บทที่ 3

วิธีการ และผลการทดลองในหลอดทดลอง

3.1 การเก็บพืชสมุนไพร และ การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

เก็บส่วนต่างๆ ของสมุนไพร เช่น ใบ ต้น ราก เป็นต้น โดยเป็นสมุนไพรที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วโดยวิธีการคัดเลือกสมุนไพรนั้นนำมาจากสมุนไพรที่ปรากฏในตำรายาแผนไทย สมุนไพรที่หมอแผนไทยใช้อยู่สมุนไพรที่งานวิจัยได้อ้างถึง และสมุนไพรในตระกูลเดียวกับสมุนไพรที่ได้ทำการวิจัยแล้วว่าสามารถใช้ได้ นำส่วนต่างๆ ของพืชมาทำการสกัดโดยทำการสกัดสองแบบ คือ การสกัดด้วยการบีบคั้นสด (การสกัดด้วยน้ำ) และการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดด้วยการบีบคั้นสด

การสกัดพืชสมุนไพรตัวอย่างด้วยด้วยน้ำ นำเอาส่วนของสมุนไพรสดที่ต้องการสกัดมาทำการตัดเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องปั่นโดยใช้เติมน้ำในปริมาณเล็กน้อย ทำการปั่นแล้วนำเอามากรอง และบีบกาก นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Lyophilizer

นำเอาส่วนของสมุนไพรที่ต้องการสกัดมาทำการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

นำไปเข้าเครื่องปั่นโดยใช้น้ำในปริมาณเล็กน้อย

นำเอาสมุนไพรที่ปั่นแล้วมาทำการบีบ

นำไปกรอง

ทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Lyophilizer

นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อนำไปทำการวิจัยต่อไป

การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดตัวอย่างพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทธานอล นำส่วนของสมุนไพรที่ต้องการสกัดมาทำการตัดให้เป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ นำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำเข้าไปอบในตู้อบที่ความร้อนประมาณ 40 องศาเซลเซียสจนแห้ง จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงหยาบ นำไปหมักกับ 95% Ethanol ให้ท่วมตัวอย่าง ทำการหมัก 3 ครั้ง ๆ ละ 3 วัน จากนั้นนำมากรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งแบบลดความดันโดยใช้เครื่อง Evaporator และ SpeedVac®

นำเอาส่วนของสมุนไพรที่ต้องการสกัดมาทำการตัดให้เป็นชิ้นส่วนเล็กๆ

⬇

ล้างให้สะอาดแล้วนำไปผึ่งให้สะเด็ดน้ำ

⬇

นำไปเข้าตู้อบที่ความร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง

⬇

นำมาบดให้เป็นผงหยาบ

⬇

นำไปหมักกับ 90% Ethanol โดยหมัก 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน

⬇

นำมากรอง

⬇

นำส่วนที่กรองไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Evaporator

⬇

นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อนำไปทำการวิจัยต่อไป

ตัวอย่างสมุนไพรที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ และเอทธานอลจะเก็บรักษาไว้ในภาชนะแก้วปิดสนิท เก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อนำไปทำการวิจัยต่อไป

3.2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS – PAGE

เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยเพียงความแตกต่างของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่านั้น ซึ่งมีวิธีการทำง่าย ใช้เวลาไม่นานและเป็นวิธีที่มีความไวสูง (Rybicki and Maud, 1996) ในการวิจัยจะใช้ 12.5% Polyacrylamide gel ซึ่งมีความสามารถในการแยกโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 15 – 60 kDa (Bollag and Stuart, 1993)

- สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

- Acrylamide
- N, N' - methylenebisacrylamide
- Tris (hydroxymethyl) amino methane
- SDS: sodium dodecyl sulfate
- Glycine
- Brilliant blue R: ที่ใช้ย้อมโปรตีนโดยเฉพาะ (for electrophoresis)
- Bromphenol blue dye
- APS: ammonium persulfate
- TEMED: N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine
- Acetic acid
- Methanol
- Glycerol
- Sucrose
- Conc. HCl และ NaOH เพื่อใช้ปรับ pH
- rack ใส่ eppendrof ขนาด 0.5 และ 1.5 ml
- micropipet 1000, 200 และ50 µl ชนิดที่ปรับปริมาตรได้ตามที่ต้องการ
- pipet 5 ml
- syringe ที่ใช้ run HPLC
- บีกเกอร์
- กระบอกตวง
- แท่งแก้วคน
- กรวยกรอง
- ขวดใส่สารละลาย
- tip ขนาดต่าง ๆ
- eppendrof

- syringe พลาสติก ขนาด 12 ml ต่อสายยางยาวประมาณ 2.5 cm
- กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
- megnetic bar
- ขวดน้ำกลั่น
- กระดาษทิชชู
- mask
- ถุงยาง
- พลาสติกใส
- ถุงมือ
- spatula
- กล่องพลาสติกสำหรับ staining, destaining และ10%acetic acid
- ชุดเครื่องมือ gel electrophoresis
- stirrer
- pH – meter
- เครื่องเขย่า (Vortex)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

SDS-PAGE ประกอบด้วยชั้น separate และชั้น stacking โดยที่ชั้นของ stacking จะมี pH ที่ต่ำกว่าชั้น separate เพื่อช่วยให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารดีขึ้น ชั้น stacking จะมี pore size ขนาดใหญ่ทำให้สารลงมาจับเป็น band ก่อนแล้วจึงทำให้เกิดการแยกในชั้น separate ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

	Separate	**Stacking**
30% monomer	2.90 ml	0.9 ml
3.0 M Tris-HCl pH 8.8	1.75 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	1.0 ml
1% SDS	0.70 ml	0.4 ml
APS	0.35 ml	0.2 ml
TEMED	10 µl	5 µl
DW	1.30 ml	1.9 ml

หมายเหตุ : ในการเตรียมเจล 2 แผ่น ทำได้โดยการเตรียม separate 2 ชุด และ stacking 1 ชุด พร้อมกัน

- วิธีการเตรียมสาร

30% Monomer

Acrylamide	30.0 g
Bis-acrylamide	0.8 g

1. นำ acrylamide 30 g ผสมกับ bis-acrylamide 0.8 g
2. เติมน้ำกลั่นประมาณ 50 ml (เนื่องจาก monomer จะเกิดการพองตัว)
3. นำไปอุ่นบน water bath จนละลาย
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนครบ 100 ml
5. นำไปกรองด้วยกระดาษ Wathman No.1
6. ใส่ขวดสีชา หรือ ใส่ขวดใสห่อกระดาษ foil แล้วเก็บในตู้เย็น (สารไวต่อแสง)

ข้อควรระวัง : acrylamide และ bis – acrylamide เป็น potent neurotoxins และสามารถดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังได้ดังนั้นในขณะที่เตรียมสารจะต้องสวมถุงมือและ mask ปิดจมูกด้วยทุกครั้ง

3.0 M Tris-HCl buffer pH 8.8

จากสูตร

$n = g/MW$

$M = (g/MW)/L$

$g = 3.0\ M \times 0.1L \times 121.1\ g$

$36.33\ g$

ชั่ง Tris 36.33 g ละลายน้ำประมาณ 80 ml จากนั้น ปรับ pH ด้วย conc. HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 ml

0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8

คำนวณเช่นเดียวกับสูตรข้างต้น

ชั่ง Tris 6.055 g ละลายน้ำประมาณ 80 ml จากนั้น ปรับ pH ด้วย conc. HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 ml

1% SDS

ชั่ง SDS 1 g ละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 ml

Running buffer

เป็นสารละลาย buffer ที่ใช้ในการ run gel

Tris		3.03 g
Glycine		14.4 g
SDS		1.0 g
DW	to	1000 ml

ชั่งสารตามสูตรแล้วนำมาผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 200 ml ละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1000 ml

Staining solution

เป็นสารละลายที่ใช้ในการย้อมสีของโปรตีน

0.2% Briilliant Blue R in acetic acid	7.0 ml
Methanol	46.5 ml
DW	46.5 ml

ตวงสารละลายตามสูตรนำมาผสมกันในปริมาณที่กำหนดไว้

Destaining solution

เป็นสารละลายที่ใช้ในการล้างสีที่เป็นส่วนเกินออก

Acetic acid	125 ml
Methanol	250 ml
DW to	1000 ml

ตวง acetic acid และ methanol ตามสูตรนำมาผสมกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1000 ml

10% Acetic acid

เป็นสารละลายที่ใช้แช่แผ่น gel เพื่อ fix band และทำให้ gel ใส

Acetic acid	100 ml
DW to	1000 ml

ตวง acetic acid 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1000 ml

หมายเหตุ : เมื่อเตรียมสารเสร็จแล้วกรองด้วยกระดาษกรองทุกอย่าง ยกเว้น destaining solutionและ 10% acetic acid ที่ไม่ต้องกรอง

- **วิธีการทดลอง**

1. ขั้นตอนการเตรียมพิษงู

ลักษณะของพิษงู

พิษงูเห่า : เป็นผงละเอียดสีขาว

พิษงูกะปะ : เป็นผงละเอียดสีเหลือง

- **เตรียมพิษงูให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน 100.00 mg/ml โดยในการทดลองเตรียม 1 ml ใส่ใน eppendrof ขนาด 1.5 ml ดังนั้นต้องชั่งพิษงู 100.00 mg หรือชั่งให้ใกล้เคียงแล้วคำนวณปริมาตร PBS (phosphate buffer ส่วนประกอบและวิธีการเตรียมอยู่ด้านบน) ที่ใช้ใหม่ ปริมาตรของพิษงูที่เตรียม 1 ml สามารถใช้ในการวิจัยได้นานและใช้ในวิธีการทดสอบทั้งหมดของการวิจัยครั้งนี้**

ตาราง 3-1 การเตรียมพิษงู

พิษงู	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาตร PBS ที่ใช้ (ml)
พิษงูเห่า	0.1026	1.026
พิษงูกะปะ	0.1003	1.003

- ทำ stock solution ของพิษงู

จาก conc. 100 mg/ml ใน PBS ⟹ 10 mg/ml ในน้ำกลั่น โดยดูดพิษงูจาก conc. 100 mg/ml จำนวน 100 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วยน้ำ ปริมาณพิษงูที่ใช้ในแต่ละ well คือ 20 µg โดยดูดพิษงูจาก stock solution 10 mg/ml จำนวน 2 µl

- วิธีการเก็บพิษงู

ให้เก็บในช่องแช่แข็งทั้งหมดโดยพิษงู 10 mg/ml ให้แบ่งเป็น stock solution ก่อนโดย aliquot ใส่ eppendrof ขนาด 0.5 ml จำนวน 40 µl/eppendrof ซึ่งเพียงพอต่อการ run gel 2 แผ่น เวลานำมาใช้ก็ first in first out aliquot ประมาณ 3 – 5 eppendrof ก่อนถ้าหากไม่เพียงพอก็ค่อย aliqout ใหม่

ก่อนนำพิษงูไปใช้ต้องวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อน จะไม่นำมาใช้ในขณะที่เย็น ๆ ถ้าหากต้องการให้พิษงูที่เป็นน้ำแข็งละลายเร็วก็สามารถนำไป vortex ได้

2. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด

สารละลาย ที่ใช้ในการละลายสารสกัดจะเป็น ชนิดเดียวกันกับสารละลายที่ใช้สกัดสาร โดยเตรียมให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ซึ่งในการทดลองจะเตรียมเป็นความเข้มข้น 100, 200

และ 300 mg/ml ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารสกัดแต่ละชนิด โดยในการเตรียมแต่ละความเข้มข้นก่อนที่จะนำไปเจือจางจะต้องนำไปปั่นที่ 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนที่เป็นส่วนใสมาเจือจาง ปริมาณของสารแต่ละความเข้มข้นที่ใช้ในการ load ลงไปใน well คือ 10 µl คิดเป็น 1, 2 และ 3 mg ตามลำดับ

ชั่งสารสกัด 250 mg ละลายใน สารละลายที่ใช้สกัดสาร 500 µl โดยใช้ vortex แต่ถ้าหากสารละลายยากก็ละลายโดยใช้ sonicator เมื่อละลายดีแล้วก็นำไป centrifuge จะได้สารสกัดที่มีความ เข้มข้น 500 mg/ml

↓

ดูดสารสกัดความเข้มข้น 500 mg/ml จำนวน 150 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 µl ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 300 mg/ml

↓

ดูดสารสกัดความเข้มข้น 300 mg/ml จำนวน 100 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 µl ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 mg/ml

