

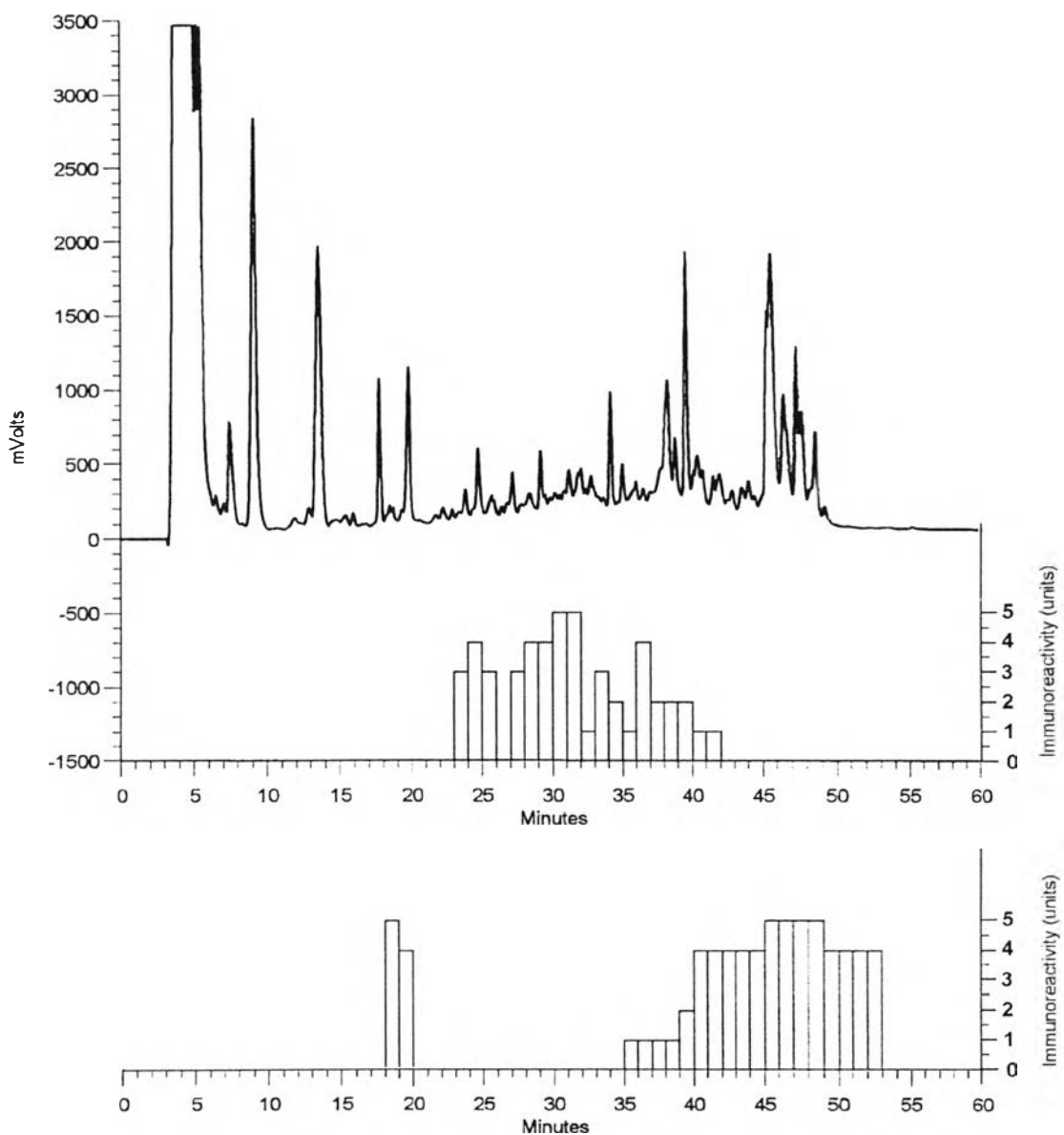
บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์จากต่อมไชนัสของกิ้งกูด้าในขั้นตอนแรก

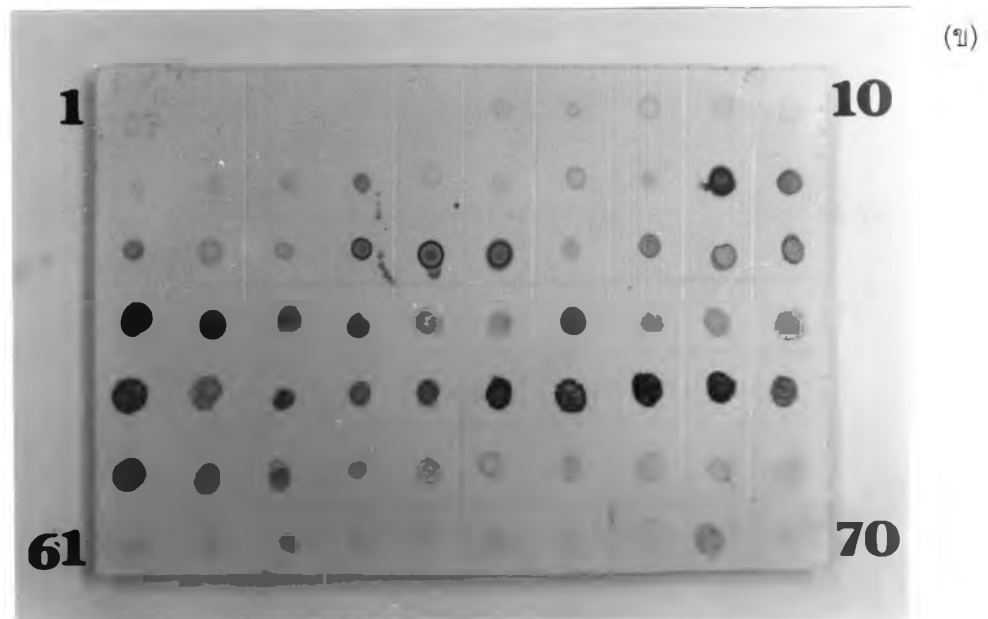
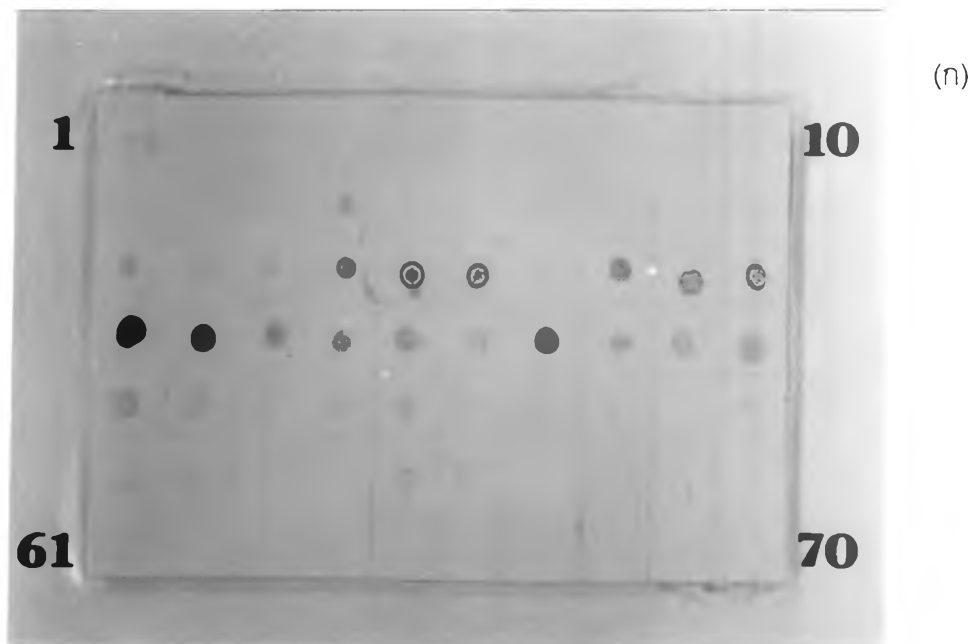
จากการนำสารสกัดจากต่อมไชนัสของกิ้งกูด้าจำนวน 1,000 ต่อม ที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ ในอัตราส่วน 90:1:9 มาผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 8-64% acetonitrile ใน 0.1% TFA โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ของ 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA ต่อนาที อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามสารเปปไทด์ที่ออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ได้โครมาโตแกรมดังภาพประกอบ 4.1 ซึ่งพบว่าสามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในขั้นตอนนี้ออกเป็นพีคใหญ่ (มากกว่า 100 มิลลิโวลต์) จำนวน 13 พีค และพีคขนาดเล็กอีกเป็นจำนวนมาก

จากนั้นเก็บแฟรคชันที่ผ่านออกจากคอลัมน์ทุก ๆ 1 นาที แบ่งสารละลายในแต่ละแฟรคชันมาตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี Dot-ELISA บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ปริมาณแต่ละจุดเทียบเท่ากับ 40 ต่อม พบว่ามี สารคล้าย FMRF-amide อยู่ในแฟรคชันที่ 24-26, 28-41 โดยช่วงพีคที่มีความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในแฟรคชันที่ 30-32 และ 37 (ภาพประกอบ 4.2ก) ต่อมาจึงนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสนี้ไปตรวจหาสารคล้าย CHH พบว่ามีแฟรคชันที่ติดสีเข้มเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วงแฟรคชันที่ 19-20, 41-53, 63 และ 69 โดยพีคที่มีความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในแฟรคชันที่ 19-20 และ 46-49 (ภาพประกอบ 4.2ข)

การตรวจหาสารคล้ายฮอร์โมน ด้วยวิธี Dot-ELISA ในขั้นตอนแรกนี้ ทดสอบกับแอนติบอดีเพียงสองชนิด คือ FMRFamide และ CHH ส่วนฮอร์โมน PDH และ PP6 ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากมีการคาบเกี่ยวกันของผลที่ได้จากการตรวจหาสารคล้าย CHH หลังจากทดสอบ FMRFamide จึงอาจเกิดความสับสนและผิดพลาดได้ง่ายหากนำไปทดสอบต่อไป และปริมาณสารสกัดมีอยู่น้อยจะเป็นการสิ้นเปลือง ดังนั้นการทดสอบฮอร์โมน PDH และ PP6 จึงทดสอบเฉพาะกับเปปไทด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 2 และ 3 เท่านั้น



ภาพประกอบ 4.1 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากต่อมไฮนัสของกิ้งกูดจำนวน 1,000 ต่อม หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก และแผนภูมิแท่งแสดง แพรคชันที่พบสารคล้าย FMRamide และ CHH ปริมาณของสารคล้ายฮอร์โมน ต่าง ๆ อนุมานจากความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นในแต่ละแพรคชันของ Dot-ELISA ในภาพประกอบ 4.2



ภาพประกอบ 4.2 Dot-ELISA ของสารสกัดจากต่อมไชนัสของกิ้งกูดดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก (ก) สารคล้าย FMRF-amide (แต่ละจุดปริมาณ เทียบเท่ากับ 40 ต่อม) จากนั้นนำมาตรวจหาสารคล้าย CHH (ข)

4.2 การทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์จากต่อมไชนัสของกิ้งกูดำในขั้นตอนที่ 2-3

จากการนำแต่ละแฟรคชันของขั้นตอนที่ 1 ตั้งแต่แฟรคชันที่ 8-52 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 2 และ 3 พบว่าสามารถทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 99 แฟรคชัน จากแฟรคชัน 29 แฟรคชัน ส่วนแฟรคชันที่ไม่พบเปปไทด์บริสุทธิ์ ได้แก่ แฟรคชันที่ 8-18, 22, 24, 27, 29 และ 44 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC แสดงดังภาพประกอบ 4.3 (แฟรคชันที่ 19-23), ภาพประกอบ 4.8 (แฟรคชันที่ 25-30), ภาพประกอบ 4.12 (แฟรคชันที่ 31-34), ภาพประกอบ 4.17 (แฟรคชันที่ 35-39), ภาพประกอบ 4.25 (แฟรคชันที่ 40-42), ภาพประกอบ 4.31 (แฟรคชันที่ 43-46), ภาพประกอบ 4.36 (แฟรคชันที่ 47-48) และ ภาพประกอบ 4.42 (แฟรคชันที่ 49-52)

ในขั้นตอนที่ 2 เป็นการทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA ระบบ gradient ชนิดต่างๆ สามารถทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ได้ทั้งหมด 82 ตัวอย่าง โดยมีการเรียกชื่อเปปไทด์ตามแฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกออกมาจากขั้นตอนที่ 1 เปปไทด์ส่วนใหญ่ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนที่ 2 จะเรียกชื่อเปปไทด์ตามแฟรคชันที่แยกออกมาในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้จุดทศนิยม 1 ตำแหน่ง ตัวอย่างเช่น SGP19.29 หมายถึงเปปไทด์ที่ได้จากแฟรคชันที่ 19 ของขั้นตอนที่ 1 นำมาแยกในขั้นตอนที่ 2 ได้เปปไทด์บริสุทธิ์จากแฟรคชันที่ 29 (ภาพประกอบ 4.3)

สำหรับเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 2 ที่ยังไม่บริสุทธิ์ จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA สามารถทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง การเรียกชื่อจะใช้หมายเลขแฟรคชันหลังจุดทศนิยมตำแหน่งที่ 2 ตัวอย่างเช่น SGP40.40.32 หมายถึงเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ได้จากแฟรคชันที่ 40 ในขั้นตอนที่ 1 แล้วนำแฟรคชัน 40 ในขั้นตอนที่ 2 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 3 และได้เปปไทด์บริสุทธิ์จากแฟรคชันที่ 32 (ภาพประกอบ 4.25)

เมื่อนำแฟรคชันเปปไทด์บริสุทธิ์ไปทดสอบแอนติบอดี พบว่าเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีชนิดเดียว มีจำนวน 59 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นสารคล้าย FMRFamide 13 ตัวอย่าง, สารคล้าย CHH 30 ตัวอย่าง, สารคล้าย PDH 13 ตัวอย่าง และ สารคล้าย PP6 3 ตัวอย่าง เปปไทด์บริสุทธิ์ให้ผลบวกกับแอนติบอดีสองชนิด มีจำนวน 11 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นสารคล้าย CHH และ FMRFamide 9 ตัวอย่าง และ สารคล้าย PDH และ PP6 2 ตัวอย่าง ส่วนแฟรคชันที่ไม่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบ (unknown) จำนวน 29 ตัวอย่าง

โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC แสดงดังภาพประกอบ 4.4 (ก) - 4.47 (ก) โดยใช้สัญลักษณ์แทนชนิดของเปปไทด์บ่งชี้แฟรคชันที่ได้เปปไทด์บริสุทธิ์ ซึ่งเวลาที่เก็บตัวอย่างในแต่ละแฟรคชันจะช้ากว่าเวลาในโครมาโตแกรมประมาณ 0.6-0.9 นาที เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรมจะเห็นว่า เปปไทด์บริสุทธิ์ที่ได้ส่วนใหญ่จะปรากฏเป็นพีคเดี่ยวแยกจากสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ดังนั้นจึงคาดว่าเปปไทด์ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์มากพอ แต่บางแฟรคชันอาจจะมีสิ่งปนเปื้อนอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องจากพื้นฐานของพีคยังมีดึงของสารปนเปื้อนติดอยู่ ค่าความสูงของพีคโดยประมาณแสดงในตารางที่ 4.1

4.3 การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเปปไทด์โดย mass spectrometry

จากการนำตัวอย่างของสารเปปไทด์ ไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 932.6 - 9,103.1 ดาลตัน (แมสสเปกตรัมของเปปไทด์บริสุทธิ์ แสดงดังภาพประกอบ 4.4 (ข) - 4.47 (ข) และสรุปผลการวิเคราะห์ได้ดังตารางที่ 4.1)

โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลนี้ พบว่าเปปไทด์บางตัวมีพีคย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างออกไปประมาณ 23 หรือ 38 ดาลตัน (ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของโซเดียมและโปแตสเซียม) ตัวอย่างเช่น SGP28.34 มีน้ำหนักโมเลกุล 1,444.1, 1,466.4 ดาลตัน, SGP37.22 มีน้ำหนักโมเลกุล 1,075.6, 1,098.0 ดาลตัน เป็นต้น จึงคาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารเปปไทด์ที่มีโซเดียมและโปแตสเซียมประกอบอยู่ด้วย

จากการพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแฟรคชัน พบว่าสารเปปไทด์บางแฟรคชัน อาจเป็นเปปไทด์รูปแบบเดียวกัน เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน และมาจากลำดับแฟรคชันที่ต่อเนื่องกัน หรือถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้นของสารละลาย 80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA ใกล้เคียงกัน ได้แก่

1). SGP19.29 (1340.8) และ SGP 20.29 (1342.1) ปรากฏในแฟรคชันที่ 29 เป็นสารคล้าย CHH

2). SGP28.34 (1444.1, 1466.4), SGP28.35 (1443.8) และ SGP28.36 (1444.5) ปรากฏในแฟรคชันที่ 34-36 น่าจะเป็นสารคล้าย PDH

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

14). SGP47.36 (3520.7, 7033.8), SGP47.37 (3519.7,7032.6), SGP47.38 (3532.5, 7058.3) ปรากฏในแฟรคชันที่ 36-38 และเป็นสาร unknown

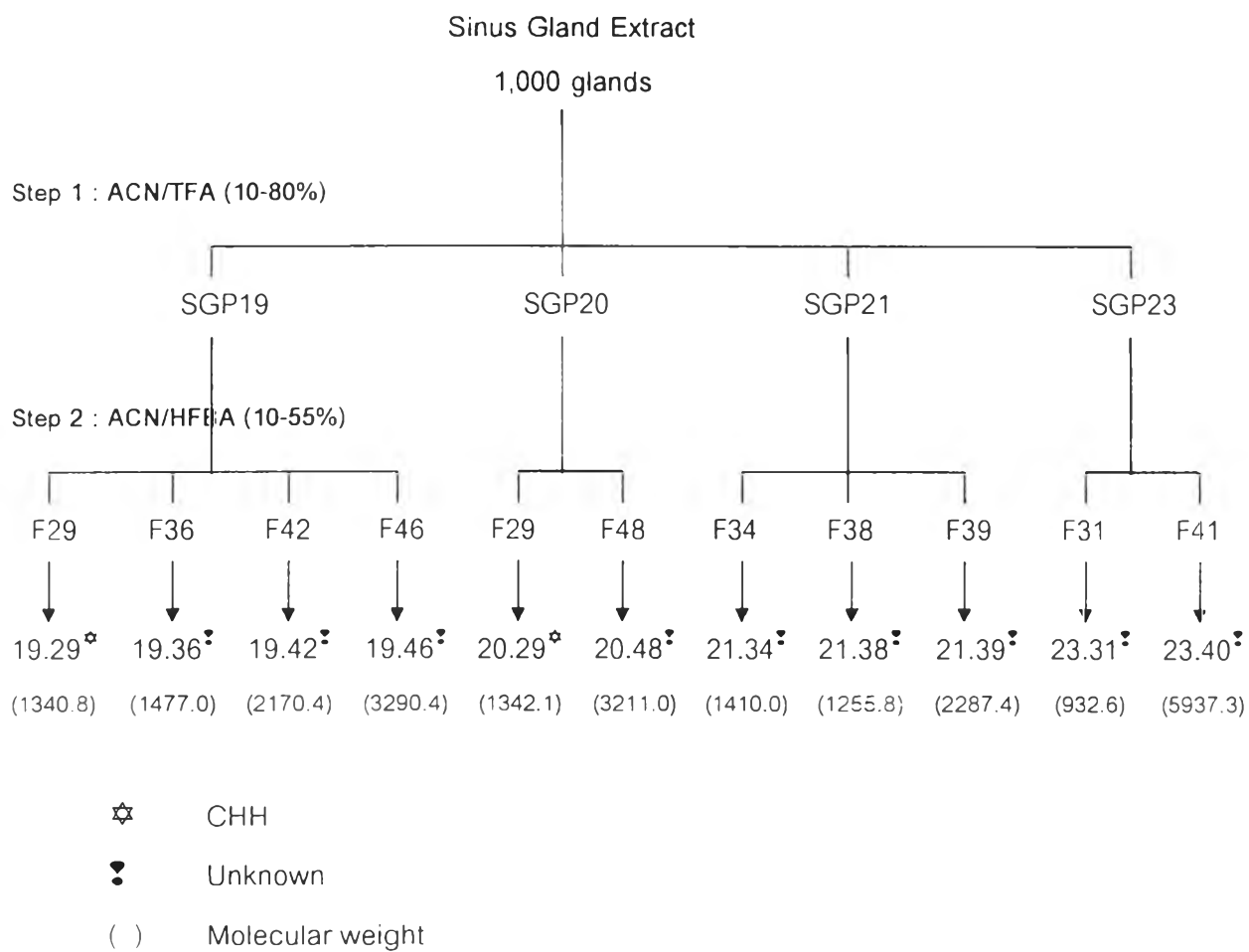
15). SGP48.39.26 (4114.9, 8220.6), SGP48.39.27 (4116.0, 8221.4), SGP 49.39.26 (4114.9, 8220.0), SGP49.39.27 (4115.6, 8221.9) และ SGP49.39.28 (4118.5, 8232.8) ปรากฏในแฟรคชันที่ 39-40 ของขั้นตอนที่ 2 และแฟรคชันที่ 26-28 ในขั้นตอนที่ 3 และเป็นสารคล้าย CHH

16). SGP48.41.29 (4183.8, 8321.0), SGP48.41.30 (4162.4, 8309.3), SGP 48.41.31 (4156.3, 8290.9), SGP49.41.27 (4176.1, 8310.6), SGP49.41.28 (4161.0, 8311.3), SGP49.41.29 (4172.2, 8313.8) และ SGP49.41.30 (4163.4, 8311.4) ปรากฏในแฟรคชันที่ 41-43 ในขั้นตอนที่ 2 เมื่อทำต่อขั้นตอนที่ 3 พบในแฟรคชันที่ 27-31 และเป็นสารคล้าย CHH

