

# การศึกษาสมบัติบางประการของสารที่มีฤทธิ์ต้านพิษงูเห่า ซึ่งสกัดจากสมุนไพร

## Study of Some Properties of Anti-Cobra Venom Substances Extracted from Medicinal Plants

ประสงค์ สีหานาม (Prasong Seehanam)\*

ดร. นิสันต์ สัตยาศัย (Dr. Nison Sattayasai)\*\*

ดร. จินตนา สัตยาศัย (Dr. Jintana Sattayasai)\*\*\*

ดร. ศักดา ดาดวง (Dr. Sakda Daduang)\*\*\*\*

### บทคัดย่อ

สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนลำต้นใต้ดินของว่านพญางูตัวเมีย (*Curcuma* sp.) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่เชื่อว่าจะสามารถต้านการออกฤทธิ์ของพิษงูเห่า และสารที่มีสมบัติในการรีดิวซ์บางชนิด ถูกนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพในการลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าด้วยวิธี ELISA พบว่า สารสกัดจากว่านพญางูตัวเมียและสารที่มีสมบัติในการรีดิวซ์ทุกตัวที่นำมาตรวจสอบ ยกเว้น NADPH สามารถลดการจับกันดังกล่าวได้ เมื่อทำการตรวจสอบผลของสารผสมระหว่างสารสกัดกับสารที่มีสมบัติในการรีดิวซ์ต่อการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากว่านพญางูตัวเมียและสารที่มีสมบัติในการรีดิวซ์ยกเว้น NADPH มีการทำงานร่วมกันในลักษณะที่คล้ายกับ additive effect และเมื่อทดสอบด้วย monobromobimane ทำให้ทราบว่าการทำงานของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากว่านพญางูตัวเมีย ไม่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ในพิษงู เมื่อใช้วิธี western immunoblotting เปรียบเทียบกัมมันตภาพ ของสารออกฤทธิ์ที่ค่า pH ต่างกัน พบว่า สารออกฤทธิ์สามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้าง (pH 5-9)

### ABSTRACT

The aqueous extract of *Curcuma* sp. (Wanphayangu-tuamea) rhizomes, a medicinal plant believed to be snake bite antidotes and some reducing agents were tested for their effects on the binding between cobra venom and antivenom antibodies using ELISA. The aqueous extract and the reducing agents, except NADPH, could decrease the binding. The combinations of the aqueous extract and various reducing agents, except NADPH, showed an additive effect on the activity of the aqueous extract. Using monobromobimane, the action of the active ingredient(s) was found not to involve the reduction of disulfide bonds of the toxin. Using western immunoblotting, the activity of the active ingredient(s) was found to retain under a wide range of pH (pH 5-9).

คำสำคัญ : สมุนไพร สารต้านพิษงู

Key Words : medicinal plant, snake bite antidote

\* มหบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\*\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\*\*\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทนำ

ผู้ป่วยจากการถูกพิษกัต ถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อน การรักษาผู้ป่วยที่ถูกพิษกัตใช้วิธีฉีดซีรัมแก้พิษ เป็นวิธีหลัก อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวนี้ พบว่า ยังมีปัญหา ได้แก่ การตอบสนองของผู้ป่วยต่อซีรัมที่ต่างกัน ประสิทธิภาพของซีรัมในการแก้พิษ ปริมาณพิษจำนวนมากเพื่อใช้สำหรับผลิตซีรัม และความยุ่งยากในการผลิตซีรัม ปัญหาเหล่านี้นำไปสู่การขาดแคลน ซีรัมและทำให้ซีรัมมีต้นทุนสูง และหากผู้ป่วยอยู่ห่างจากสถานพยาบาลที่มีซีรัม อาจทำให้เสียชีวิต เนื่องจากได้รับซีรัมไม่ทันเวลา นอกจากการรักษาโดยการให้ซีรัมแล้ว ยังมีรายงานการใช้สมุนไพรในการแก้พิษอีกทางหนึ่ง (Mors et al., 2000; Ahmad et al., 2003; Alam and Gomes, 2003) สมุนไพรสามารถปลูกได้ทั่วไป วิธีใช้และการเก็บรักษาทำได้ง่ายสะดวก ซึ่งหากสมุนไพรสามารถแก้พิษได้จริง จะช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ถูกกัดได้ ในประเทศไทย มีรายงานการตรวจหาสมุนไพรที่สามารถต้านพิษ ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้อวัยวะแยกกล้ามเนื้อกระบังลมหนู (isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation) (Cherdchu et al., 1977; Cherdchu et al., 1978) วิธีดังกล่าวนี้ต้องอาศัยความชำนาญสูง ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองและศึกษาสมุนไพรได้น้อยชนิด จึงมีรายงานการค้นพบสมุนไพรที่สามารถต้านพิษอยู่น้อย ดังนั้น Tophrom (2001) จึงได้พัฒนาวิธีเพื่อใช้ตรวจสอบสมุนไพรหลายชนิดพร้อมๆ กัน โดยการดัดแปลงวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และพบว่าสารสกัดจากว่านพญาภูตัวเมีย (*Curcuma* sp.) สามารถลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าได้ดี เมื่อทำการตรวจหาโปรตีนเป้าหมายในพิษงูเห่าที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์ในสารสกัด ด้วยวิธี western immunoblotting พบว่า เกิดการจางหายไปของโปรตีนหลายขนาด ได้แก่ โปรตีนขนาด 14 23 27 และ 70 กิโลดาลตัน