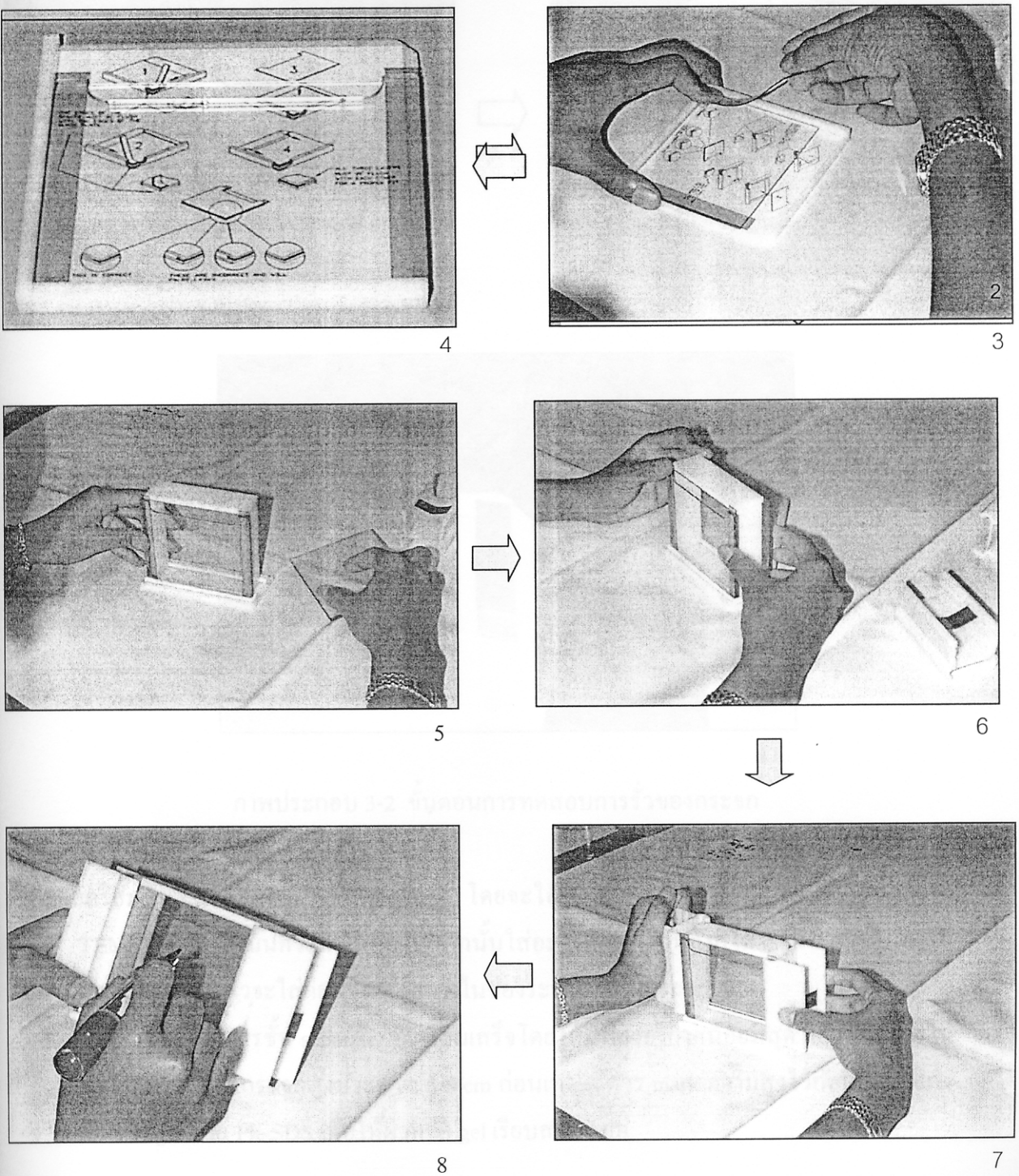
↓

ดูดสารสกัดความเข้มข้น 200 mg/ml จำนวน 50 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 µl ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 mg/ml

หมายเหตุ : ปัญหาที่พบ คือ สารสกัดบางชนิดมีความสามารถในการละลายน้อยทำให้ใช้เวลาในการละลายนาน ดังนั้นต้องเตรียมสารละลายให้พร้อมก่อนการทดลองอาจจะเตรียมล่วงหน้า แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อความรวดเร็วในการทดลอง ในการทดลองมีการใช้สารสกัดที่เป็นส่วนใส กับสารสกัดที่ไม่ต้อง centrifuge หลังจากละลายเสร็จแล้ว ผลที่ได้พบว่าสารสกัดที่เป็นส่วนใส ปรากฏแถบ(band)ของสารสกัดรบกวนแถบของพิษงูน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ยังไม่ผ่านการ centrifuge ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกสารสกัดที่เป็นส่วนใส อีกปัญหาหนึ่งที่พบโดยเฉพาะในกรณีของสารสกัดจากเอธานอลคือ การลอยของสารตัวอย่าง วิธีการแก้ไขทำได้โดยการเติม sucrose เพื่อเพิ่มน้ำหนัก ปริมาณที่เติมประมาณ 1 เม็ดถั่วเขียว และเพิ่มเวลาในการ centrifuge ให้นานขึ้น

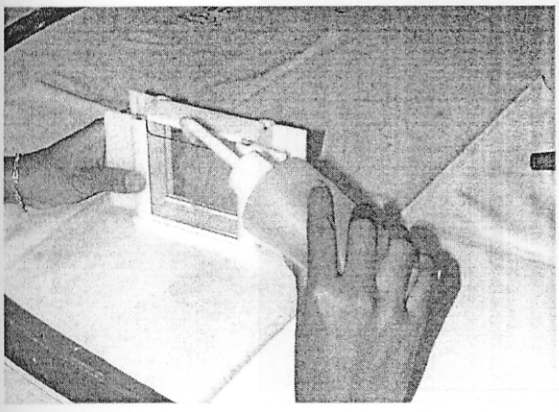
- ขั้นตอนการทดลองฤทธิ์การต้านพิษงูของสมุนไพรโดยใช้เทคนิค SDS - PAGE

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจก โดยใช้ Alcohol หรือ Acetone เช็ดให้สะอาดแล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง
2. ประกอบแผ่นกระจกเข้าเป็นชุดสำหรับการเตรียมเจล ดังรูป

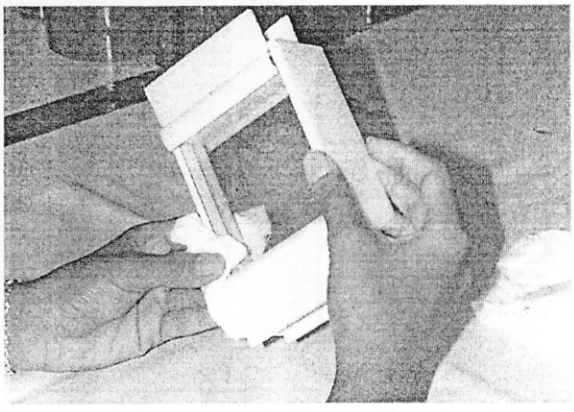


ภาพประกอบ 3-1 ขั้นตอนการประกอบแผ่นกระจกเข้าเป็นชุดสำหรับการเตรียมเจล

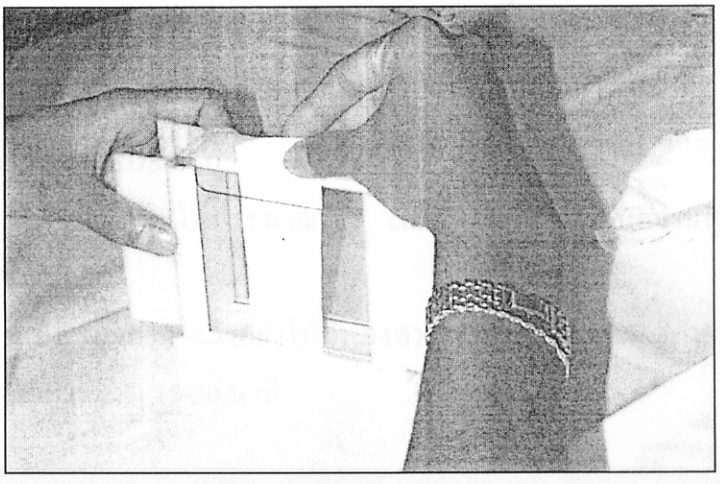
3. ทดสอบการรั่วของกระจกหลังจากประกอบเสร็จโดยใช้น้ำกลั่น ถ้าหากไม่รั่วก็เทน้ำกลั่นออก แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง ถ้ารั่วก็เซ็ทชุดเจลใหม่



9



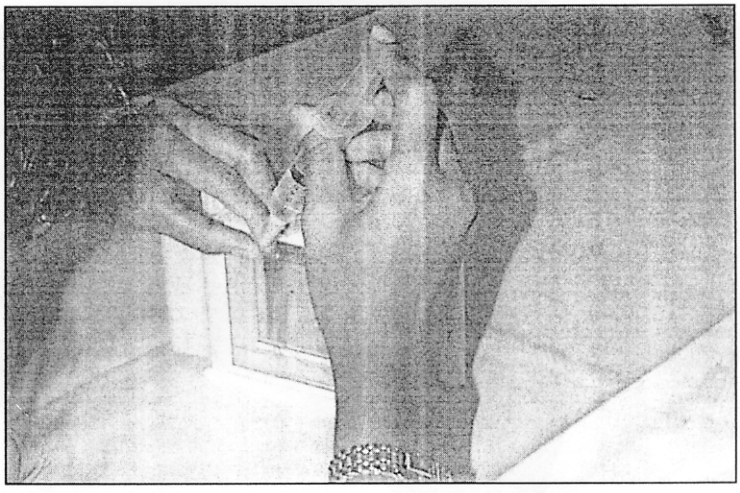
10



11

ภาพประกอบ 3-2 ขั้นตอนการทดสอบการรั่วของกระจก

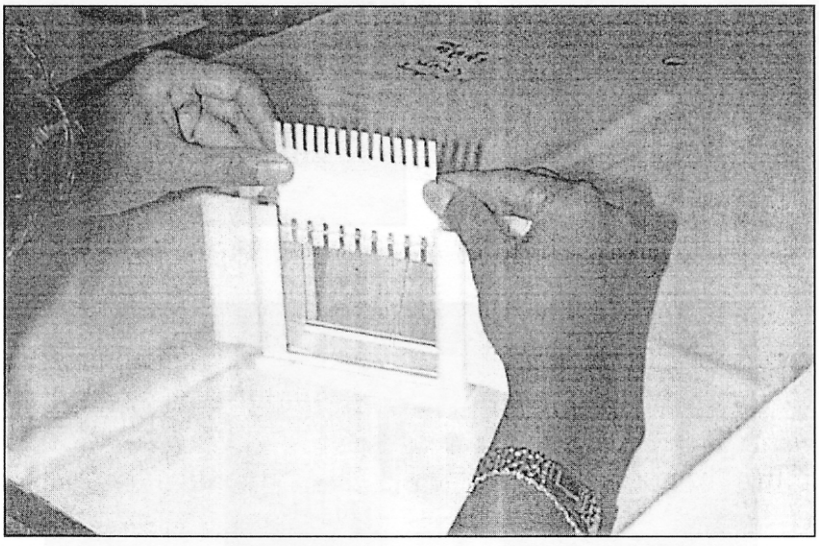
4. เตรียมชั้น separate และ ชั้น stacking โดยจะใส่ TEMED ก่อนแล้วใส่น้ำทันทีเนื่องจาก TEMED มีกลิ่นเหม็นควรทำในตู้ควัน จากนั้นใส่อะไรก่อนหรือหลังก็ได้ ส่วน APS เป็นสารที่ช่วยให้ gel แข็งตัวจะใส่ก่อนจะเท gel ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก
5. ใช้ syringe ดูดสารชั้น separate ที่เตรียมเสร็จโดยให้มีฟองอากาศน้อยที่สุด แล้วปล่อยลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกสูงประมาณ 5.5 cm ก่อนเท gel ควร mark ความสูงไว้ก่อนแล้ว cover ผิวหน้า gel ด้วย 1% SDS เพื่อให้ผิวหน้า gel เรียบสม่ำเสมอ



12

ภาพประกอบ 3-3 การเตรียมชั้น separate

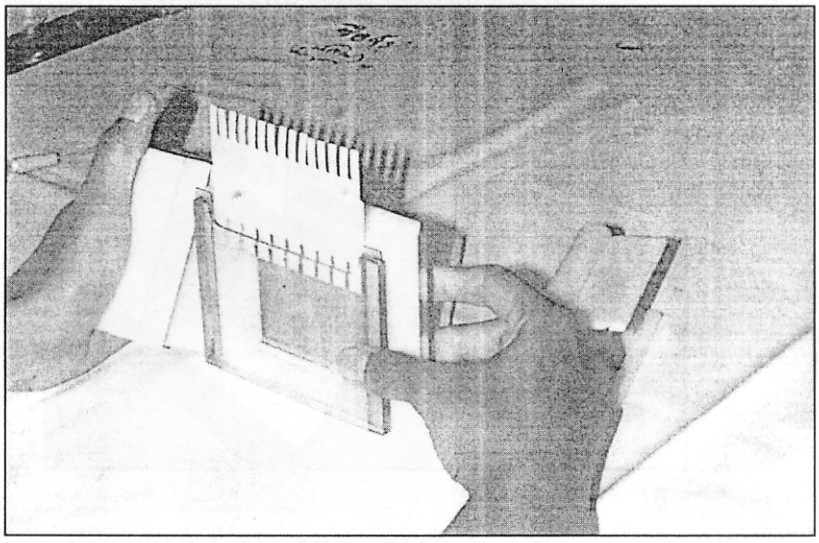
6. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที
7. ใช้กระดาษกรองซับ 1% SDS ออก
8. เทชั้น stacking ลงไปโดยจะใส่ประมาณ 2.5 cm ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับความสูงของ gel และความสามารถในการแยก
9. เสียบ comb ให้เป็นแนวตรงระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ถ้าหากมีฟองอากาศก็ให้ขยับเขยื้อน comb แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที



13

ภาพประกอบ 3-4 การเสียบ comb เพื่อสร้าง well สำหรับ load sample

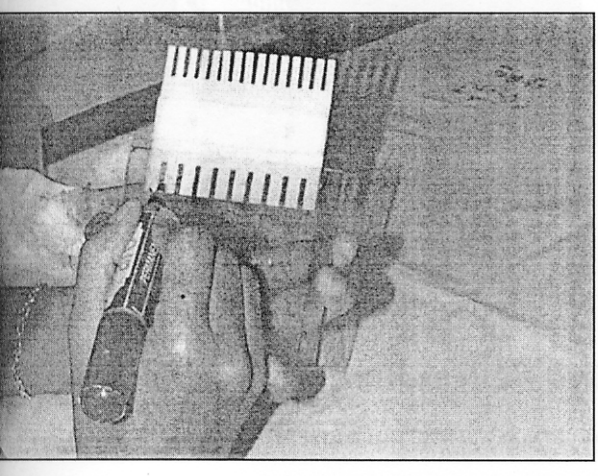
10. เมื่อ gel แข็งแล้ว ถอดแผ่นกระจกนั้นออกจากอุปกรณ์ที่ใช้เตรียม gel