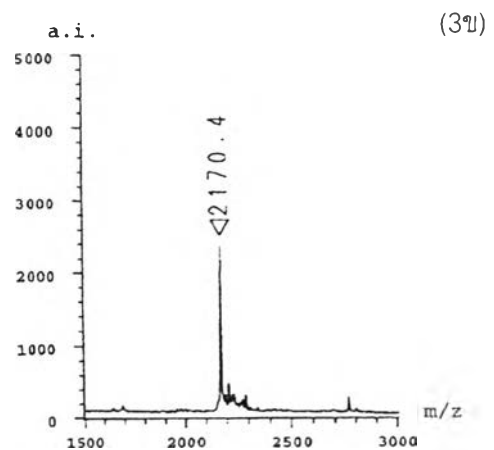
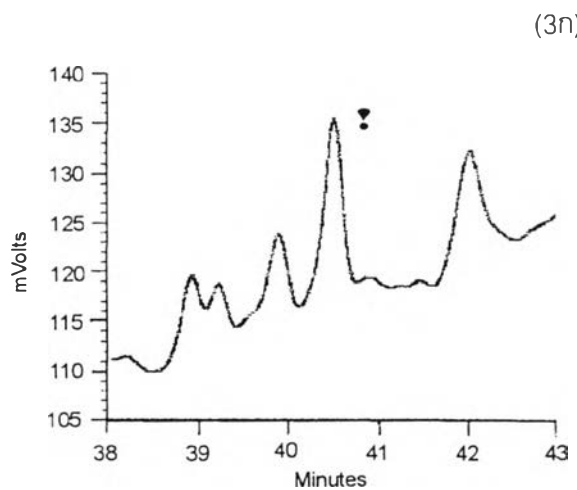
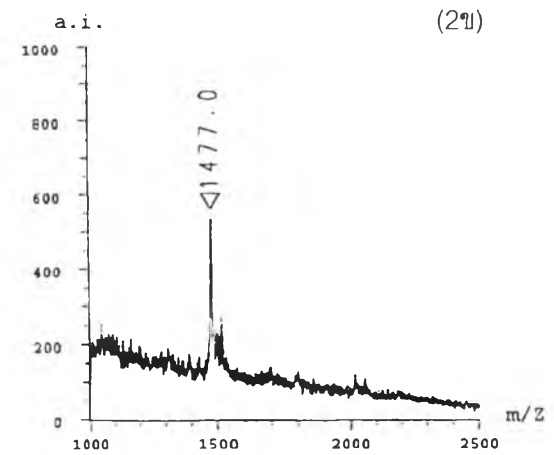
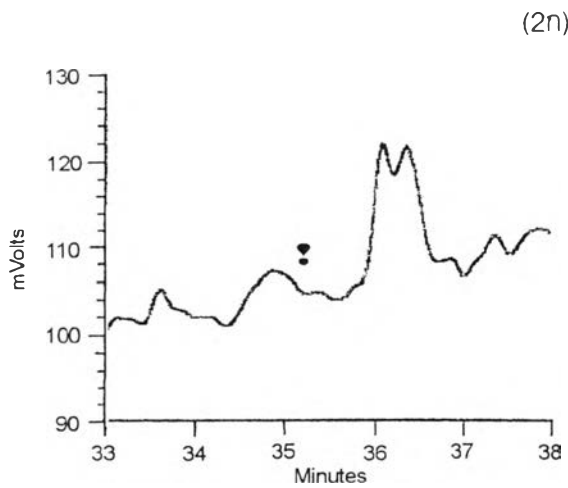
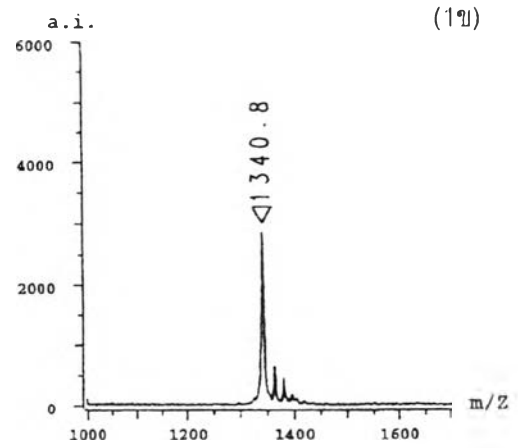
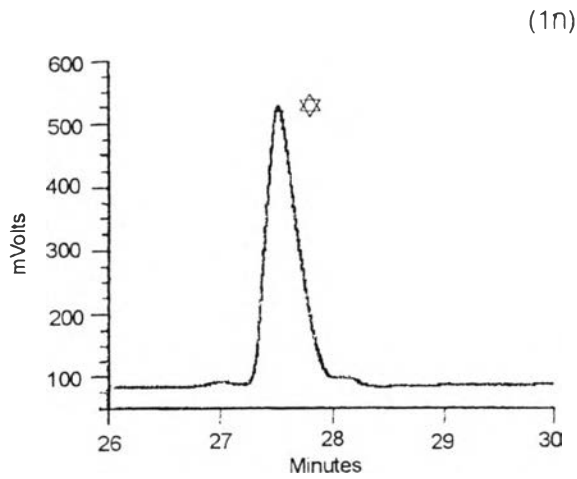
17). SGP50.34 (3288.4) และ SGP51.34 (3284.5) ปรากฏในแฟรคชันที่ 34 และเป็นสารคล้าย PDH

18). SGP50.37 (3460.5,6897.7), SGP50.38 (6900.1) และ SGP51.38 (6906.3) ปรากฏในแฟรคชันที่ 37, 38 และเป็นสารคล้าย PP6

ดังนั้นจึงคาดว่าจะได้เปปไทด์บริสุทธิ์รูปแบบต่าง ๆ กันอย่างน้อย 59 รูปแบบ โดยเป็น สารคล้าย FMRFamide 11 รูปแบบ, สารคล้าย CHH 10 รูปแบบ, สารคล้าย PDH 7 รูปแบบ, สารคล้าย PP6 1 รูปแบบ, สารคล้าย CHH และ FMRFamide 7 รูปแบบ, สารคล้าย PDH และ PP6 1 รูปแบบ และสาร unknown 22 รูปแบบ



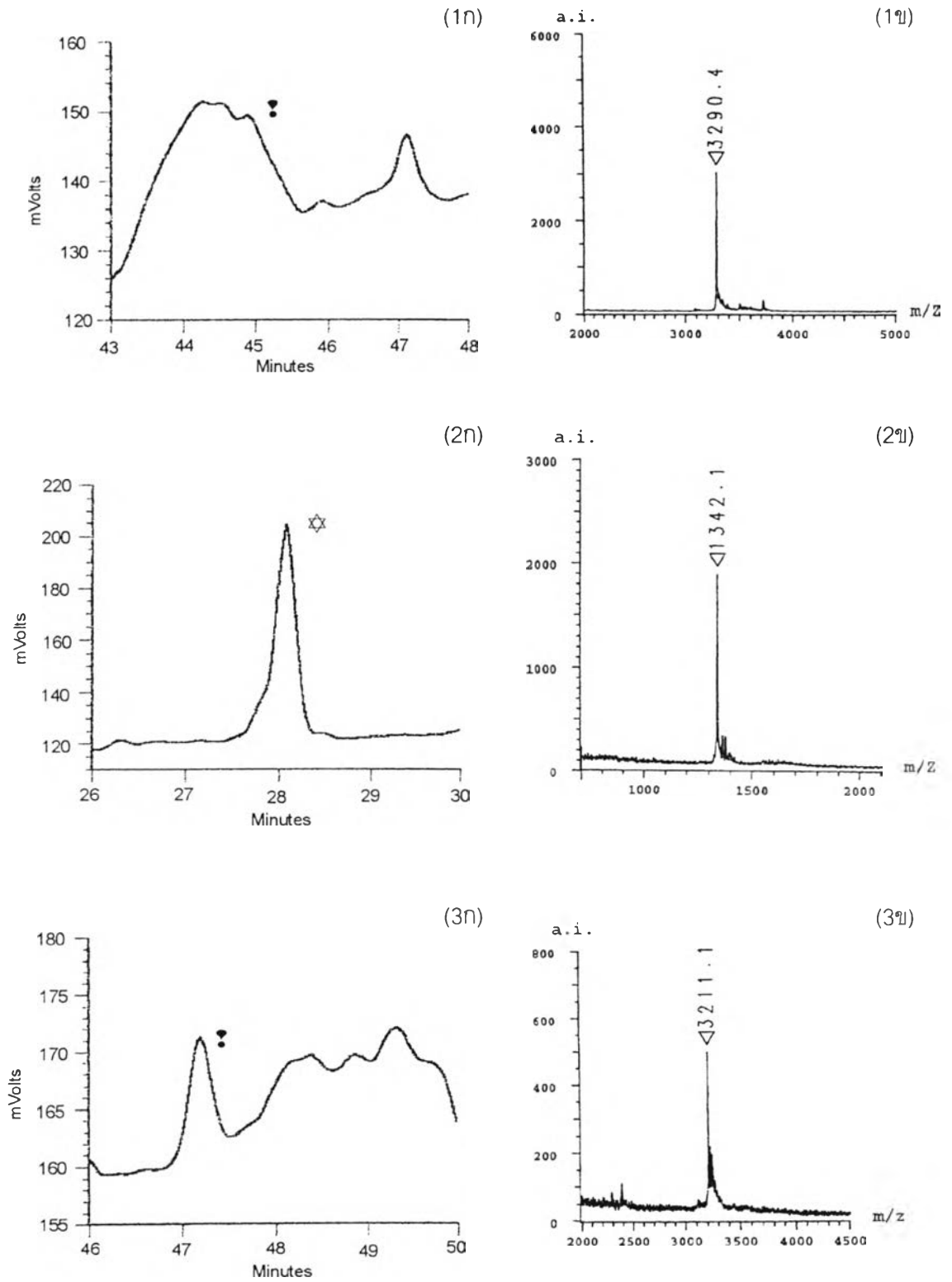
ภาพประกอบ 4.3 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 19 ถึง แฟรคชันที่ 23



ภาพประกอบ 4.4 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP19.29 (1), SGP19.36 (2) และ SGP19.42 (3)

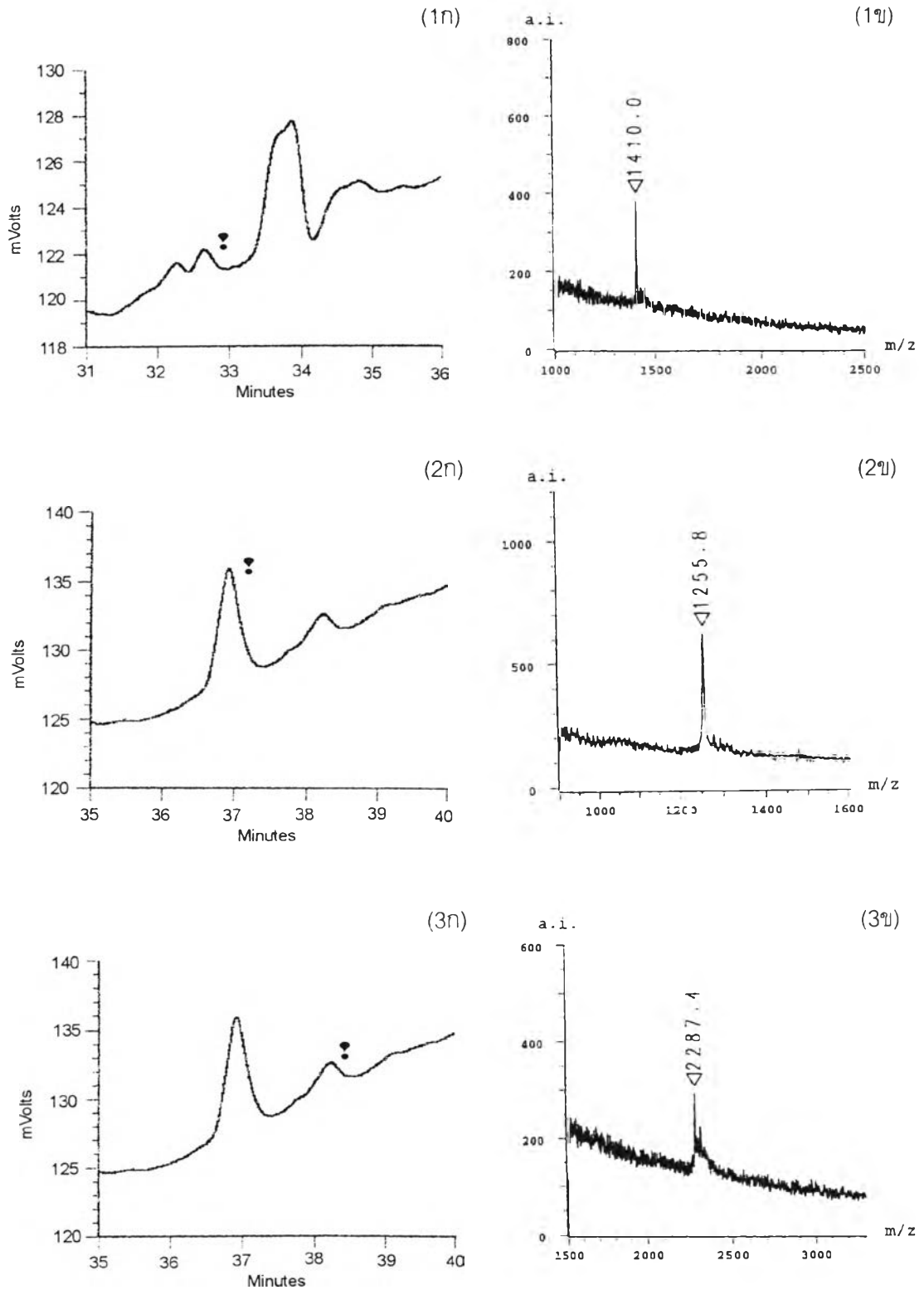
☆ CHH ? Unknown



ภาพประกอบ 4.5 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP19.46 (1), SGP20.29 (2) และ SGP 20.48 (3)

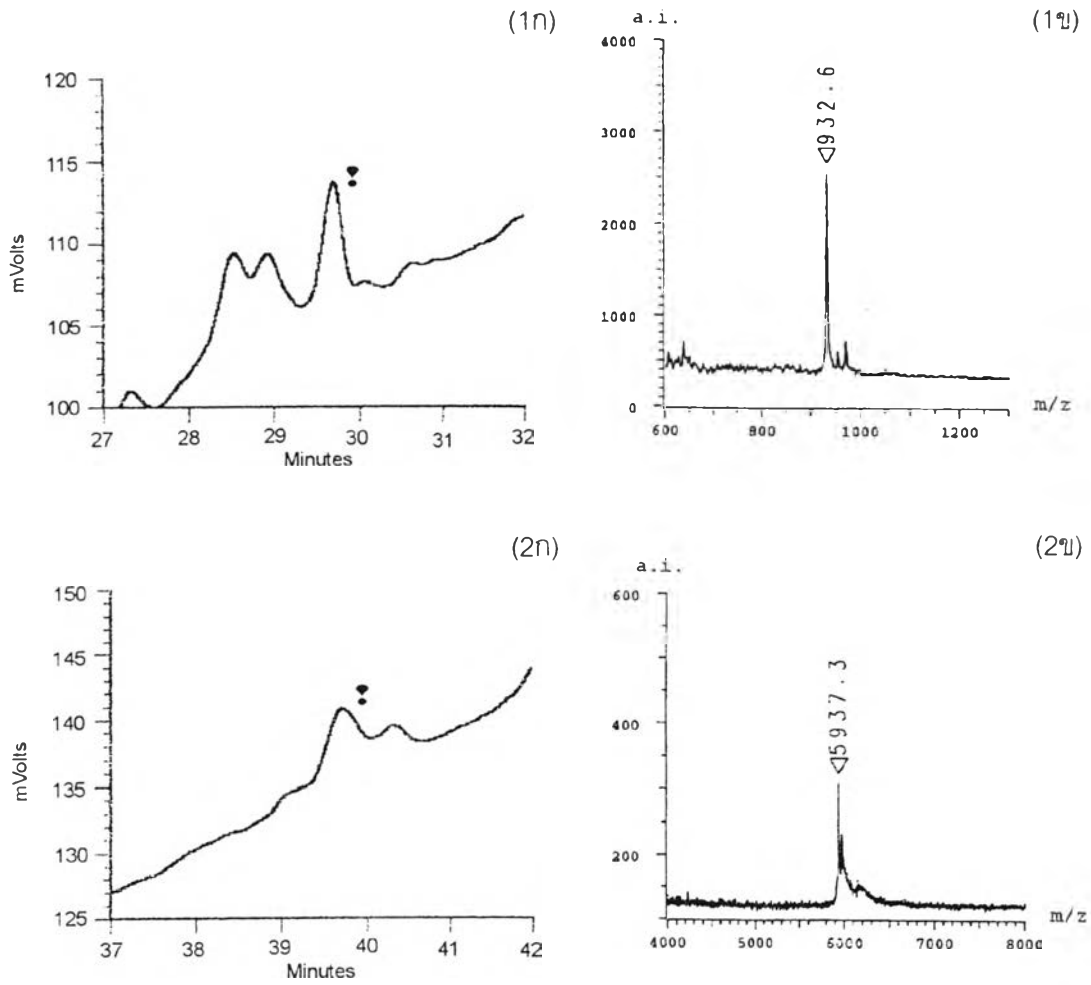
☆ CHH ● Unknown



ภาพประกอบ 4.6 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

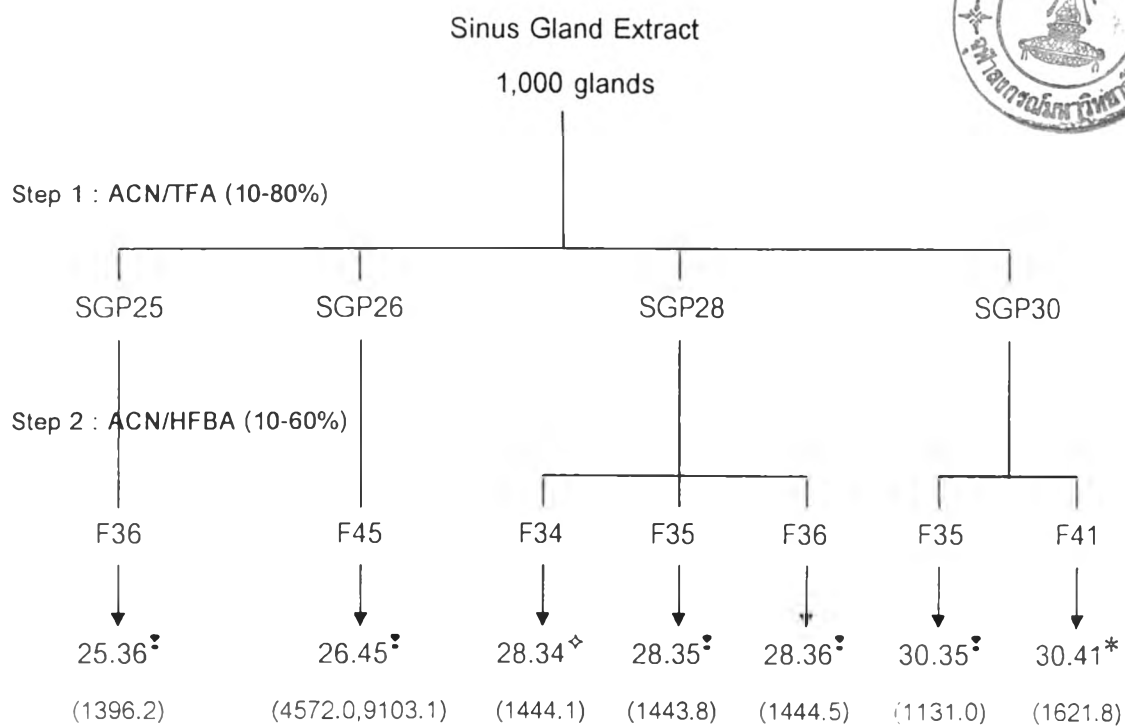
SGP21.34 (1), SGP21.38 (2) และ SGP 21.39 (3)

! Unknown



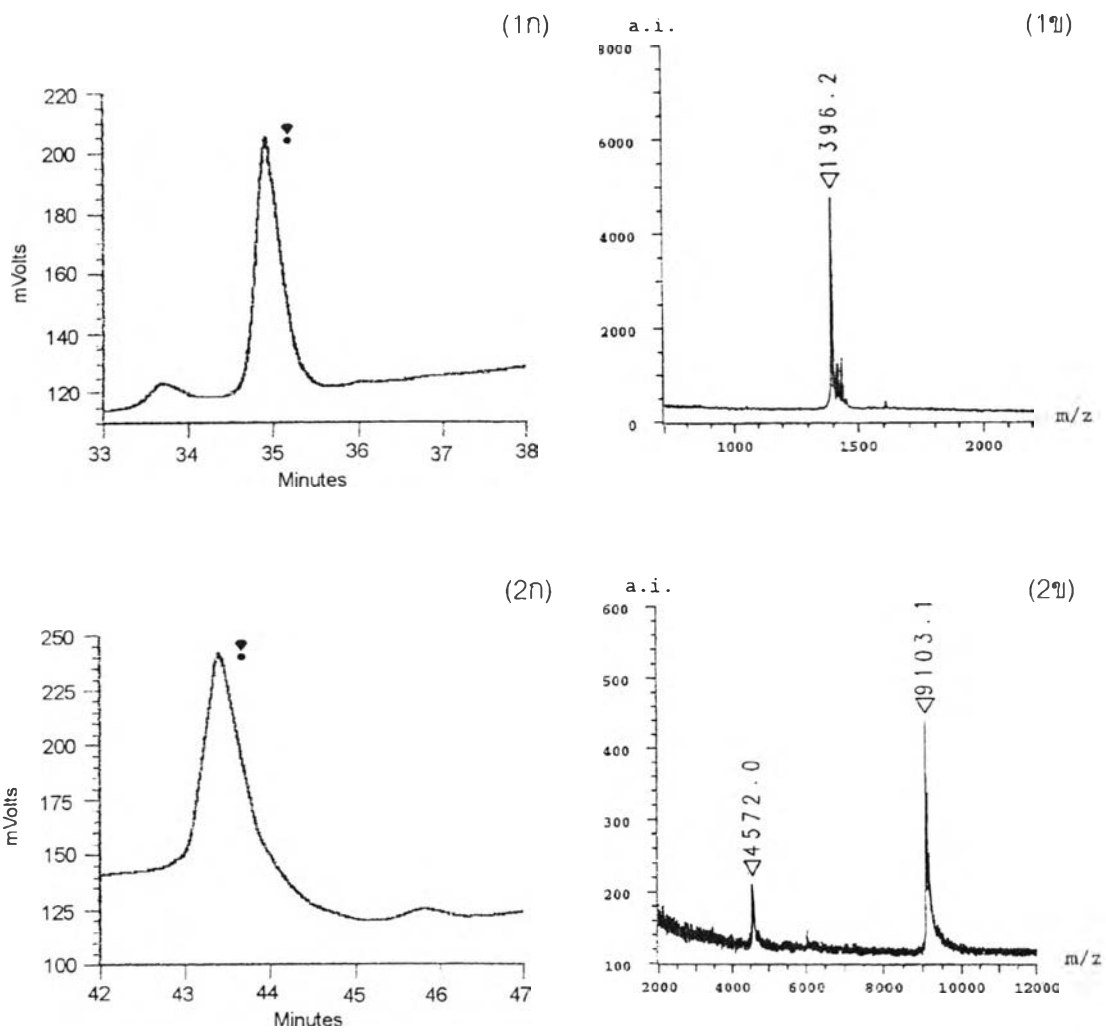
ภาพประกอบ 4.7 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP23.31 (1) และ SGP23.41 (2)