(kDa) และพิสูจน์ได้ว่าโปรตีนขนาด 14 กิโลดาลตัน คือนิวโรทอกซิน (neurotoxin) นอกจากนี้ยังพบว่า 2-mercaptoethanol สามารถลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าได้เช่นเดียวกับสารสกัดจากว่านพญาภูตัวเมีย ซึ่งเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ของสารสกัดอาจเกี่ยวข้องกับพันธะไดซัลไฟด์ ข้อสรุปนี้คล้ายกับรายงานของ Lozano และคณะ (1994) ที่กล่าวว่า thioredoxin ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 12 กิโลดาลตัน สามารถสลายพันธะไดซัลไฟด์ของพิษงูสามเหลี่ยมและส่งผลให้ความเป็นพิษนั้นลดลง ได้เช่นเดียวกับ dithiothreitol (DTT)

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จะทำการยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านพญาภูตัวเมีย (*Curcuma* sp.) และสารรีดิวซ์ ได้แก่ 2-ME, DTT, n-AC และ NADPH ในการลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า ด้วยวิธี ELISA และยังใช้วิธีนี้ตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการของสารออกฤทธิ์ เช่น ผลต่อพันธะไดซัลไฟด์ และความสัมพันธ์กับ NADH/thioredoxin system รวมถึงการทดสอบกัมมันตภาพ (activity) ของสารออกฤทธิ์ในสภาวะ pH ที่ต่างกันด้วยวิธี western immunoblotting

## วิธีดำเนินการวิจัย

### เครื่องมือ

1. ELISA plate (Nalge Nunc International, Denmark)
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (ELISA plate reader)(Bio-Rad, U.S.A)
3. เครื่องมือสำหรับเตรียมเจล (Mini-Protean II Dual Slab Cell)( Bio-Rad, U.S.A)

### สมุนไพรที่ใช้

ว่านพญาภูตัวเมีย (*Curcuma* sp.) ส่วนลำต้นใต้ดิน

## การสกัดสมุนไพรด้วยน้ำ

นำส่วนลำต้นใต้ดินของว่านพญาภูตัวเมีย มาบดกับน้ำกลั่นในโกร่ง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -65 องศาเซลเซียส และนำไปทดสอบประสิทธิภาพและสมบัติทางชีวเคมี บางประการด้วยวิธี ELISA และ western immunoblotting วิธี ELISA

เคลือบ (coat) พืชในหลุม microtiter plate ที่ไว้ประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วเติม blocking solution เพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ 1 ชั่วโมง เติมสารสกัดว่านพญาภูตัวเมียหรือสารที่มีสมบัติรีดิวซ์ ที่เจือจางใน PBS buffer, pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปบ่ม (incubate) ด้วย globulin refined horse anti-venom antibody 1 ชั่วโมงและบ่มด้วย protein G-alkaline phosphatase เพื่อเข้าจับกับแอนติบอดี ตัวแรกอีก 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม di-sodium 4-nitrophenylphosphate hexahydrate ใน substrate buffer ที่ไว้จนสารละลายมีสีเหลือง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (A<sub>405</sub>) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader และคำนวณร้อยละการดูดกลืนแสงที่เหลืออยู่ของการจับกันระหว่างพืชเห่า และแอนติบอดีต่อพืชเห่าโดยใช้สมการ

$$\% A_{405} = \frac{A_{405} (\text{ตัวอย่าง})}{A_{405} (\text{ควบคุม})} \times 100$$

ตัวอย่าง = เติมสารสกัดจากว่านพญาภูตัวเมีย

ควบคุม = ไม่เติมสารสกัดจากว่านพญาภูตัวเมีย

## วิธีการ western immunoblotting

### การเตรียม SDS-PAGE

1. การเตรียมเจล เตรียม 15% separating gel ด้วย Mini-protein II Dual Slab Cell เริ่มจากเตรียม separating gel ขนาดความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาวและหนาประมาณ 8 และ 0.75 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเตรียมเสร็จแล้ว นำไปเทลงในช่องเตรียมเจล จากนั้นฉีดน้ำกลั่นปิดบริเวณด้านบนของเจลแล้วตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อให้เจลมีการจัดเรียงตัวที่สมบูรณ์ เมื่อครบ 3 ชั่วโมง