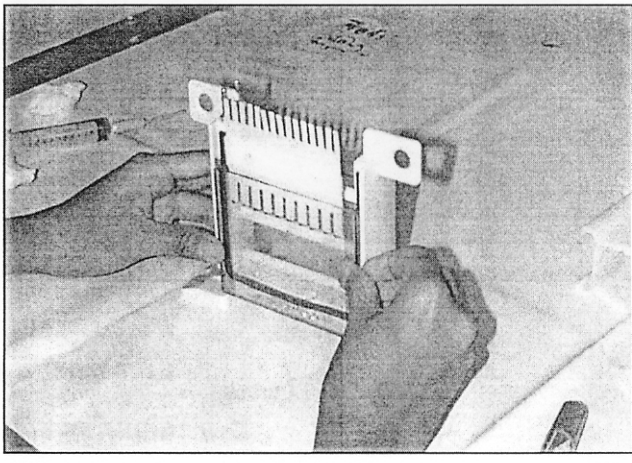
14

ภาพประกอบ 3-5 การถอดแผ่นกระจกออกจากชุดประกอบเจลเพื่อนำไปประกอบกับชุดเจลที่มีขั้วไฟฟ้า

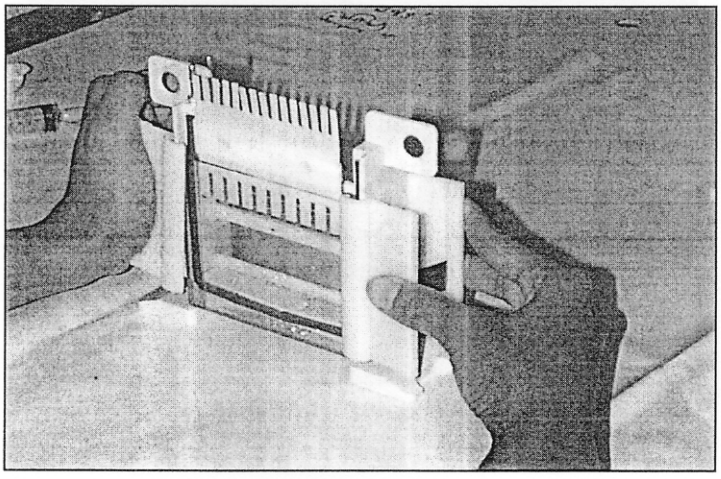
11. นำแผ่นกระจกที่มี gel อยู่นำมาประกอบตามคู่มือแล้ว mark well แต่ละ well



15

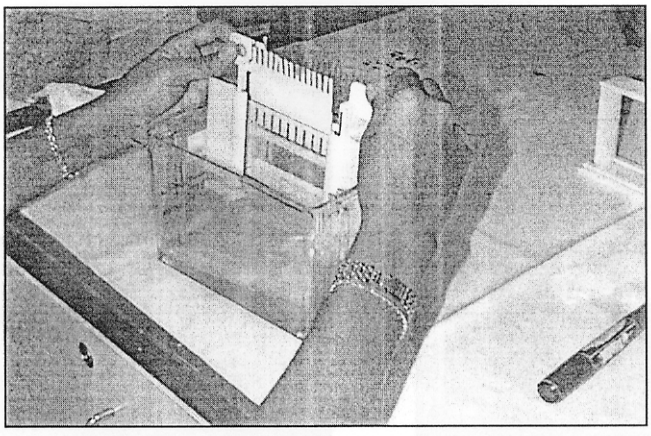


16



17

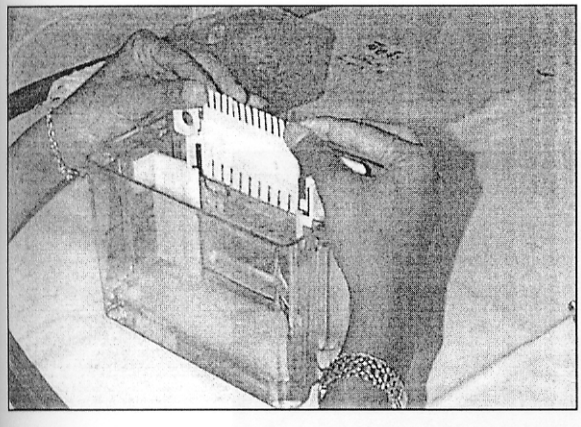
12. เท running buffer ลงใน tank ให้ระดับ buffer อยู่เหนือเส้นลวดเล็กน้อยและเทลงในช่องว่างระหว่างเจลแต่ละคู่ด้วยโดยให้ระดับ buffer อยู่เหนือ well เล็กน้อย



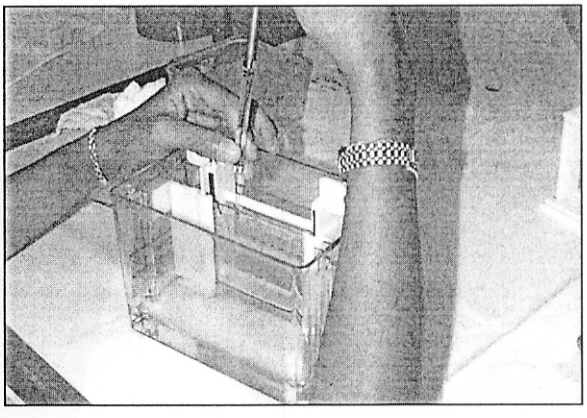
18

ภาพประกอบ 3-7 การวางชุดเจลลงใน tank ที่มี running buffer

13. ดึง comb ออกอย่างระมัดระวัง แล้วล้าง well โดยใช้ running buffer



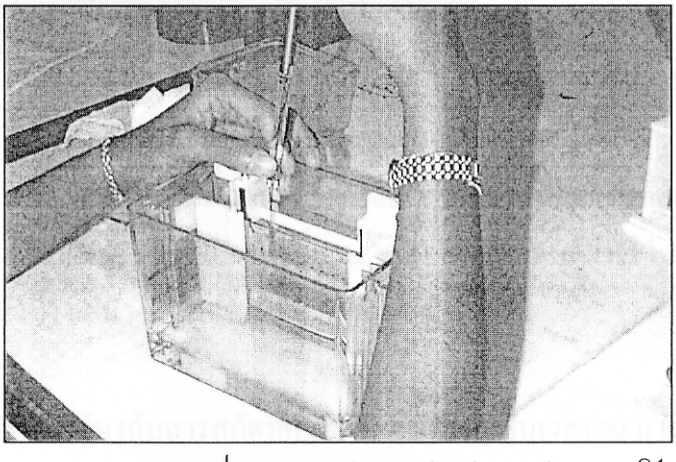
19



20

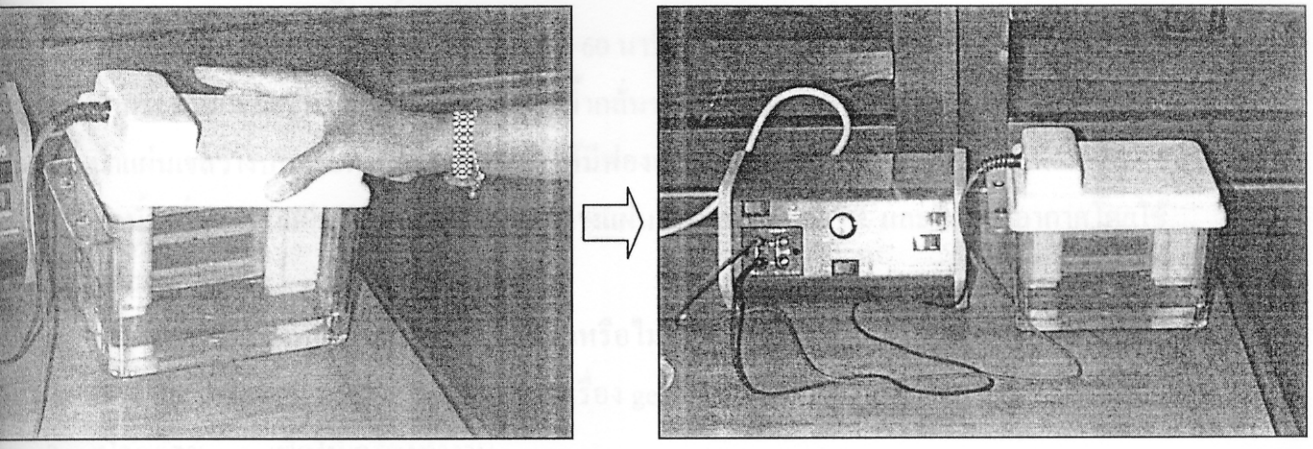
ภาพประกอบ 3-8 การดึง comb และการล้าง well

14. ใช้ syringe ดูดสารละลายตัวอย่าง (sample***) แล้ว load ลงในแต่ละ well



ภาพประกอบ 3-9 การ load sample 21

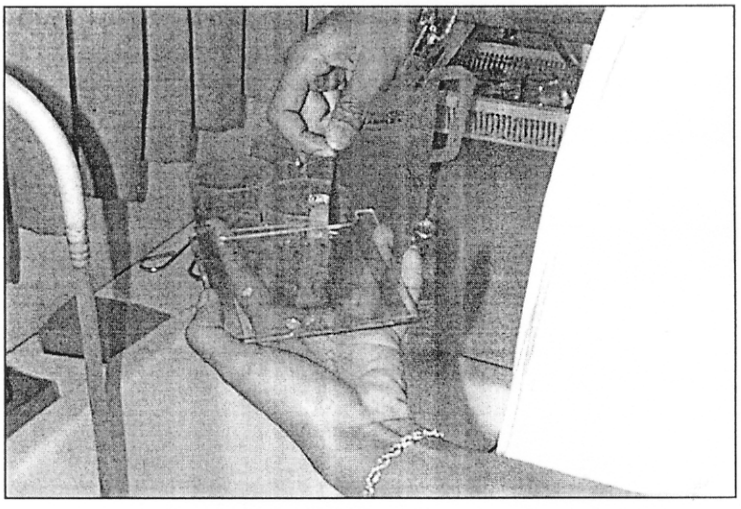
15. ให้กระแสไฟฟ้าแบบกระแสตรงโดยเลือก current constant 30 mA ต่อการ run gel 2 ชุด หรือ อาจจะใช้กระแสไฟฟ้า 40 mA ก็ได้ ซึ่งเวลาในการ run gel 90 นาที



22 23

ภาพประกอบ 3-10 ขั้นตอนการให้กระแสไฟฟ้ากับแผ่นเจล

16. หลังจาก run sample เสร็จแล้ว ปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้า แล้วแกะแผ่น gel ออก นำไปแช่ใน staining solution ประมาณ 30 นาที



24

ภาพประกอบ 3-11 การแกะเจลออกจากแผ่นกระจก

17. เมื่อครบเวลา ให้เปลี่ยนมาแช่ใน destain solution 1 ชั่วโมง เพื่อล้างสีที่ย้อมที่เป็นส่วนเกินออก แล้วตามด้วย 10% acetic acid 60 นาที เพื่อ fix band สลับกันจนกว่าจะใส
18. ล้างด้วยน้ำ แล้วนำ แผ่น gel ไปถ่ายรูป หรือ ทำแห้ง

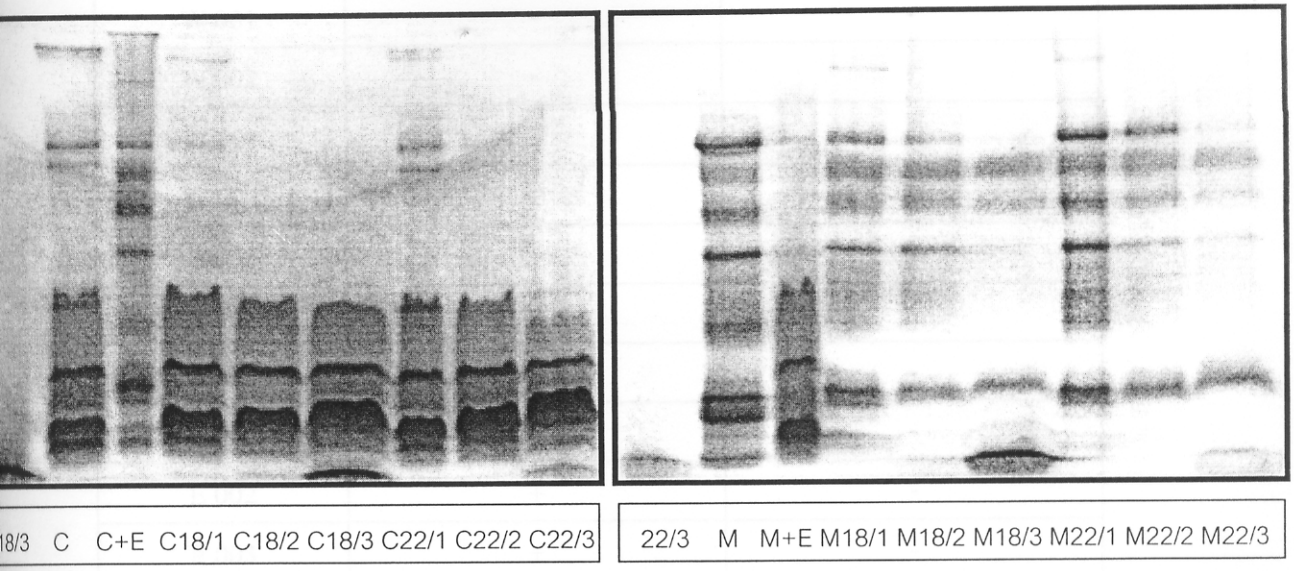
*** incubate พิษงู และพิษงูกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

- ขั้นตอนการทำ gel ให้แห้ง

1. เปิดสวิตช์ของเครื่อง gel dryer
2. set อุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 70 °C เป็นเวลา 60 นาที
3. นำกระดาษกรองวางบน gel dryer แล้วใช้น้ำกลั่นชะให้เปียก
4. นำแผ่นเจลวางบนกระดาษกรองนั้น อย่าให้มีฟองอากาศ เพราะอาจทำให้ gel แตกได้
5. ฉีดน้ำกลั่นลงบนแผ่น gel เล็กน้อย แล้ววางแผ่นพลาสติกทับลงไป และไล่ฟองอากาศโดยใช้ spatula
6. วางกระดาษกรองทับด้านบนแผ่นพลาสติกหรือไม่ต้องวางก็ได้
7. ฉีดน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปิดพลาสติกของเครื่อง gel dryer ทับอีกครั้ง
8. เปิดสวิตช์ auto เพื่อให้เครื่องทำงาน
9. เมื่อครบเวลานำแผ่น gel ที่แห้งออก และ label ให้เรียบร้อย
10. ปิดเครื่อง