❓ Unknown



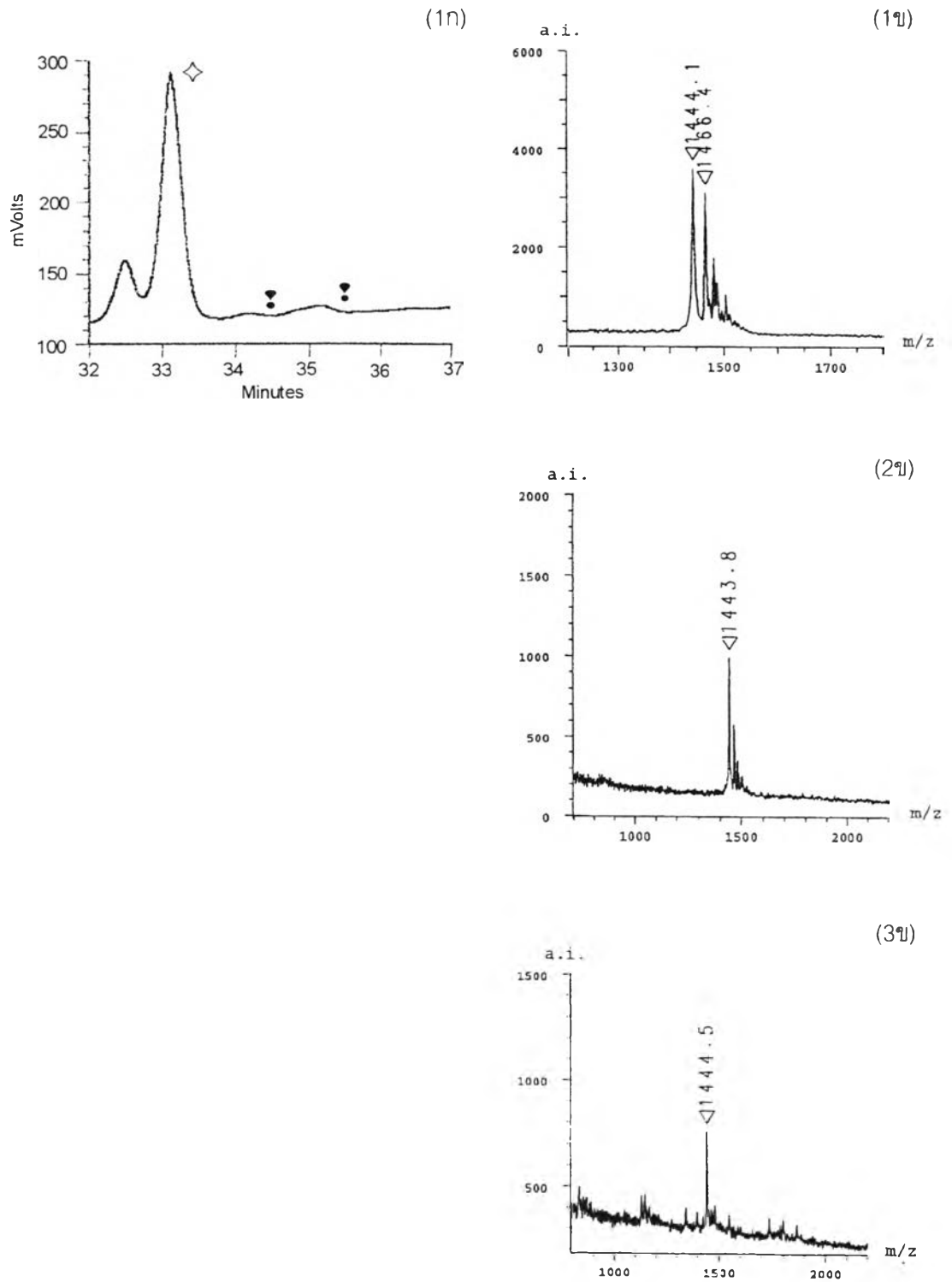
- * FM
- ◇ PDH
- Unknown
- () Molecular weight

ภาพประกอบ 4.8 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 25 ถึง แฟรคชันที่ 30



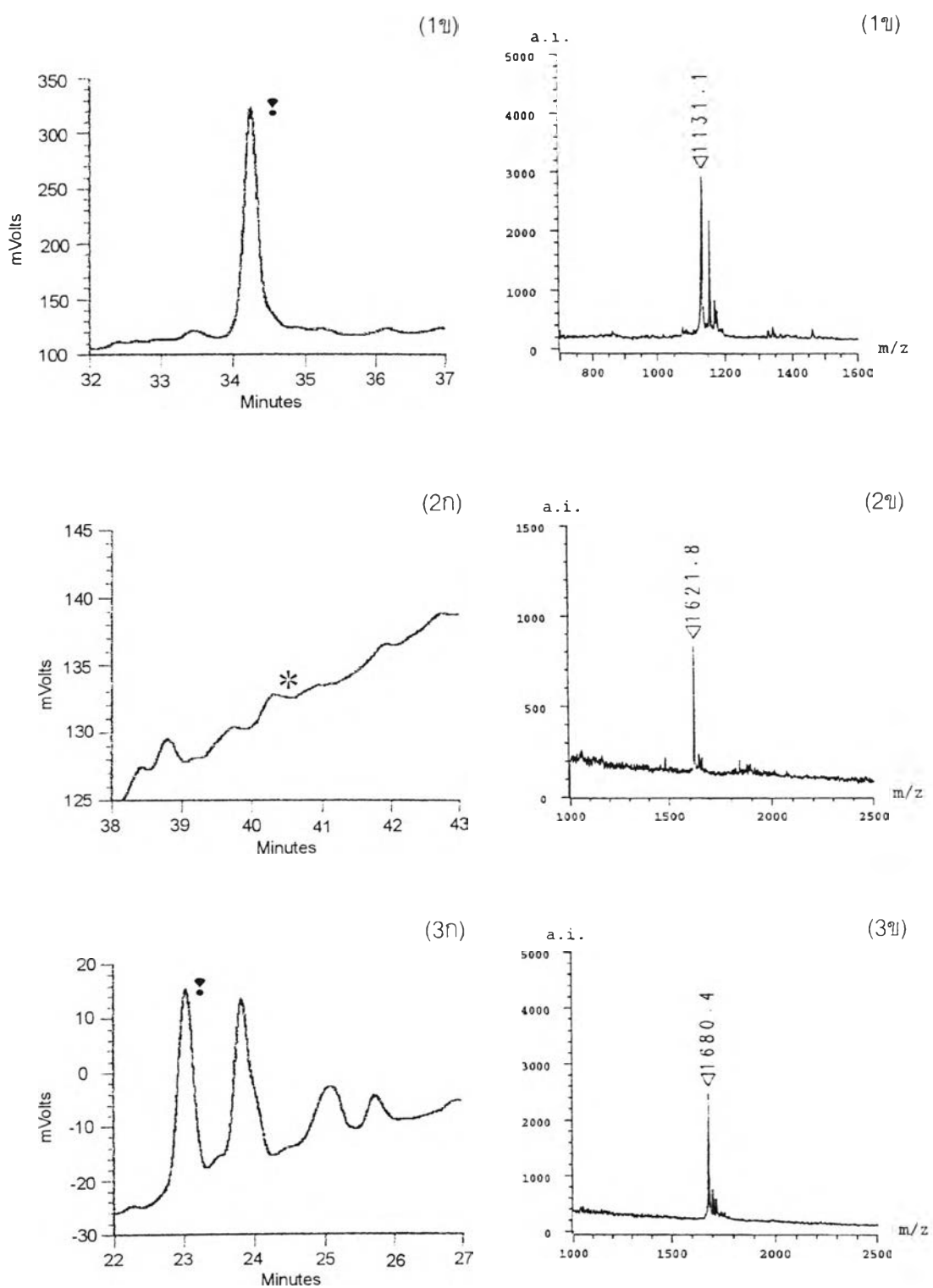
ภาพประกอบ 4.9 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP25.36 (1) และ SGP26.45 (2)

❓ Unknown



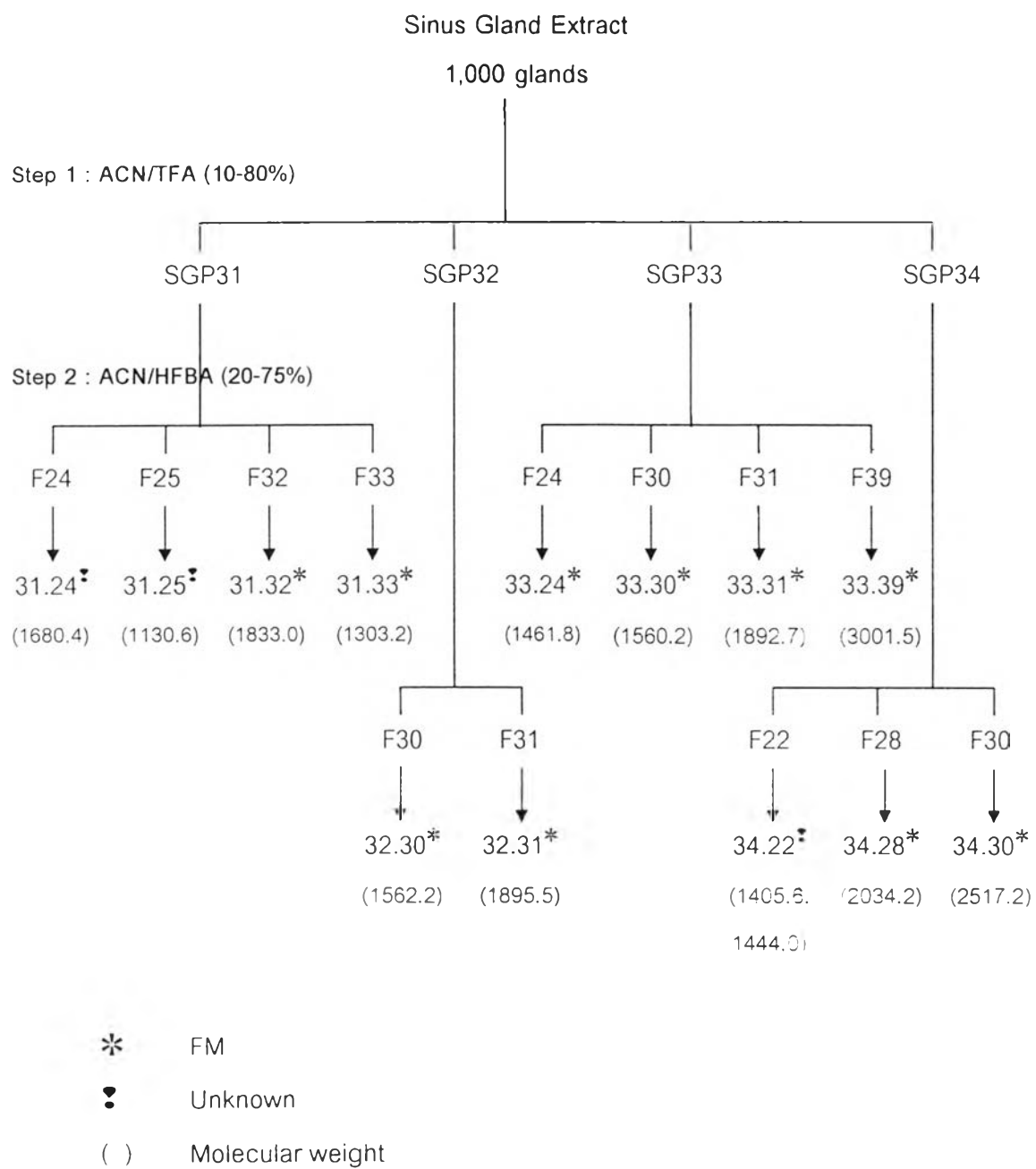
ภาพประกอบ 4.10 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP28.34 (1), SGP28.35 (2) และ SGP 28.36 (3)

◇ PDH ! Unknown

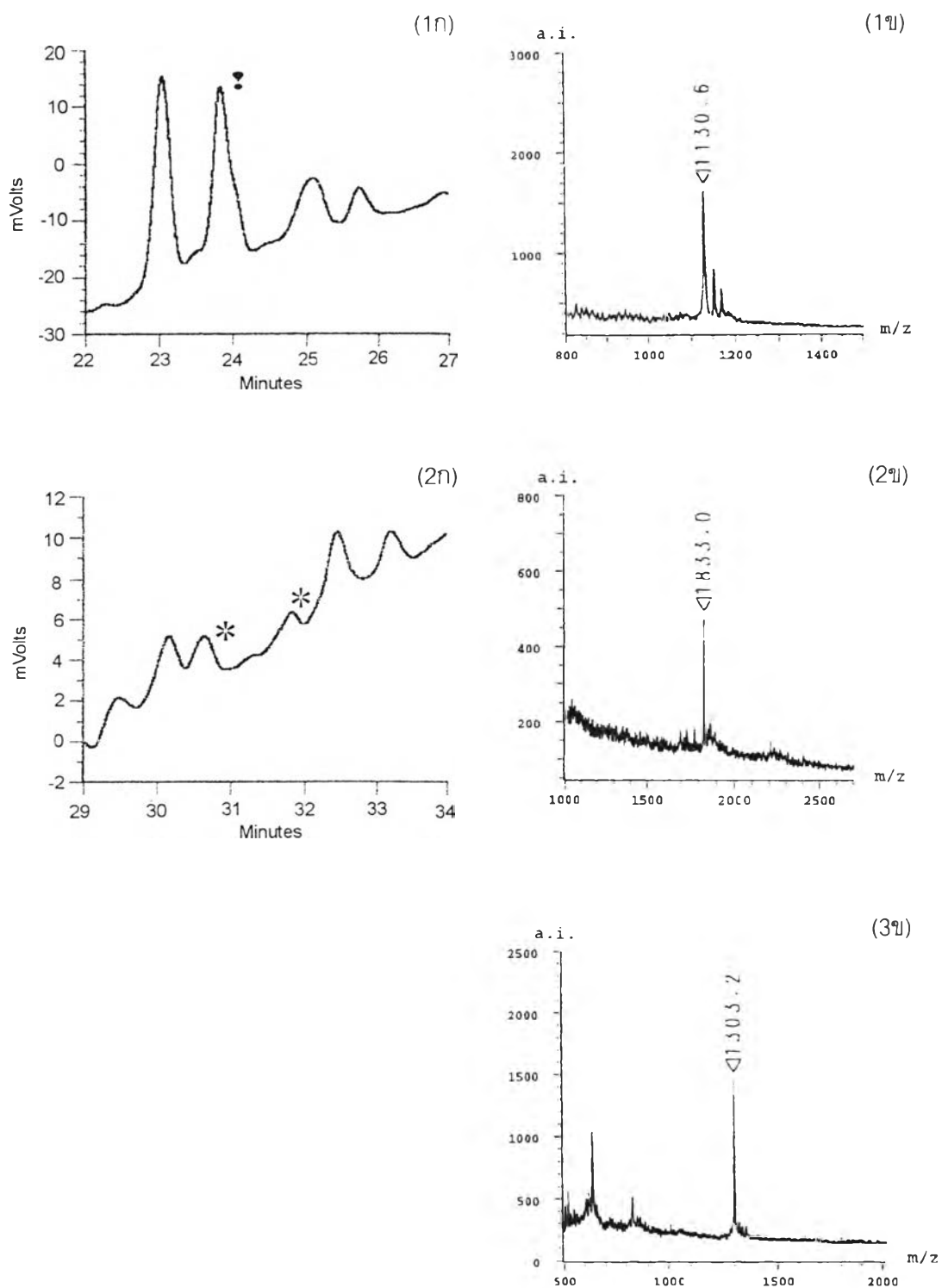


ภาพประกอบ 4.11 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP30.35 (1), SGP30.41 (2) และ SGP 31.24 (3)

• Unknown * FM



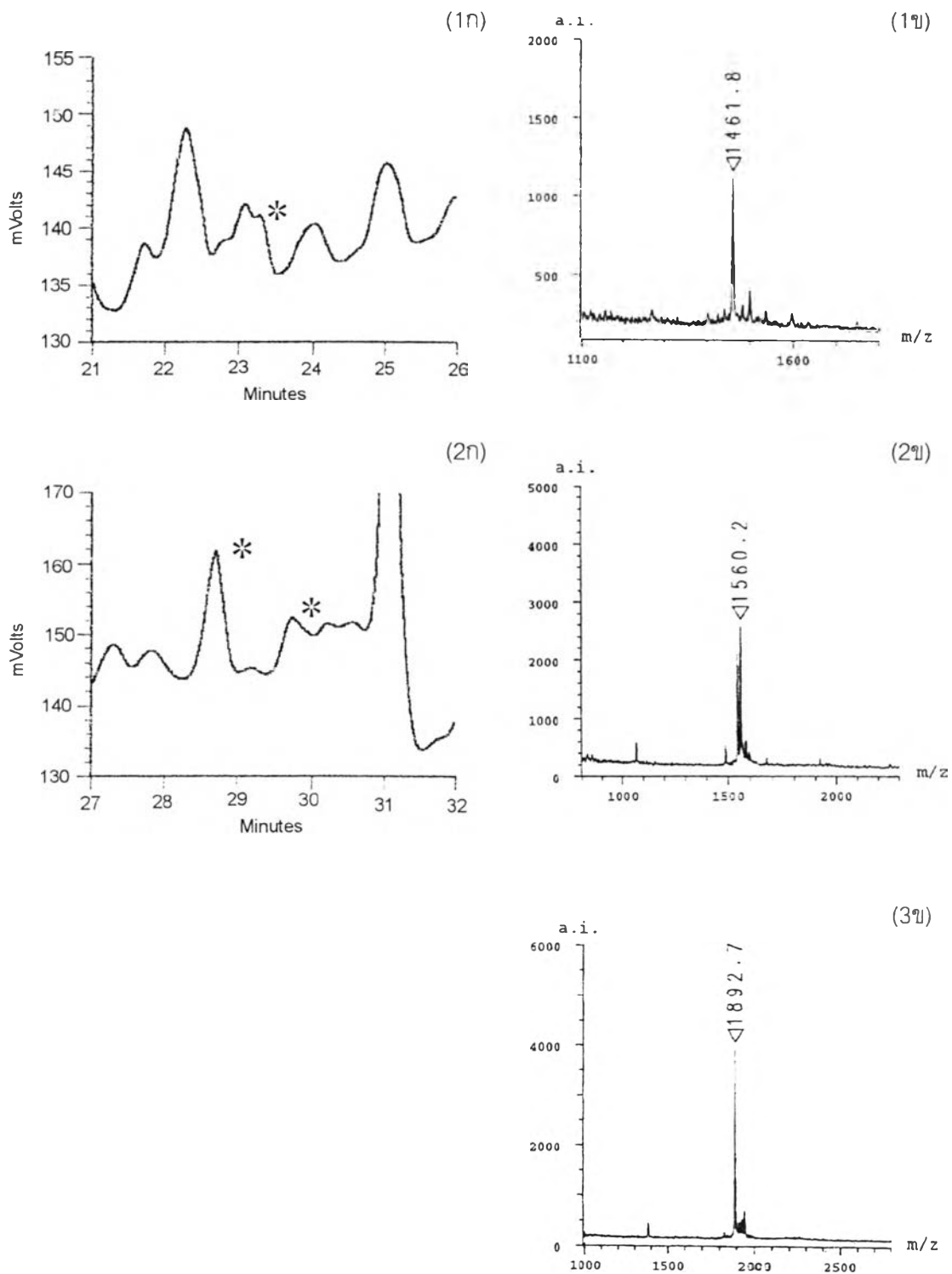
ภาพประกอบ 4.12 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 31 ถึง แฟรคชันที่ 34



ภาพประกอบ 4.13 โคโรมาโตแกรมของเพปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเพปไทด์ (ข)
SGP31.25 (1), SGP31.32 (2) และ SGP 31.33 (3)

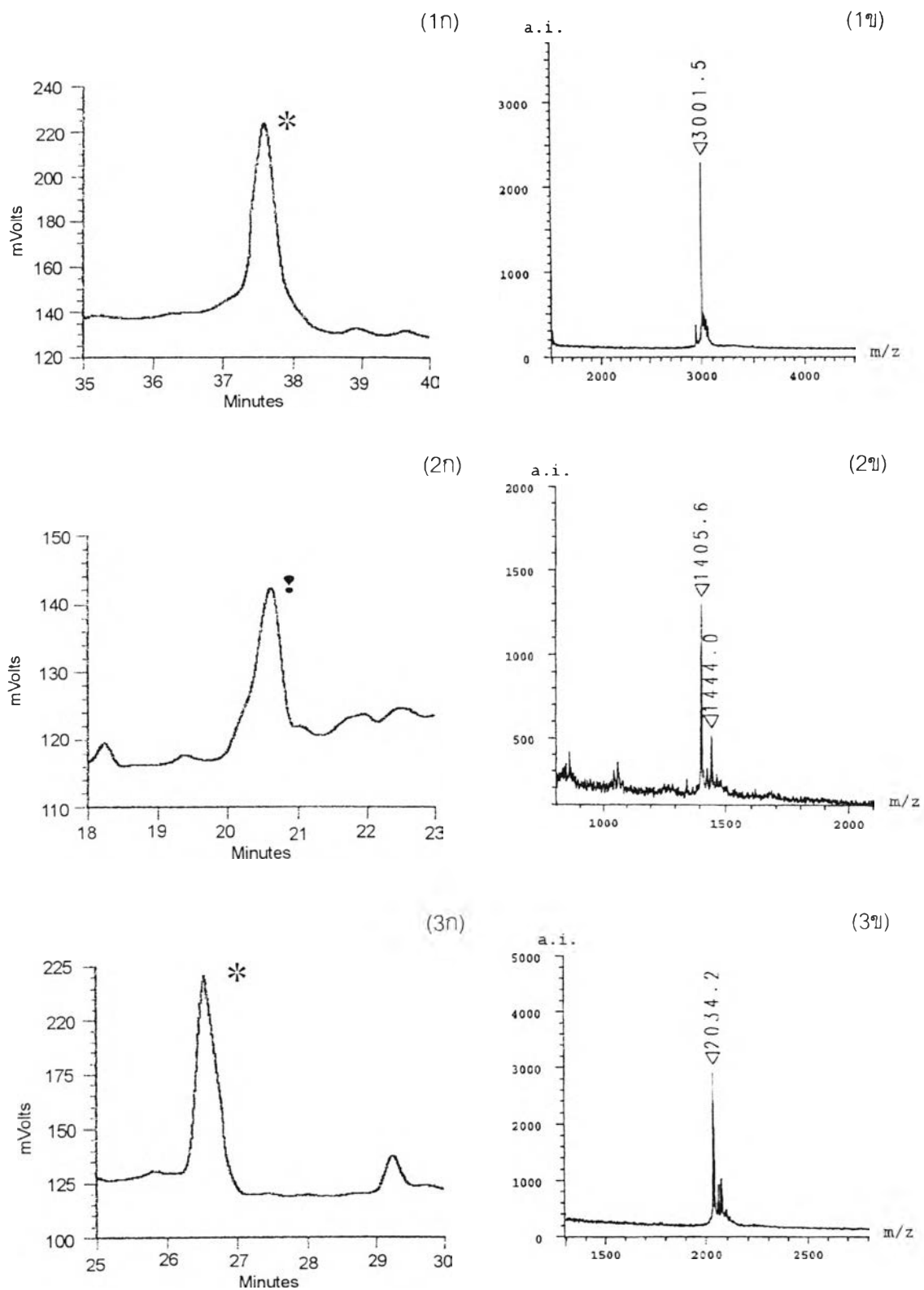
❓ Unknown * FM

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย



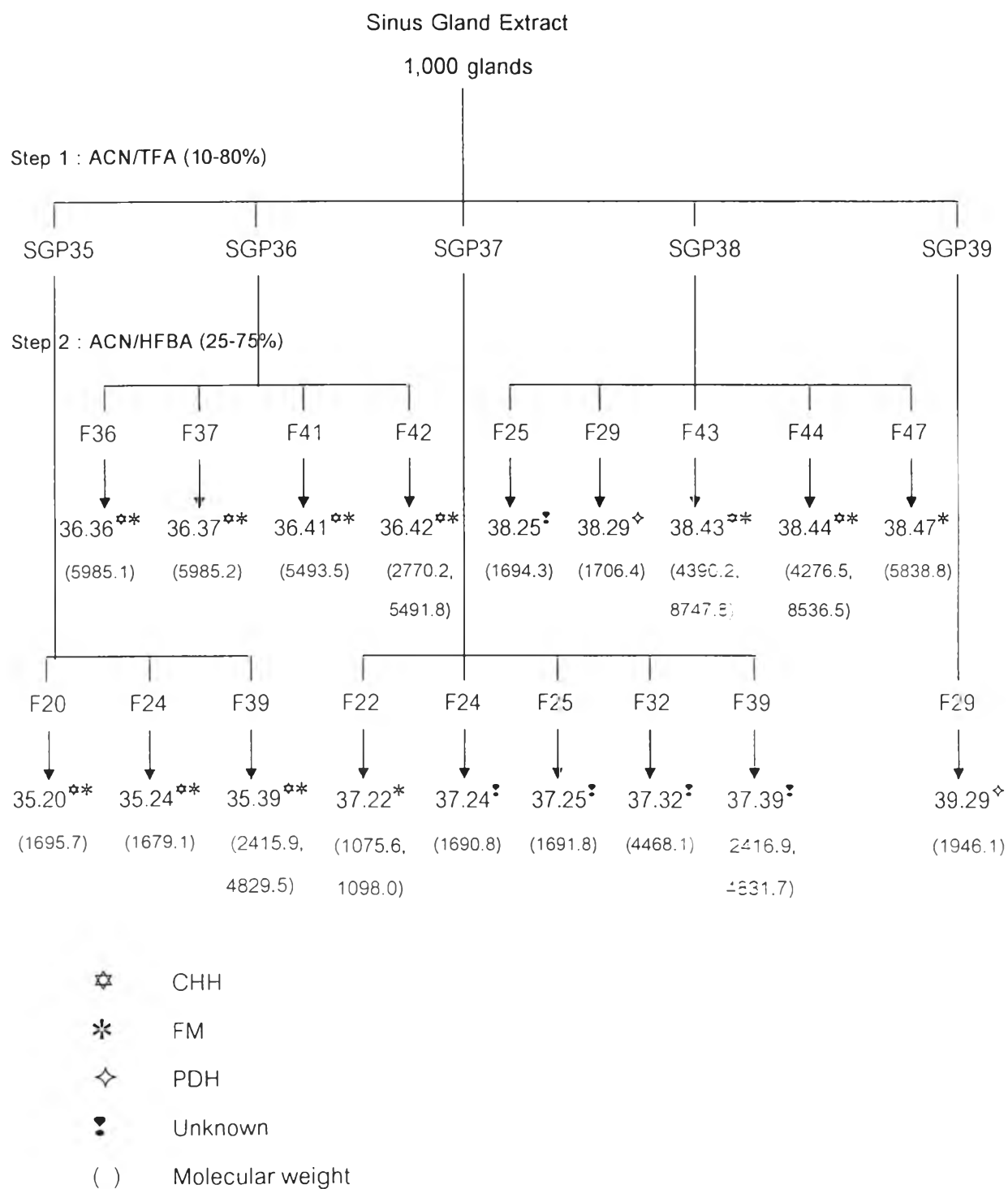
ภาพประกอบ 4.15 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP33.24 (1), SGP33.30 (2) และ SGP 33.31 (3)