เตรียม 4% stacking gel และเทที่ด้านบนของ separating gel ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลมีการจัดเรียงตัวที่สมบูรณ์ อย่างน้อย 30 นาที

2. การเตรียมตัวอย่างพืช นำพืชเห่าแห้ง มาละลายในน้ำแล้วผสมกับ solubilizing buffer ที่ไม่มี 2-mercaptoethanol และไม่ต้องนำพืชที่เตรียมไปต้มเนื่องจากป้องกันพืชสูญเสียสภาพ เพราะแอนติบอดีที่ใช้จำเพาะกับพืชที่ไม่สูญเสียสภาพ ส่วน marker ที่ใช้บอกตำแหน่งใช้ prestained marker ซึ่งเมื่อผ่านการ run gel จะปรากฏเป็นแถบสีโดยไม่ต้องนำไปย้อมสีภายหลัง

3. การแยกโปรตีนในพืช นำพืชหรือ marker ที่ผสมกับ solubilizing buffer มา load บน stacking gel จากนั้นนำชุดของ gel ไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer บรรจุอยู่ เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 150 โวลต์ ไปเรื่อยๆ จนแถบสีของ solubilizing buffer เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจล จึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

### Western transfer

ทำการถ่ายเท (transfer) โปรตีนจากแผ่นเจลที่ผ่านการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ไปยังแผ่น nitrocellulose จากนั้น ให้กระแสไฟฟ้าเข้าไป โดยให้ค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 150 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โปรตีนจากแผ่นเจลจะถูกถ่ายเทไปอยู่บนแผ่น nitrocellulose

การตรวจหาโปรตีนโดยใช้หลักการ immunoblotting

หลังจากถ่ายเทโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose แล้ว นำแผ่น nitrocellulose ไปแช่ในสารละลาย blocking solution เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น บ่มด้วยสารสกัดจากว่านพญาภูตัวเมียใน pH ต่างๆ กัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วบ่มด้วย globulin refined horse anti-venom antibody 1 ชั่วโมง และบ่มด้วย protein G-alkaline phosphatase อีก 1 ชั่วโมง เติม substrate solution (NBT/BCIP ใน substrate buffer) เขย่า จนปรากฏแถบสีม่วงของโปรตีนชัดเจน จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

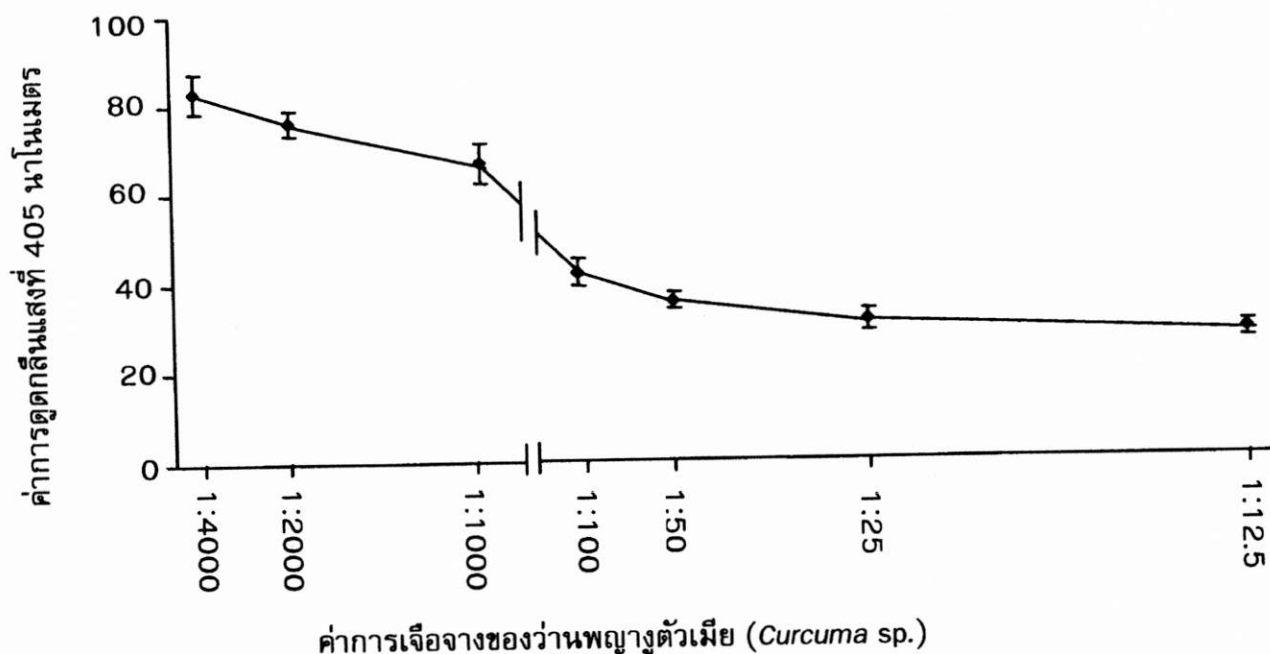
## ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านพญาตัวเมียและสารรีดิวซ์ด้วยวิธี ELISA พบว่าสารสกัดจากว่านพญาตัวเมียและสารรีดิวซ์ ได้แก่ 2-mercaptoethanol (2-ME), dithiothreitol (DTT) และ n-acetylcysteine (n-AC) ยกเว้น reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) สามารถลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าได้ (ภาพที่ 1 ก, 1 ข)