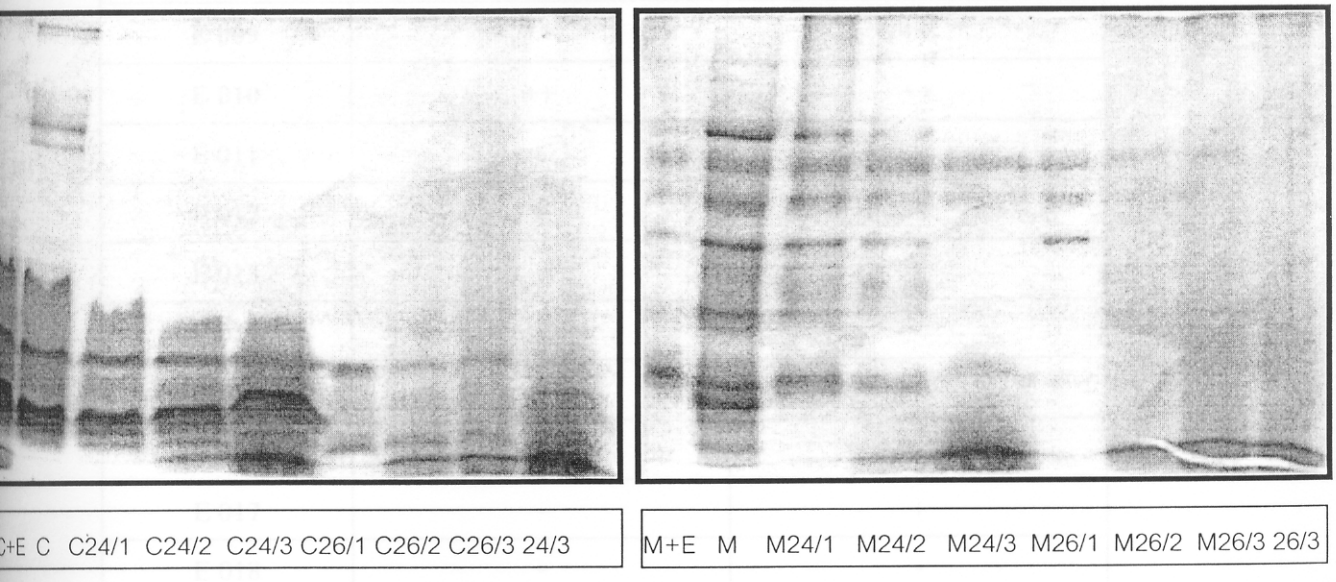
- ผลการทดลอง SDS-PAGE

1. ภาพตัวอย่างของ SDS-PAGE ที่ให้ผลลบ [negative, (-)] ของตัวอย่างสมุนไพรกับพิษงูเห่า (C) และงูกะปะ (M) ในภาพประกอบจะเป็นตัวอย่างสารสกัด E018 และ E022



ภาพประกอบ 3-12 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสารสกัด E018 และ E022

2. ภาพตัวอย่างของ SDS-PAGE ที่ให้ผลบวก [positive, (+)] ของตัวอย่างสมุนไพรกับพิษงูเห่า (C) และงูกะปะ (M) ในภาพประกอบจะเป็นตัวอย่างสารสกัด E026 (สารสกัด E024 ได้ผลลบ)



ภาพประกอบ 3-13 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสารสกัด E024 และ E026

3. ตารางสรุปผลการทดลอง SDS-PAGE ของสารสกัดสมุนไพร

ตารางที่ 3-2 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสารสกัดสมุนไพร

ตัวอย่างสมุนไพร	ผลการทดสอบ SDS-PAGE	
	พิษงูเห่า	พิษงูกะปะ
W 001	-	-
W 002	-	-
W 003	-	-
W 004	-	-
W005	-	-
W006	-	-
W 007	-	-
E 001	+	-
E 002	+	-
E 003	+	-
E 004	++	++
E 005	++	-
E 006	++	-
E 007	++	+
E 008	++	+
E 009	++	++
E 010	++	++
E 011	-	-
E 012	+	+
E 013	+	-
E 014	-	-
E 015	+++	+++
E 016	-	-
E 017	-	+
E 018	-	-
E 019	-	-
E 020	-	-

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

ตัวอย่างสมุนไพร	ผลการทดสอบ SDS-PAGE	
	พิษงูเห่า	พิษงูกะปะ
E 021	-	-
E 022	-	-
E 023	-	-
E 024	-	-
E 025	-	++
E 026	+++	+++
E 027	++	+
E 028	-	-
E 029	-	+
E 030	-	-
E 031	-	-
E 032	-	+
E 033	-	+++
E 034	-	-
E 035	-	-
E 036	++	-
E 037	-	-
E 038	++	-
E 039	+	-
E 040	++	++
E 041	++	-
E 042	++	++
E 043	++	-
E 044	-	-
E 045	++	-
E 046	+	-
E 047	-	-
E 048	+++	+++

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

ตัวอย่างสมุนไพร	ผลการทดสอบ SDS-PAGE	
	พิษงูเห่า	พิษงูกะปะ
E 050	-	-
E 051	-	+
E 052	+++	+++
E 053	-	-
E 054	-	-
E 055	-	-
E 056	-	-
E 057	-	-
E 058	++	-
E 059	+	-
E 060	++	-
E 061	-	-
E 062	-	+
E 063	-	++
E 064	-	-
E 065	-	-
E 066	-	-
E 067	-	-
E 068	-	-
E 069	-	-
E 070	-	-
E 071	-	-
E 072	-	-
E 073	-	-
E 074	-	-
E 075	-	-
E 076	-	-
E 077	-	-

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

ตัวอย่างสมุนไพร	ผลการทดสอบ SDS-PAGE	
	พิษงูเห่า	พิษงูกะปะ
E 078	-	-
E 079	-	-
E 080	-	-
E 081	-	-
E 082	-	-
E 083	-	-
E 084	-	-
E 085	-	-
E 086	-	-
E 087	-	++
E 088	-	-
E 089	-	+++
E 089*	+++	+++
E 090	-	+++
E 091	-	+++
E 092	-	++
E 093	-	-
E 094	+	-
E 095	+	+
E 096	+	-
E 097	-	++
E 098	-	-
E 099	-	+
E 100	-	-
E 101	++	++
E 026 (ซ้ำ)	+++	+++
E 026 (ใหม่)	+++	+++

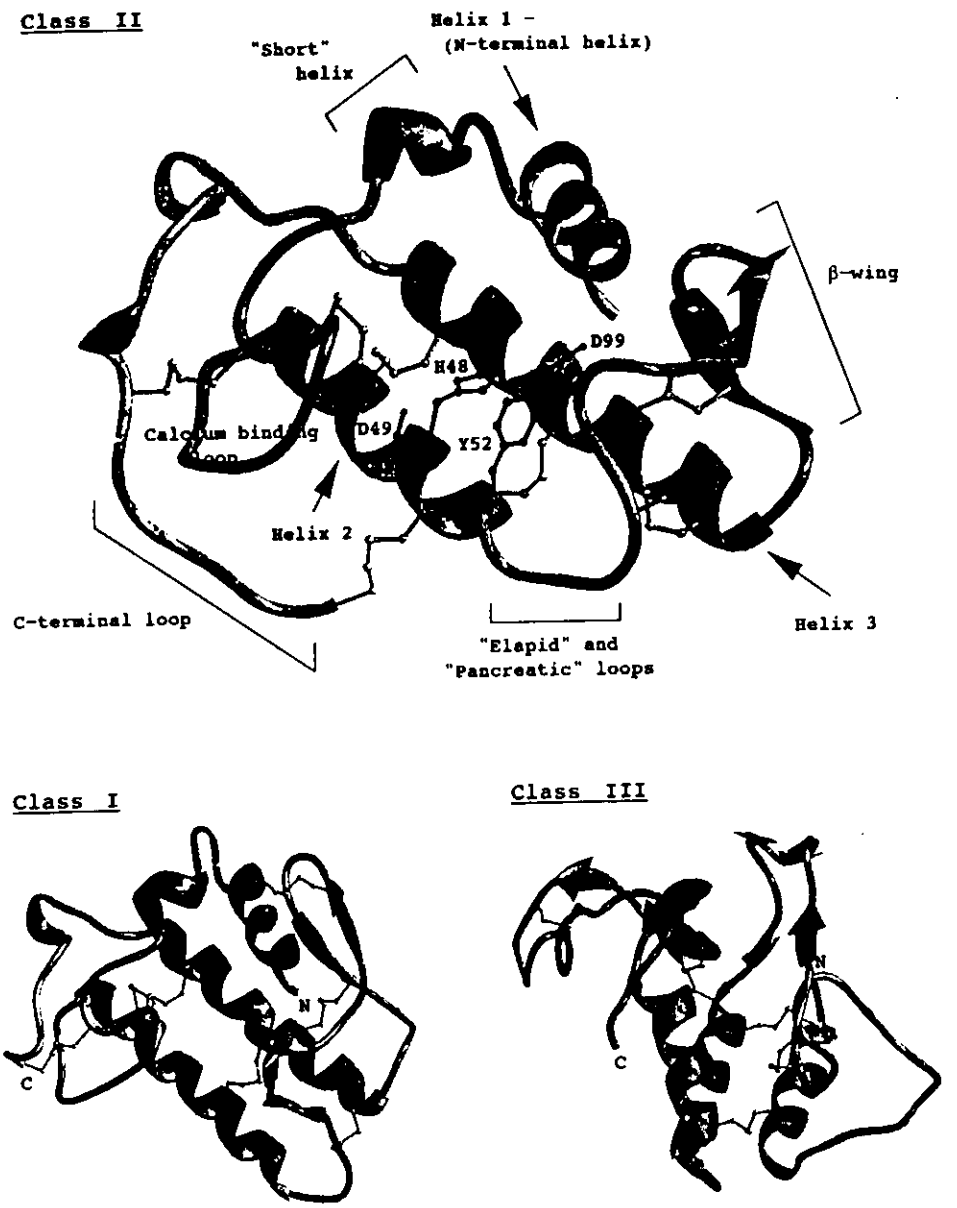
- สรุปผลการทดลอง

เทคนิค SDS – PAGE เป็นวิธีการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้า ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองเป็นการเปรียบเทียบแถบ (band) โปรตีนของพิษงูซึ่งได้ทำปฏิกิริยากับสารสกัดของสมุนไพรในหลอดทดลองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเทียบคับแถบโปรตีนของพิษงูเห่าไทย และพิษงูกะปะที่ไม่ได้ใส่สารสกัดของสมุนไพร(ใช้เป็น control) ถ้าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ในการต้านพิษงู จะทำให้แถบโปรตีนของพิษงูจางหายไปเมื่อเทียบกับcontrol ผลการทดลองกับสารสกัดด้วยน้ำและเอทธานอล พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อโปรตีนในพิษงูที่แสดงฤทธิ์ว่ามีคุณสมบัติในการต้านพิษงูที่น่าสนใจ (positive มากกว่าหรือเท่ากับ ++) ทั้งงูเห่าไทยและงูกะปะ ได้แก่ ใบเสลดพังพอนตัวเมีย(E004) ใบกะเพรา(E009) ใบโหระพา(E010) เถาโคกกระออม(E015) ใบโคลงเคลง (E026) โกฐเชียง(E040) โกฐพุงปลา(E042) เปลือกสายหยุด(E048) กิ่งอบเชย(E052) ใบฝ้ายผี (E089*) และรากขมิ้นขม(E101) ซึ่งทั้งหมดเป็นสารสกัดสมุนไพรที่สกัดจากเอทธานอล ยกเว้นสารสกัดจากใบฝ้ายผี(E89*) จะเป็นสารสกัดที่ได้จากเอทธานอลที่ละลายในน้ำ สำหรับสารสกัดจากสมุนไพรที่มีผลต่อแถบโปรตีนทั้งหมดของพิษงูกะปะ (positive +++) คือ เถาโคกกระออม(E015) ใบโคลงเคลง(E026) เปลือกสายหยุด(E048) กิ่งอบเชย(E052) และ ใบฝ้ายผี(E089*) และสารสกัดจากสมุนไพรที่มีผลต่อแถบโปรตีนทั้งหมดของพิษงูเห่า (positive +++) คือ เถาโคกกระออม(E015) ใบโคลงเคลง(E026) ข่า(E033) เปลือกสายหยุด(E048) กิ่งอบเชย(E052) พริกไท(E090) พลูคาว (E091) และ ใบฝ้ายผี(E089 และ E089*)

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าแถบของโปรตีน (band) ของพิษงูเห่าไทย และงูกะปะที่จางลงหรือหายไปนั้น เป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพร ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มของสารเคมีหลายชนิดที่เกิดปฏิกิริยา หรือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนในพิษงู ทำให้โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในพิษงูเห่า และงูกะปะสูญเสียคุณสมบัติไป อย่างไรก็ตามวิธีการ SDS-PAGE นี้เป็นเพียงการทดลองในขั้นแรกของการหาสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านพิษงู คงจะต้องมีการทดลองอื่นอีกเพื่อเป็นการสนับสนุน และยืนยันผลการทดลองวิธี SDS-PAGE ซึ่งการทดลองที่จะทำต่อไปคือการทดลองการยับยั้ง activity ของเอนไซม์ 2 ชนิดในพิษงู คือการทดสอบ phospholypase A_2 enzyme activity และ proteolytic enzyme activity เพื่อที่จะได้เป็นการยืนยันผลการทดลองในเบื้องต้นให้ได้ว่าสารสกัดจากสมุนไพรใดในการวิจัยครั้งนี้มีศักยภาพในการศึกษาต่อในสัตว์ทดลอง (in vivo)