* FM

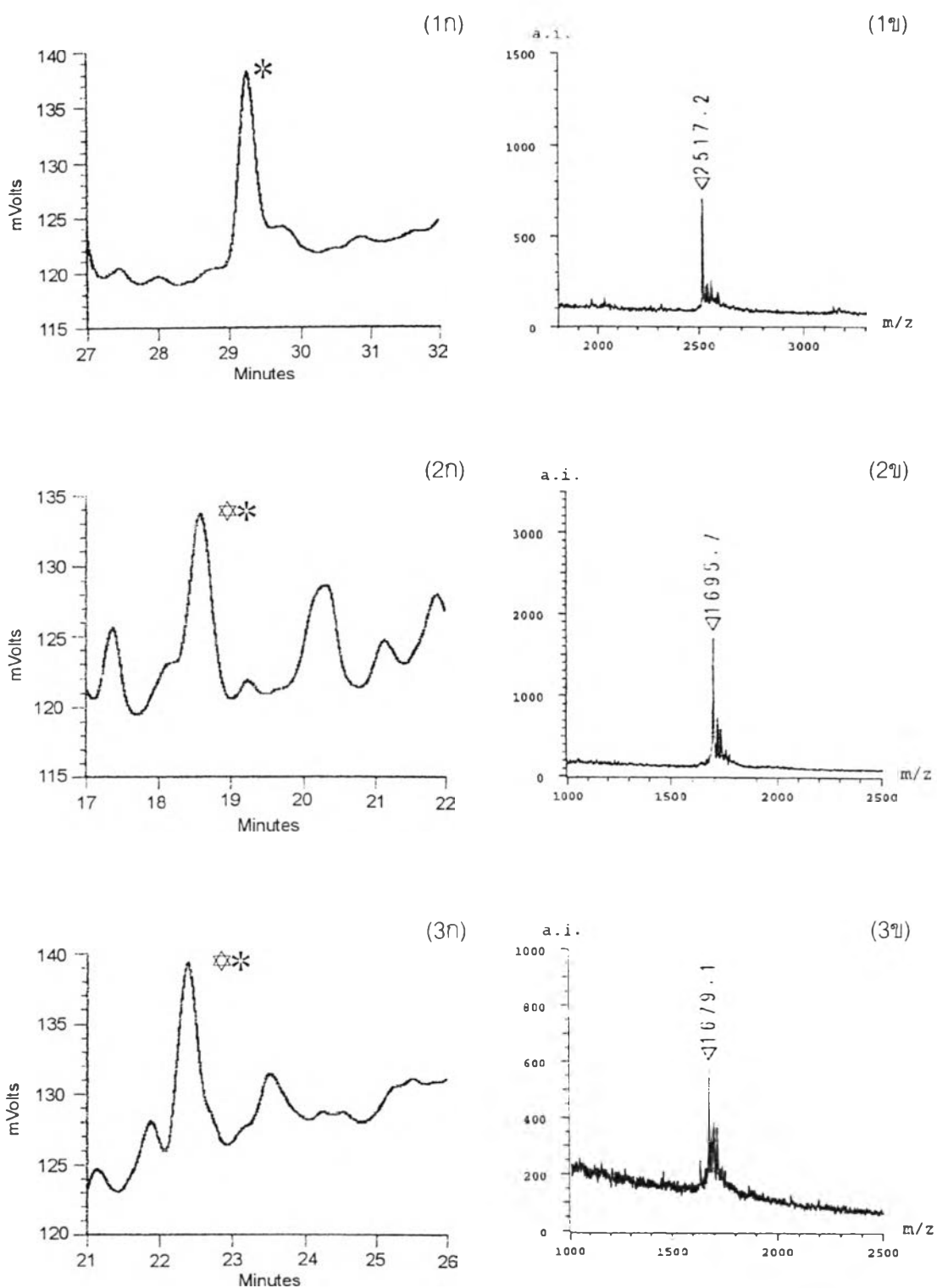


ภาพประกอบ 4.16 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP33.39 (1), SGP34.22 (2) และ SGP 34.28 (3)

? Unknown * FM



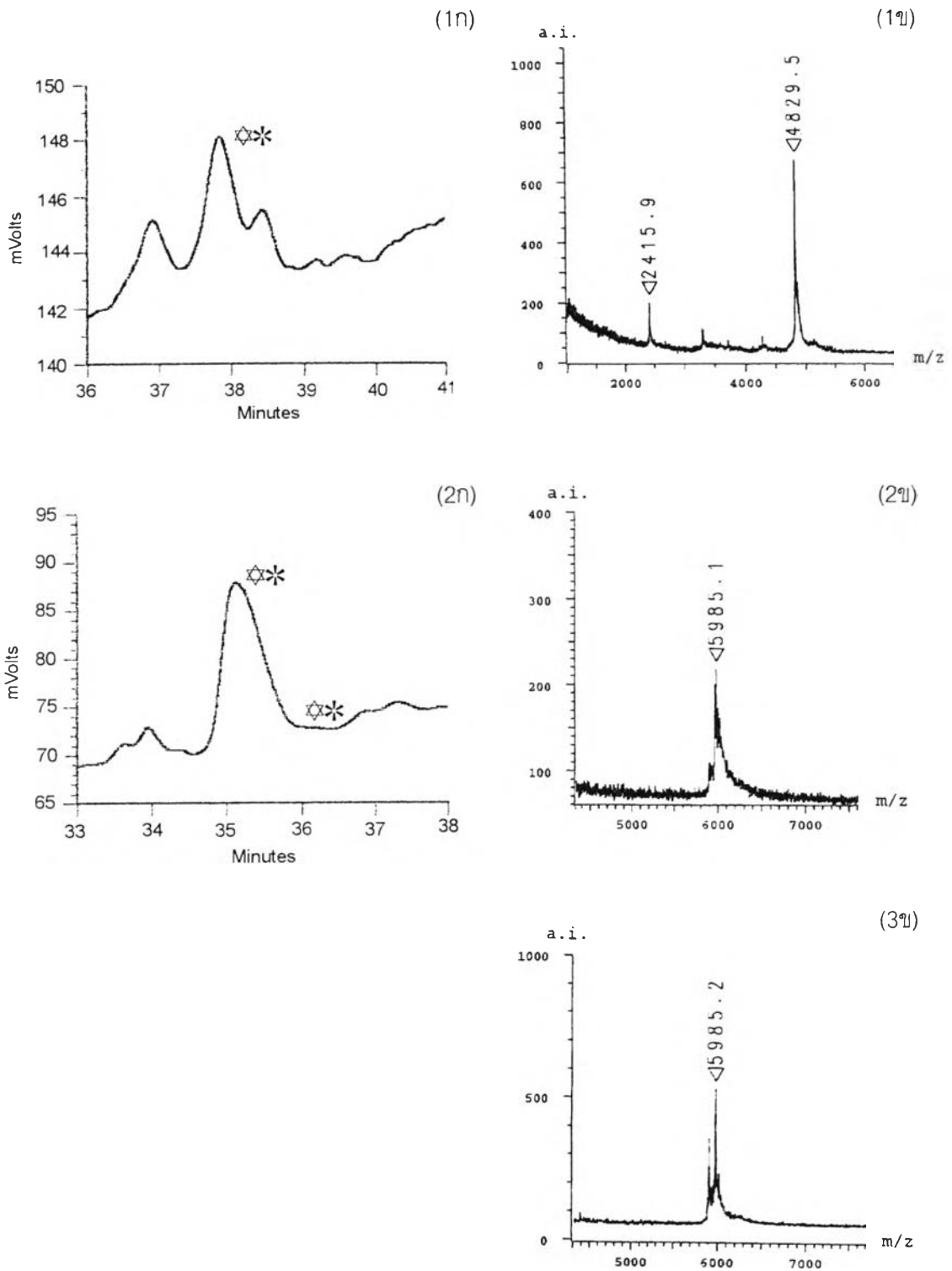
ภาพประกอบ 4.17 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 35 ถึง แฟรคชันที่ 39



ภาพประกอบ 4.18 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

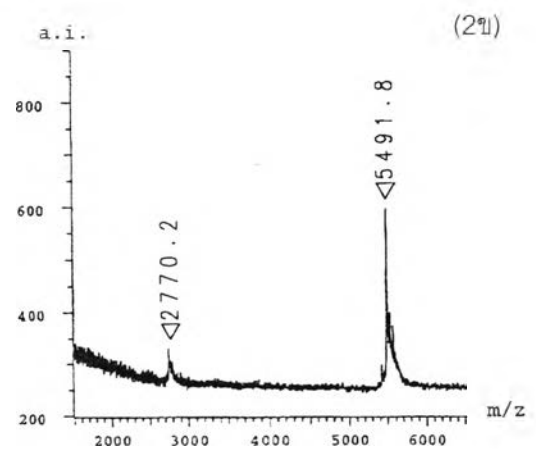
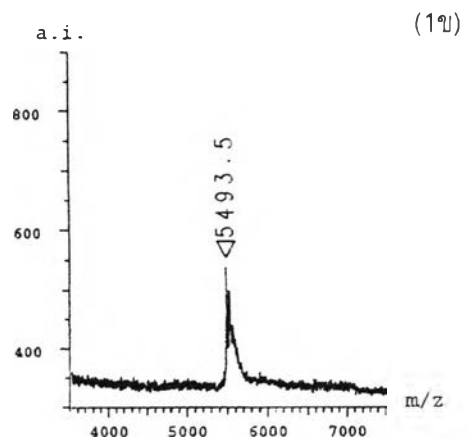
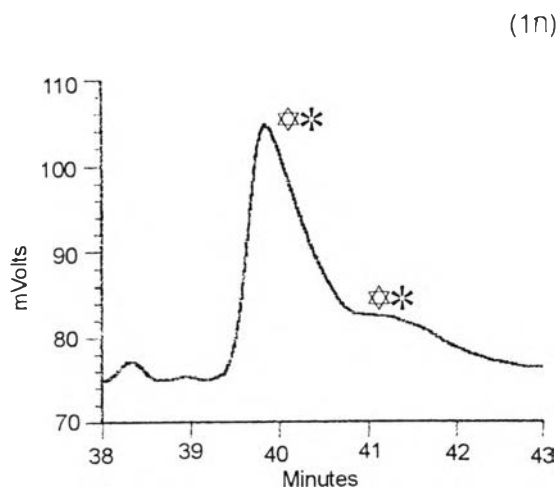
SGP34.30 (1), SGP35.20 (2) และ SGP 35.24 (3)

☆ CHH * FM



ภาพประกอบ 4.19 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP35.39 (1), SGP36.36 (2) และ SGP 36.37 (3)

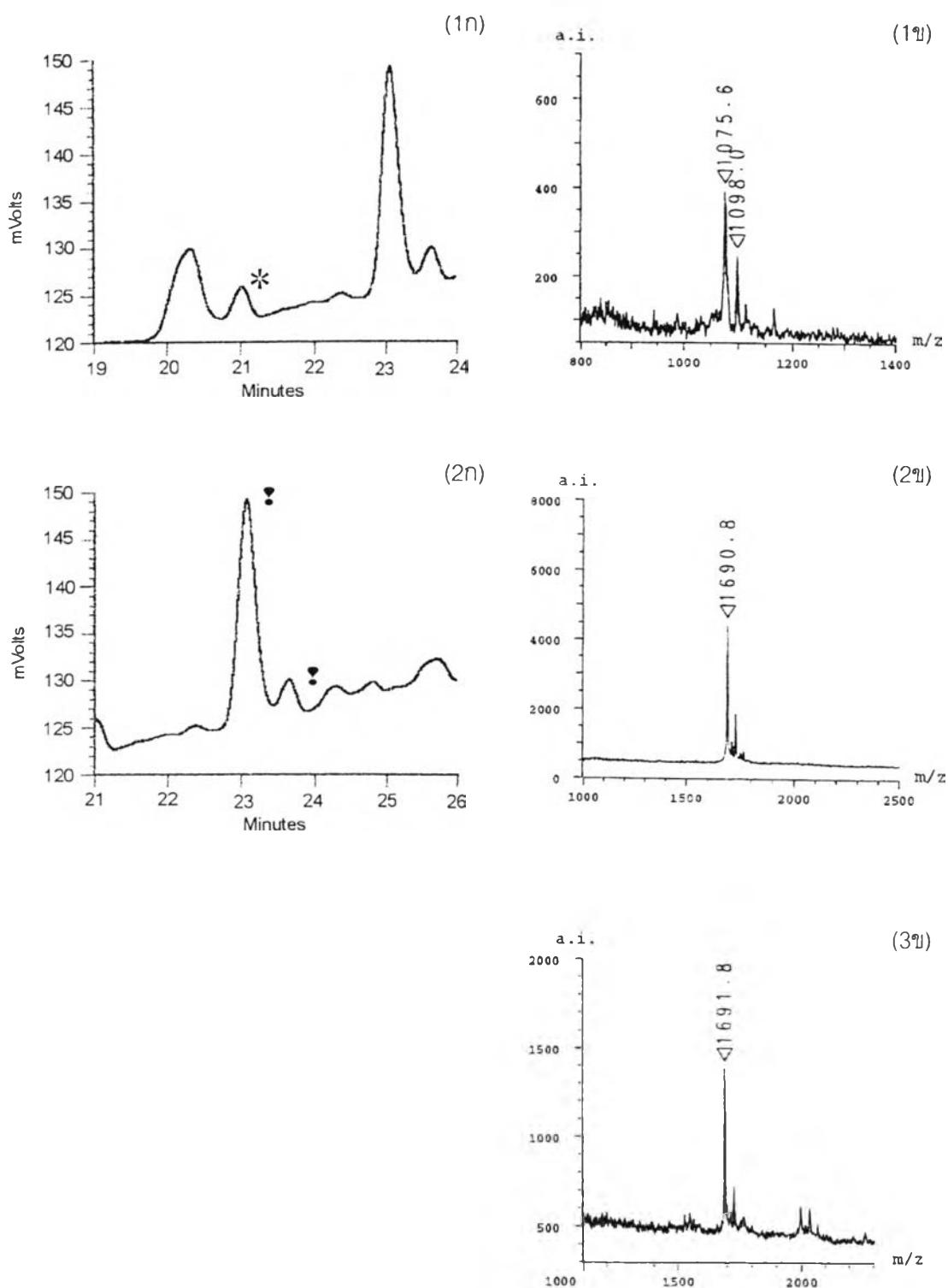
☆ CHH * FM



ภาพประกอบ 4.20 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP36.41 (1) และ SGP36.42 (2)

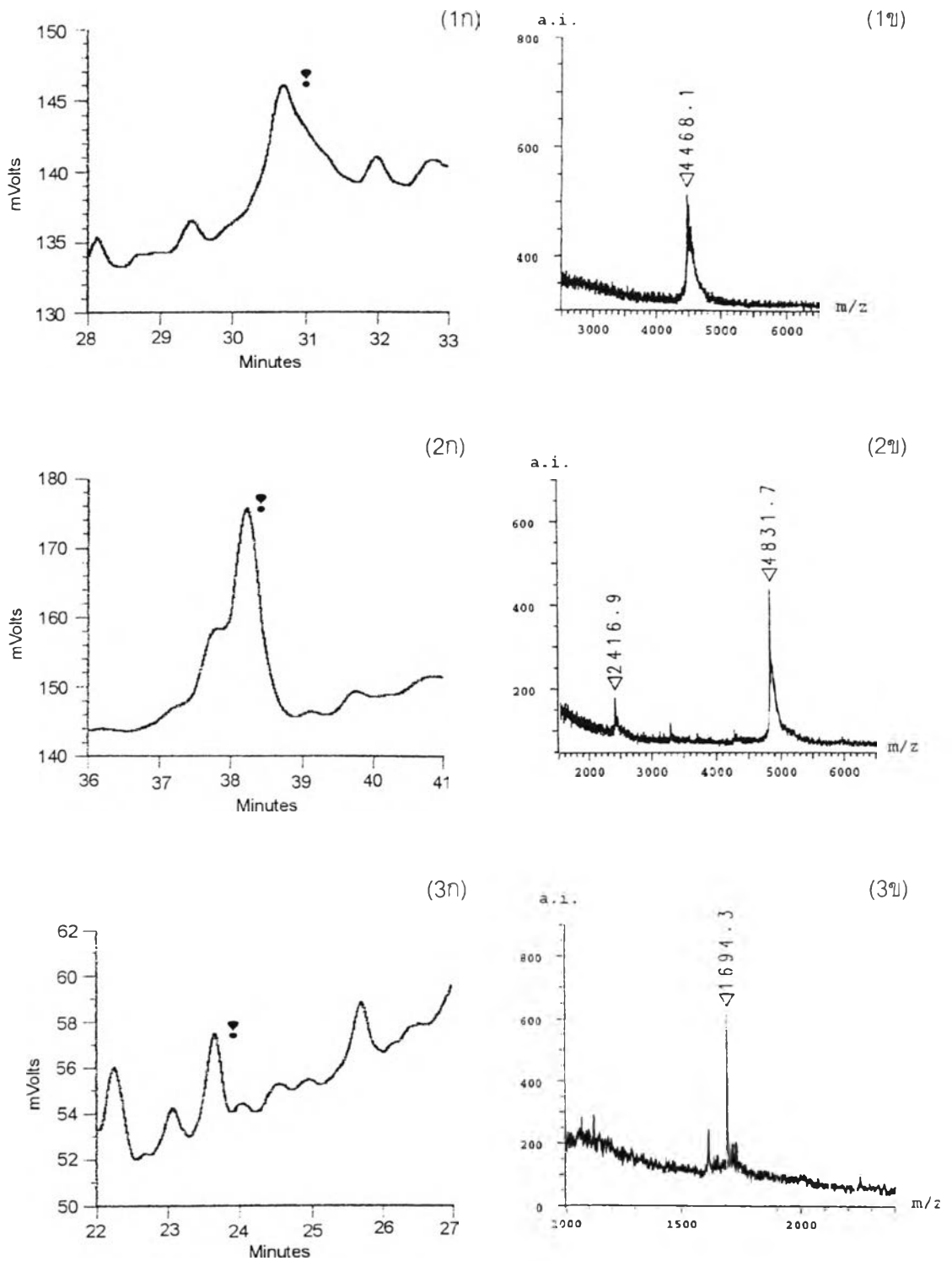
☆ CHH * FM



ภาพประกอบ 4.21 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP37.22 (1), SGP37.24 (2) และ SGP37.25 (3)