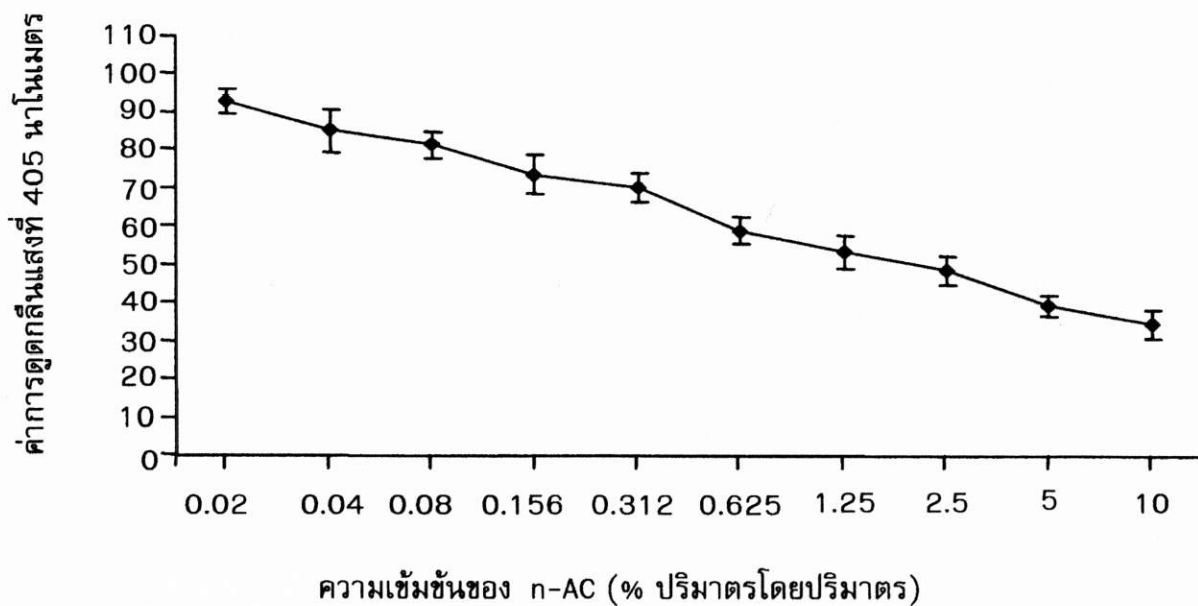
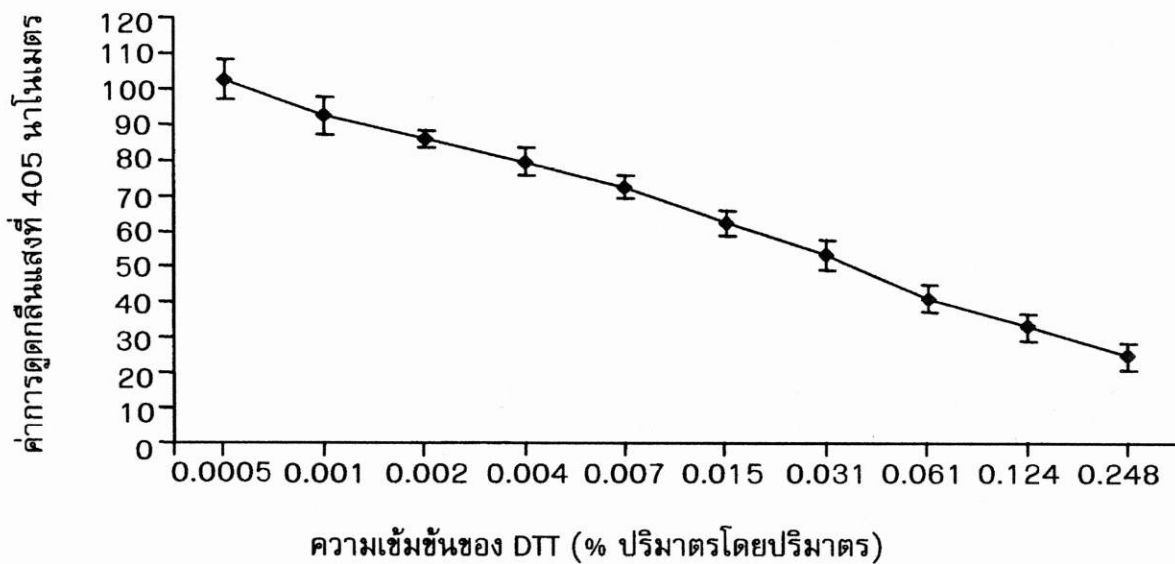
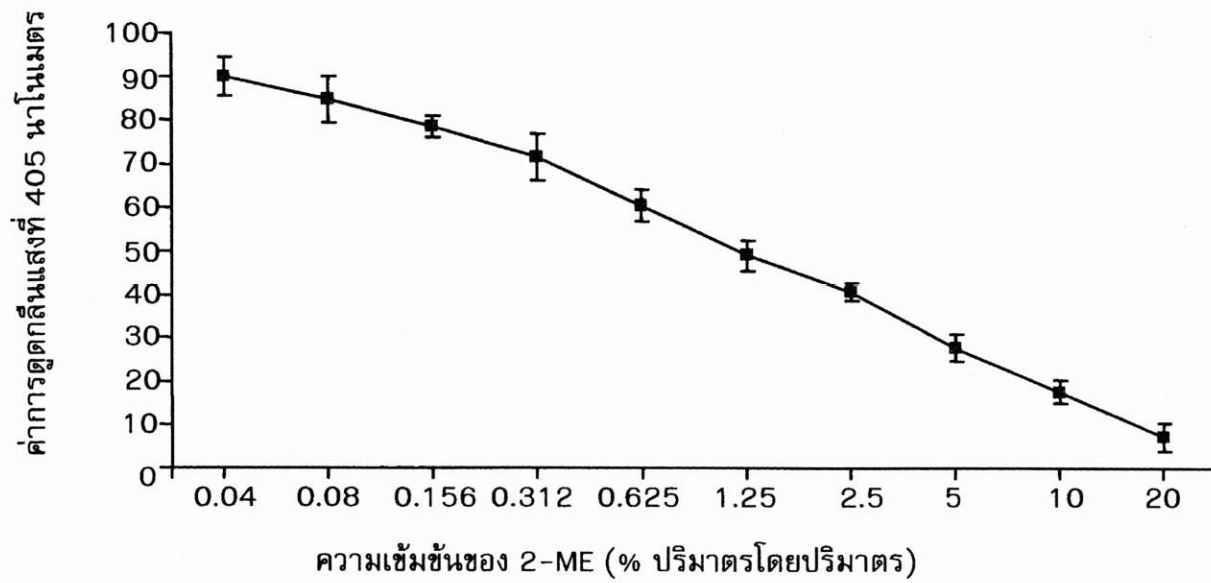
ผลของสารผสมระหว่างสารสกัดจากว่านพญาตัวเมียและสารรีดิวซ์พบว่าสารผสมทุกตัวยกเว้นสารผสมระหว่างสารสกัดจากว่านพญาตัวเมียและ NADPH มีการทำงานร่วมกันในลักษณะ additive effect (ภาพที่ 2)