3.3 การทดสอบ Phospholipase A_2 enzyme activity

Phospholipase A_2 (PLA_2) เป็นเอนไซม์ที่พบในพิษงูเกือบทุกชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ขนาดเล็ก และโครงสร้างเป็นตติยภูมิ คือ จะมีโครงสร้างเกลียวอัลฟา และแผ่นบีต้าอยู่น้อย และมีพันธะไดซัลไฟล์หรือไอออนของโลหะเป็นจำนวนมากช่วยยึดโครงสร้างไว้ (พัชรา กีระกะลัส, 2541) ดังรูป



ภาพประกอบ 3-14 โครงสร้างของ phospholipase A_2 enzyme

Class I ได้แก่ Elapidae

Class II ได้แก่ Viperidae

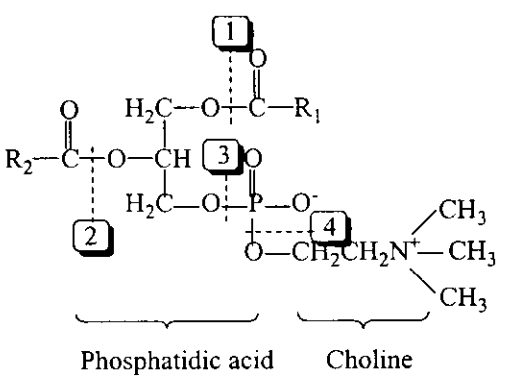
Class III ได้แก่ Lizard and bee venom

PLA_2 มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ hydrolysis พวก lipid เชื่อว่า haemolysis ในผู้ป่วยเกิดได้ 2 ทาง ทางตรง คือ พิษงูละลายไขมันผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ทางอ้อม คือ คนปกติมี Lecithin อยู่ในเม็ดเลือด หรืออยู่ในพลาสมา ถ้าได้รับพิษงูซึ่งมี Lecithinase A หรือ Phospholipase A จะเปลี่ยน Lecithin ให้เป็น Lysolecithin ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิด Haemolysis และเกิด Haemolysis มากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับ fector ต่างๆ เช่น

- ระดับของ Plasma lecithin
- Protective effect ของ plasma protein
- Sensitivity ของเม็ดเลือดแดงต่อ lysolecithin
- ประสิทธิภาพของม้าม

นอกจากนี้ PLA_2 ยังเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ โดยจะไปเหนี่ยวนำ ให้เกิดอาการต่าง ๆ มากมาย เช่น ปล่อย histamin ออกมาได้จากอวัยวะบางแห่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง เส้นประสาทกล้ามเนื้อ รอยต่อระหว่างประสาทและกล้ามเนื้อ บางคนกล่าวว่า PLA_2 เป็นเพียงตัวช่วยให้ส่วนประกอบของพิษงูอย่างอื่นซึมผ่านเข้าไปในระบบประสาทแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบประสาทอีกต่อหนึ่ง (บุญเยือน ทุมวิภาต, 2525)

การทดสอบ PLA_2 enzyme ได้ใช้ เลซิทิน (lecithin) ที่สกัดจาก egg yolk เป็น substrate ซึ่ง lecithin เป็นเอสเทอร์ของกรดฟอสฟาติดิดกับโคลีน การที่เลซิทินมีหมู่โคลีนและกรดฟอสฟอริคทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารที่มีประจุได้ในพลาสมาซึ่งมีประโยชน์ในการทำให้สารประกอบไขมันคงสภาพเป็นสารละลายได้ในร่างกาย เลซิทินเป็นฟอสโฟไลปิดที่มีมากที่สุดในร่างกาย สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วๆไป ยกเว้นอะซิโตน กรดไขมันในโมเลกุลส่วนใหญ่เป็นกรดปาลมิติค (palmitic acid), สเตรียริค (stearic acid), โอเลอิค (oleic acid), ลิโนเลอิค (linoleic acid) และอะราคิโดนิค (arachedoic acid) โดยที่ตำแหน่งที่ 1, 3 มักจะเป็นกรดอิ่มตัว ส่วนตำแหน่งที่ 2



จะเป็นกรดไม่อิ่มตัว ดังโครงสร้าง

ภาพประกอบ 3-15 สูตรโครงสร้างของ lecithin

PLA_2 จะไปย่อย หรือสลายที่ตำแหน่ง 2 ซึ่งจะได้กรดไขมันกับ lysolecithin ซึ่งเอนไซม์สร้างขึ้นที่ตับอ่อนในรูปของ pro-enzyme ก่อนแล้วจึงถูกกระตุ้นด้วยทริปซิน ในพิษงูก็มีเอนไซม์นี้เช่นกัน แต่ต้องอาศัยแคลเซียมเป็นตัวกระตุ้น ซึ่ง lysolecithin เป็นตัวฟอก และทำลายเม็ดเลือดที่รุนแรง โดยไปละลายเมมเบรนของเซลต่าง ๆ ได้ (นันทยา ชนะรัตน์, 2532) เมื่อเม็ดเลือดแดงถูกทำลายหรือแตกจะทำให้องค์ประกอบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (Hemoglobin) กระจายตัวออกมา

- สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

1. eppendrof ขนาด 1.5 ml
2. micropipet ชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 50, 200, 1000, 5000 µl
3. tip ขนาดต่างๆ
4. หลอด centrifuge
5. rack สำหรับใส่หลอด centrifuge
6. เครื่อง centrifuge
7. เครื่อง spectrophotometer
8. Tris-HCl
9. $CaCl_2$
10. NaCl
11. KCl
12. Na_2HPO_4
13. KH_2PO_4
14. Human RBC
15. Hen's egg yolk

- เตรียมสารเพื่อใช้ในการทดสอบ Phospholipase A_2 enzyme activity

1. 12.5mM Tris-HCl + 10mM $CaCl_2$ pH 7.4 500 ml
   -ชั่ง Tris 0.7569 g และ $CaCl_2$ 0.555 g ละลายน้ำ ประมาณ 480 ml
   -ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml
2. PBS pH 7.5 เตรียม 500 ml

NaCl	18 g	9 g
HCl (KCl)	0.2 g	0.1 g
Na_2HPO_4	1.15 g	0.575 g
KH_2PO_4	0.2 g	0.1 g
DW to	1000 ml	500 ml

3. Human RBC

3.1 นำ Human RBC ไป centrifuge แล้วเอาส่วน plasma ออก

3.2 ล้าง RBC ด้วย NSS แล้วนำไปcentrifuge

3.3 นำ NSS ออก

3.4 ทำตามขั้นตอน 3.2 และ 3.3 จนกระทั่งส่วนของ NSS ใส ก็จะได้ pure RBC

3.5 นำไปเตรียมเป็น 2% v/v in buffer PBS-KCl

4. Hen's egg yolk (Substrate)

ประกอบด้วย egg yolk ผสมกับ 12.5mM Tris-HCl + 10mM $CaCl_2$ pH 7.4 ในอัตราส่วน 2 : 1 นำไป centrifuge ที่ 15000 g , 60 min , 10 ^{o}C นำส่วน supernatant มาใช้

- การทดลองหาปริมาณพิษงูที่เหมาะสมในการทดสอบ

- การเตรียมพิษงู เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบ

<u>การเตรียมพิษงูกะปะ ให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน</u>

1. ชั่งพิษงูกะปะ 0.10 mg ละลายใน PBS pH 7.5 ปริมาตร 1 ml (ความเข้มข้น 100 mg/ml)
2. ดูดพิษงูกะปะ 50 µl จากข้อ 1 แล้ว เจือจาง ด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 0.5 ml (ความเข้มข้น10 mg/ml)
3. ดูดพิษงูกะปะ 100 µl จากข้อ 2 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ml (ความเข้มข้น 1 mg/ml)
4. ดูดพิษงูกะปะ 600 µl จากข้อ 3 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1.5 ml (ความเข้มข้น 400 µg/ml)***
5. ดูดพิษงูกะปะ 880 µl จากข้อ 4 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1.1 ml (ความเข้มข้น 320 µg/ml)***
6. ดูดพิษงูกะปะ 450 µl จากข้อ 5 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 0.9 ml (ความเข้มข้น 160 µg/ml)***
7. ดูดพิษงูกะปะ 600 µl จากข้อ 6 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 0.6 ml (ความเข้มข้น 80 µg/ml)***

หมายเหตุ

1. *** เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองโดยที่

ความเข้มข้น 400µg/ml	=	50 µg /125 ml
ความเข้มข้น 320 µg/ml	=	40 µg /125 ml
ความเข้มข้น 160 µg/ml	=	20 µg /125 ml
ความเข้มข้น 80 µg/ml	=	10 µg /125 ml

2. Tris-HCl buffer หมายถึง 12.5mM Tris-HCl+10mM $CaCl_2$ pH 7.4

<u>การเตรียมพิษงูเห่า ให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน</u>

เตรียมวิธีการเดียวกันกับ การเตรียมพิษงูกะปะ

- ผลการทดลอง หาความเข้มข้นของพิษงูกะปะ และพิษงูเห่าที่เหมาะสม

การทดลองนี้ได้ทำ positive control ควบคู่ไปด้วย โดยจะใช้เซรุ่มแก้พิษงู (antivenom) แต่ละชนิดเป็น positive control

ตาราง 3-3 ค่า O.D ของพิษงู

sample	O.D. 580 nm ที่ 60 นาที		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
C 80 mg/ml	0.795	0.767	0.781
C 160 mg/ml	0.797	0.792	0.795
C 320 mg/ml	0.797	0.8	0.799
C 400 mg/ml	0.786	0.787	0.787
M 80 mg/ml	0.279	0.238	0.259
M 160 mg/ml	1.076	1.122	1.099
M 320 mg/ml	1.17	1.173	1.172
M 400 mg/ml	1.157	1.164	1.161

ตาราง 3-4 ค่า O.D ของพิษงูกับ antivenom

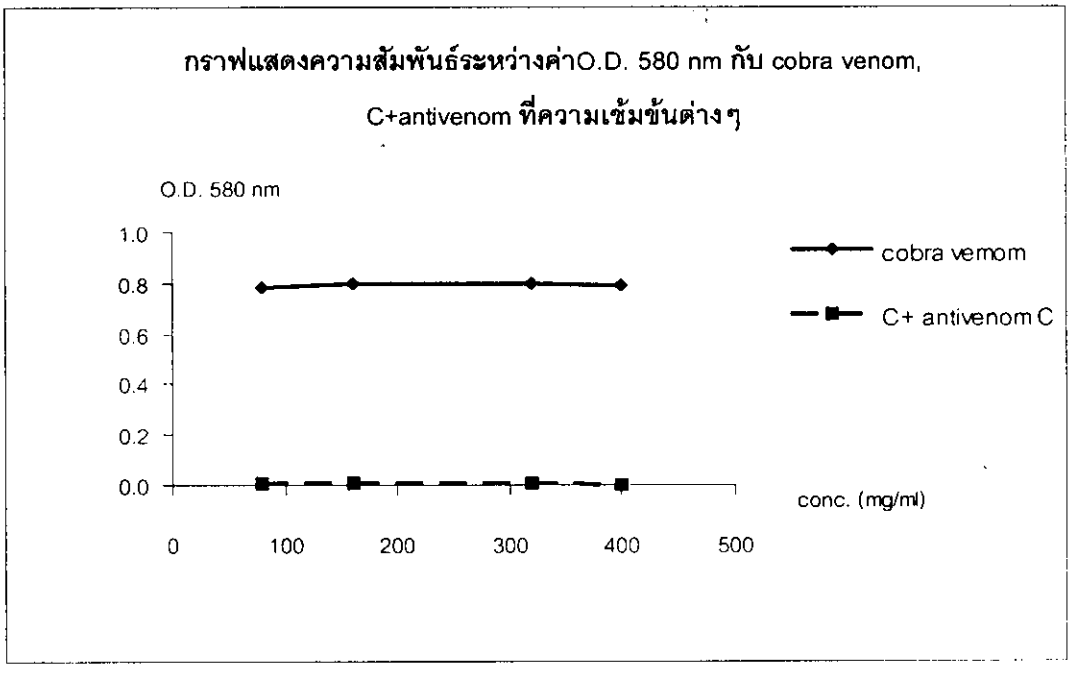
sample	O.D. 580 nm ที่ 60 นาที			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	สุทธิ
C 80 mg/ml + antivenom C	0.008	0.011	0.010	0.008
C 160 mg/ml+ antivenom C	0.007	0.007	0.007	0.005
C 320 mg/ml+ antivenom C	0.01	0.011	0.011	0.009
C 400 mg/ml+ antivenom C	0.015	0.013	0.014	0.012
M 80 mg/ml + antivenom M	0.006	0.005	0.006	0.003
M 160 mg/ml+ antivenom M	0.007	0.006	0.007	0.004
M 320 mg/ml+ antivenom M	0.016	0.014	0.015	0.012
M 400 mg/ml+ antivenom M	0.013	0.014	0.014	0.011

