุ้งเคอร์ฟิช *P. clarkii* ซึ่งเปปไทด์ Pej-SGP-IV สามารถยับยั้งการสร้าง ecdysteroid และเมื่อตรวจหาลำดับกรดอะมิโนพบว่า จะประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 หน่วย มีปลาย N และ ปลาย C เป็นอิสระ ลำดับกรดอะมิโนของ Pej-SGP-IV คล้ายคลึงกับ Cam-MIH

ปี ค.ศ.1999 Sithigorngul และคณะ ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และลำดับกรดอะมิโนของ CHH จากก้านตากุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbrergii* โดยการสกัด CHH จากก้านตา ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติกและน้ำ อัตราส่วน 90:1:9 สารที่สกัดได้นำไปผ่าน RP-HPLC และติดตาม CHH โดยวิธีทาง biological activity test พบว่าแยก CHH ได้ 1 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย แต่เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ไม่สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากลำดับกรดอะมิโนจึงชี้

ให้เห็นว่าน่าจะมีกรดอะมิโนหายไปหนึ่งตัว ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นทรีโอนีนมากกว่าเมไทโอนีน ต่อมาได้มีการสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนทางปลาย C จากก้านตากุ้งก้ามกราม โดยวิธี solid phase peptide synthesis คือ เปปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ เปปไทด์ YANAVQTV-NH_2 (T+) นำเปปไทด์เชื่อมกับโปรตีน BSA และใช้กระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์ ตรวจหาไตเตอร์และคุณภาพของแอนติบอดีต่อเปปไทด์ทั้งสองโดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA และ Dot-ELISA และใช้ซีรั่มที่มีไตเตอร์สูงที่สุดตรวจหาฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในสารสกัดจากก้านตาที่แยกด้วยกระบวนการทาง RP-HPLC โดยวิธี Dot-ELISA พบสารคล้ายเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ในแฟรคชั่นที่ 30 และ 38 ตามลำดับ แต่จากการตรวจหาการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนพบว่า แฟรคชั่นที่ 37-39 มีความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดกุ้ง ขณะที่แฟรคชั่นที่ 30 ไม่มี และจากการใช้แอนติบอดีต่อเปปไทด์ทั้งสองเพื่อตรวจหาแหล่งที่พบ CHH ในก้านตา โดยวิธี immunocytochemistry พบว่า แอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ เท่านั้นที่มีการติดสีที่เซลล์ประสาทใน medulla terminalis ganglionic X-organ (MTGXO) และที่เส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไซนัส จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงว่าเฉพาะแอนติบอดีต่อ T+ เท่านั้นที่สามารถจับกับ CHH ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนนี้น่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย โดยมีทรีโอนีนอยู่ในตำแหน่งที่ 71 (นันทิกา ปานจันทร์, 2541)

ตารางที่ 2.1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ CHH/MIH/GIH ในสัตว์พวกครัสตาเซียนต่าง ๆ

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Keller and Wonderer 1978	*C. maenas*	sinus gland 50mM NH_4Ac	PAGE gel filtration Sephadex G-50	Bioassay Dansylation Edman degradation	-hyperglycemic activity - 57 residues -MW 6,726 Da
Kegel and others 1989	*C. maenas*	sinus gland	RP-HPLC	DABITC-PITC	-Cam-CHH -72 residues -MW 8,524 Da
Webster 1986	*C. maenas*	sinus gland	Gel filtration	*in vitro* bioassay RIA	-putative MIH -heat-stable -MW 6-14 kDa