การตรวจหาหมู่ซัลไฟไฮดริลอิสระด้วยวิธี SDS-PAGE เมื่อบ่มพิษงูเห่าด้วยสารสกัดจากว่านพญาตัวเมียแล้วทดสอบด้วย monobromobimane ซึ่งเป็นสารที่จำเพาะต่อหมู่ซัลไฟไฮดริล พบว่าไม่ปรากฏการเรืองแสงของแถบโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่บ่มพิษงูเห่าด้วย n-AC (เลน 3) และ DTT (เลน 4) (ภาพที่ 3)

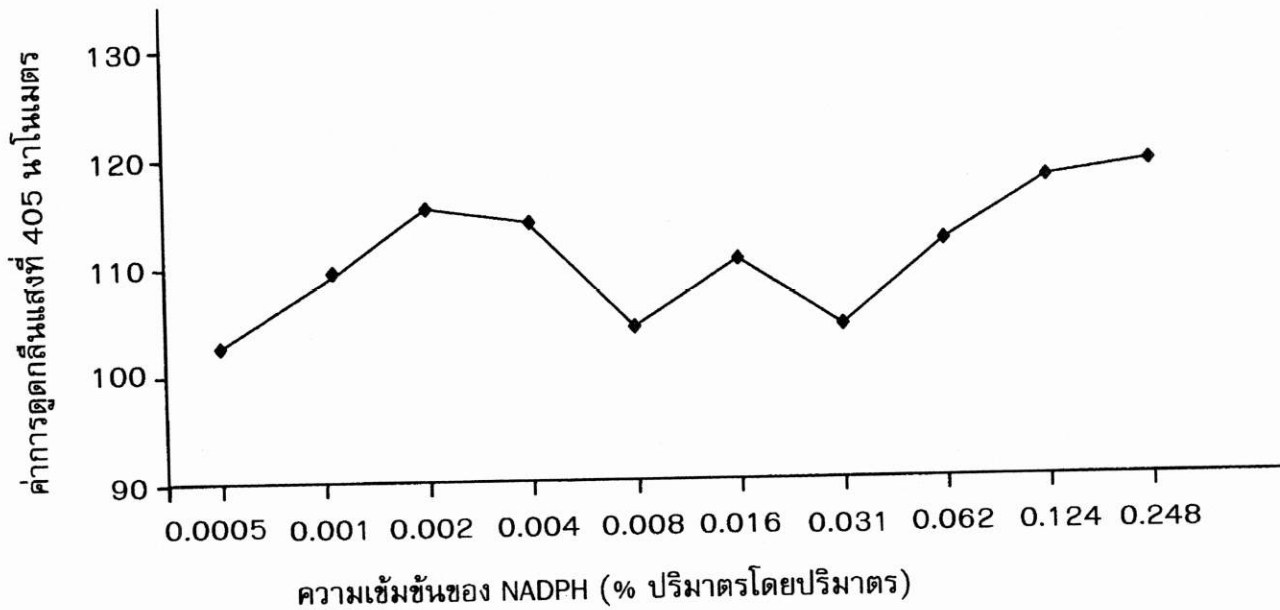
การตรวจสอบกัมมันตภาพของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากว่านพญาตัวเมียในสภาวะกรด (pH 5, 6) และสภาวะเบส (pH 8, 9) ด้วยวิธี western immunoblotting พบว่าสารออกฤทธิ์สามารถทำงานได้ทุก pH ที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 4)



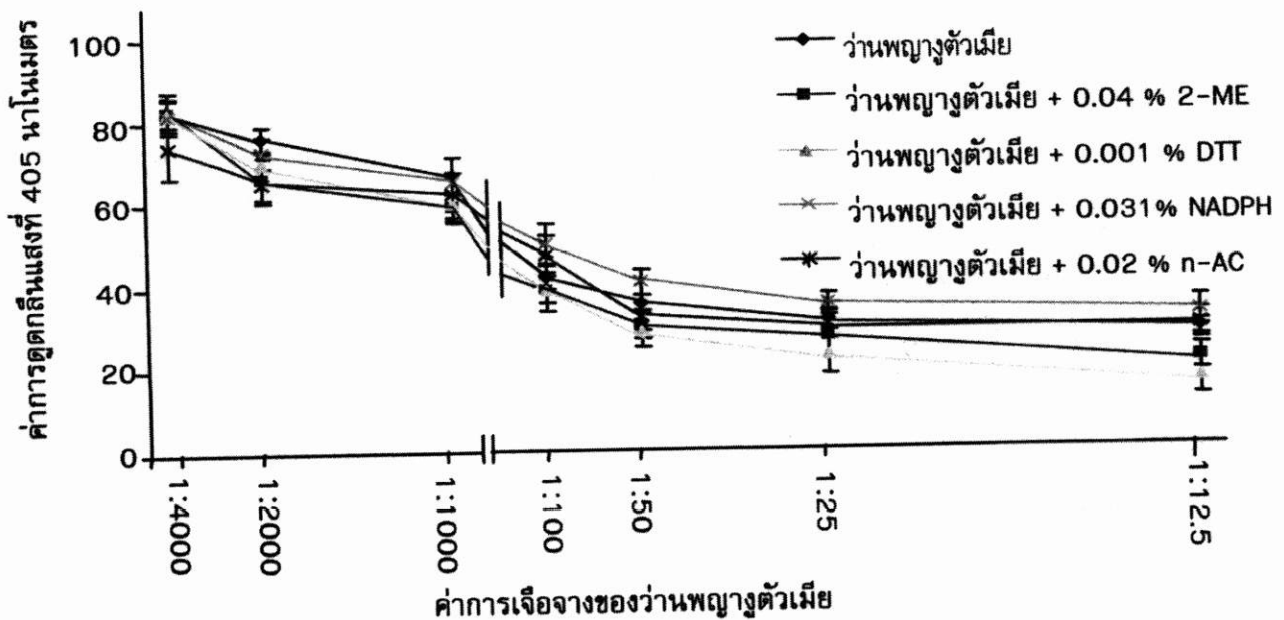
ภาพที่ 1 (ก) ผลของว่านพญาตัวเมียต่อการจับกันระหว่างพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า



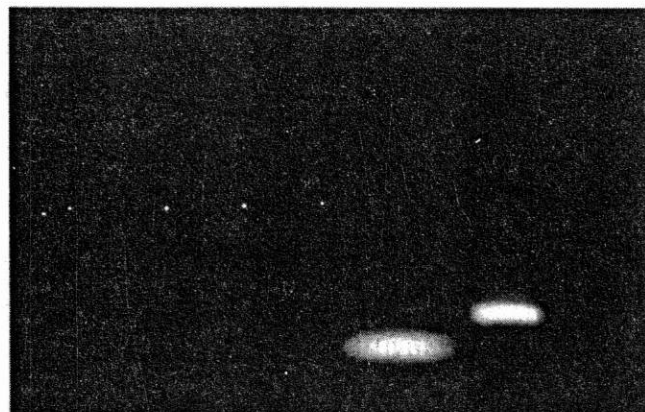
ภาพที่ 1 (ข) ผลของวุ้นพญางูตัวเมียต่อการจับกันระหว่างพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า