หมายเหตุ : สุทธิ คือ ค่าเฉลี่ย – ค่า Control

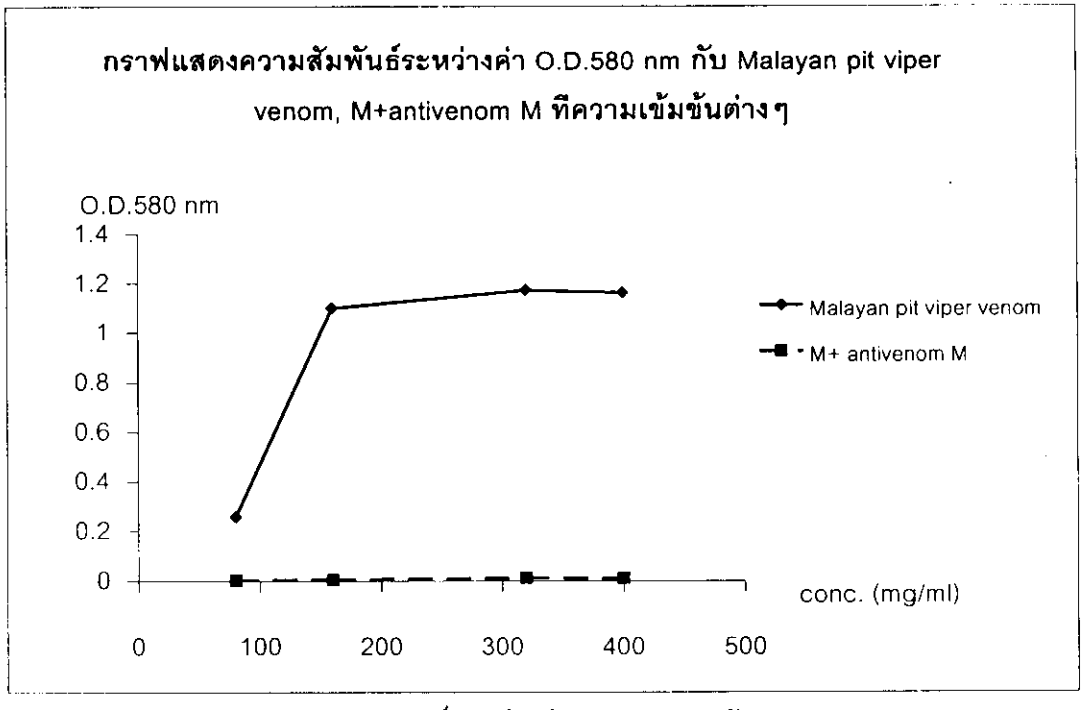
Control C = 0.002 C หมายถึง พิษงูเห่า

Control M = 0.003 M หมายถึง พิษงูกะปะ

นำค่าเหล่านี้ไป plot กราฟ เพื่อหาจุดที่ปฏิกิริยาของพิษงูกับ substrate เริ่มคงที่ ซึ่งจะเป็นปริมาณพิษงูที่ใช้ในการทดลอง



ภาพประกอบ 3-16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าO.D 580 nm กับ cobra venom และ C+antivenom ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพประกอบ 3-17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าO.D 580 nm กับ Malayan pit viper venom และ M+antivenom ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟจะเห็นได้ว่า จุดที่พิษงูเริ่มคงที่คือ พิษงูเห่า ปริมาณ 10 μg (conc. 80 mg/ml 125 μl) และ พิษงูกะปะ ปริมาณ 20 μg (160 mg/ml 125 μl) ซึ่งจะเป็นปริมาณพิษงูที่ใช้ในการทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพร

- การทดลอง Phospholipase A_2 enzyme กับสารสกัดจากสมุนไพร

(สมุนไพร 1 ชนิด ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง)

- การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

1. ชั่งสารสกัด 0.05 mg ละลายด้วยตัวทำลายที่เหมาะสม และปรับปริมาตรให้ครบ 500 μl (conc. 100 mg/ml)
2. ชั่งสารสกัด 0.04 mg ละลายด้วยตัวทำลายที่เหมาะสม และปรับปริมาตรให้ครบ 500 μl (conc. 80 mg/ml)
3. ดูดสารสกัดจากข้อ 1 มา 360 μl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl โดยปรับปริมาตรให้ครบ 1200 μl (conc. 30 mg/ml)
4. ดูดสารสกัดจากข้อ 3 มา 300 μl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl โดยปรับปริมาตรให้ครบ 900 μl (conc. 10 mg/ml)
5. ดูดสารสกัดจากข้อ 4 มา 100 μl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl โดยปรับปริมาตรให้ครบ 1000 μl (conc. 1 mg/ml)
6. ดูดสารสกัดจากข้อ 5 มา 100 μl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl โดยปรับปริมาตรให้ครบ 1000 μl (conc. 0.1 mg/ml)

หมายเหตุ : สมุนไพรแต่ละชนิดทำ 2 ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยดูความใสของสารละลายที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่กำหนดได้

- การเตรียมพิษงู

<u>การเตรียมพิษงูเห่า</u>

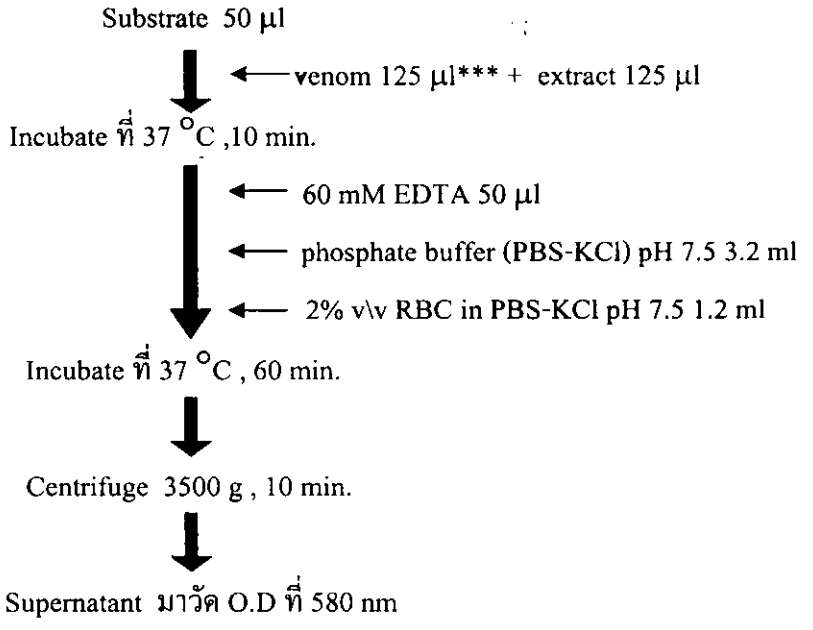
พิษงูเห่า 1 mg/ml ดูดมา 80 μl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl bufferโดยปรับปริมาตรให้ครบ 1 ml (conc. 80 μg/ml)

<u>การเตรียมพิษงูกะปะ</u>

พิษงูกะปะ 1 mg/ml ดูดมา 160 μl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl buffer โดยปรับปริมาตรให้ครบ 1 ml (conc. 160 μg/ml)

หมายเหตุ : Tris-HCl buffer หมายถึง 12.5mM Tris-HCl + 10mM $CaCl_2$ pH 7.4

- Protocol การวิเคราะห์ Phospholipase A_2 enzyme activity



หมายเหตุ 1. O.D. 580 nm ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงของ Hemoglobin

2. control (extract : extract 125 + buffer 125 µl)

(venom : venom 125 + buffer 125 µl)

3. blank (buffer 250 µl)

4. *** เป็นปริมาณของพิษงูที่เหมาะสมในการทดลองกับสมุนไพรซึ่งได้จากการทดลองการหาปริมาณพิษงูที่เหมาะสม

5. ทำซ้ำ หลังการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร อีกครั้ง

- ผลการทดสอบ Phospholipase A_2 enzyme activity (Malayan pit viper venom)

Phospholipase A_2 enzyme activity (%)	**Malayan pit viper venom 20 µg + Sample concentration**		
	0.1 – 10 mg/ml	**10 – 50 mg/ml**	**50 – 100 mg/ml**
0	E 087 – E 092, E 097, E 099, E 101, E 098*	E 002 – E 010, E 017, E 037, E 046, E 048, E 051, E 061, E 064, E 093, E 095, E 096, E 098, E 100, E026(เก่า),E026(ใหม่)	E 026, E 030, E 031,
1 – 20	E 035, E 051, E 052, E 055, E 058, E 060, E 069, E 093 – E 096, E 098, E 100, E 026 (เก่า)	E 001, E 005, E 006, E 013 – E 015, E 033, E 038, E 042 – E 044, E 049, E 050, E 053, E 062, E 094	E 018, E 019, E 023, E 024, E 028, E 029, E 032 – E 034, E 044, E 085
20 – 50	E 039, E 040, E 049, E 050, E 053, E 057, E 061, E 064, E 026 (ใหม่)	E 012, E 016, E 026, E 031, E 047, E 054, E 056, E 059, E 069, E 076, E 077, E 078, E 085, E 086	W 002, W 003, E 020 – E 022, E 025, E 027, E 074, E 079, E 080, E 081, E 086,
> 50	E 019, E 054, E 056, E 059, E 062, E 063, E 065 – E 068	W 001 – W 007, E 011, E 018, E 020 – E 030, E 032, E 034, E 041, E 044, E 045, E 063, E 065 – E 068, E 070 – E 075, E 079 – E 084	W 001 – W 007, E 070 – E 073, E 075, E 082 – E 084

หมายเหตุ : - Phospholipase A_2 enzyme activity of Malayan pit viper venom (20 µg) = 100%

- Phospholipase A_2 enzyme activity of Malayan pit viper venom (20 µg) + Malayan pit viper anti-venom = 0.36%

- ผลการทดสอบ Phospholipase A_2 enzyme activity (Cobra venom)

Phospholipase A_2 enzyme activity (%)	**Cobra venom 10 µg + Sample concentration**		
	0.1 – 10 mg/ml	**10 – 50 mg/ml**	**50 – 100 mg/ml**
0	E 052	E 026, E 101, E 098*, E026(เก่า), E026ใหม่)	-
1 – 20	-	E 014, E 016, E 037, E 038, E 049 – E 051	E 071, E 072, E 084, E 086
20 – 50	E 036, E 048	E 004, E 009, E 011, E 015, E 017, E 031, E 040, E 041, E 046, E 047, E 055	E 070, E 074 – E 079
> 50	W 001 – W 007, E 018 – E 035, E 046, E 047, E 049 – E 051, E 056 – E 069, E 087 – E 101, E098* E026(เก่า), E026ใหม่)	W 001 – W 007, E 001 – E 003, E 005 – E 008, E 010, E 012, E 013, E 018 – E 022, E 025, E 028 – E 030, E 032 – E 034, E 039, E 042 – E 045, E 053, E 054, E 056 – E 069, E 087 – E 100	E 073, E 080 – E 083, E 085

หมายเหตุ : - Phospholipase A_2 enzyme activity of Cobra venom (10 µg) = 100%

- Phospholipase A_2 enzyme activity of Cobra venom (10 µg) + Cobra anti-venom = 0.90%

- สรุปผลการทดสอบ Phospholipase A_2 enzyme activity

สารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบการต้านฤทธิ์ของเอนไซม์ Phospholipase A_2 ของพิษงูเห่า และงูกะปะ โดยสารสกัดจากสมุนไพรนั้นเตรียมในหลายความเข้มข้น (ตามความเหมาะสมของสมุนไพรนั้น) เช่น 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 และ 80.0 mg/ml โดยที่สารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดจะเตรียมอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น สำหรับขั้นตอนแรกของการทดลองนี้จะต้องทำการหาปริมาณพิษงูที่เหมาะสมในการทดลองนี้ พบว่าปริมาณของพิษงูกะปะที่เหมาะสำหรับการทดลอง จะใช้ปริมาณ 20 μg (160 mg/ml, 125 μl) และพิษงูเห่า จะใช้ในปริมาณ 10 μg (80 mg/ml, 125 μl) ตามที่ได้แสดงในผลการทดลอง การทดสอบสารสกัดสมุนไพรที่สามารถใช้ต้านฤทธิ์เอนไซม์ Phospholipase A_2 สำหรับพิษงูกะปะนั้น จะได้ว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Phospholipase A_2 ได้ดีมาก (สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 0.1 – 10 mg/ml) คือสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรหมายเลข E 087 – E 092, E 097, E 099, E 101 และ E 098* และสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ Phospholipase A_2 ได้ดี (สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 10 – 50 mg/ml) คือสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรหมายเลข E 002 – E 010, E 017, E 026, 037, E 046, E 048, E 051, E 061, E 064, E 093, E 095, E 096, E 098 และ E100

ผลการทดสอบการต้านฤทธิ์เอนไซม์ Phospholipase A_2 สำหรับพิษของงูเห่านั้น จากผลการทดลองจะได้ว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Phospholipase A_2 ได้ดีมาก (สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 0.1 – 10 mg/ml) คือสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรหมายเลข E 052 และสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ Phospholipase A_2 ได้ดี (สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 10 – 50 mg/ml) คือสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรหมายเลข E 026, E 101 และ E 098*

จากผลการทดลองทั้งสองข้างต้นนี้ กล่าวโดยสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีความสามารถในการต้านฤทธิ์เอนไซม์ Phospholipase A_2 ของพิษงูเห่า และงูกะปะคือ ไมยราบ (E026) ใบฝ้ายผี (E089*) และ รากของขมิ้นขม (E 101)

3.4 การทดสอบ Proteolytic enzyme activity

Proteolytic enzyme เป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลสูง พบมากในพิษงูกลุ่ม Crotalidae (เช่น งูกะปะ เป็นต้น) เอนไซม์ชนิดนี้พบน้อยในพิษงูกลุ่ม Viperidae (เช่นงูแมวเซา) ส่วนพิษงูกลุ่ม Elapidae และ Hydrophiidae มี proteolytic enzyme น้อยมากหรือไม่มีเลย ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีฤทธิ์คล้ายเอนไซม์ Trypsin ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนและสาย peptide ของคนหรือสัตว์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและการทำลายเนื้อเยื่อ และเลือด นอกจากนี้เอนไซม์ proteolytic มีส่วนช่วยทำให้เกิดการสลายของ fibrinogen ในขบวนการแข็งตัวของเลือด ทำให้เลือดไม่แข็งตัว (clot) ซึ่งก่อให้เกิดผลทาง anticoagulant อย่างไรก็ตามพบว่าในพิษงูบางชนิดมีเอนไซม์ชนิดนี้เช่นเดียวกัน แต่มีกลไกการออกฤทธิ์อื่นที่สามารถทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (coagulant effect) โดยกลไกออกฤทธิ์จะไปเปลี่ยน prothombin ให้เป็น thombin ได้ดีขึ้นทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้เร็วขึ้น (บุญเยือน ทุมวิภาต, 2525)

- สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

1. eppendrof ขนาด 1.5 ml
2. micropipet ชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 50, 200,1000 µl
3. tip ขนาดต่างๆ
4. หลอด centrifuge
5. rack สำหรับใส่หลอด centrifuge
6. เครื่อง centrifuge
7. เครื่อง spectrophotometor
8. $CaCl_2$
9. Tris-HCl
10. Trichloroacetic acid
11. Casein