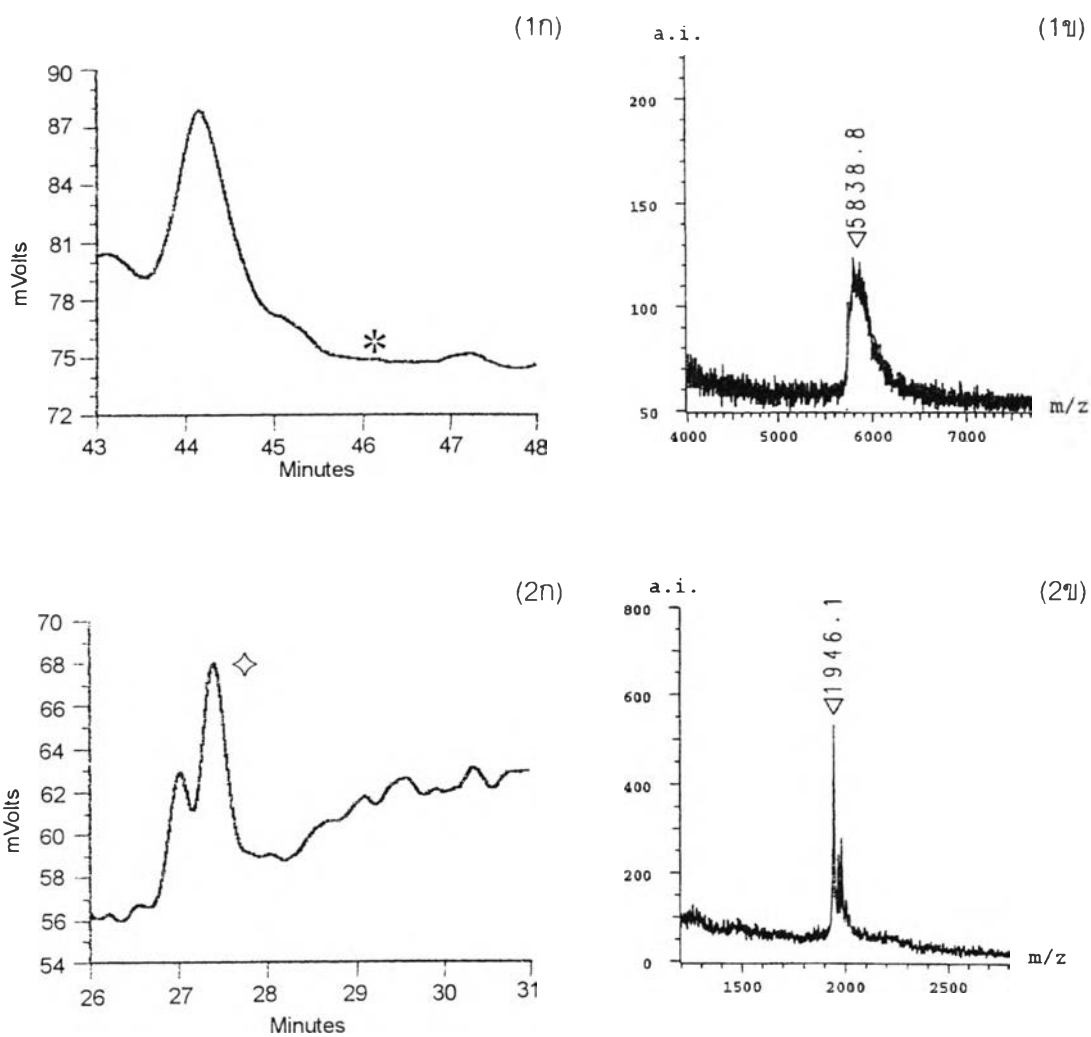
❓ Unknown * FM



ภาพประกอบ 4.22 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP37.32 (1), SGP37.39 (2) และ SGP 38.25 (3)

❓ Unknown

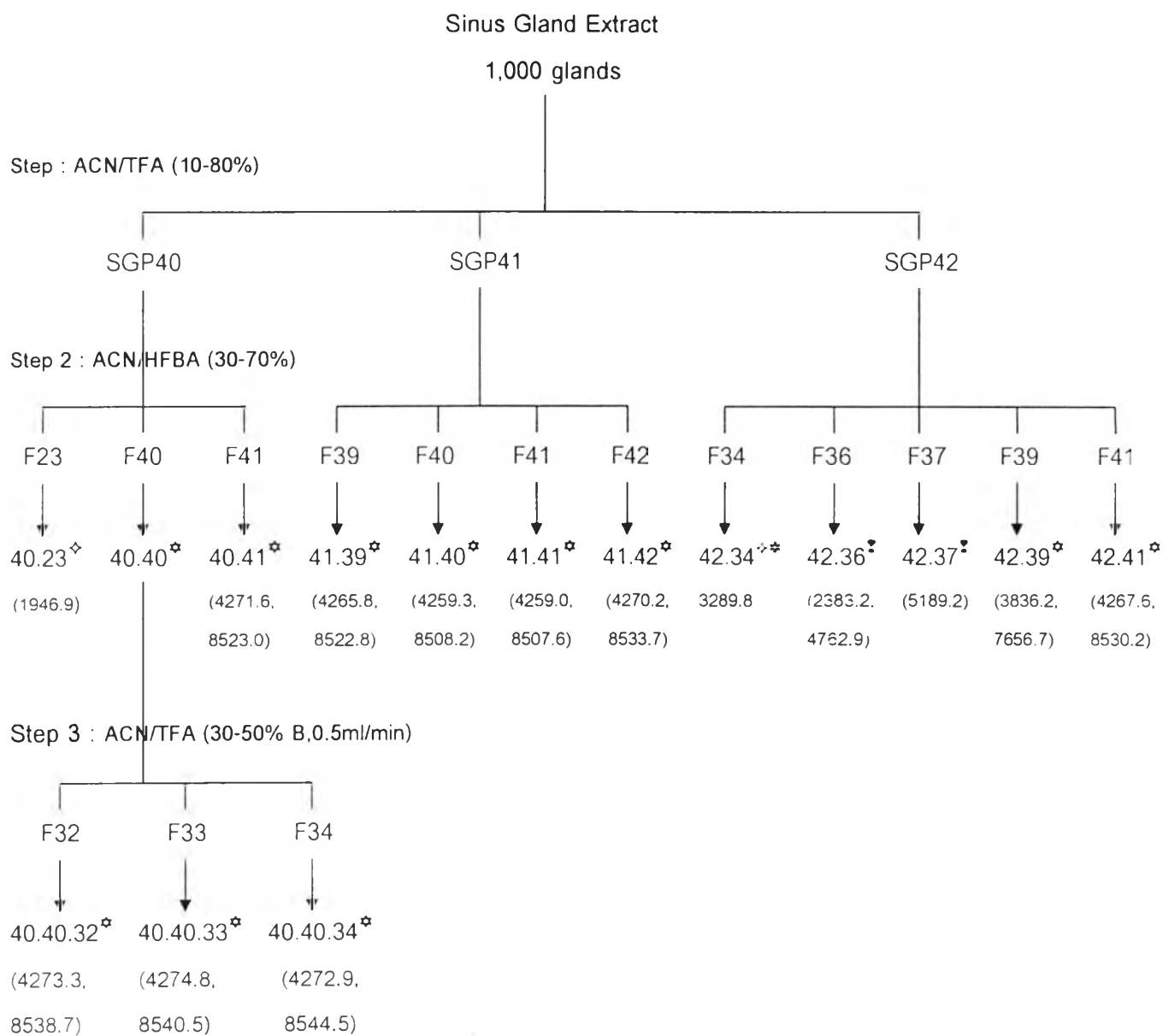
ต้นฉบับ หน้าขาดหาย



ภาพประกอบ 4.24 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

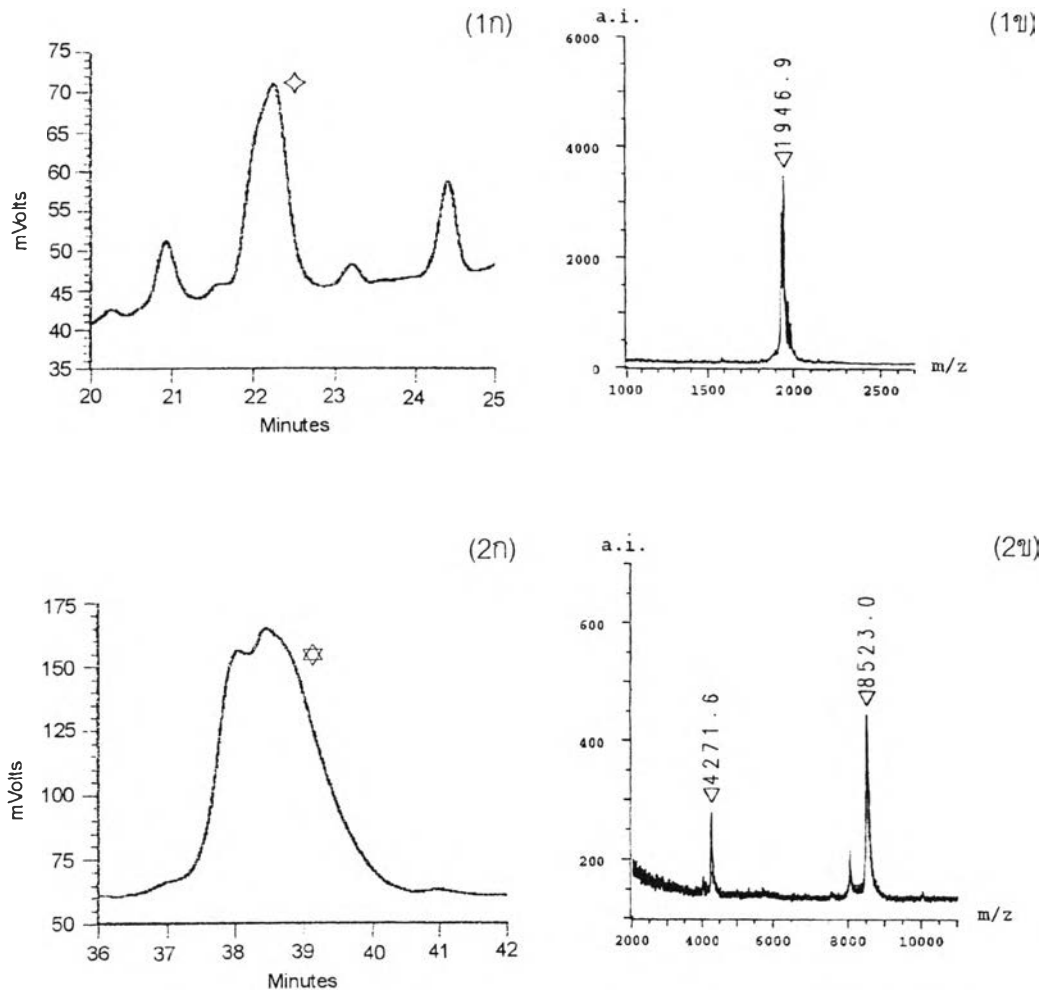
SGP38.47 (1) และ SGP39.29 (2)

* FM ◇ PDH

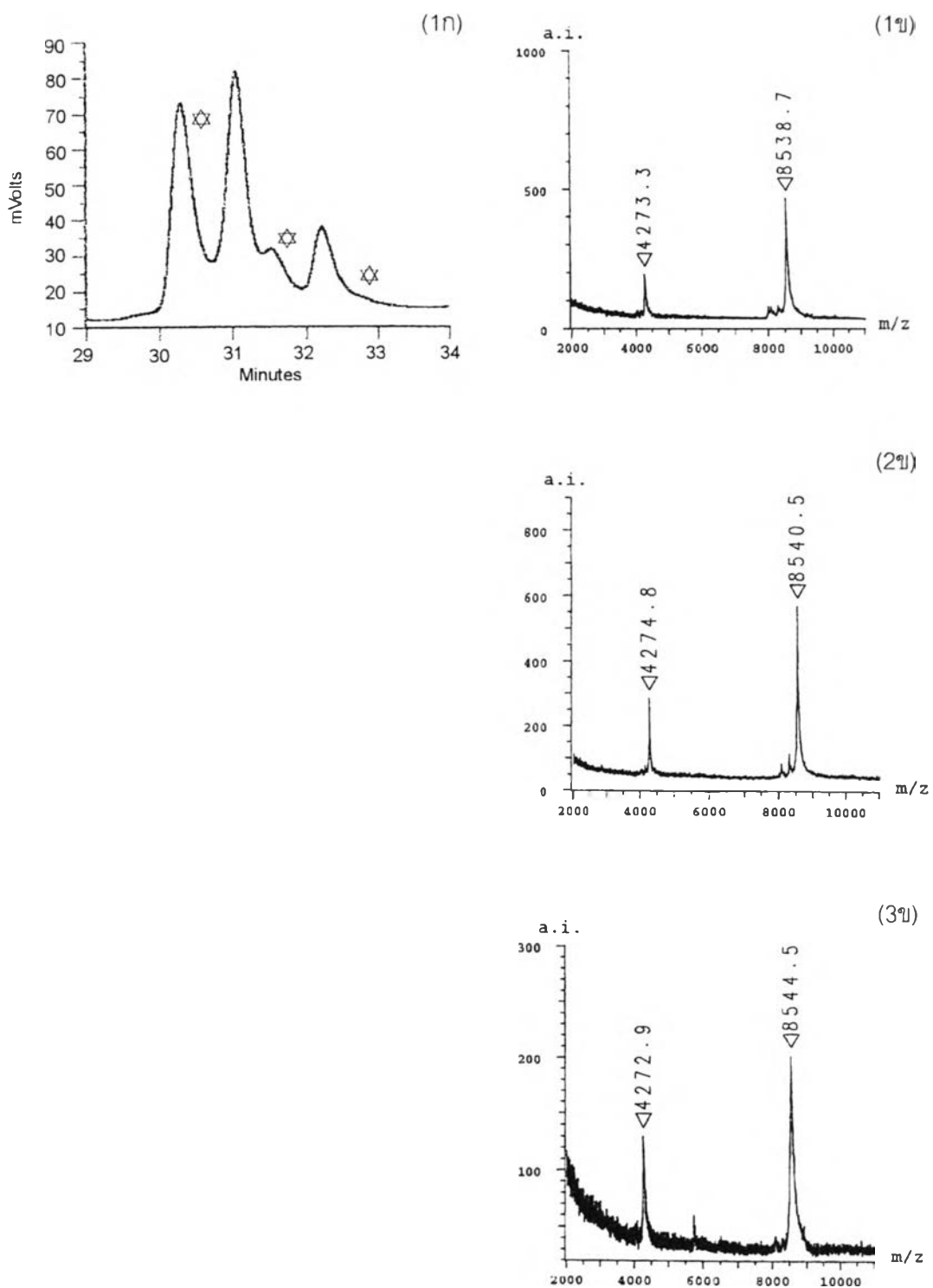


- ☆ CHH
- ◇ PDH
- ⚡ PP6
- ⚡ Unknown
- () Molecular weight

ภาพประกอบ 4.25 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 40 ถึง แฟรคชันที่ 42



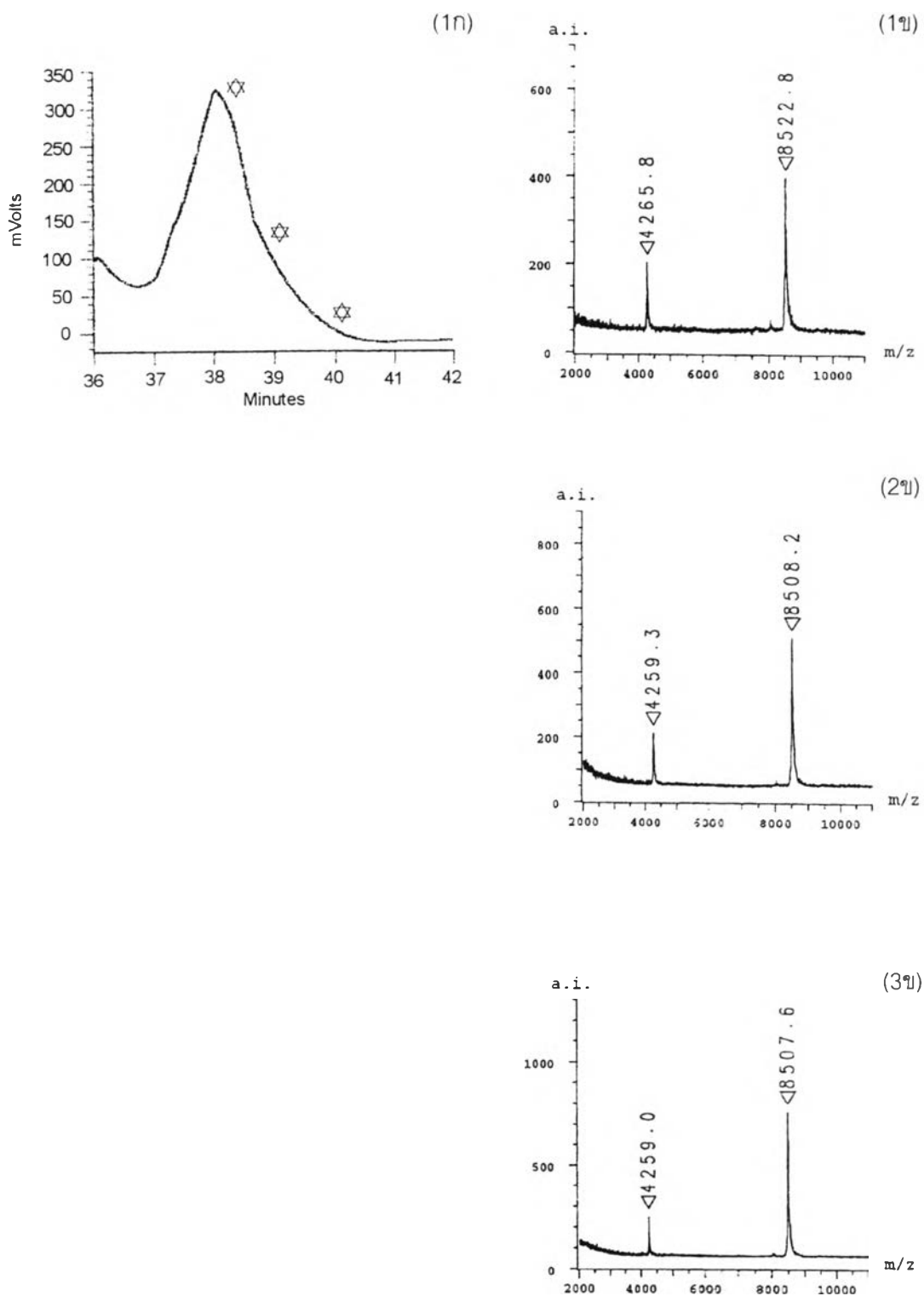
ภาพประกอบ 4.26 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
 SGP40.23 (1) และ SGP40.41 (2)
 ☆ CHH ◇ PDH



ภาพประกอบ 4.27 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP40.40.32 (1), SGP40.40.33 (2) และ SGP40.40.34 (3)

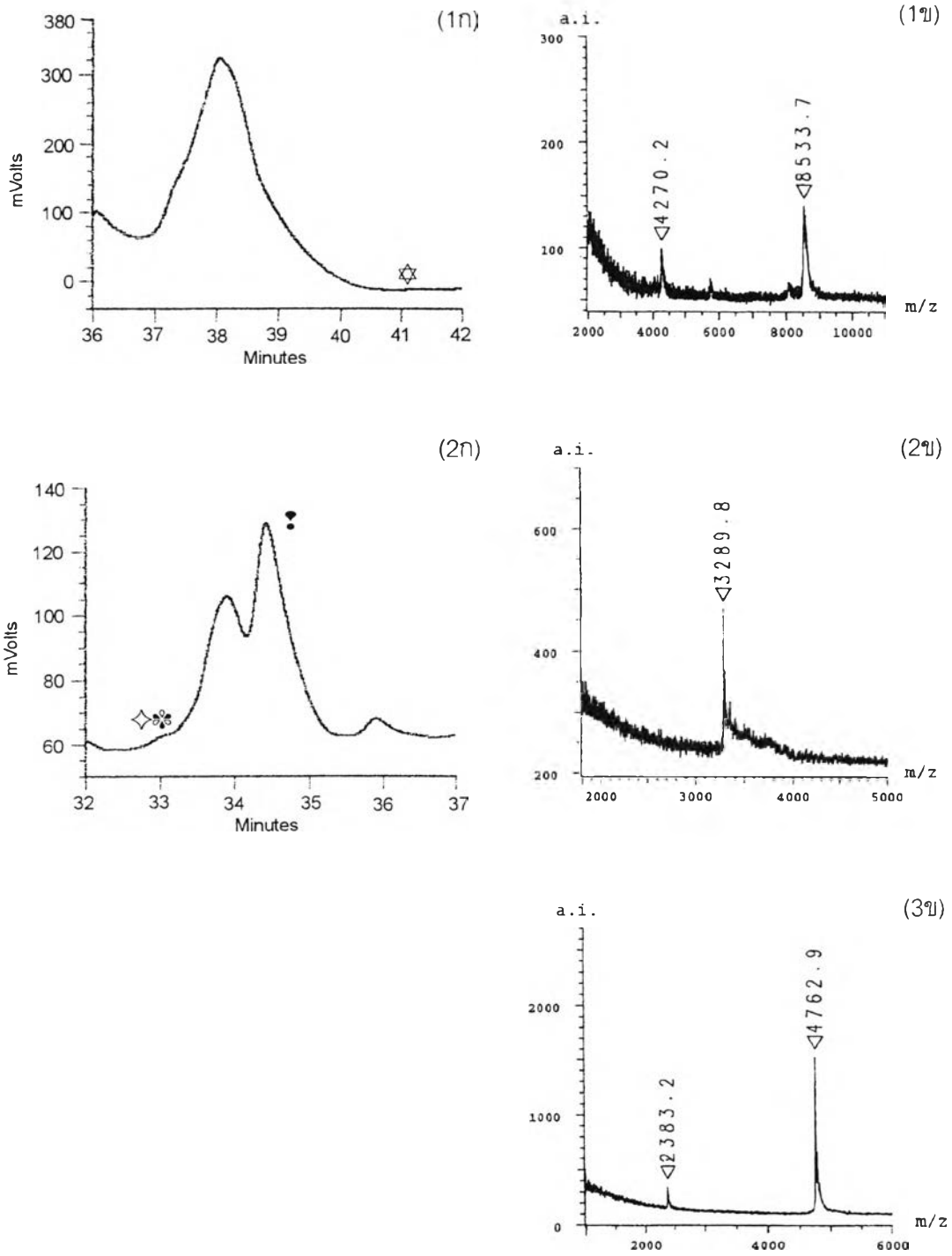
☆ CHH



ภาพประกอบ 4.28 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP41.39 (1), SGP41.40 (2) และ SGP41.41 (3)