ภาพที่ 1 (ข) ผลของสารที่มีสมบัติรีดิวซ์ต่อการจับกันระหว่างพิษงูเห่ากับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า (ต่อ)

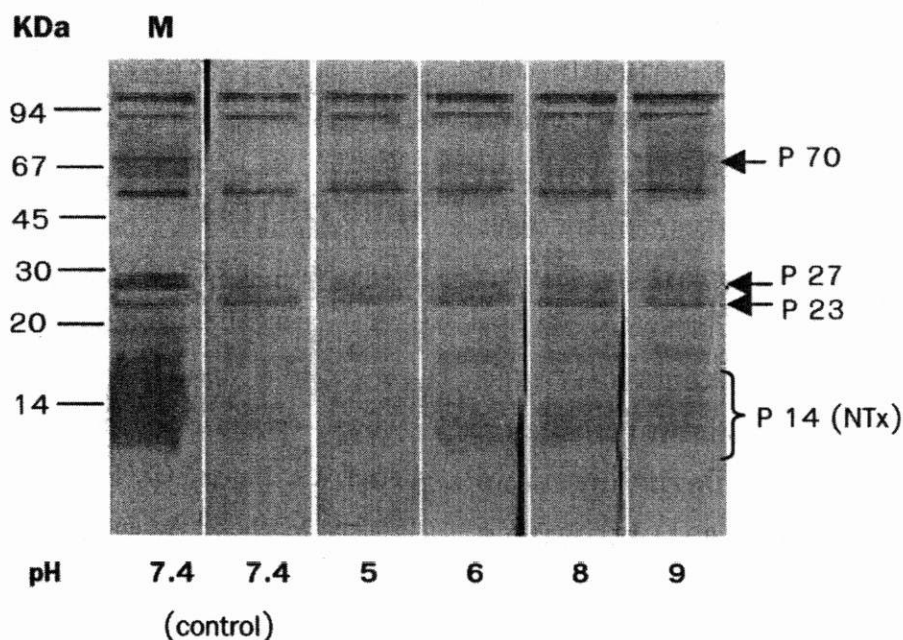


ภาพที่ 2 ผลของสารผสมระหว่างสารสกัดจากว่านพิษงูเห่ากับสารที่มีสมบัติรีดิวซ์ชนิดต่างๆ



เลน 1 2 3 4  
 พืชเหง้า พืชเหง้า พืชเหง้า พืชเหง้า  
 + + +  
 วานพญาตัวเมีย n-AC DTT

ภาพที่ 3 ผลการทดสอบหมู่ซัลไฟไฮดริลด้วย monobromobimane



ภาพที่ 4 กัมมันตภาพของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากวานพญาตัวเมียเมื่อทดสอบด้วย pH ต่างกัน

## สรุปและวิจารณ์

การจับกันระหว่างพืชเหง้าและแอนติบอดีต่อพืชเหง้าต้องอาศัยความจำเพาะเจาะจง (specificity) หากมีปัจจัยที่ทำให้โครงร่าง (conformation) ของโมเลกุลพืชเหง้าเปลี่ยนไป จะทำให้การจับกันดังกล่าวนี้เปลี่ยนไปเช่นเดียวกัน เมื่อทำการตรวจสอบผลของสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนลำต้นใต้ดินของวานพญา

ตัวเมีย (*Curcuma* sp.) และสารที่มีสมบัติรีดิวซ์ ได้แก่ 2-mercaptoethanol (2-ME), dithiothreitol (DTT) และ n-acetylcysteine (n-AC) ด้วยวิธี ELISA พบว่าสามารถลดการจับกันระหว่างพืชเหง้าและแอนติบอดีต่อพืชเหง้าได้ ผลที่ได้นี้อาจเนื่องมาจากสารที่นำมาตรวจสอบ ไปมีผลให้โมเลกุลของพืชเหง้าเปลี่ยนแปลงและเนื่องจากมีรายงานว่าพันธะ