- การเตรียมสารเพื่อใช้ในการทดสอบ Protyolytic Activity

1. 8 mM $CaCl_2$ 200 ml
   - ชั่ง $CaCl_2$ 0.1766 g ปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml ด้วย H_2O
2. 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8 200 ml
   - ชั่ง Tris 4.844 g ละลายน้ำประมาณ 180 ml ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย conc. HCl แล้วปริมาตรให้ครบ 200 ml ด้วย H_2O
3. 5% Trichloroacetic acid 200 ml

- ชั่ง TCA 10 g ปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml ด้วย H_2O

4. 1% Casein in 0.2 Tris-HCl pH 8.8

- ชั่ง Casein 1 g ละลายใน 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

- การทดลองหาปริมาณพิษงูที่เหมาะสมในการทดสอบ

- **พิษงูเห่า**

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ พิษงูเห่า ปริมาณ 100, 1000, 1500, 2000 µg **Incubate ที่เวลา** 2, 10, 40 **และ** 90 **นาที เพื่อหา จุดที่พิษงูเริ่มคงที่**

<u>การเตรียมพิษงูเห่า ให้มีความเข้มข้นแน่นอน</u>

1. ชั่งพิษงูเห่า 0.10 mg ละลายใน PBS pH 7.5 ปริมาตร 1 ml (ความเข้มข้น 100 mg/ml)
2. ดูดพิษงูกะปะ 720 µl จากข้อ 1 แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1.8 ml (ความเข้มข้น 40 mg/ml)***
3. ดูดพิษงูกะปะ 1.275 ml จากข้อ 2 แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1.7 ml (ความเข้มข้น 30 mg/ml)***
4. ดูดพิษงูกะปะ 800 µl จากข้อ 3 แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1.2 ml (ความเข้มข้น 20 mg/ml)***
5. ดูดพิษงูกะปะ 200 µl จากข้อ 4 แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 0.5 ml (ความเข้มข้น 2 mg/ml)***

หมายเหตุ

1. *** เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองโดยที่

   ความเข้มข้น 40 mg/ml = 2,000 µg / 50 µl

   ความเข้มข้น 30 mg/ml = 1,500 µg / 50 ml

   ความเข้มข้น 20 mg/ml = 1,000 µg / 50 ml

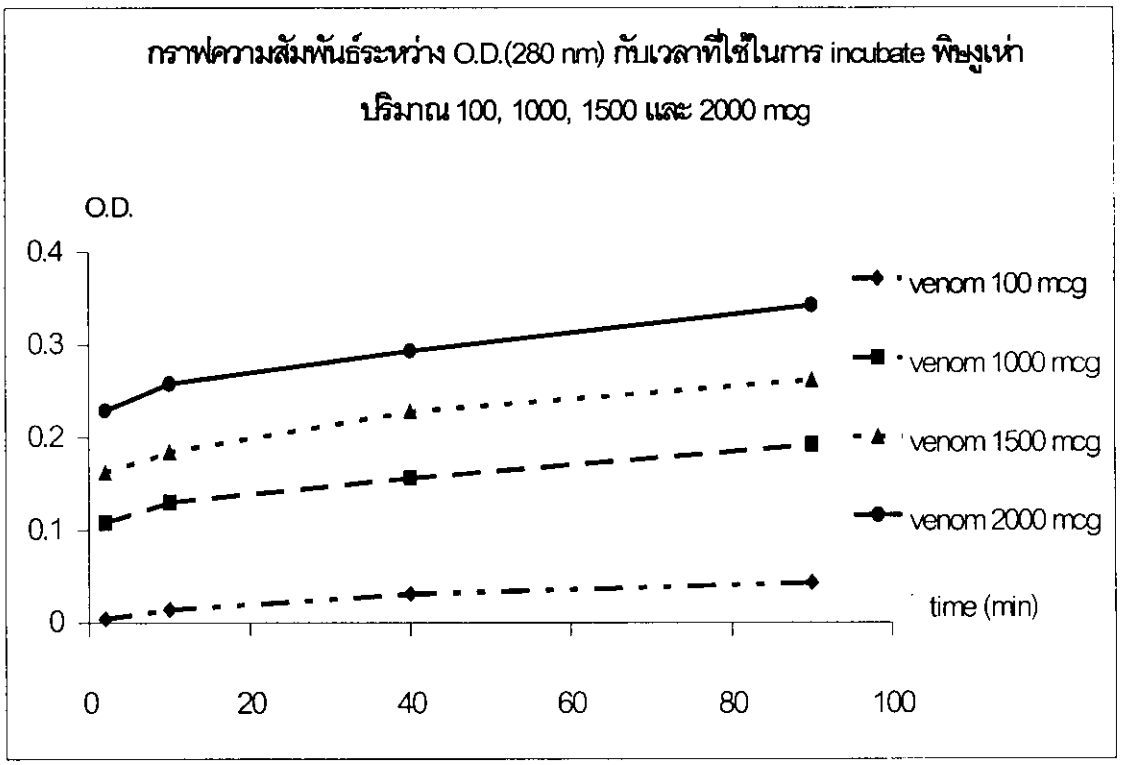
   ความเข้มข้น 2 mg/ml = 100 µg / 50 ml

2. Tris-HCl buffer หมายถึง 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8

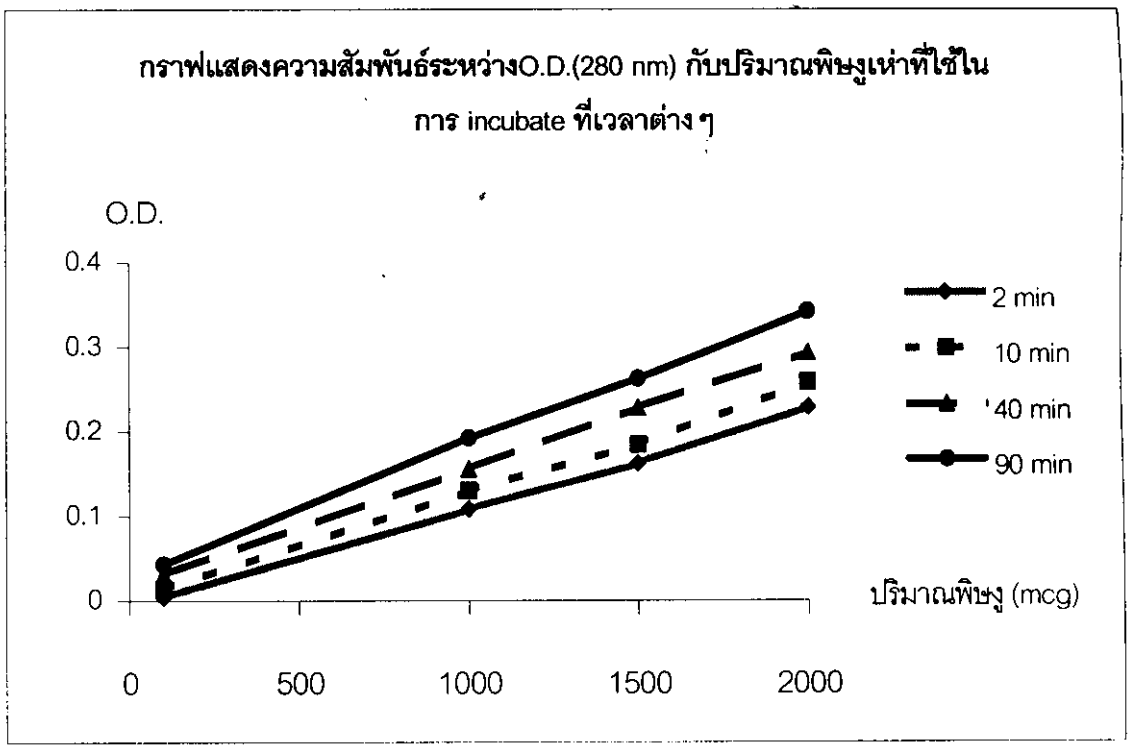
- ผลการทดลอง

ตาราง 3-5 ค่า O.D ของพิษงูเห่า

Sample	O.D. 280 nm ที่เวลาต่างๆ											
	2 นาที			10 นาที			40 นาที			90นาที		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
C 100 mcg	0.005	0.003	0.004	0.016	0.013	0.014	0.028	0.034	0.031	0.045	0.041	0.043
C 1000 mcg	0.101	0.114	0.108	0.129	0.13	0.130	0.152	0.16	0.156	0.198	0.197	0.198
C 1500 mcg	0.151	0.174	0.163	0.187	0.181	0.184	0.233	0.224	0.228	0.257	0.266	0.262
C 2000 mcg	0.221	0.237	0.229	0.255	0.261	0.258	0.292	0.294	0.293	0.336	0.347	0.342



ภาพประกอบ 3-18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง O.D 280 nm กับเวลาที่ใช้ในการ incubate พิษงูเห่า ปริมาณ 100,1000,1500 และ 2000 mcg



ภาพประกอบ 3-19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง O.D 280 nm กับปริมาณพิษงูเห่าที่ใช้ในการ Incubate ที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ : จากผลการทดลองพบว่า พิษงูเห่าที่ conc. สูงๆ เส้นกราฟยังไม่คงที่ ดังนั้นการทดลอง Proteolytic activity จะไม่ทำการทดลองใน พิษงูเห่า

- **พิษงูกะปะ**

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ พิษงูกะปะ ปริมาณ 10 100, 500, 1000 μg Incubate ที่ เวลา 3, 30,60 และ 120 นาที เพื่อหา จุดที่พิษงูเริ่มคงที่

<u>การเตรียมพิษงูกะปะ ให้มีความเข้มข้นแน่นอน</u>

1. ชั่งพิษงูกะปะ 0.10 mg ละลายใน PBS pH 7.5 ปริมาตร 1 ml (ความเข้มข้น 100 mg/ml)
2. ดูดพิษงูกะปะ 200 μl จากข้อ 1 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 1.0 ml (ความเข้มข้น. 20 mg/ml)***
3. ดูดพิษงูกะปะ 0.4 ml จากข้อ 2 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 0.8 ml (ความเข้มข้น 10 mg/ml)***
4. ดูดพิษงูกะปะ 120 μl จากข้อ 3 แล้ว เจือจา ด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 0.6 ml (ความเข้มข้น 2 mg/ml)***
5. ดูดพิษงูกะปะ 50 μl จากข้อ 4 แล้ว เจือจางด้วย Tris-HCl buffer ปรับปริมาตรให้ได้