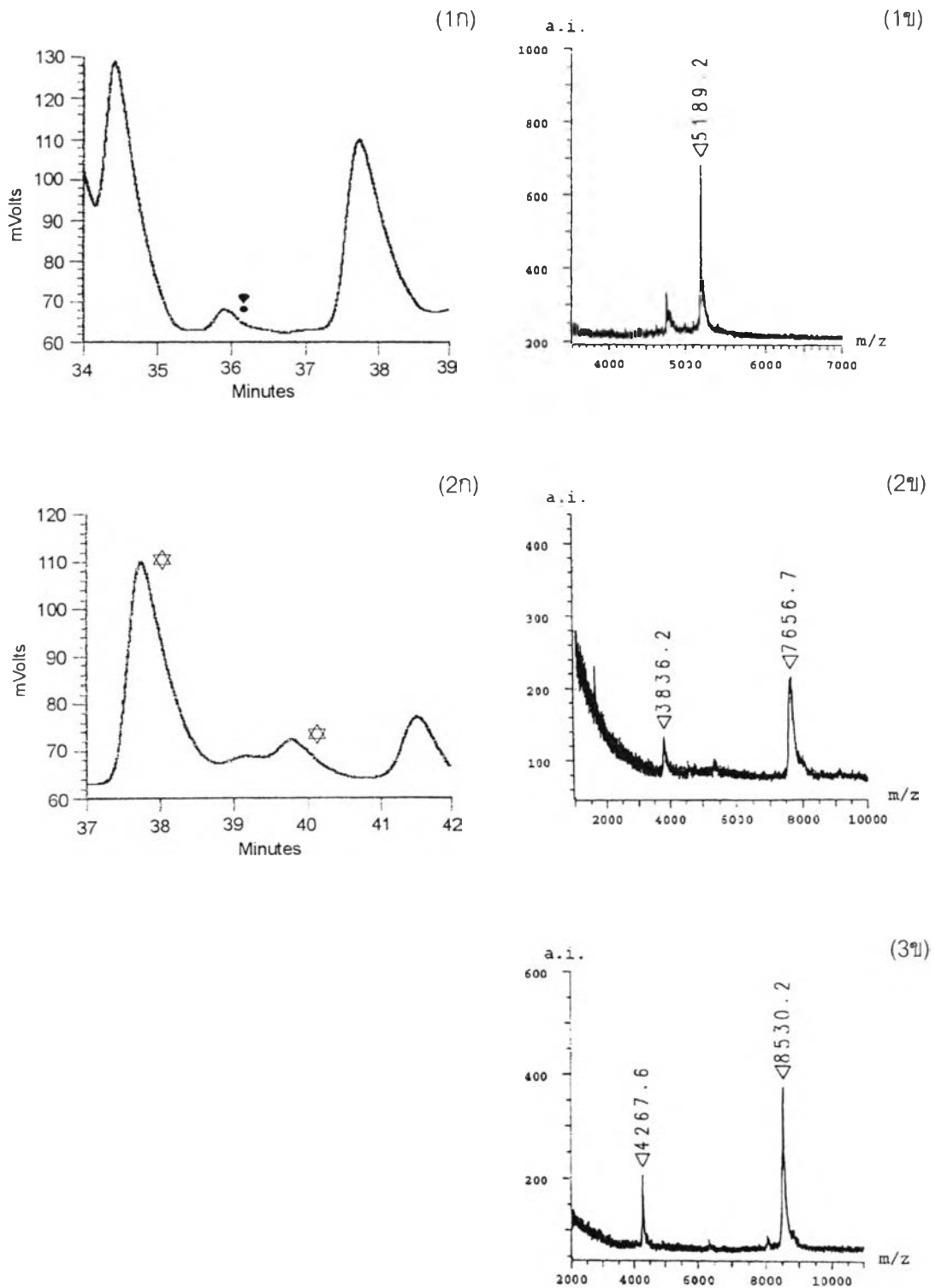
☆ CHH



ภาพประกอบ 4.29 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP41.42 (1), SGP42.34 (2) และ SGP42.36 (3)

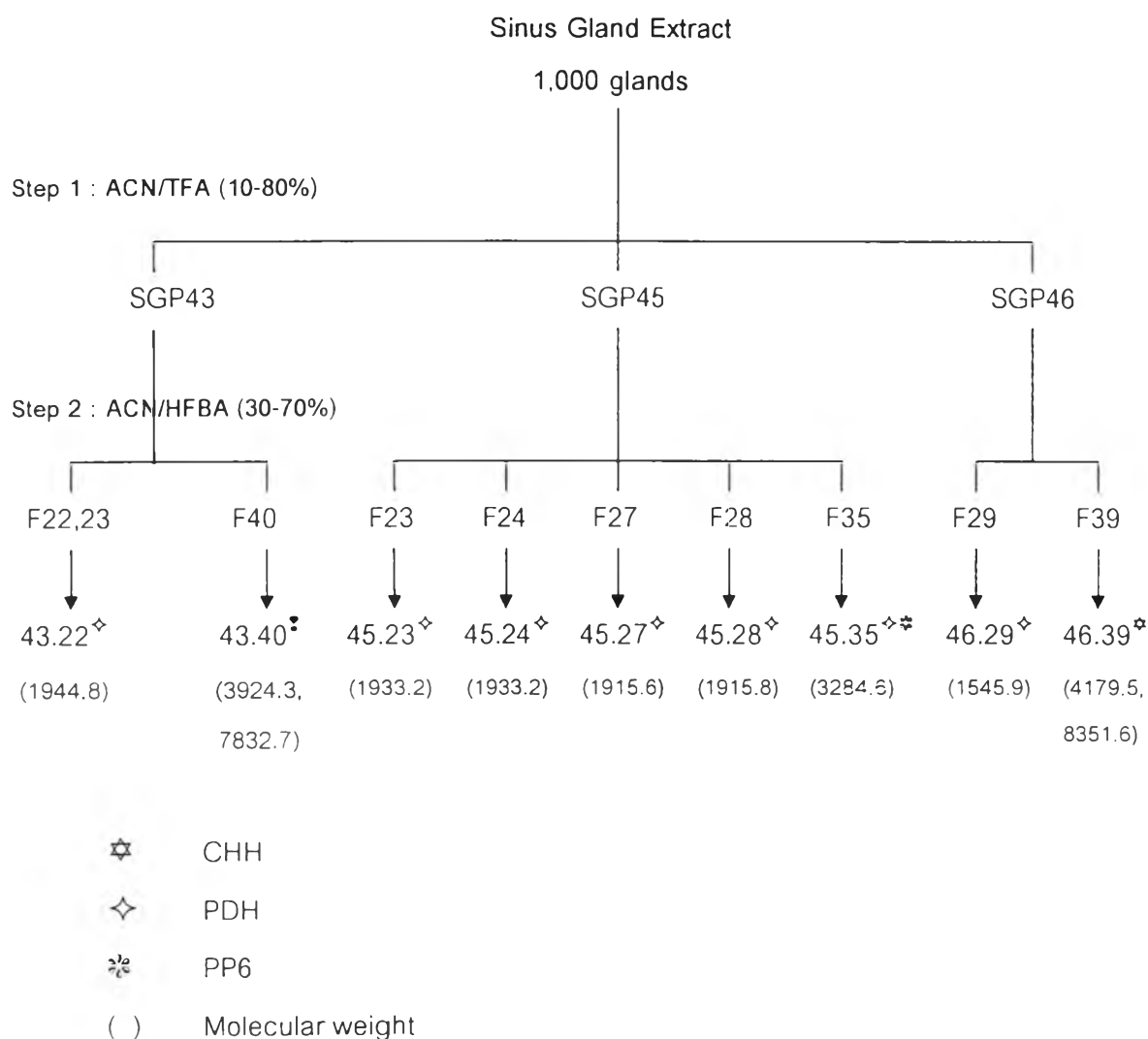
☆ CHH ✿ PP6 ◇ PDH ● Unknown



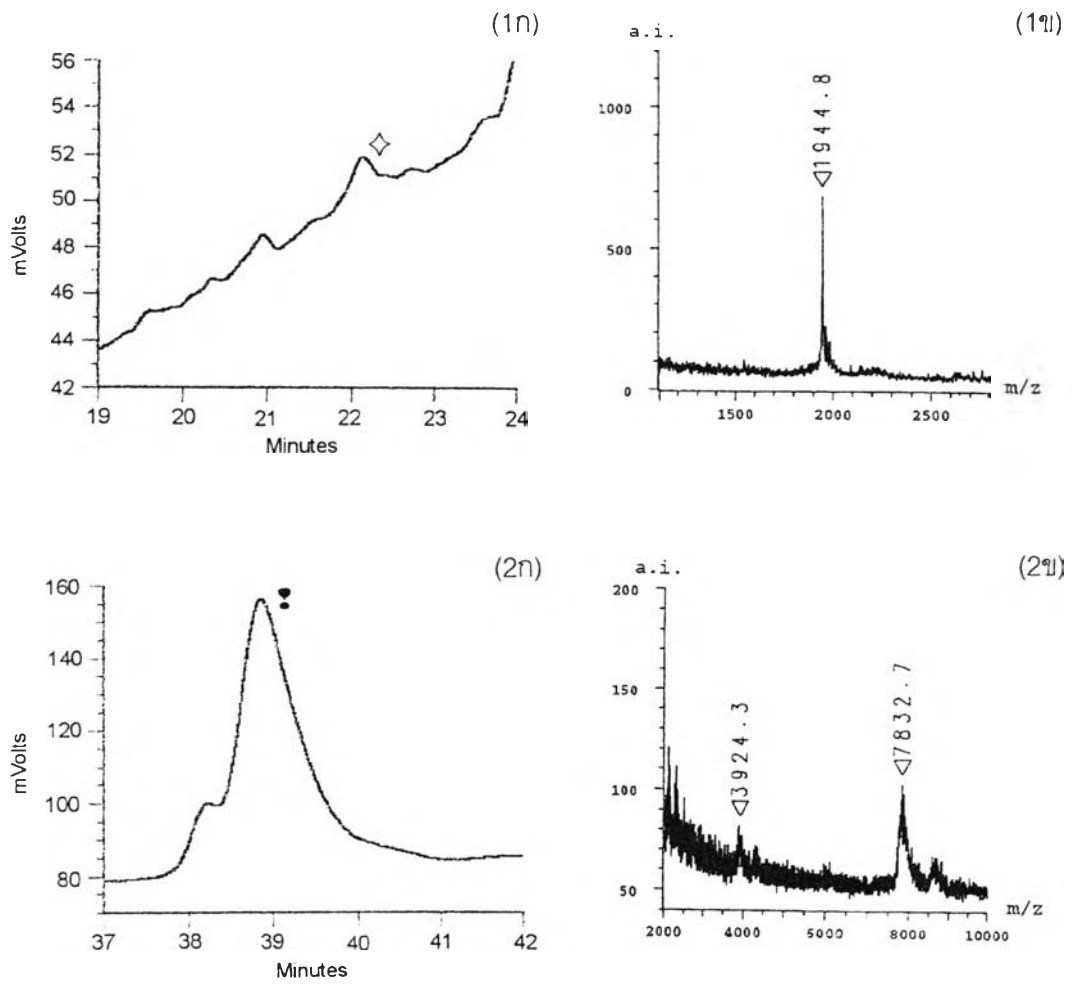
ภาพประกอบ 4.30 โคโรนาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP42.37 (1), SGP42.39 (2) และ SGP42.41 (3)

☆ CHH ? Unknown



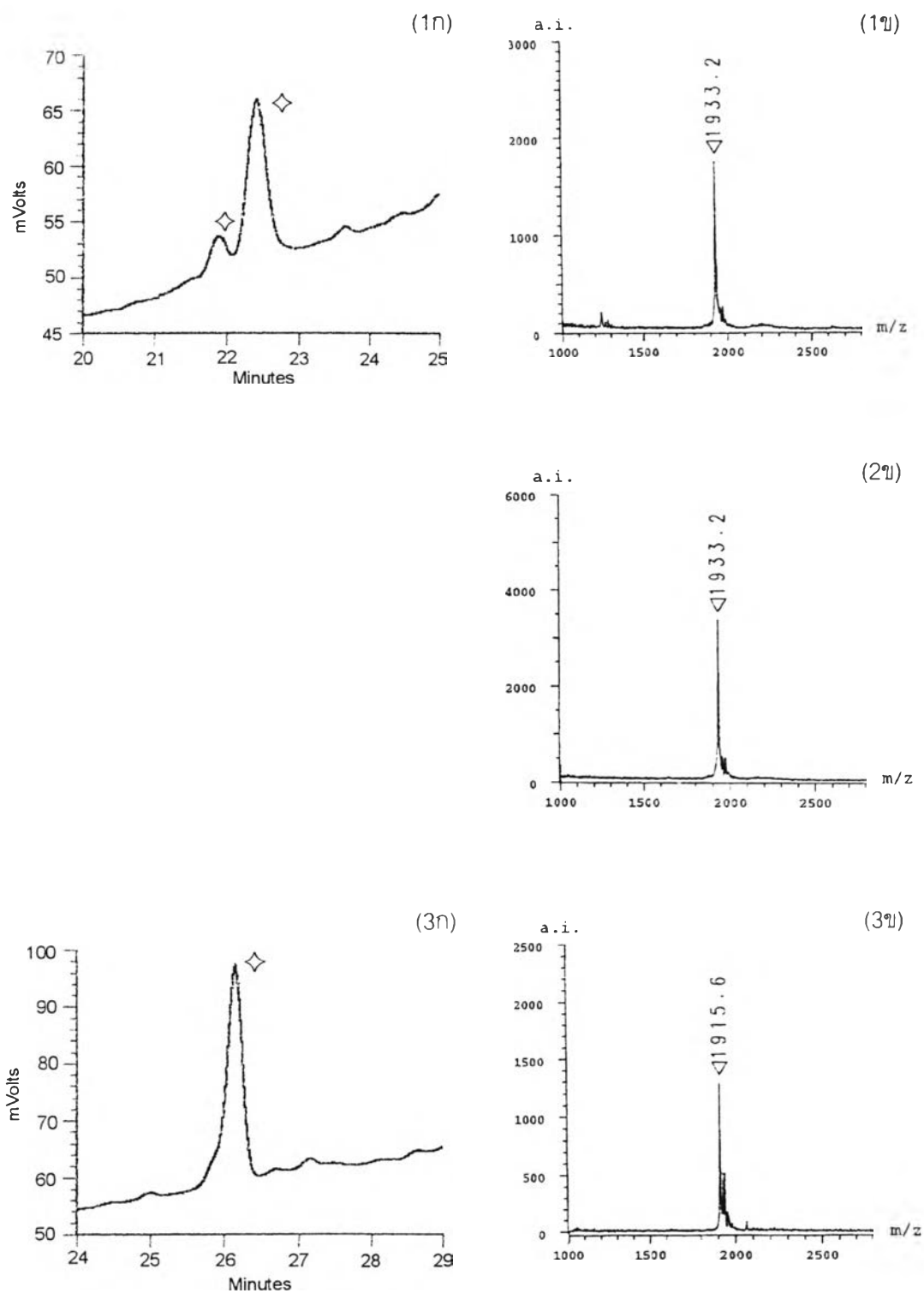
ภาพประกอบ 4.31 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 43 ถึง แฟรคชันที่ 46



ภาพประกอบ 4.32 โคโรนาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

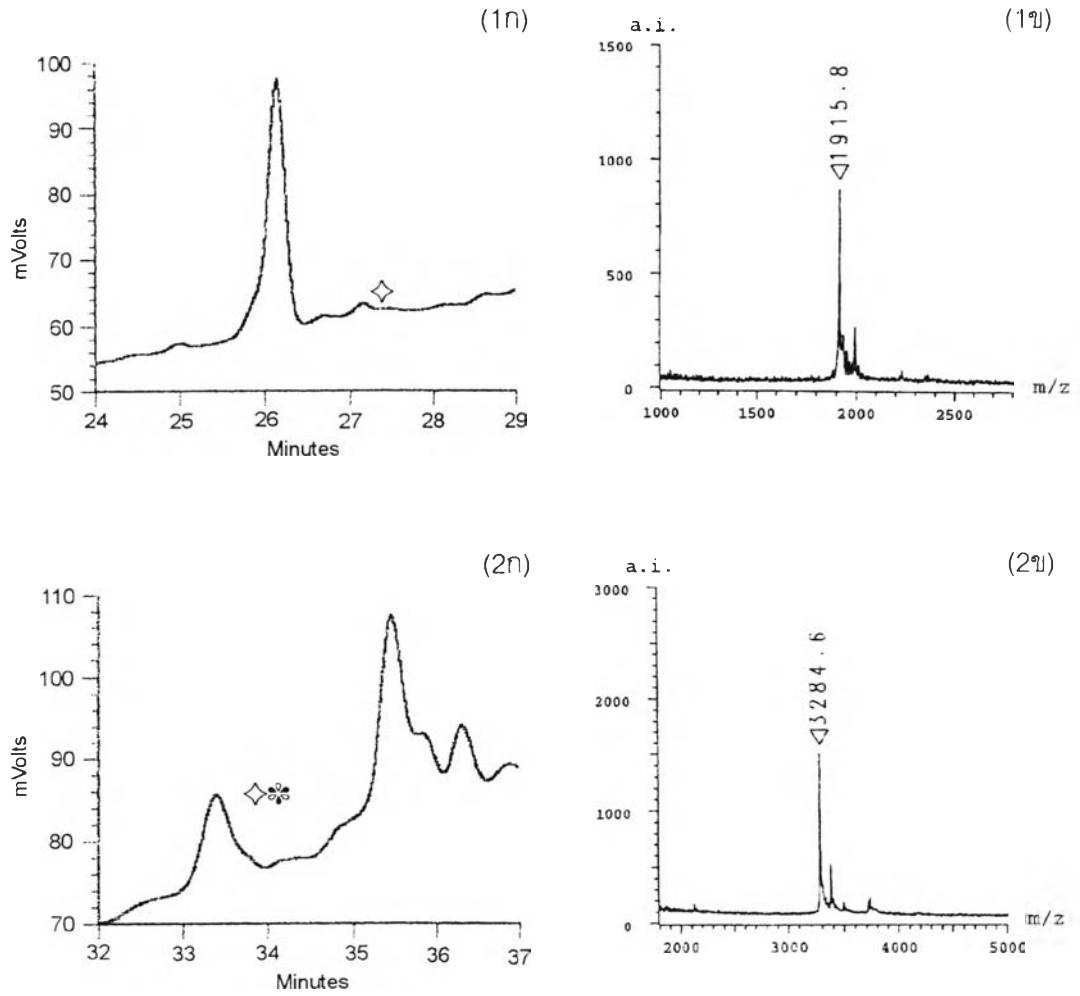
SGP43.22 (1) และ SGP43.40 (2)

◇ PDH ● Unknown

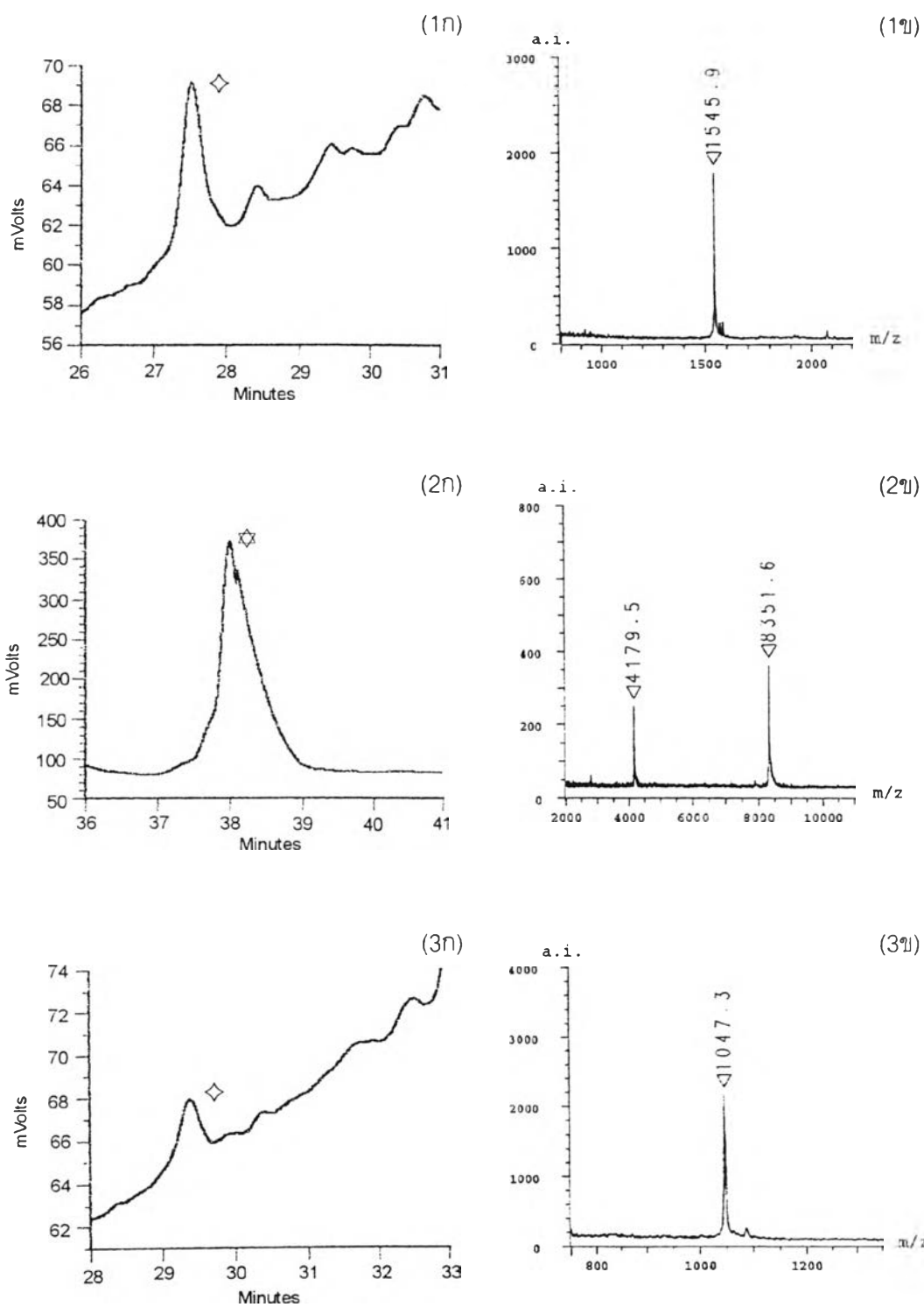


ภาพประกอบ 4.33 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP45.23 (1), SGP45.24 (2) และ SGP45.27 (3)

◇ PDH



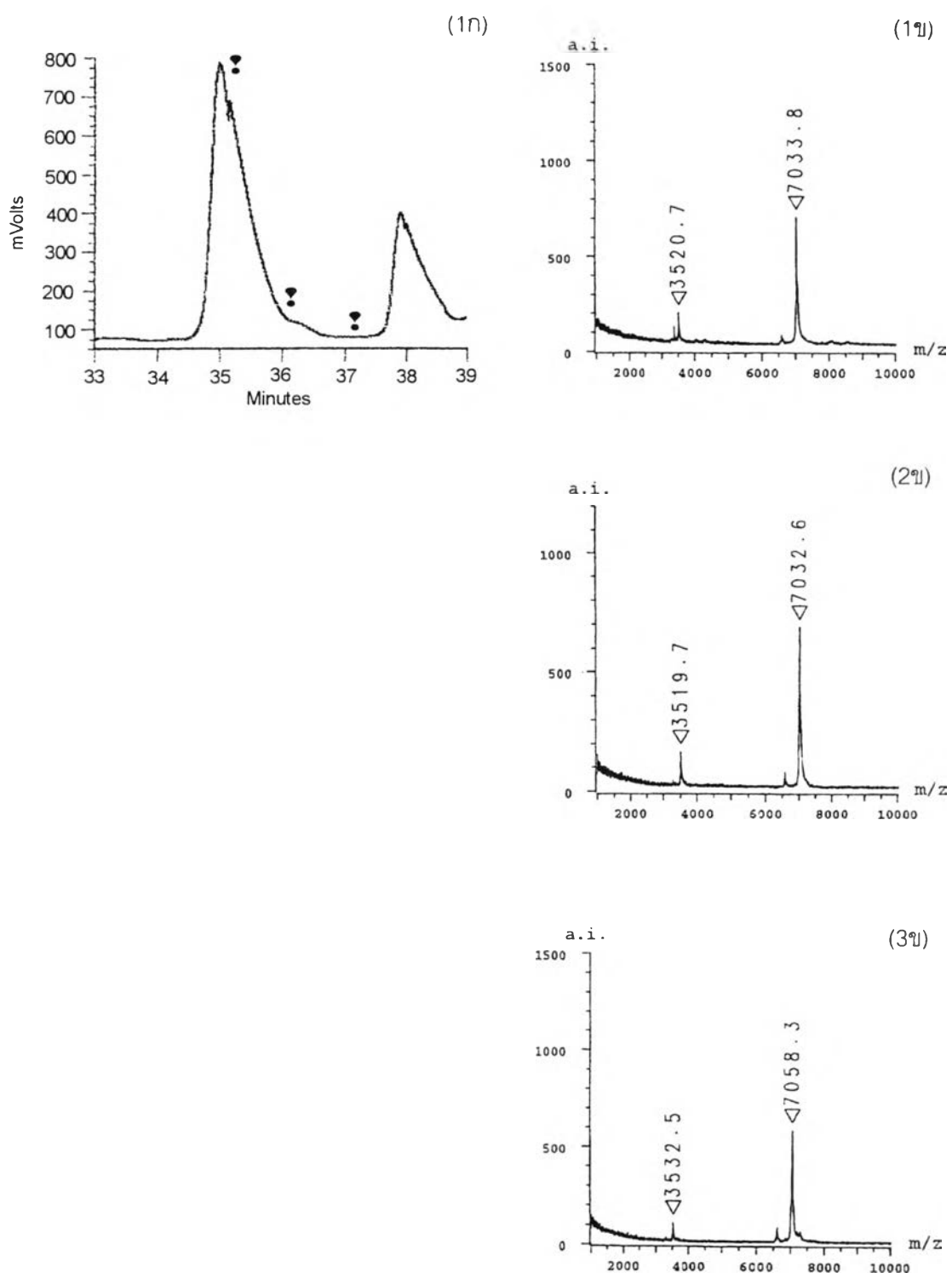
ภาพประกอบ 4.34 โคโรนาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
 SGP45.28 (1) และ SGP45.35 (2)
 ❁ PP6 ❖ PDH