ไธซัลไฟด์ที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลของพิษงูเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและความรุนแรงของพิษ (Betz et al., 1991; Lozano et al., 1994; Miyoshi and Tu, 1999; Yang, 1999) และนิวโรทอกซินซึ่งเป็นพิษหลักของงูเห่าประกอบด้วยพันธะไธซัลไฟด์ 4-5 ตำแหน่ง ดังนั้นการที่สารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมียสามารถลดพิษงูเห่าได้นั้นอาจจะเกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์พันธะไธซัลไฟด์ นอกจากนี้มีรายงานว่าโปรตีน thioredoxin สามารถรีดิวซ์พันธะไธซัลไฟด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหลายชนิดได้ (Lozano et al., 1994) และโปรตีน thioredoxin นี้พบในพิษงูหลายชนิด (Crawford et al., 1986; Florencio et al., 1988) อาจเป็นไปได้ว่า สารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมีย อาจเกี่ยวข้องกับ NADP/thioredoxin system แต่เมื่อทดลองผสมสารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมียและสารรีดิวซ์ แล้วนำไปทดสอบกัมมันตภาพ ด้วยวิธี ELISA พบว่า สารผสมทุกชนิดยกเว้นสารผสมระหว่างสารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมีย และ NADPH มีการเสริมฤทธิ์กันในลักษณะ additive effect จึงกล่าวได้ว่า สารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมีย ไม่เกี่ยวข้องกับ NADP/thioredoxin system เมื่อทดสอบผลของสารสกัดดังกล่าวนี้ในการรีดิวซ์พันธะไธซัลไฟด์ในพิษงูโดยใช้ monobromobimane ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะต่อหมู่ซัลฟิไฮดริล (Lozano et al., 1994) พบว่าสารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมียไม่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์พันธะไธซัลไฟด์เนื่องจากไม่ปรากฏการเรืองแสงของแถบโปรตีนเมื่อเทียบกับสารรีดิวซ์คือ DTT และ  $\alpha$ -AC และเมื่อเปรียบเทียบกับกัมมันตภาพของสารออกฤทธิ์ที่ pH ต่างๆ กันด้วยวิธี western immunoblotting ในการยับยั้งการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า พบว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากงูเห่าพิษงูตัวเมียสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้าง (pH 5-9) โดยสังเกตได้จากการจางหายไปของแถบโปรตีนบางขนาดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

## ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. การศึกษากัมมันตภาพสารออกฤทธิ์ของงูเห่าพิษงูตัวเมีย ควรมีการตรวจหาตำแหน่งของสารดังกล่าวนี้ ว่าอยู่ส่วนใดของสารสกัด โดยอาจทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนสารสกัดที่ได้ก่อนนำมาทดสอบ เช่น การปั่นเหวี่ยง (centrifugation)

2. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารจากงูเห่าพิษงูตัวเมีย โดยใช้สารอื่นสกัดเช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วทำการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบกับกัมมันตภาพของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้กับการสกัดด้วยน้ำ เพื่อจะได้ทราบข้อมูลว่าสารออกฤทธิ์ละลายได้ดีในสารประเภทใด

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร. อนุชิต ฤกษ์สมบูรณ์ดี ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

## เอกสารอ้างอิง

- Alam, M.I., and Gomes, A. 2003. Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Embllica officinalis*) root extract. *J. Ethnopharmacol.* 2867: 1-6.
- Betz et al., Lange, G., Pal, G.P., Wilson, K.S., Maelicke, A., and Saenger, W. 1991. The refined crystal structure of  $\alpha$ -cobrotoxin from *N.n. siamensis* at 2.4-Å resolution. *J. Bio. Chem.* 266(32): 21530-21536.
- Cherdchu, C., Poopyruchpong, N., Adcharyasucha, R., and Ratanabanangkoon, K. 1977. The absence of antagonism between extracts of *Clinacanthus natans* Burm. And *Naja naja siamensis* venom. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 8: 249-254.

- Cherdchu, C., Srisukawat, K., and Ratanabanangkoon, K. 1978. Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 61: 544-554.
- Crawford, N.A. Enzyme regulation in C<sub>4</sub> photosynthesis: purification, properties and activities of thioredoxins from C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; 244(1): 1-15.
- Florencio, F.J., Yee, B.C., Johnson, T.C., and Buchanan, B.B. 1988. An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin *h* from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* 266(2): 496-507.
- Lozano, R.M., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. 1994. Thioredoxin-linked reduction inactivation of venom neurotoxins. *Arch. Biochem. Biophys.* 309(2): 356-362.
- Miyoshi, S., and Tu, A.T. 1999. Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) inhibitor from snake venom interaction with subtypes of human mAChR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369(1): 114-118.
- Mors, W.B. 2000. Plant natural products active against snakebite-the molecule approach. *Phytochem.* 55: 627-642.
- Tophrom, P. 2001. Study of the extract from *Curcuma* sp. containing cobra venom inhibiting activity. M.Sc. Thesis. Khonkaen University, Thailand.
- Ahmad, V.U., Abbasi, M.A., Hussain, H., Akhtar, M.N., Farooq, U., Fatima, N., and Choudhary, M.I. 2003. Phenolic glycosides from *Symplocos racemosa*: natural inhibitors of phosphodiesterase I. *Phytochem.* 63: 217-220.
- Yang, C.C. 1999. Cobratoxin: structure and function. *J. Nat. Toxins.* 8(2): 221-233.