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Webster 1991	*C. maenas*	sinus gland	RP-HPLC	Automated Edman degradation	- Cam-MIH - 78 residues - MW 9,181 Da
Chang, Bruce and Newcomb 1987	*Homarus americanus*	sinus gland 0.1 N HCl 80°C	Sep-Pak C18 cartridge RP-HPLC PAGE	Bioassay RIA	- MIH activity - amino acid composition - MW ~8,700 Da
Chang, Prestwich and Bruce 1990	*Homarus americanus*	sinus gland 0.1 N HCl 80° C	RP-HPLC	Bioassay Edman degradation	- Hoa-MIH - 71 residues - CHH activity
Soyez and others 1990	*Homarus americanus*	sinus gland 10% acetic acid 1 N HCl 85°C acetic acid 80°C	RP-HPLC	Bioassay FAB-MS IEF	- CHH 2 groups - 68 residues - MW 8,633 Da - MW 8,578 Da
Tensen and others 1991	*Homarus americanus*	sinus gland	RP-HPLC	Edman degradation FAB-MS	- CHH 2 groups - 72 residues - MW 8,578 Da - MW 8,655 ± 25 Da
Soyez Deijnen and Martin 1978	*Homarus americanus*	Sinus gland 0.1 N HCl 80° C	RP-HPLC SDS-urea-PAGE	Bioassay Micro sequencing FAB-MS	- Hoa-VIH - 77 residues - MW 9,135 Da
Kegel and others 1991	*O. limosus*	sinus gland	RP-HPLC Gel filtration	Edman degradation DABITC-PITC	- Orl-CHH - 72 residues - MW 8,400 Da ~ Cam-CHH 61% ~ Hoa-MIH 81%

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Huberman and Aguilar 1986	*P. bouvieri*	sinus gland	RP-HPLC SDS-PAGE	Bioassay Dansylation	- CHH - 52 residues - MW 6,042 Da
Huberman and others 1988	*P. bouvieri*	sinus gland	SDS-PAGE	Bioassay Dansylation	- CHH-B, CHH-C - 52-53 residues - MW 6 - 6.2 kDa
Huberman and Aguilar 1989	*P. bouvieri*	sinus gland	RP-HPLC SDS-PAGE	*in vitro* assay Dansylation	- MIH activity - 53-55 residues - MW 6,243-6,402 Da - no Trp, His, Met
Huberman and others 1993	*P. bouvieri*	sinus gland	RP-HPLC	Edman degradation EI-MS	- CHH-I - 72 residues - MW 8,388 Da ~Orl-CHH 98.6% ~Cam-CHH 61.1% ~Hoa-CHH A 83.3% ~Hoa-CHH B 79.2%
Aguilar and others 1996	*P. bouvieri*	sinus gland	RP-HPLC	Manual Edman degradation MALDI-TOFMS	-Prb-MIH -72 residues -MW 8,322 Da ~ Prb-MIH 90% ~Hoa-MIH 79%
Aguilar and others 1992	*P. bouvieri*	sinus gland	RP-HPLC	*in vitro* bioassay Dansyl method	-Prb-VIH -72-74 residues -MW 8,388 ± 2 Da

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Yasuda and others 1994	*P. clarkii*	sinus gland	Gel filtration Sephadex G-75 RP-HPLC	Bioassay	-CHH activity -Prc-CHH I, Prc-CHH-II -72 residues
Terauchi and others 1996	*P. clarkii*	sinus gland 0.9% NaCl in 80% ACN	RP-HPLC	*in vitro* bioassay RIA	- MIH activity
Nagasawa and others 1996	*P. clarkii*	sinus gland	RP-HPLC	Edman degradation	- Prc-MIH -75 residues
Yang and others 1995	*P. japonicus*	sinus gland 0.9% NaCl in 30% ACN	RP-HPLC	Bioassay	-Pej-CHH -72 residues -MW 8,353 Da ~Orl-CHH 50% ~Cam-CHH 42% ~Hoa-CHH A 50% ~Hoa-CHH B 42% ~Prb-CHH 40% ~Prc-CHH 50%
Yang and others 1996	*P. japonicus*	sinus gland	RP-HPLC	*in vitro* bioassay RIA	-Pej-MIH -77 residues ~ Cam-MIH
Sithigorngul and others 1999	*Macrobrachium rosenbergii*	Eyestalk	RP-HPLC	Bioassay Dot-ELISA MALDI-TOF	-Mar-CHH -71 residues