ภาพประกอบ 4.35 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP46.29 (1), SGP46.39 (2) และ SGP47.31 (3)

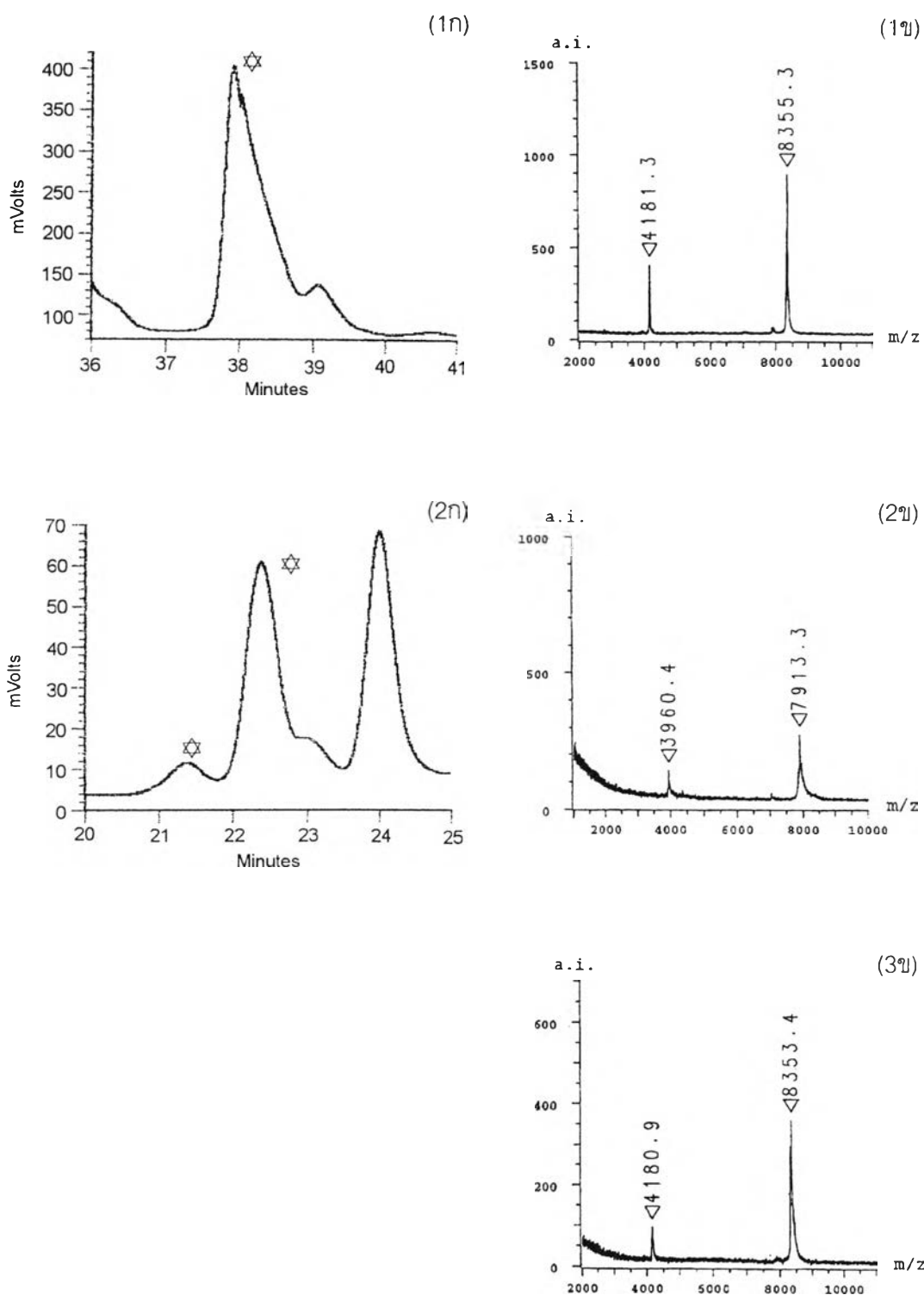
☆ CHH ◇ PDH



ภาพประกอบ 4.37 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP47.36 (1), SGP47.37 (2) และ SGP47.38 (3)

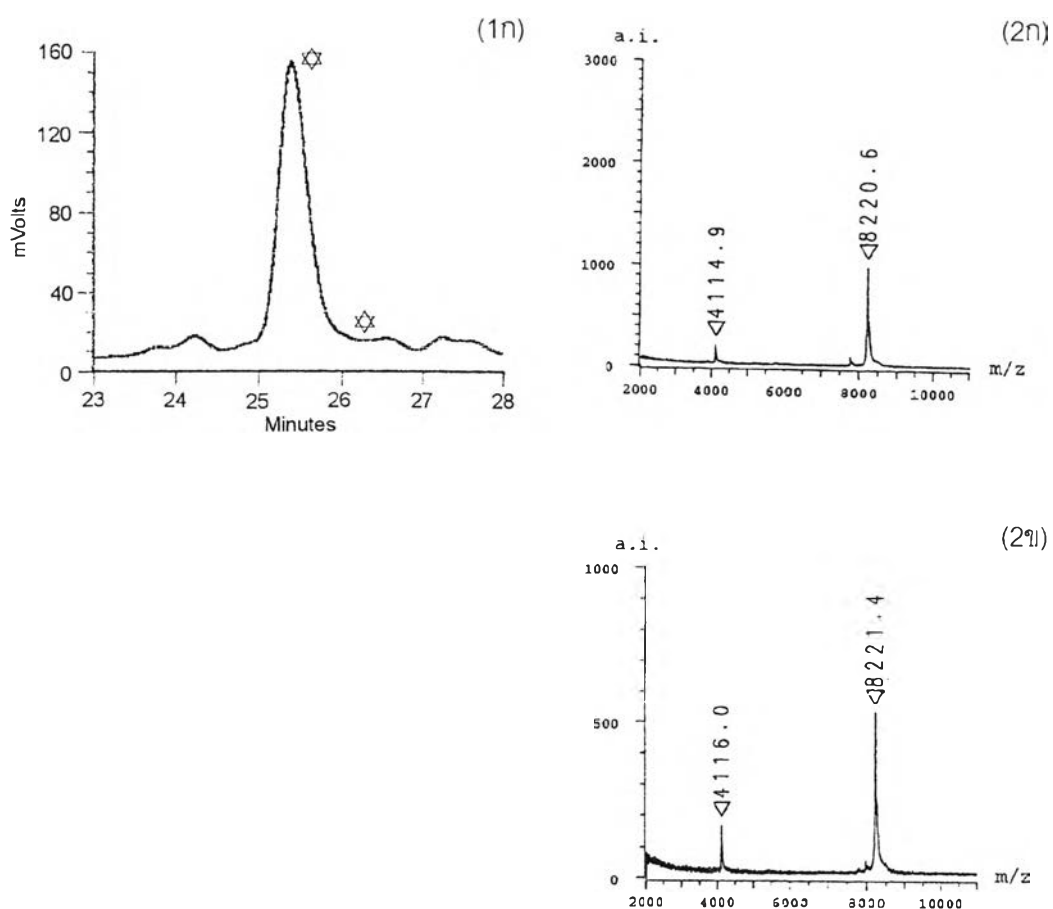
• Unknown



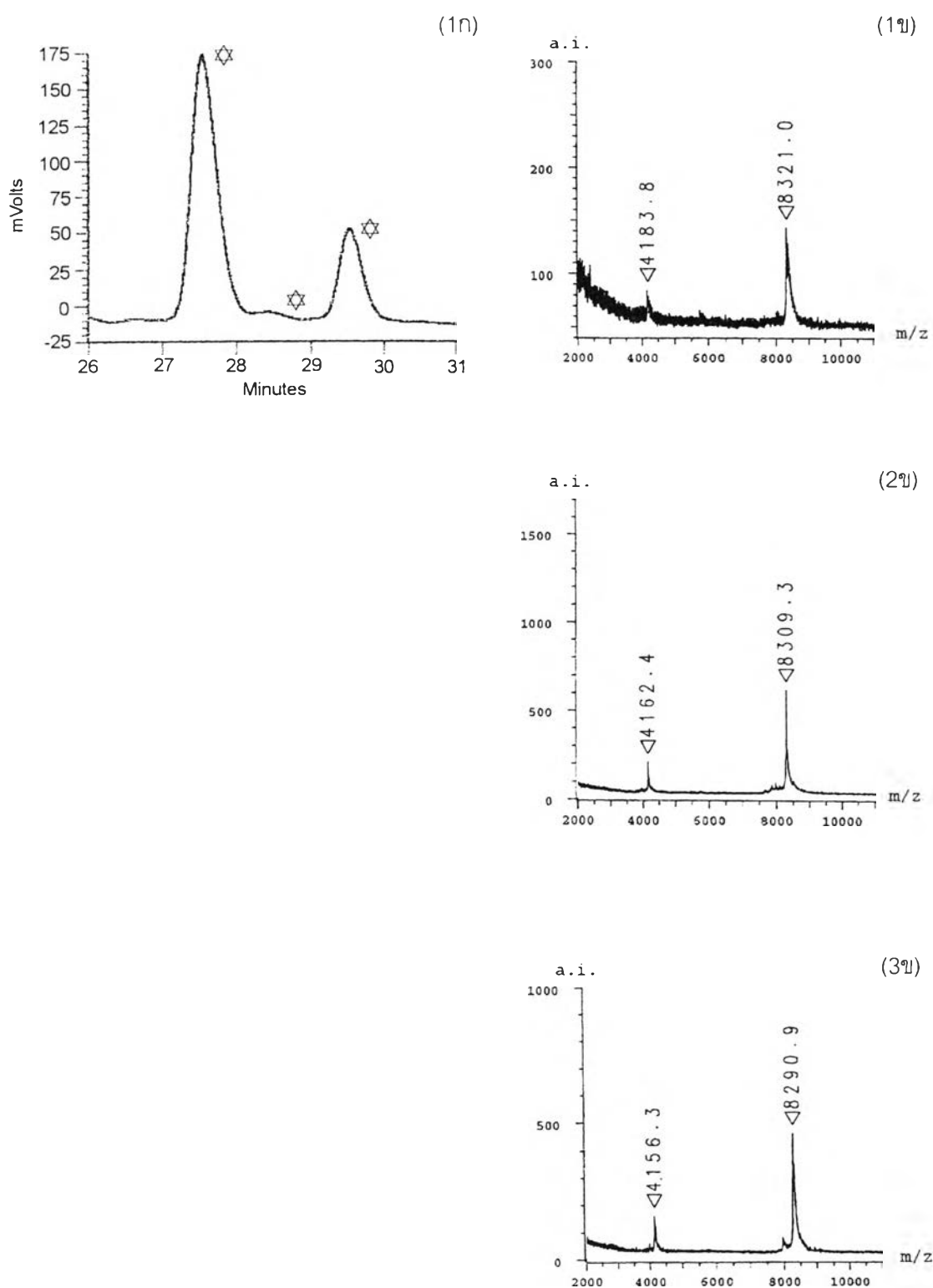
ภาพประกอบ 4.38 โคโรนาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ ะแมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP47.39 (1), SGP47.40.22 (2) และ SGP47.40.24 (3)

☆ CHH



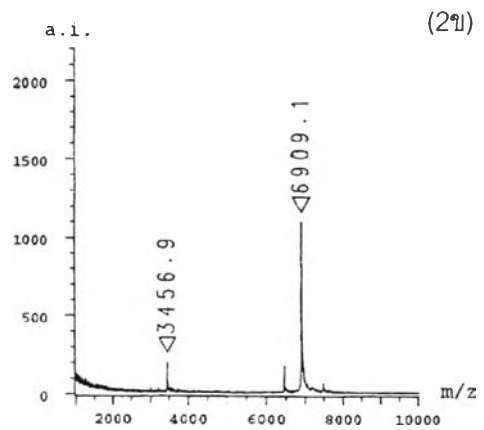
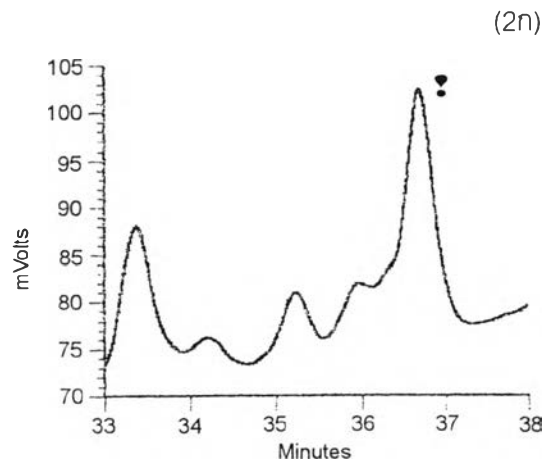
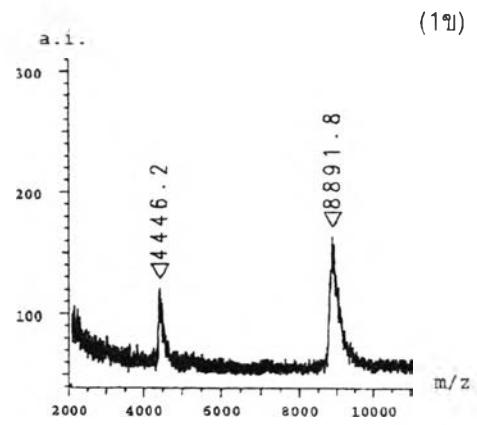
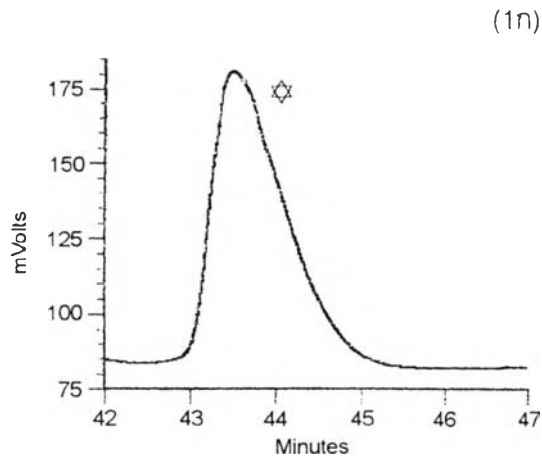
ภาพประกอบ 4.39 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
 SGP48.39.26 (1) และ SGP48.39.27 (2)
 ☆ CHH



ภาพประกอบ 4.40 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP48.41.29 (1), SGP48.41.30 (2) และ SGP48.41.31 (3)

☆ CHH

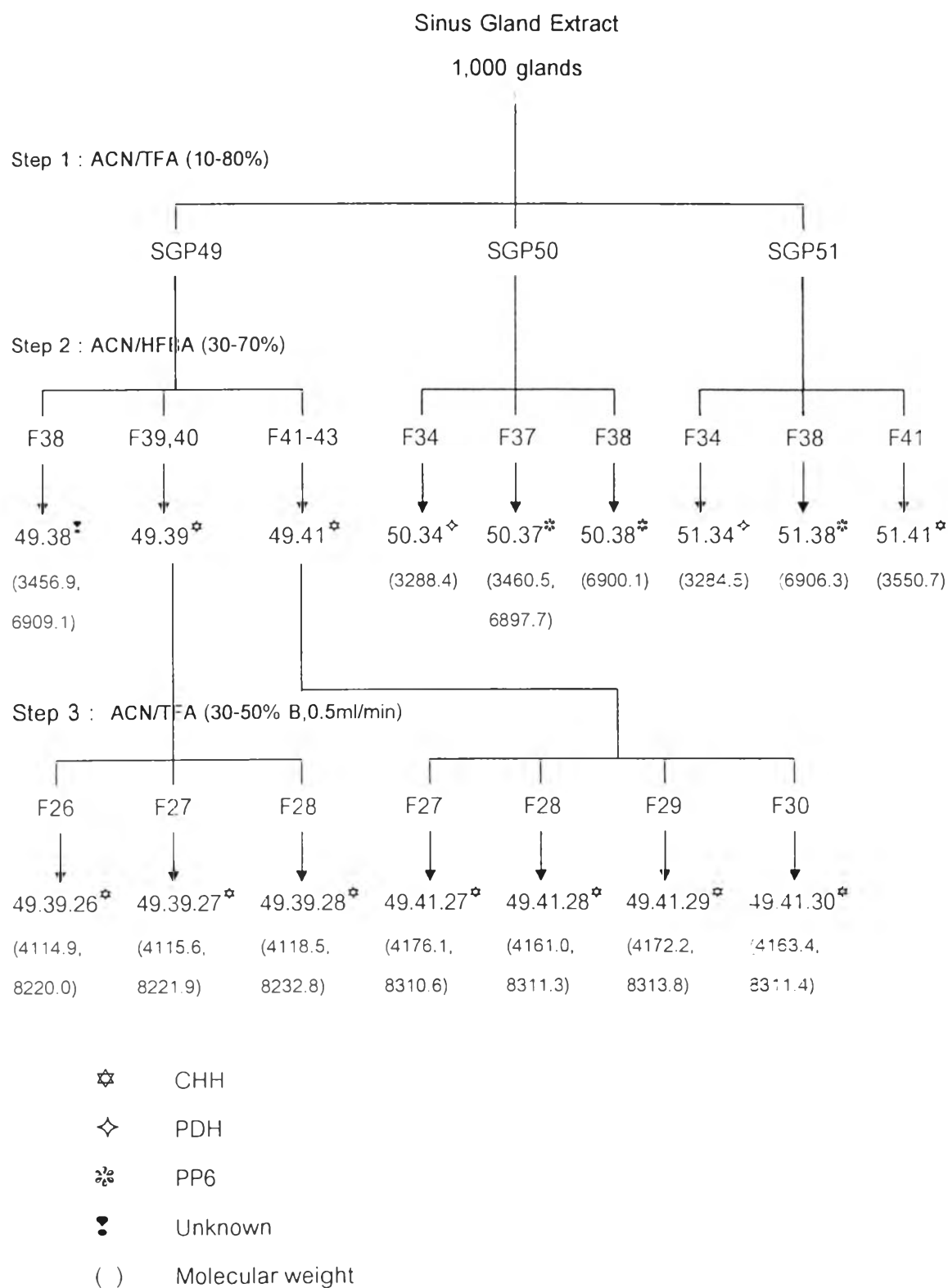


ภาพประกอบ 4.41 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

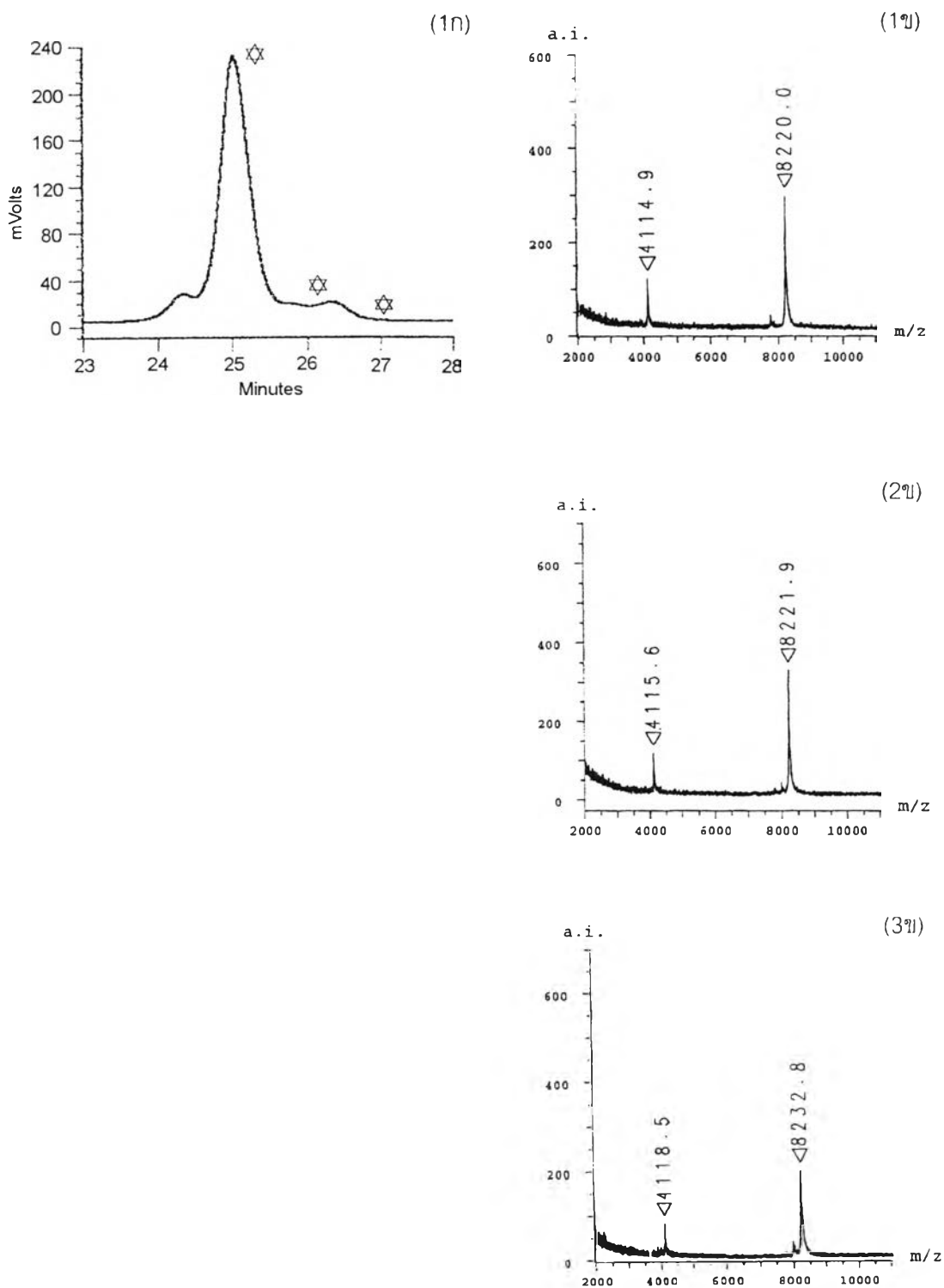
SGP48.45 (1) และ SGP49.38 (2)