0.5 ml (ความเข้มข้น 0.2 mg/ml)***

หมายเหตุ 1. *** เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองโดยที่

ความเข้มข้น 20 mg/ml = 1,000 µg / 50 µl

ความเข้มข้น 10 mg/ml = 100 µg / 50 ml

ความเข้มข้น 2 mg/ml = 10 µg / 50 ml

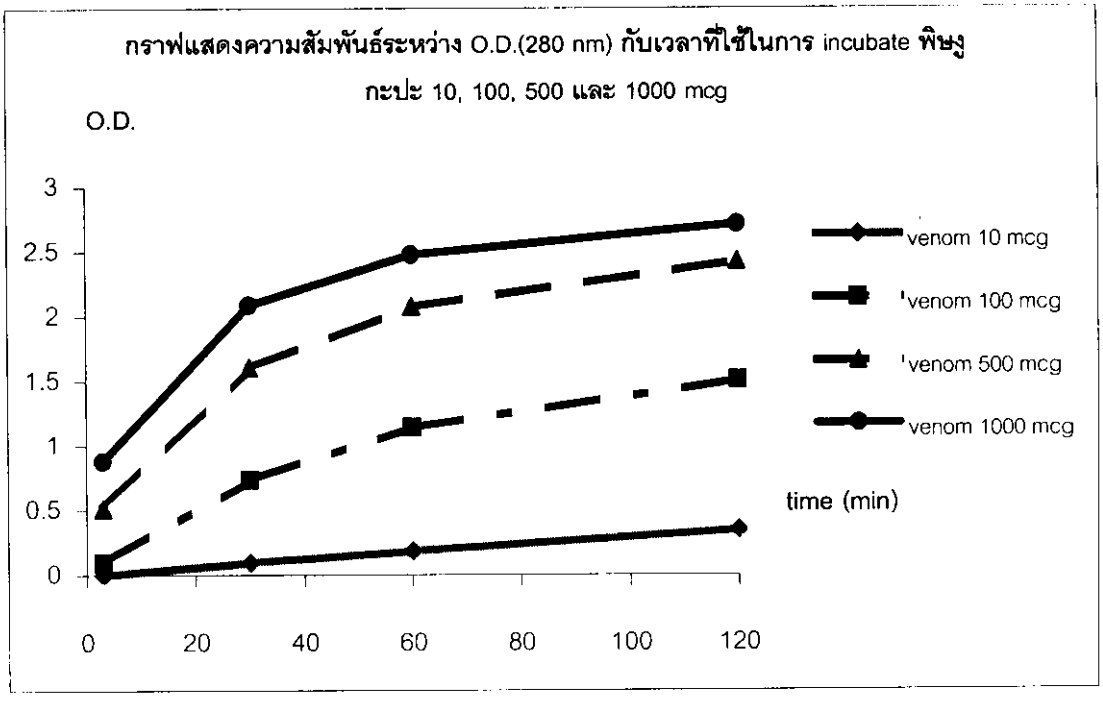
ความเข้มข้น 0.2 mg/ml = 1 µg / 50 ml

2. Tris-HCl buffer หมายถึง 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8

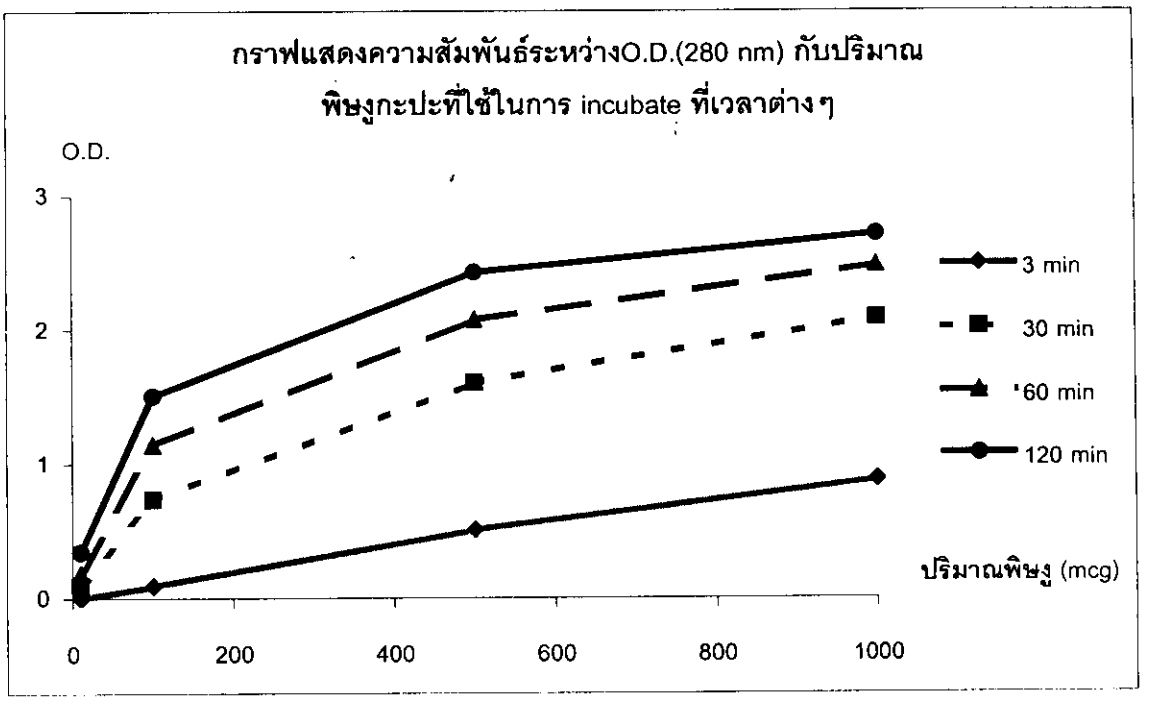
ผลการทดลอง

ตาราง 3-6 ค่า O.D ของพิษงูกะปะ

Sample	O.D. 280 nm ที่เวลาต่างๆ											
	3 นาที			30 นาที			60 นาที			120 นาที		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
M 10 mcg	0	0	0	0.097	0.094	0.096	0.183	0.191	0.187	0.341	0.352	0.347
M 100 mcg	0.087	0.096	0.092	0.075	0.727	0.401	1.13	1.155	1.143	1.532	1.485	1.509
M 500 mcg	0.504	0.518	0.511	1.586	1.627	1.607	2.065	2.089	2.077	2.434	2.418	2.426
M 1000 mcg	0.897	0.864	0.881	2.095	2.084	2.090	2.485	2.473	2.479	2.713	2.706	2.710



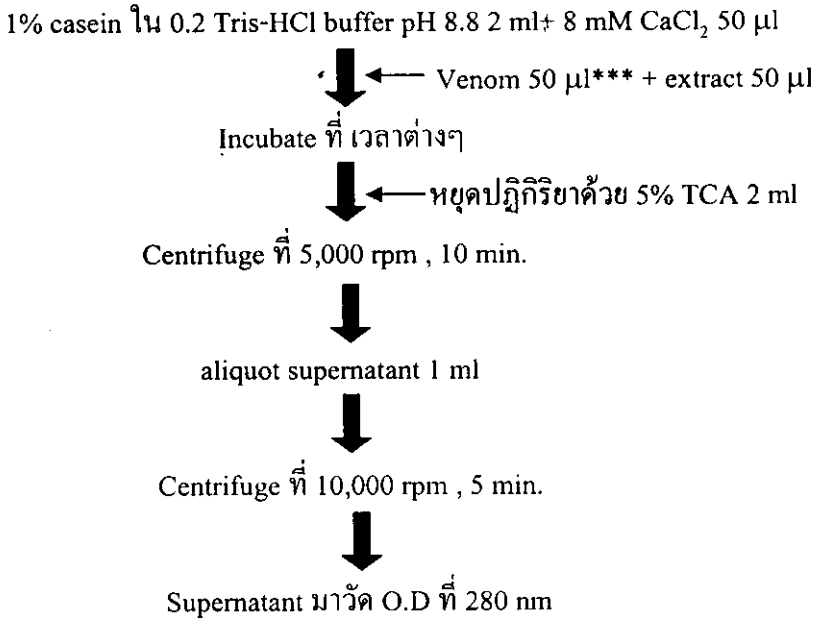
ภาพประกอบ 3-20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง O.D 280 nm กับเวลาที่ใช้ในการ incubate พิษงูกะปะปริมาณ 10,100, 500 และ1000 mcg



ภาพประกอบ 3-21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง O.D 280 nm กับปริมาณพิษงูกะปะที่ใช้ในการ incubate ที่เวลาต่างๆ

จากการทดลองพบว่า จุดที่ปฏิกิริยาของพิษงูเริ่มคงที่ คือ ที่เวลาประมาณ 90 นาที ดังนั้น การทดสอบ Proteolytic enzyme activity จะใช้เวลาในการ incubate ที่ 90 นาที และปริมาณพิษงูที่ใช้จะเลือกใช้ที่ปริมาณ 100 μg เนื่องจากค่า O.D อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

- Protocol ในการทดสอบ Protyolytic enzyme activity



หมายเหตุ : 1. O.D. 280 nm เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ กรดอะมิโน

2. Control (venom : Venom 50 µl + 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8 50 µl)

(extract : Extract 50 µl + 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8 50 µl)

3. Blank (0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8 100 µl)

4. *** เป็นปริมาณของพิษงูที่เหมาะสมในการทดลองกับสมุนไพรซึ่งได้จากการทดลองการหาปริมาณพิษงูที่เหมาะสม

5. ทำซ้ำ หลังการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร อีกครั้ง

การทดสอบ Proteolytic enzyme กับสารสกัด

sample ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. พิษงูกะปะ 100 µg 50 µl + 0.2 Tris-HCl buffer pH 8.8 50 µl
2. พิษงูกะปะ100 µg 50 µl + antivenom 50 µl
3. พิษงูกะปะ100 µg 50 µl + ethanol 90%
4. พิษงูกะปะ100 µg 50 µl+ สารสกัด ความเข้มข้น 100 mg/ml
5. พิษงูกะปะ100 µg 50 µl+ สารสกัด ความเข้มข้น 20 mg/ml

- การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

(สมุนไพร 1 ชนิด ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง)

1. ชั่งสารสกัด 0.3 mg ละลายด้วยตัวทำลายที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 ml (ความเข้มข้น 300 mg/ml)
2. ดูดสารสกัด 200 µl จากข้อ 1 มา dilute ด้วย H_2O โดยปรับปริมาตรให้ครบ 600 µl (ความเข้มข้น 100 mg/ml)***
3. ดูดสารสกัด 100 µl จากข้อ 2 มา dilute ด้วย H_2O โดยปรับปริมาตรให้ครบ 500 µl (ความเข้มข้น 20 mg/ml)***

- การเตรียมพิษงู (สำหรับการทดลอง 2 ครั้ง; duplicate/ สมุนไพร 1 ชนิด)

<u>การเตรียมพิษงูกะปะ</u>

พิษงูกะปะ 10 mg/ml ดูดมา 100 µl แล้ว dilute ด้วย Tris-HCl buffer โดยปรับปริมาตรให้ครบ 0.5 ml (ความเข้มข้น 2 mg/ml) ในการทดสอบจะใช้พิษงู ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 50 µl ซึ่งจะมีพิษงูปริมาณ 100 µg

หมายเหตุ : Tris-HCl buffer หมายถึง 12.5mM Tris-HCl+10mM $CaCl_2$ pH 7.4

*** หมายถึง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง

- ผลการทดสอบ Proteolytic enzyme activity

Proteolytic enzyme activity (%)	**Malayan pit viper venom 100 μg + Sample concentration**		
	1 – 20 mg/ml	**21 – 50 mg/ml**	**51 – 100 mg/ml**
Less than 60	E 018, E 026, E 029 – E 031, E 034 – E 036, E 047 – E 048, E 062, E 064, E 089, E 091, E 092, E 100, E 101, E026(เก่า),E026(ใหม่) E 098*	E 001 – E 017, E 040 – E 045, E 050 – E 053, E 060, E 063, E 069	W 002, W 003, E 018 – E 036, E 046 – E 057, E 059 – E 075, E 079, E 084 – E 086, E089, E 091, E 092, E 096 – E 101, E 026 (เก่า), E 026 (ใหม่), E 098*
More than 60	W 001 – W 007, E 019 – E 025, E 027, E 028, E 032, E 046, E 055 – E 059, E 061, E 065, E 066, E 068, E 087 – E 090, E 094 – E 099	E 054, E 065, E 067, E 070 – E 086	W 005 – W 007, E 058, E 076 – E 078, E 080 – E 083, E 087, E 088, E 090, E 093 – E 095

หมายเหตุ : - Proteolytic enzyme activity of Malayan pit viper venom (100 μg) = 100%

- Phospholipase A_2 enzyme activity of Malayan pit viper venom (100 μg) + Malayan pit viper anti-venom = 60%

- สรุปผลการทดสอบ Proteolytic enzyme activity

การทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ proteolytic ที่มีอยู่ในพิษงู (Proteolytic enzyme activity) ทำได้โดยการเตรียมสารสกัดสมุนไพรหลายความเข้มข้น เช่น 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0, 80.0 และ 100.0 mg/ml โดยที่สมุนไพรแต่ละชนิดจะเตรียมอย่างน้อย 2 ความเข้มข้นตามความเหมาะสมในการใช้ทดสอบ (โดยไม่รบกวนผลการทดลอง) ซึ่งการทดลองในขั้นตอนแรกจะต้องหาปริมาณของพิษงูกะปะที่เหมาะสมต่อการทดลอง พบว่าพิษงูกะปะที่เหมาะสมในการทดลองนี้จะใช้ปริมาณ 100 μg (ความเข้มข้น 2 mg/ml, 50 μl) สำหรับพิษงูเห่าไม่สามารถหาปริมาณพิษงูที่เหมาะสมได้เนื่องจาก ค่า OD ที่วัดได้จากการทดลองไม่คงที่ สูงขึ้นเรื่อยๆ ถึงแม้ว่าจะใช้ปริมาณพิษงูที่มากก็ตาม จึงทำให้ไม่สามารถหาปริมาณที่เหมาะสมของพิษงูเห่าที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ ดังนั้นการทดลองสารสกัดจากสมุนไพรที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ proteolytic จะทำการทดลองเฉพาะพิษงูกะปะเท่านั้น

จากผลการทดลอง สารสกัดจากสมุนไพรจะสามารถยับยั้ง Proteolytic enzyme activity ของพิษงูกะปะได้หรือไม่นั้น เกณฑ์ที่ใช้บ่งบอกว่าสารสกัดจากสมุนไพรมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ (positive test) จะต้องมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า หรือเท่ากับฤทธิ์ของเซรุ่ม แก้พิษงูกะปะที่ทำปฏิกิริยากับพิษงูกะปะโดยตรง จากผลการทดลองที่ได้พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้ง Proteolytic enzyme activity ของ เซรุ่มแก้พิษงูกะปะคือ 60% ดังนั้นสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์หรือมีศักยภาพในการใช้ต้านฤทธิ์ Proteolytic enzyme activity นี้จะต้องน้อยกว่า 60% โดยปริมาณของสารสกัดที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วยระหว่าง 1 – 20 mg/ml โดยสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดังกล่าวคือสารสกัดหมายเลข E 018, E 026, E 029 – E 031, E 034 – E 036, E 047 – E 048, E 062, E 064, E 089, E 091, E 092, E 100, E 101 และ E 089*

3.5 สรุปผลการวิจัยในหลอดทดลอง (in *vitro*)

การทดลองในบทที่ 3 นี้เป็นการศึกษาศักยภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านพิษงูเห่าไทยและงูกะปะในหลอดทดลอง (in *vitro*) โดยใช้วิธีการทดลอง 3 วิธีคือ

1. ความสามารถหรือฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในพิษงูเห่า และงูกะปะโดยใช้วิธีการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนในสนามไฟฟ้า (gel electrophoresis) ด้วยวิธี SDS-PAGE
2. ความสามารถ หรือฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ในพิษงูเห่า และงูกะปะ (Phospholypase A_2 enzyme inhibition activity)
3. ความสามารถ หรือฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โปรติโอไลติค ในพิษงูกะปะ (Proteolytic enzyme inthibition activity)

โดยสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ สารสกัดสมุนไพรที่ได้จากการบีบคั้นสดด้วยน้ำ 7 ตัวอย่าง (W001 – W007) และสารสกัดสมุนไพรจากเอธานอล 104 ตัวอย่าง (E001 – E104)

สำหรับการแปลผลในการทดลองแรก จะสังเกตจากแถบโปรตีนของพิษงูที่ทำปฏิกิริยากับสารสกัดสมุนไพรโดยเทียบกับแถบโปรตีนของพิษงู ในการทดลองที่สองและสามเป็นการหาความสามารถหรือฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีในพิษงูที่มีผลต่อระบบเลือด (Phospholypase A_2 enzyme) และระบบเนื้อเยื่อ (Proteolytic enzyme activity) ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามรายงานที่กล่าวไว้ข้างต้นสำหรับการทดลองนั้น ๆ แล้ว

สำหรับสารสกัดจากสมุนไพรที่ให้ผลการวิจัยที่ดีทั้งสามการทดลองมีด้วยกัน 5 ตัวอย่างคือ เถาโคกกระออม (E015) ใบโคลงเคลง (E026) เปลือกสายหยุด (E048) กิ่งอบเชย (E052) และใบฝ้ายผี (E089*) ซึ่งสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ตัวอย่างนี้มีศักยภาพที่จะทำการศึกษาวิจัยเบื้องต้นในสัตว์ทดลอง ในบทที่ 4 ต่อไป