สารคล้าย FMRFamide

ได้มีการศึกษาการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการหาลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide มากมาย ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีรายงานการแยกสกัด FMRFamide เป็นครั้งแรก โดย Price และ Greenberg (1977) จากปมประสาทของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* ได้ใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิด thin layer chromatography, ion-exchange chromatography และ gel filtration ศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารสกัดโดยนำไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation พบว่าสารนี้เป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 (FMRF-NH_2) จากนั้นนำสารนี้ไปตรวจสอบทางชีวภาพกับกล้ามเนื้อหัวใจของหอยชนิดนี้ พบว่า FMRFamide ปริมาณความเข้มข้น 10^{-8} โมล่าร์ต่อลิตร จะสามารถกระตุ้นอัตราการเต้นของหัวใจ

ต่อมามีการพบฮอร์โมนนี้และฮอร์โมนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ FMRFamide ในระบบประสาทของสัตว์ต่าง ๆ มากมาย ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่น พวกปะการัง (Grimmelikhuijzen and Graff,1986) หนอนตัวกลม (Sithigorngul, Stretton and Cowden,1991) แม่เพรียง (Krajniak and Greenberg,1992) และ (Lundquist and Nassel,1990) จนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ไก่ (Dockray and others,1983) และ หนู (Majane Panula and Yang,1989) เป็นต้น

จากการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ของสัตว์พวกครัสตาเซียน (ตารางที่ 2.2) ในปี ค.ศ.1987 Trimmer, Kobierski และ Kravitz ได้ศึกษาในกุ้งลอบสเตอร์ *H. americanus* โดยนำระบบประสาทส่วน pericardial organ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90:1:9) จากนั้นนำไปแยกผ่านเจลฟิลเตรชัน แล้วไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกระบวนการ RP-HPLC 3 ขั้นตอน ติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี RIA หาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Edman degradation พบว่า สารนี้มีโครงสร้างเป็น octapeptide amide 2 รูปแบบ คือ Ser-Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2 (SDRNFLLRF-NH_2) และ Thr-Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2 (TNRNFLRF-NH_2)

ในปี ค.ศ.1991 Krajniak ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในปูม้า *Callinectes sapidus* โดยทำการแยกสกัดจาก pericardial organ และ thoracic ganglia ด้วยอะซีโตน และทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่านกระบวนการ RP-HPLC ติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี

RIA แล้วนำไปหาลำดับกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ microsequencing analysis และ FAB-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 1,159 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-Tyr-Asn-Arg-Ser-Phe-Leu-Arg-Phe-Arg-NH_2 (GYNRSFLRF-NH_2) และเมื่อศึกษาบทบาททางสรีรวิทยา พบว่ามีผลเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ ต่อมาในปี ค.ศ.1993 Yasuda, Naya และ Nakanishi ได้แยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของปูม้า *Callinectes sapidus* ด้วยอะซีโตน แล้วนำไปแยกผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน Sephadex G-75 และ HPLC 2 ขั้นตอน และติดตามสารคล้าย FMRFamide โดยวิธี carboxy terminal analysis หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีสารคล้าย FMRFamide 2 รูปแบบ จากการหาโครงสร้างลำดับกรดอะมิโนเป็นดังนี้ คือ CP1 ประกอบด้วย pGlu-Gly-Arg-Phe-NH_2 (pEGRF-NH_2) และ CP2 ประกอบด้วย pGlu-Leu-Gly-Arg-Phe-NH_2 (pELGRF-NH_2)

ในปี ค.ศ.1991 Mercier ได้ศึกษาในกุ้งเครย์ฟิช *Procambarus clarkii* โดยแยกสกัดจาก pericardial organ ซึ่งใช้ตัวทำละลาย เมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90:1:9) แล้วนำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และ HPLC 2 ขั้นตอน พบว่าสารที่แยกได้นี้มีผลต่อความแรงและเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ ต่อมาในปี ค.ศ.1993 Mercier และคณะ ได้แยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จาก pericardial organ ของกุ้งชนิดเดียวกัน พบว่าสารที่แยกได้มีโครงสร้าง 2 รูปแบบ ดังนี้คือ NF1 มีลำดับกรดอะมิโน Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2 (NRNFLRF-NH_2) และ DF2 มีลำดับกรดอะมิโนคือ Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2 (DRNFLRF-NH_2)