☆ CHH

● Unknown



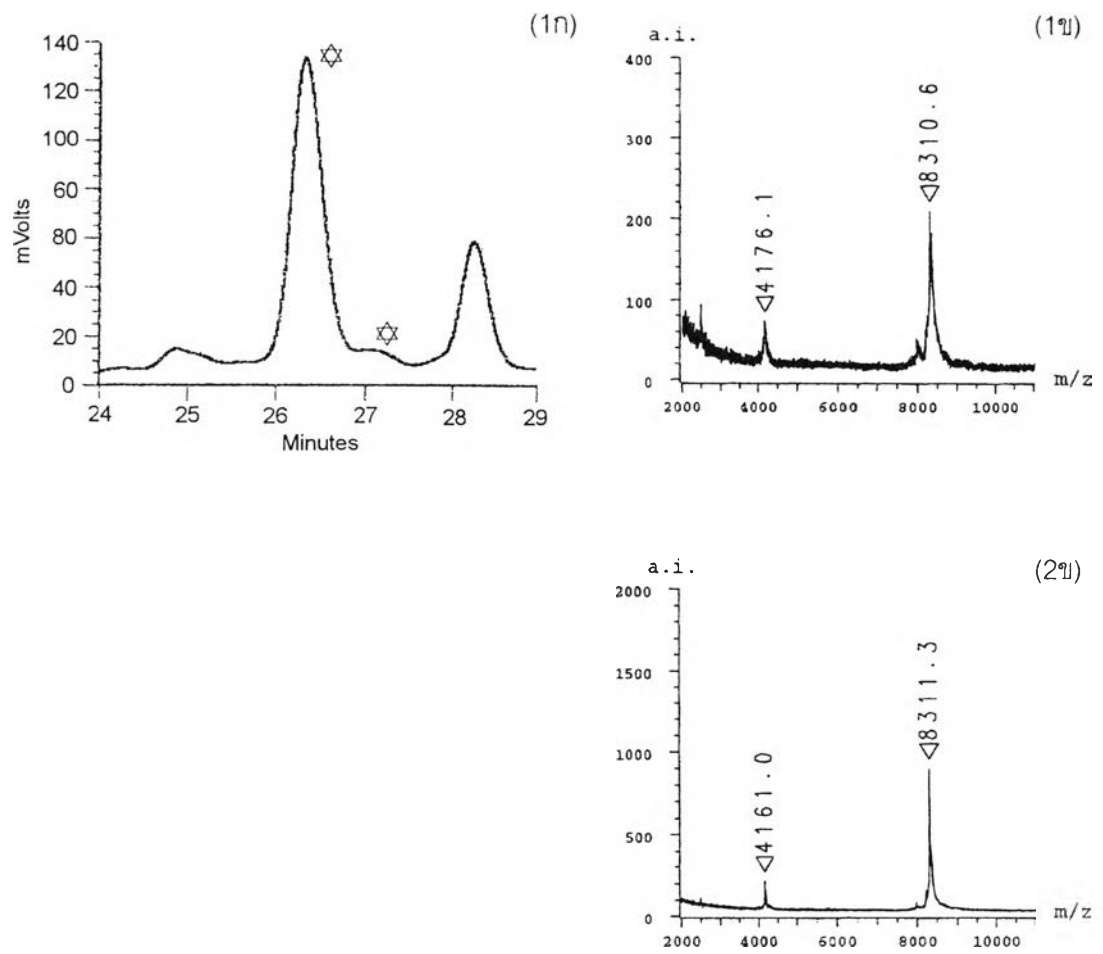
ภาพประกอบ 4.42 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของแฟรคชันที่ 49 ถึง แฟรคชันที่ 52



ภาพประกอบ 4.43 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

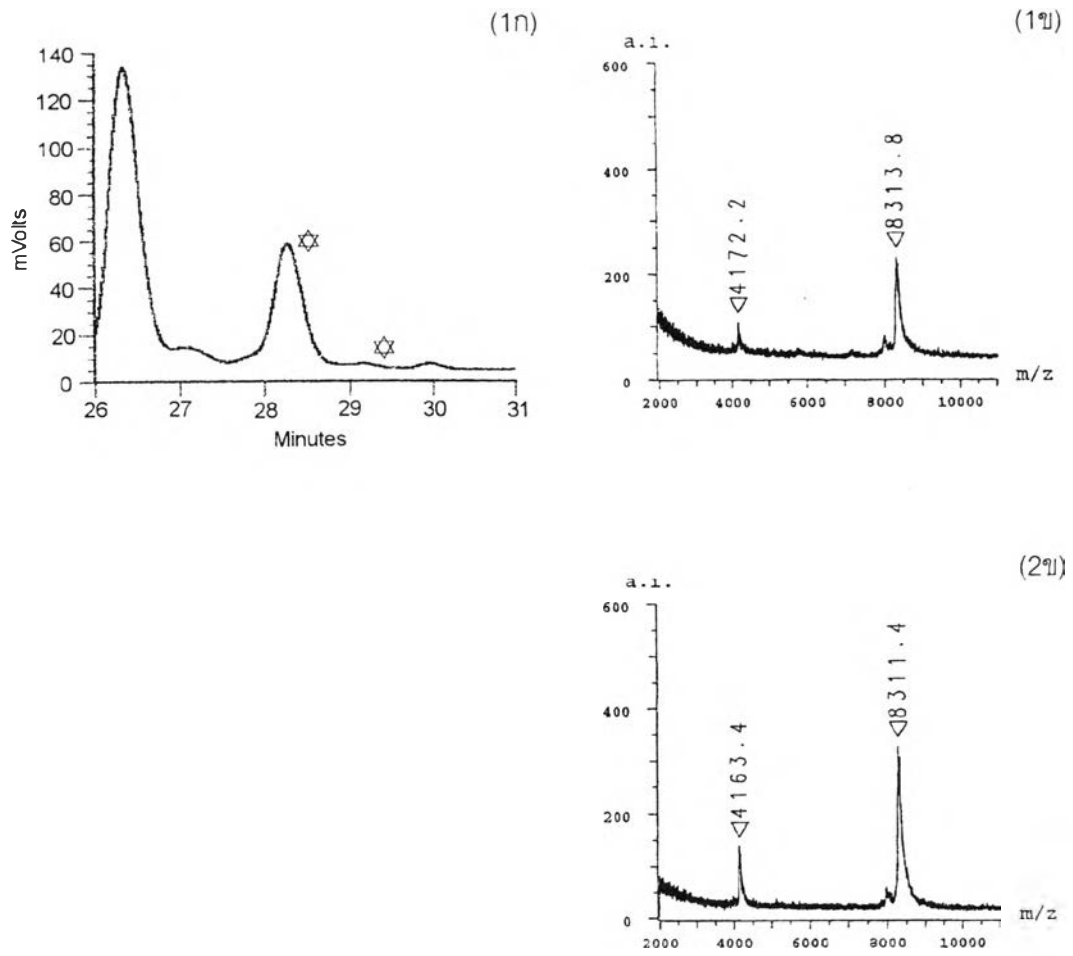
SGP49.39.26 (1), SGP49.39.27 (2) และ SGP49.39.28 (3)

☆ CHH



ภาพประกอบ 4.44 โครมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP49.41.27 (1) และ SGP49.41.28 (2)

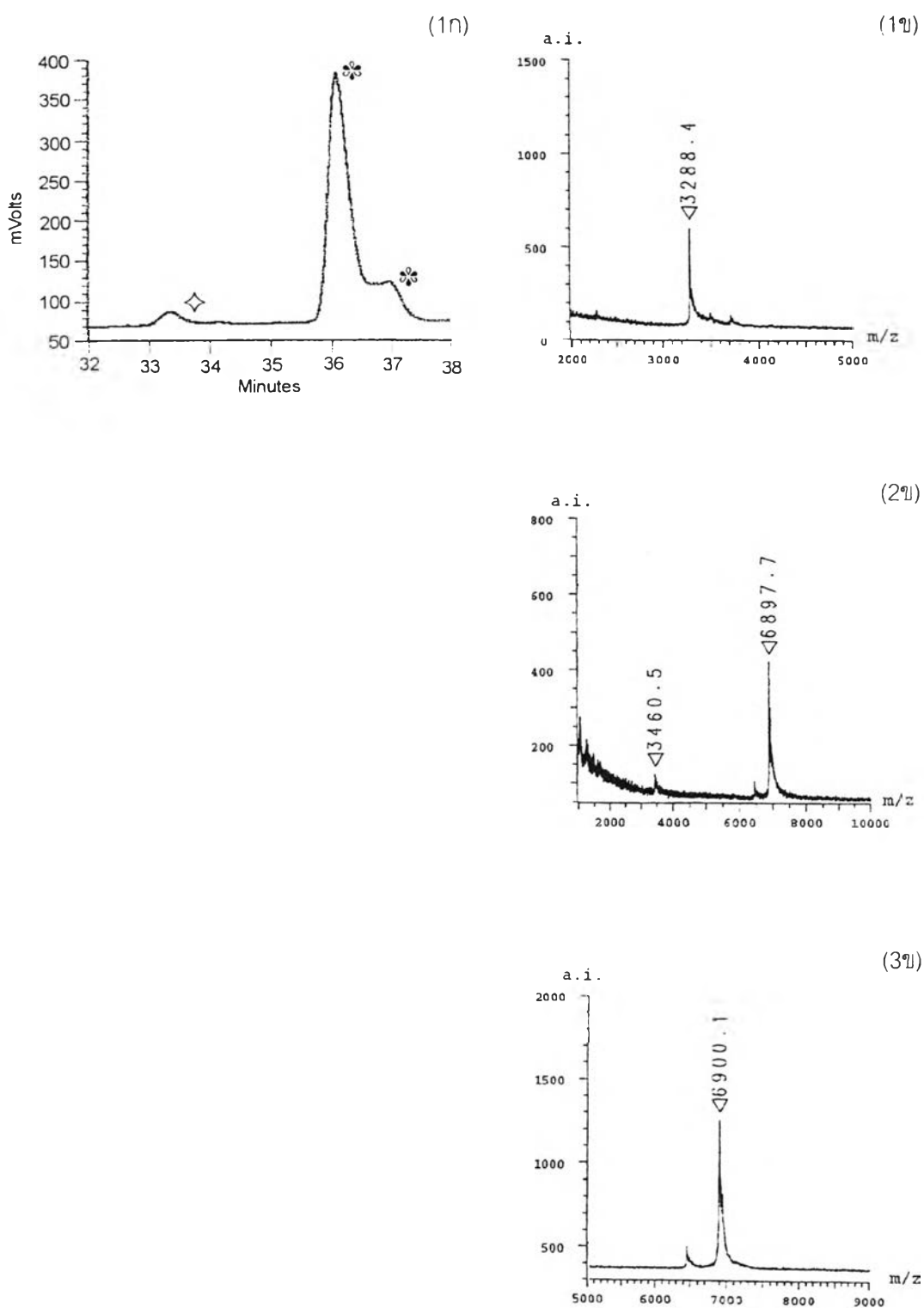
☆ CHH



ภาพประกอบ 4.45 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

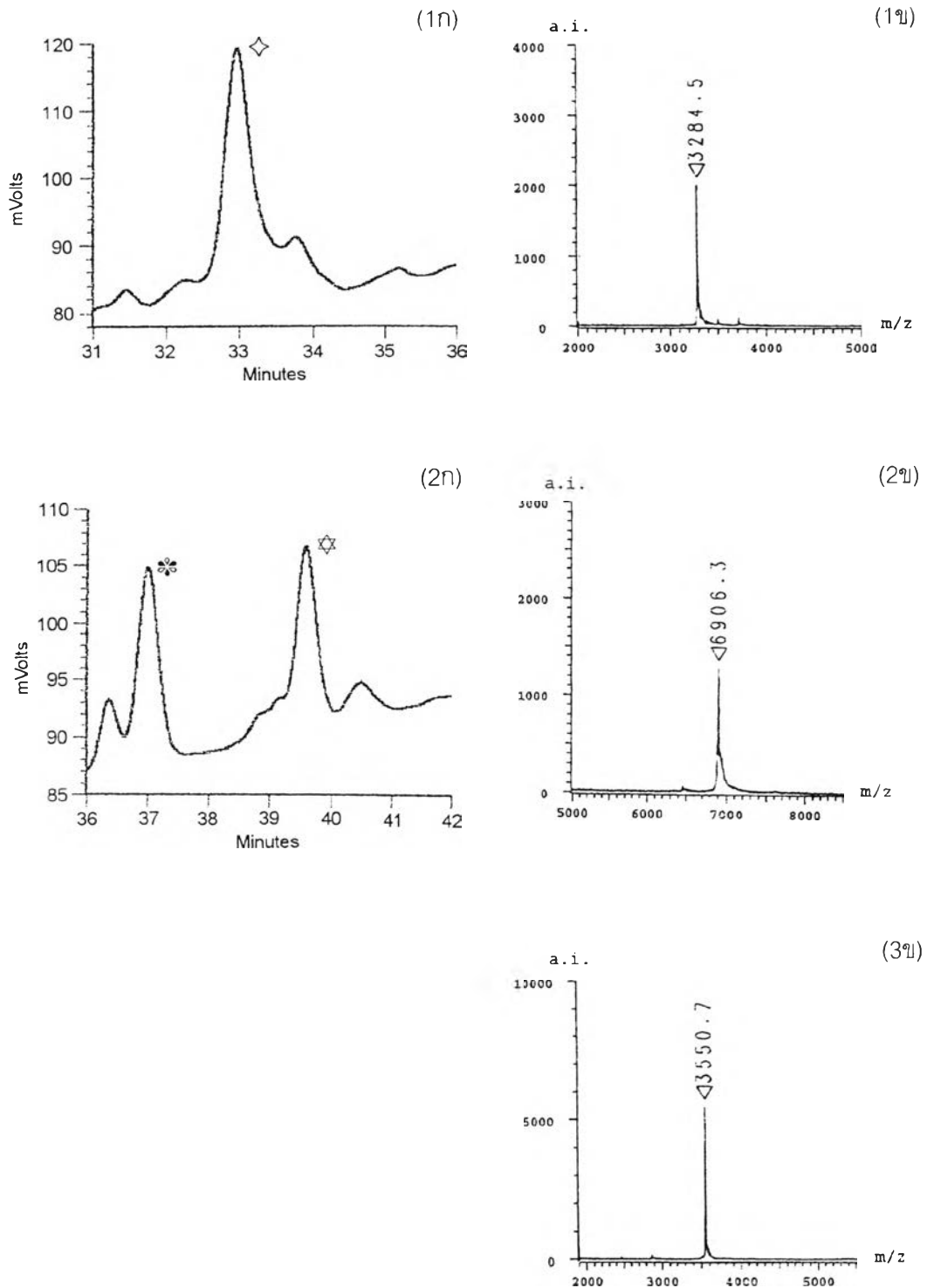
SGP49.41.29 (1) และ SGP49.41.30 (2)

☆ CHH



ภาพประกอบ 4.46 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)
SGP50.34 (1), SGP50.37 (2) และ SGP50.38 (3)

◇ PDH ☆ PP6



ภาพประกอบ 4.47 โคโรมาโตแกรมของเปปไทด์บริสุทธิ์ (ก) และ แมสสเปกตรัมของเปปไทด์ (ข)

SGP51.34 (1), SGP51.38 (2) และ SGP51.41 (3)

☆ CHH ◇ PDH ☆ PP6

ตารางที่ 4.1 ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของสารเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC

Peptide	Molecular weight (dalton)	Peak height (mV)	Identification
SGP19.29	1340.8	445	CHH
SGP19.36	1477.0	6	unknown
SGP19.42	2170.4	20	unknown
SGP19.46	3290.4	15	unknown
SGP20.29	1342.1	85	CHH
SGP20.48	3211.0	12	unknown
SGP21.34	1410.0	1	unknown
SGP21.38	1255.8	10	unknown
SGP21.39	2287.4	4	unknown
SGP23.31	932.6	8	unknown
SGP23.41	5937.3	6	unknown
SGP25.36	1396.2	85	unknown
SGP26.45	4572.0 ⁺ , 9103.1 ⁺	115	unknown
SGP28.34	1444.1, 1466.4 [❖]	170	PDH
SGP28.35	1443.8	10	unknown
SGP28.36	1444.5	8	unknown
SGP30.35	1131.0, 1153.4 [❖]	200	unknown
SGP30.41	1621.8	2	FM
SGP31.24	1680.4	40	unknown
SGP31.25	1130.6, 1152.9 [❖]	30	unknown
SGP31.32	1833.0	2	FM
SGP31.33	1303.2	2	FM

- ⁺ โมเลกุลไอออน
- ⁺ โมเลกุลไอออนที่มีประจุ 2+
- [❖] อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม (Na⁺)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Peptide	Molecular weight (dalton)	Peak height (mV)	Identification
SGP32.30	1562.2	50	FM
SGP32.31	1895.5	44	FM
SGP33.24	1461.8	6	FM
SGP33.30	1560.2	18	FM
SGP33.31	1892.7	8	FM
SGP33.39	3001.5	95	FM
SGP34.22	1405.6, 1444.0 ⁺	22	unknown
SGP34.28	2034.2	100	FM
SGP34.30	2517.2	20	FM
SGP35.20	1695.7	14	CHH,FM
SGP35.24	1679.1	14	CHH,FM
SGP35.39	2415.9 ⁺ , 4829.5 ⁺	5	CHH,FM
SGP36.36	5985.1	15	CHH,FM
SGP36.37	5985.2	15	CHH,FM
SGP36.41	5493.5	30	CHH,FM
SGP36.42	2770.2 ⁺ , 5491.8 ⁺	20	CHH,FM
SGP37.22	1075.6, 1098.0 [⊕]	4	FM
SGP37.24	1690.8	25	unknown
SGP37.25	1691.8	3	unknown
SGP37.32	4468.1	10	unknown
SGP37.39	2416.9 ⁺ , 4831.7 ⁺	26	unknown

- ⁺ โมเลกุลไอออน
- [⊕] โมเลกุลไอออนที่มีประจุ 2+
- [⊖] อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม (Na⁺)
- [⊗] อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโปแตสเซียม (K⁺)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Peptide	Molecular weight (dalton)	Peak height (mV)	Identification
SGP38.25	1694.3	4	unknown
SGP38.29	1706.4	9	PDH
SGP38.43	4390.2 ⁺ , 8747.8 ⁺	34	CHH,FM
SGP38.44	4276.5 ⁺ , 8536.5 ⁺	4	CHH,FM
SGP38.47	5838.8	2	FM
SGP39.29	1946.1	10	PDH
SGP40.23	1946.9	26	PDH
SGP40.40.32	4273.3 ⁺ , 8538.7 ⁺	55	CHH
SGP40.40.33	4274.8 ⁺ , 8540.5 ⁺	35	CHH
SGP40.40.34	4272.9 ⁺ , 8544.5 ⁺	10	CHH
SGP40.41	4271.6 ⁺ , 8523.0 ⁺	40	CHH
SGP41.39	4265.8 ⁺ , 8522.8 ⁺	260	CHH
SGP41.40	4259.3 ⁺ , 8508.2 ⁺	200	CHH
SGP41.41	4259.0 ⁺ , 8507.6 ⁺	70	CHH
SGP41.42	4270.2 ⁺ , 8533.7 ⁺	10	CHH
SGP42.34	3289.8	4	PDH,PP6
SGP42.36	2383.2 ⁺ , 4762.9 ⁺	65	unknown
SGP42.37	5189.2	5	unknown
SGP42.39	3836.2 ⁺ , 7656.7 ⁺	47	CHH
SGP42.41	4267.6 ⁺ , 8530.2 ⁺	8	CHH
SGP43.22	1944.8	2	PDH
SGP43.40	3924.3 ⁺ , 7832.7 ⁺	65	unknown

- ⁺ โมเลกุลไอออน
- ⁺ โมเลกุลไอออนที่มีประจุ 2+
- ❖ อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม (Na⁺)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Peptide	Molecular weight (dalton)	Peak height (mV)	Identification
SGP45.23 } SGP45.24 } SGP45.27 } SGP45.28 }	1933.2 1933.2 1915.6 1915.8	15 15 40 40	PDH PDH PDH PDH
SGP45.35	3284.6	10	PDH,PP6
SGP46.29	1545.9	8	PDH
SGP46.39	4179.5 ⁺ , 8351.6 ⁺	290	CHH
SGP47.31	1047.3	2	PDH
SGP47.36 } SGP47.37 } SGP47.38 }	3520.7 ⁺ , 7033.8 ⁺ 3519.7 ⁺ , 7032.6 ⁺ 3532.5 ⁺ , 7058.3 ⁺	700 400 40	unknown unknown unknown
SGP47.39	4181.3 ⁺ , 8355.3 ⁺	320	CHH
SGP47.40.22	3960.4 ⁺ , 7913.3 ⁺	8	CHH
SGP47.40.24	4180.9 ⁺ , 8353.4 ⁺	50	CHH
SGP48.39.26 } SGP48.39.27 }	4114.9 ⁺ , 8220.6 ⁺ 4116.0 ⁺ , 8221.4 ⁺	140 140	CHH CHH
SGP48.41.29 } SGP48.41.30 } SGP48.41.31 }	4183.8 ⁺ , 8321.0 ⁺ 4162.4 ⁺ , 8309.3 ⁺ 4156.3 ⁺ , 8290.9 ⁺	180 10 65	CHH CHH CHH
SGP48.45	4446.2 ⁺ , 8891.8 ⁺	90	CHH
SGP49.38	3456.9 ⁺ , 6909.1 ⁺	25	unknown

- + โมเลกุลไอออน
- + โมเลกุลไอออนที่มีประจุ 2+
- ❖ อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม (Na⁺)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Peptide	Molecular weight (dalton)	Peak height (mV)	Identification
SGP49.39.26	4114.9 ⁺ , 8220.0 ⁺	210	CHH
SGP49.39.27	4115.6 ⁺ , 8221.9 ⁺	25	CHH
SGP49.39.28	4118.5 ⁺ , 8232.8 ⁺	5	CHH
SGP49.41.27	4176.1 ⁺ , 8310.6 ⁺	120	CHH
SGP49.41.28	4161.0 ⁺ , 8311.3 ⁺	120	CHH
SGP49.41.29	4172.2 ⁺ , 8313.8 ⁺	50	CHH
SGP49.41.30	4163.4 ⁺ , 8311.4 ⁺	50	CHH
SGP50.34	3288.4	18	PDH
SGP50.37	3460.5 ⁺ , 6897.7 ⁺	300	PP6
SGP50.38	6900.1	50	PP6
SGP51.34	3284.5	35	PDH
SGP51.38	6906.3	15	PP6
SGP51.41	3550.7	15	CHH

- +** โมเลกุลวารีไอออน
- +** โมเลกุลวารีไอออนที่มีประจุ 2+
- ❖** อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม (Na⁺)
- +** อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโปแตสเซียม (K⁺)
-]** คู่ของแฟรคชันที่คาดว่าจะเปปไทด์รูปแบบเดียวกัน
-]** กลุ่มของแฟรคชันที่คาดว่าจะเปปไทด์รูปแบบเดียวกัน