ส่วนในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ได้มีรายงานการแยกสกัดและการทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตากุ้ง ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ โดยใช้กระบวนการทาง RP-HPLC ในการทำให้บริสุทธิ์ และใช้วิธี Dot-ELISA ในการตรวจหาสารหลังจากแยกด้วยกระบวนการ HPLC แล้ว พบว่าสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในแฟรคชั่นที่ 24-41 (จำนวน 13 แฟรคชั่น) แฟรคชั่นที่มีสีเข้มมากที่สุด ได้แก่แฟรคชั่นที่ 38 ซึ่งคาดว่าในก้านตากุ้งก้ามกรามอาจมีสารคล้าย FMRF amide หลายรูปแบบในปริมาณที่ต่างกัน (วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคณะ, 2537) ต่อมาในปี ค.ศ.1998 Sithigorngul และคณะ ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา พบสารคล้าย FMRFamide มีโครงสร้าง 5 รูปแบบ ดังนี้ Mar-FLP1 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน คือ DRNFLRF-NH_2 มีน้ำหนักโมเลกุล 965.7 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 120 พิโคโมล Mar-FLP2 มี

การเรียงลำดับกรดอะมิโน คือ ADKNFLRF-NH_2 น้ำหนักโมเลกุล 1,009.4 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 100 พิโคโมล Mar-FLP3 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ NYDKNFLRF-NH_2 น้ำหนักโมเลกุล 1,215.4 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 130 พิโคโมล Mar-FLP4 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ APALRLRF-NH_2 มีน้ำหนักโมเลกุล 943.0 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 180 พิโคโมล Mar-FLP5 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ DRTPALRLRF-NH_2 มีน้ำหนักโมเลกุล 1243.0 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 280 พิโคโมล

ในปี พ.ศ.2541 จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม ได้ศึกษาการแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 9000 ก้านตา ในตัวทำละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ แล้วนำสารสกัดแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และชะด้วย 50%acetonitrile / 0.1%TFA หลังจากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC 5-7 ขั้นตอน โดยใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibody (FM-23), mouse anti-KNEFIRFamide monoclonal antibody (AF1-62) และ mouse anti-KHEYLRFamide (AF2-32) จาก 10 แฟรคชั่นของ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 พบสารคล้าย FMRFamide บริสุทธิ์ทั้งหมด 18 แฟรคชั่น และจากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่าสารเหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 990-2,679 ดาลตัน แตกต่างจากสารคล้าย FMRFamide ที่รายงานในสัตว์ครัสตาเซียนอื่น ๆ จึงคาดว่าสารคล้าย FMRFamide ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ที่เคยรายงานมาก่อน

ตารางที่ 2.2 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ FMRFamide ในสัตว์ครัสตาเซียนต่างๆ

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Trimmer and others 1987	*H. americanus*	Pericardial organ	Gel filtration Sephadex G-25 RP-HPLC	RIA	-2 octapeptides -SDRNFLRFamide MW 1,053.20 Da -TNRNFLRFamide MW 1,066.24 Da
Krajniak 1991	*Callinectes sapidus*	Pericardial organ and thoracic ganglia	RP-HPLC	RIA	- GYNRSFLRFamide MW 1,158.34 Da

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Mercier and others 1993	*Procambarus clarkii*	Pericardial organ	RP-HPLC	RIA	-NRNFLRFamide MW 506.57 Da -DRNFLRFamide MW 619.73 Da
Yasuda and others 1993	*Callinectes sapidus*	Eyestalk	Gel filtration Sephadex G-75 RP-HPLC	Carboxy terminal analysis	-pEGRFamide MW 955.13 Da -pELGRFamide MW 966.12 Da
Sithigorngul and others 1999	*Macrobrachium rosenbergii*	Eyestalk	RP-HPLC	Dot-ELISA	-DRNFLRFamide MW 966.12 Da -ADKNFLRFamide MW 1,009.19 Da -NYDKNFLRFamide MW 1,215.39 Da -APALRLRFamide MW 942.19 Da -DRTPALRLRFamide MW 1,243.40 Da
จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม 2541	*Peneaus monodon*	Eyestalk	RP-HPLC	Dot-ELISA	-PFM 1-18 -MW 990-2679 Da